

Université de Montréal

Caractérisation de fibroblastes dérivés de cellules souches pluripotentes induites

Par Cynthia Désaulniers-Langevin

Département de pharmacologie et physiologie, faculté de médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M. Sc.) en
pharmacologie

Avril 2018

© Cynthia Désaulniers-Langevin, 2018

RÉSUMÉ

Afin d'appliquer les concepts de thérapie cellulaire chez l'humain, il est nécessaire d'obtenir une quantité importante de cellules qui sont cliniquement sécuritaires. Ces cellules doivent également être autologues au système immunitaire du patient. Les cellules souches pluripotentes induites (iPSC) sont très intéressantes pour la thérapie cellulaire puisqu'elles peuvent être générées à partir de n'importe quelle cellule somatique tout en ayant un potentiel de réplication illimité. Toutefois, le processus de reprogrammation utilisé pour générer ces cellules requiert une altération de l'expression de plusieurs gènes impliqués dans le contrôle de la croissance cellulaire (p53, par exemple). Le rétablissement complet de l'expression et/ou de la fonction de ces gènes après la différenciation des cellules iPS est encore inconnu et incertain. En utilisant des populations de fibroblastes (dérivées originellement d'une biopsie de peau ou différenciées à partir de cellules iPS autologues), notre but est de les caractériser et de déterminer leurs capacités de réparation de l'ADN après des dommages causés par l'irradiation. Les deux populations de fibroblastes expriment les marqueurs FSP-1 et vimentine alors qu'ils ont perdu les marqueurs membranaires de pluripotence SSEA4 et Tra1-

60. Les résultats montrent que les deux populations répondent de manière similaire aux dommages à l'ADN, mais qu'une plus forte dose d'irradiation (5Gy) semble inhiber davantage la croissance des fibroblastes dérivés de cellules iPS. La réponse p21 semble également plus grande dans les cellules dérivées d'iPSCs après une irradiation de 10 Gy. Démontrer que les cellules dérivées d'iPSC sont en mesure de réparer efficacement leur ADN lors des dommages est essentiel au développement des thérapies cellulaires basées sur les iPSC chez l'humain.

MOTS-CLÉS : Thérapie cellulaire, iPSC, fibroblastes, dommages à l'ADN, réparation de l'ADN, reprogrammation, différenciation

ABSTRACT

In order to apply the concepts of cell therapy in humans, it is necessary to obtain an important source of human cells that are clinically safe. It is also highly preferable that these cells are autologous to the patient's immune system. Induced pluripotent stem cells (iPSC) are very attractive for cell therapy as they can be generated from any somatic cell while having unlimited replication potential. However, the reprogramming process for generating these cells requires an alteration of the expression of several genes involved in the control of cellular growth such as p53. Whether the expression and/or function of these genes is fully restored upon differentiation of iPSC is largely unknown. Using populations of fibroblasts (either originally derived from skin biopsies or differentiated from autologous iPSC), our goal is to characterize them and determine their DNA repair capacities following damages caused by irradiation. Both fibroblasts populations express markers such as FSP-1 and vimentin but lose the expression of pluripotency genes (SSEA4 and Tra1-60). We also have quantitatively measured the capacity of our populations to undergo cellular senescence and DNA repair following exposure to ionizing radiation. Our results show that both populations respond similarly to DNA damage but that a higher dose of irradiation (5 Gy) appears to further inhibit the growth of iPSC-derived fibroblasts. The p21 response also appears to be greater in iPSC-derived fibroblasts after a 10 Gy irradiation. The demonstration that iPSC-derived cells are able to repair their DNA after damages is essential to the development of iPS-based cell therapies in humans.

KEYWORDS : Cell therapy, iPSC, fibroblasts, DNA damage, DNA repair, reprogramming, differentiation

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	ii
ABSTRACT.....	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	iv
LISTE DES TABLEAUX.....	vi
LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....	viii
DÉDICACE.....	x
REMERCIEMENTS.....	xi
AVANT-PROPOS.....	xii
1. INTRODUCTION.....	1
1.1 Thérapie cellulaire.....	1
1.1.1 Thérapies cellulaires approuvées.....	1
1.1.2 Défis actuels de la thérapie cellulaire.....	2
1.2 Médecine régénératrice à partir de cellules souches pluripotentes.....	3
1.2.1 Cellules souches humaines embryonnaires.....	3
1.2.1.1 Opinion publique et éthique.....	4
1.2.1.2 Défis.....	4
1.2.2 Cellules souches pluripotentes induites.....	5
1.2.2.1 Modèles de maladies basés sur les cellules iPS.....	6
Tableau I : Thérapies fructueuses basées sur la technologie iPS, chez l'animal.....	7
1.2.2.2 Découverte de médicaments basée sur les cellules iPS.....	8
1.2.2.3 Applications cliniques.....	9
1.3 Reprogrammation cellulaire.....	10
Tableau II : Techniques générales d'évaluation de la pluripotence des iPSC.....	11
1.3.1 Différentes sources de cellules.....	12
Tableau III : iPSC dérivées à partir de différentes espèces et types cellulaires.....	13
1.3.2 Différentes approches d'acheminement disponibles.....	14
1.3.2.1 Reprogrammation par des virus ou des plasmides.....	14
Tableau IV : Méthodes d'acheminement des facteurs de transcription.....	15
1.3.4 Gènes suppresseurs de tumeurs.....	16
1.3.4.1 Fonctions.....	16
1.3.4.2 Le gène suppresseur de tumeurs p53.....	17
1.3.4.3 Hypothèse de Knudson.....	18
1.4 Maintien de l'intégrité génomique.....	19
1.4.1 Jonctions d'extrémités non-homologues.....	19

1.4.2	Recombinaison homologue	20
1.5	Différenciation cellulaire à partir de cellules iPS	20
1.6	Projet.....	21
1.6.1	Hypothèse expérimentale.....	21
1.6.2	Objectifs du projet	21
2.	MATÉRIEL ET MÉTHODE.....	23
	Culture des fibroblastes	23
	Culture des iPSC.....	23
	Différenciation des iPSC en fibroblastes.....	24
	Caractérisation des cellules Immunofluorescence.....	24
	Cytométrie en flux.....	25
	Mesures de la capacité de réparation de l'ADN après irradiation	25
	53BP1 et H2AX.....	25
	Incorporation du BrdU.....	26
	Expression de p21 par qPCR.....	26
3.	RÉSULTATS.....	28
3.1	Caractérisation morphologique des différentes lignées cellulaires.....	28
3.2	Capacité de réparation de l'ADN.....	33
4.	DISCUSSION.....	38
4.1	Caractérisation morphologique et phénotypique	38
4.2	Capacité de réparation de l'ADN.....	40
4.2.1	Incorporation de BrdU.....	41
4.2.2	Évaluation des foyers de réparation de l'ADN.....	42
4.2.3	Expression de p21 après irradiation.....	43
4.2.4	Variations observées entre les deux populations de fibroblastes... Error! Bookmark not defined.	
	Perspectives	44
	Conclusions	45
	BIBLIOGRAPHIE.....	47

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Thérapies fructueuses basées sur la technologie iPS, chez l'animal	7
Tableau II : Techniques générales d'évaluation de la pluripotence des iPSC	11
Tableau III : iPSC dérivées à partir de différentes espèces et types cellulaires... ..	13

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : Transplantation autologue de cellules dérivées d'iPSC génétiquement modifiées.....	8
FIGURE 2 : Criblage de médicaments à partir de cellules iPS.....	9
FIGURE 3 : Rôle putatif des facteurs de reprogrammation pendant la formation d'iPSC	12
FIGURE 4 : Voie de signalisation de p53 simplifiée.....	18
FIGURE 5 : Hypothèse de Knudson	19
FIGURE 6 : Morphologie des différentes populations de fibroblastes au microscope optique	28
FIGURE 7 : Marqueurs de fibroblastes et de pluripotence en immunofluorescence	32
FIGURE 8 : Marqueurs de surface des fibroblastes et des iPSC en cytométrie en flux.....	32
FIGURE 9 : Incorporation de BrdU après irradiation.....	33
FIGURE 10 : Profils de réparation de l'ADN en fonction du temps après une irradiation de 1Gy.....	35
FIGURE 11 : Expression de p21 après irradiation par qPCR	36

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

18S : Unité de l'ARN ribosomal

53BP1 : Protéine liant p53

ADN : Acide désoxyribonucléique

AMP : Adénosine monophosphate

ARN : Acide ribonucléique

bFGF : Facteur de croissance des fibroblastes

BRCA : Protéine impliquée dans la réparation de l'ADN

BrdU : Bromodéoxyuridine

BSA : Sérum d'albumine bovine

C/EBP α : Facteur de transcription

CD44 : Glycoprotéine d'adhésion

CD73 : Enzyme qui convertit l

CD90 : Protéine de surface

cDNA : ADN complémentaire

CMH-1 : Complexe majeur d'histocompatibilité 1

c-Myc : Facteur de transcription, oncogène

CO₂ : Dioxyde de carbone

DMEM : Milieu de culture (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

DMSO : Diméthyl sulfoxyde

FBS : Sérum bovin fœtal

FGF : Facteur de croissance de fibroblastes

FITC : Florescéine

FSP-1 : Protéine spécifique aux fibroblastes

GCDR : Gentle Cell Dissociation Reagent

H2AX : Histone phosphorylée lors des coupures d'ADN double-brin

HLA-1 : Antigène de leucocyte humain 1

IL-10 : Interleukine 10

iPSC : Cellules souches pluripotentes induites

Klf4 : Facteur de transcription impliqué dans la prolifération

Ku70/80 : Protéines impliquées dans la réparation de l'ADN

LoxP : Séquence d'ADN utilisée pour la recombinaison

MRE11 : Protéine impliquée dans la réparation de l'ADN

MyoD : Protéine impliquée dans la différenciation musculaire

NK : Cellule tueuse naturelle ou lymphocyte NK

NSG : Souris nod scid gamma

O₂ : Dioxygène

Oct3/4 : Facteur de transcription essentiel à l'auto-renouvellement des cellules

p14^{ARF} : Gène suppresseur de tumeurs

p16^{INK4a} : Inhibiteur de kinases

p21 : Inhibiteur des kinases cycline dépendantes

p53 : Facteur de transcription

PARP1 : Poly [ADP-ribose] polymérase 1

PBMC : Cellules mononuclées de sang périphérique

PD : Doublement de population (population doubling)

PE : Phycoérythrine

qPCR : Réaction quantitative de polymérisation en chaîne

Rad51 : Protéine impliquée dans la réparation de l'ADN

Ras : GTPase, oncogène

RPM : Rotations par minutes

RT-PCR : Réaction de polymérisation en chaîne par transcription inverse

shp53 : Petit ARN en épingle à cheveux qui réduit l'expression de p53

Sox2 : Facteur de transcription essentiel à l'auto-renouvellement des cellules

SSEA4 : Antigène spécifique au stade embryonnaire

TRA-1-60 : Antigène de rejet tumoral

DÉDICACE

*À mes parents et à ma soeur,
qui ont toujours cru en moi
et qui m'ont assidûment encouragée
à donner le meilleur de moi-même.*

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le Dr Christian Beauséjour qui, de par son écoute, sa compréhension et son enthousiasme, a su m'encourager et m'aiguiller tout au long de mes études de maîtrise au sein de son laboratoire. J'aimerais également remercier les membres du laboratoire, en particulier Basma Benabdallah et Gaël Moquin-Beaudry, pour le support technique et moral qu'ils ont su m'apporter lors de mes études graduées. J'aimerais également exprimer ma reconnaissance envers mon ancien directeur de stage Fernando Alvarez, mais aussi Kathie Béland – qui était assistante de recherche dans ce laboratoire à l'époque – de m'avoir donné la chance de connaître le Centre de Recherche du CHU Sainte-Justine et de m'avoir outillée pendant deux ans. Évidemment, je ne serais pas celle que je suis aujourd'hui sans le soutien inconditionnel de ma famille et je leur en serai à jamais reconnaissante.

AVANT-PROPOS

De nouvelles technologies se développent sans cesse afin de repousser toujours un peu plus les limites de la science et ce qui s'avérait autrefois de la science-fiction se rapproche désormais de notre réalité. Les génies génétiques et cellulaires ont beaucoup à offrir et semblent promettre des avancées qui se révélaient encore inaccessibles il y a quelques années. Ces territoires sont encore inexplorés, en majorité, et peuvent se montrer particulièrement accueillants pour les scientifiques osant s'y aventurer.

Toutefois, malgré l'excitation et l'appel de la nouveauté, la prudence est de mise afin d'investiguer davantage ces nouvelles technologies qui se prédestinent pourtant à un brillant avenir.

1. INTRODUCTION

1.1 Thérapie cellulaire

La thérapie cellulaire telle qu'on la connaît aujourd'hui peut être définie par la pratique consistant à injecter du matériel cellulaire à un patient ¹. Ce principe n'est pas né de la dernière pluie et était déjà utilisé au dix-neuvième siècle par le physiologiste et neurologue Charles-Édouard Brown-Séquard alors que ce dernier injectait à ses contemporains – ainsi qu'à lui-même – des extraits testiculaires animaux dans l'espoir de contrer le vieillissement ². Si cette technique et les recherches futures en ayant découlé ont permis la découverte de la testostérone ³, on a également pu assister aux débuts d'une certaine forme de thérapie cellulaire.

Au cours des dernières années, ce champ scientifique s'est vraiment démarqué et même si sa soudaine popularité en fait une cible de choix pour les médecines alternatives qui peuvent s'avérer dangereuses, les progrès réalisés dans le domaine demeurent très impressionnants.

1.1.1 Thérapies cellulaires approuvées

De nombreux traitements basés sur la thérapie cellulaire existent présentement au Canada et sont déjà largement approuvés par la communauté scientifique et les agences de santé gouvernementales.

C'est le cas, notamment, des transfusions sanguines qui sont utilisées depuis le dix-septième siècle grâce aux travaux de William Harvey sur les animaux ⁴. Elles consistent à transférer du sang ou des composantes sanguines d'un donneur sain à un patient. Les premières transfusions utilisaient le sang complet, mais cette approche n'est plus d'actualité et des composantes sanguines telles que les globules rouges ou blancs, les facteurs de coagulation, les plaquettes ou le plasma sont désormais injectées aux patients ⁵.

Les travaux du chirurgien allemand Carl Bunger sur les autogreffes de peau en 1823 ⁶ ont mené à de plus amples recherches et à une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la transplantation d'organes qui est maintenant devenue un traitement de choix pour de nombreuses maladies.

Les premières expérimentations animales de greffes de moelle osseuse, quant à elles, ont été réalisées dans les débuts de la deuxième moitié du vingtième siècle, mais c'est en 1957 qu'E. Donnall Thomas effectue la première transplantation de cellules souches hématopoïétiques ⁷. Ces cellules peuvent être récupérées d'un donneur à partir d'un prélèvement intra-osseux, d'une cytophérèse ou d'un prélèvement de sang de cordon ⁸.

Ces traitements sont désormais de routine - malgré la complexité de certains d'entre eux - au sein de nos hôpitaux et d'autres encore sont approuvés par Santé-Canada, mais demeurent néanmoins sous le radar afin d'en considérer les risques et les effets à long terme. C'est le cas, par exemple, de la nouvelle technique d'injection de cellules souches afin de traiter l'arthrose du genou ⁹.

1.1.2 Défis actuels de la thérapie cellulaire

Malgré l'ascension fulgurante de ce domaine scientifique, de nombreux défis résident encore afin d'offrir aux patients de nouveaux traitements basés sur des thérapies cellulaires.

Tout d'abord, une grande quantité de cellules s'avère nécessaire et demeure parfois un frein au traitement de certains patients. En effet, le nombre de cellules souches contenues dans un sang de cordon, par exemple, n'est pas suffisant afin de greffer un adulte ¹⁰. De plus, le rejet immunitaire des cellules greffées par le receveur est un obstacle majeur à de nombreuses thérapies cellulaires. Le donneur et le receveur doivent être compatibles, mais ils ne le seront presque jamais complètement, ce qui deviendra une contrainte importante dans la vie future du patient puisque ce dernier devra probablement prendre des médicaments immunosuppresseurs pour le reste de sa vie.

L'intérêt marqué des scientifiques pour la thérapie cellulaire amène néanmoins son lot de défis supplémentaires dont le plus important est probablement la mise en marché à grande échelle. Le marché du médicament est présentement dominé par les protéines (majoritairement des anticorps monoclonaux ¹¹) et les petites molécules (acides nucléiques ¹², peptides ¹³, etc.). La manufacture et la commercialisation de cellules thérapeutiques représentent un plus gros défi puisqu'en raison de leur plus grande complexité, ces dernières requièrent des conditions particulières et laborieuses de maintien et d'entreposage ¹⁴.

1.2 Médecine régénératrice à partir de cellules souches pluripotentes

L'utilisation des cellules souches en thérapie cellulaire gagne en popularité puisque ces dernières possèdent des caractéristiques particulièrement intéressantes. En effet, non seulement elles peuvent se renouveler indéfiniment, mais elles peuvent aussi donner naissance à tous les autres types cellulaires. Les cellules souches hématopoïétiques sont déjà utilisées depuis de nombreuses années dans les greffes de moelle osseuse, mais les recherches semblent démontrer que les possibilités ne sont restreintes qu'à l'imagination des scientifiques. De nombreuses approches sont déjà réalisées chez la souris, c'est le cas, notamment, de la greffe de cellules souches embryonnaires afin d'améliorer la fonction cardiaque après un infarctus du myocarde ¹⁵ ou de la greffe de neurones différenciés à partir de cellules souches afin de réduire les déficits moteurs provoqués par la maladie de Parkinson ¹⁶. La différenciation de cellules bêta pancréatiques humaines à partir de cellules souches et l'injection de ces cellules au sein d'un pancréas d'une souris néonatale afin de prévenir le diabète de type 1 est un autre exemple des différentes retombées possibles de ce champ de recherche ¹⁷.

1.1.3 Cellules souches humaines embryonnaires

Isolées pour la première fois en 1998 ¹⁸, les recherches sur les cellules souches humaines embryonnaires se sont multipliées puisqu'elles sont très utiles afin de comprendre certaines maladies et pourraient même être utilisées afin de traiter des maladies comme le diabète, le Parkinson, la sclérose en plaques ou l'infarctus du myocarde ¹⁹⁻²¹. Il y a un peu moins de dix ans, Ideguchi *et al* démontraient par exemple que des neurones dérivés de cellules souches

embryonnaires murines se connectaient de manière spécifique aux régions du système nerveux qui leur étaient propres sans interagir avec les autres parties du cerveau ²².

Ces cellules sont prélevées à partir d'un embryon humain au stade de blastocyste et possèdent toutes les caractéristiques intéressantes des cellules souches ¹⁸. Plusieurs lignées cellulaires dérivées des cellules souches embryonnaires humaines sont présentement en essais cliniques afin de traiter des maladies comme la dégénérescence maculaire, le diabète de type 1 ou les lésions de la moelle épinière ²³.

1.1.3.1 Opinion publique et éthique

Or, l'utilisation de ces cellules requiert la formation d'embryons humains dédiés à la recherche, une approche qui, de manière générale, ne fait pas l'unanimité et n'a pas le support de la population puisque la technique utilisée de récupération des cellules d'intérêt nécessite la destruction du blastocyste ^{24,25}. La législation varie selon les pays et si certains d'entre eux sont plus laxistes sans imposer de véritables lignes directrices comme le Japon ²⁶ ou la Chine ²⁷, d'autres sont plus stricts quant aux lois entourant la recherche sur les cellules souches embryonnaires humaines. C'est le cas, notamment, de l'État de Singapour ²⁶, qui permet la recherche sur des embryons de moins de deux semaines ainsi que de l'Australie ²⁶ et du Brésil ²⁸, qui ont des lois strictes à ce sujet. Cette question éthique se pose principalement par rapport aux valeurs et à la culture de chacun des pays puisqu'en Chine, par exemple, la vie débute à la naissance et l'embryon n'est donc pas considéré vivant. La majorité des pays semble néanmoins autoriser la recherche sur les cellules souches embryonnaires humaines lorsqu'elles proviennent d'embryons excédentaires pour la fécondation *in vitro* qui auraient de toute façon été détruits par la suite.

1.1.3.2 Défis

De nombreux défis entravent la recherche et les thérapies basées sur les cellules souches puisque si ces dernières ont de grands avantages, elles peuvent aussi avoir des inconvénients non négligeables. En effet, de manière générale, les cellules souches embryonnaires sont

récoltées à partir d'un embryon allogénique, ce qui peut occasionner un rejet cellulaire important chez le patient à qui ces cellules pourraient être injectées ²⁹.

De plus, ces cellules ont la possibilité de se différencier en de nombreux autres types cellulaires et ce qui est un grand avantage pour la thérapie cellulaire s'avère être également l'un de ses plus grands défis. En effet, des cellules souches injectées *in vivo* chez la souris forment des tératomes, une différenciation spontanée des cellules en ectoderme, mésoderme et endoderme ^{18,30}. Cette technique est d'ailleurs utilisée afin d'attester la pluripotente cellulaire ³¹.

L'un des grands avantages de travailler avec des cellules souches s'avère être la possibilité de renouvellement infinie. Or, encore une fois, cet atout peut également être un obstacle puisque la culture cellulaire *in vitro* à long terme peut introduire des mutations indésirables au sein des cellules d'intérêt ^{32,33} ou diminuer les fonctions mitochondriales, ce qui semble être lié à l'âge des cellules ³⁴.

1.1.4 Cellules souches pluripotentes induites

Produites pour la première fois en 2006 par l'équipe du Dr. Yamanaka ³⁵, les cellules souches pluripotentes induites, quant à elles, sont des cellules souches générées à partir de cellules humaines telles que des fibroblastes ou des cellules mononucléées sanguines périphériques (PBMCs) ³⁶. Elles possèdent les mêmes caractéristiques que les cellules souches embryonnaires, ce qui signifie qu'elles peuvent se renouveler indéfiniment tout en pouvant se différencier en n'importe quelle cellule somatique du corps.

Or, l'utilisation de ces cellules en thérapie cellulaire pourrait prévenir le rejet immunitaire puisqu'elles seraient reprogrammées à partir des cellules du patient et donc autologues à son système immunitaire. Certaines conditions semblent toutefois activer le système immunitaire puisque les cellules souches pluripotentes induites (iPSC) peuvent être éliminées par les cellules NK, qu'elles soient autologues ou allogéniques, étant donné qu'elles ont perdu l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité 1 (CMH-1), chez la souris ou de l'antigène de leucocyte humain 1 (HLA-1) chez l'humain ³⁷⁻³⁹. Des études chez la souris ont également démontré que

des cellules dérivées d'iPSC surexpriment certains antigènes tumoraux comme Hormad1³⁷ ou sont rejetées lorsque les animaux sont traités avec un anti interleukine 10 (IL-10), démontrant par le fait même que ces cellules surexpriment l'IL-10, une cytokine immunosuppressive⁴⁰.

Si l'immunogénicité des cellules iPS a été démontrée dans plusieurs publications, l'immunogénicité des cellules différenciées complètement à partir d'iPS est encore incertaine et semble dépendre du type cellulaire final⁴¹⁻⁴³.

1.1.4.1 Modèles de maladies basés sur les cellules iPS

Puisque les cellules iPS peuvent être générées de manière autologue à partir des cellules du patient, elles sont donc un outil de taille afin de modéliser de nombreuses maladies, en particulier des maladies génétiques. En effet, le génome de chaque individu diffère à des milliers de sites de gènes codant pour des protéines lorsqu'il est comparé au génome de référence, ce qui donne lieu à de nombreuses possibilités de mutations, néfastes ou non, pour l'individu. De nombreuses mutations connues altèrent la structure des protéines, et donc leur fonction^{44,45}.

Auparavant, la modélisation des différentes maladies était effectuée grâce à des cellules souches embryonnaires humaines, ce qui pose les mêmes contraintes déjà énoncées plus haut^{46,47}. De plus, les modèles animaux sont une bonne alternative afin de mieux comprendre certaines maladies, mais les différences entre les espèces rendent la découverte de nouvelles thérapies et de médicaments particulièrement ardue⁴⁸. Les modèles de petits animaux sont encore incapables, d'ailleurs, de reproduire efficacement certaines maladies humaines pour différentes raisons telles que l'absence d'une pathologie naturelle génétique chez l'animal nécessitant une modification génétique importante ou la courte espérance de vie de certains d'entre eux rendant difficile la recherche sur des maladies qui se développent à un âge avancé chez l'humain, entre autres⁴⁹.

Les iPSC dérivées d'un patient pourraient éventuellement offrir un accès illimité à des échantillons frais et ainsi fournir de nombreuses possibilités d'étude de la maladie et de recherche de traitements éventuels pouvant réduire les effets secondaires indésirables ⁵⁰. Le **tableau I** démontre d'ailleurs que plusieurs thérapies basées sur les iPSC ont vu le jour chez l'animal et semblent avoir porté fruits dans plusieurs cas, que ce soit afin de trouver la pathologie de la maladie, son mécanisme d'action ou un traitement potentiel.

Tableau I : Thérapies fructueuses basées sur la technologie iPSC

Table 1.

Successful human iPSC mediated therapy cases

Disease	Mutations	Disease pathology found	Disease mechanism found	Patient specific therapy suggested	Reference
Leopard syndrome	<i>PTPN11</i>	YES	NA	NA	(22)
LQT1	<i>KCNQ1 (R190Q)</i>	YES	NA	NA	(16)
LQT2	<i>KCNH2 (A614V)</i>	YES	NA	NA	(17)
LQT8	<i>CACNA1C</i>	YES	NA	NA	(18)
LQT3-	<i>SCN5A (F1473C), KCNH2 (K897T)</i>	YES	YES	YES*	(20)
ARVD/C	<i>PKP2</i>	YES	YES	NA	(55)
Brugada	<i>PKP2</i>	YES	YES	NA	(78)
Schizophrenia	Not identified	YES	YES	YES	(32)
AD	Sporadic & familial (<i>APP</i>)	YES	YES	YES	(28)
AD	<i>PS1 (A246E) & PS2 (N141I)</i>	YES	YES	YES	(29)
AD	Sporadic & <i>APP (duplication)</i>	YES	YES	YES	(31)
ALS	<i>SOD1 (+/A4V), SOD1 (+/D90A)</i>	YES	YES	YES	(48, 49)
SMA	<i>SMN1</i>	YES	YES	YES	(44, 46)
HD	<i>HTT</i>	YES	YES	YES**	(52, 53)
PD	<i>PINK, Parkin, LRRK2</i>	YES	YES	YES	(54, 56)
RTT	<i>MECP2</i>		YES	YES	(37)
PWS	<i>Chromosome 15q11-q13 deletion</i>	YES	NA	NA	(43)
Hepatic disorder	<i>AAT</i>	YES	YES	YES**	(62)

*Living patient therapy has been made, **Novel drug screen has been made, NA: Not applicable, PS1: Presenilin-1, PS2: Presenilin-2, APP: Amyloid Precursor Protein, PKP2: Plakophilin-2.

LQT : Syndrome du QT long, AD : Maladie d'Alzheimer, ARVD/C : Dysplasie ventriculaire droite arythmogène
ALS : Sclérose latérale amyotrophique, SMA : Syndrome de l'artère mésentérique supérieure, HD : Maladie de Huntington, PD : Maladie de Parkinson, RTT : Syndrome de Rett, PWS : Syndrome de Prader-Willi. (Changsung, 2015 ⁵¹)

Comparer les cellules iPSC d'un patient à celles d'un donneur sain pourrait ne pas forcément être une bonne approche puisque le contexte génétique des individus est différent ⁵². Toutefois, grâce aux différentes technologies disponibles d'édition du génome telles que CRISPR-Cas9, qui s'avère être la plus rapide, il est possible de modifier génétiquement les lignées cellulaires en corrigeant la mutation, par exemple, afin d'obtenir de meilleurs contrôles cellulaires possédant exactement le même contexte génétique ⁵³.

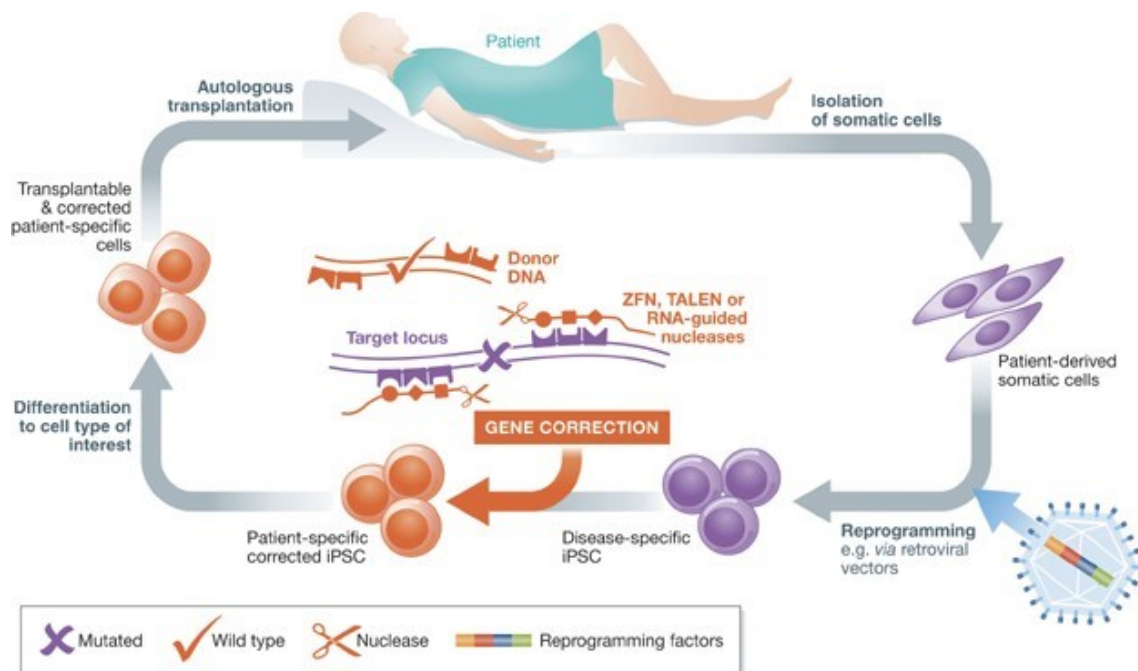


Figure 1 : Transplantation autologue de cellules dérivées d'iPSC génétiquement modifiées. Cette figure représente un modèle de transplantation autologue selon lequel des cellules somatiques sont d'abord isolées d'un patient et reprogrammées à l'état de cellules souches grâce à des vecteurs (rétroviraux ou non). Par la suite, ces cellules peuvent être corrigées par génie génétique grâce à différentes techniques, différenciées en cellules d'intérêt pour le patient et réinjectées au même patient. (Kaufmann *et al*, 2013 ⁵⁴)

1.1.4.2 Découverte de médicaments basée sur les cellules iPSC

L'utilisation des iPSC peut également servir au développement de médicaments puisqu'il est possible de tester de nombreuses combinaisons sur différentes cellules afin de trouver celle qui semble démontrer les plus grands effets bénéfiques tout en diminuant les effets secondaires. Les professionnels de la santé comprennent davantage les maladies qui les préoccupent et se tournent de plus en plus vers la médecine personnalisée afin de soigner leurs patients de manière plus efficace ⁵⁵. Des iPSC dérivées d'un patient peuvent désormais être différenciées en de nombreux types cellulaires qui ne sont pas toujours disponibles à l'aide d'une biopsie, comme les neurones et les cellules gliales ⁵⁶. À partir de ces cellules, il est possible de déterminer certains phénotypes qui sont pertinents dans le cadre de la maladie et de cribler différents

traitements afin de caractériser leur efficacité^{57,58}. La figure 2 représente les étapes requises afin de procéder au criblage des petites molécules comme traitements potentiels à partir de cellules souches pluripotentes induites.

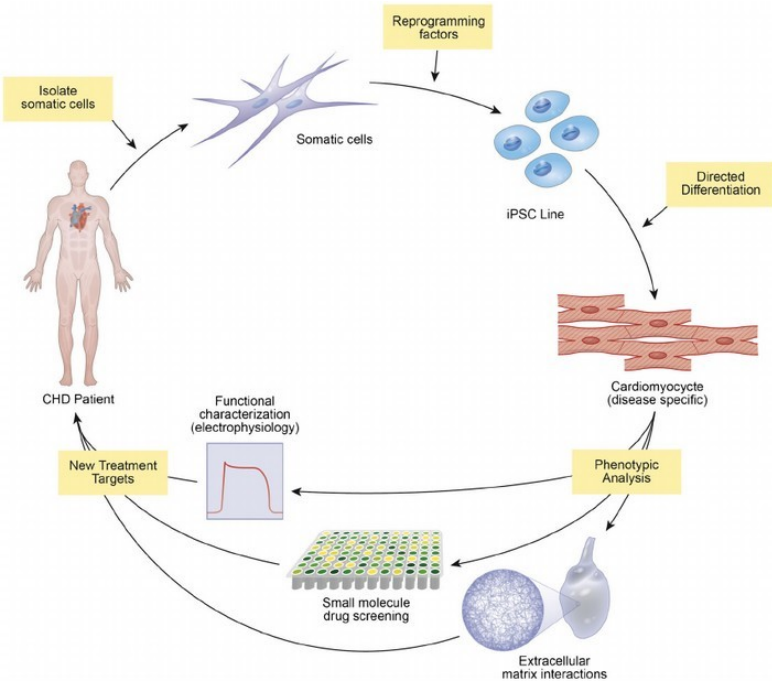


Figure 2: Criblage de médicaments à partir de cellules iPS. Cette figure représente un modèle de criblage de médicaments selon lequel des cellules somatiques d'un patient sont isolées et reprogrammées en iPSC. Ces cellules peuvent ensuite être différenciées en cellules d'intérêt pour le patient et utilisées afin de faire un criblage de différentes molécules dans le but de découvrir un médicament (Doyle *et al*, 2015⁵⁹)

1.1.4.3 Applications cliniques

Évidemment, les différentes thérapies cellulaires sur le marché amènent l'espoir d'une médecine régénérative pour des maladies dégénératives ou pour des blessures trop importantes pour être soignées autrement. Les blessures accidentelles liées à l'activité humaine et les maladies dégénératives sont en hausse dans la population, ce qui rend d'autant plus importante la recherche sur des techniques alternatives pouvant contrer, par exemple, le rejet immunitaire ou la pénurie d'organes disponibles⁶⁰. Les cellules iPS pourraient contrer ces deux grands défis de l'ère moderne puisqu'elles sont dérivées à partir des propres tissus du patient. Les cellules iPS dérivées d'un patient pourraient donc être génétiquement modifiées afin de corriger des mutations génétiques, différenciées en un type cellulaire voulu et réinjectées au patient afin de retrouver un gain de fonction cellulaire. Certaines maladies du foie comme la tyrosinémie peuvent être modélisées *in vitro* et pourraient être de bonnes candidates pour la thérapie basée sur les cellules iPS⁶¹. Effectivement, il n'est pas toujours nécessaire d'obtenir un fort pourcentage de gain de fonction afin d'observer des effets bénéfiques chez le patient, d'autant

plus lorsqu'il s'agit d'une protéine manquante dans l'organisme. Une étude clinique utilisant des cellules dérivées d'iPSC est déjà en cours afin de traiter la dégénérescence maculaire ⁶² et d'autres suivront probablement rapidement dans les prochaines années.

1.2 Reprogrammation cellulaire

Les travaux de Davis *et al* en 1987 ont démontré qu'il était possible de changer le destin des cellules en exprimant de manière ectopique dans des fibroblastes le facteur des muscles squelettiques MyoD, induisant ainsi la formation de myofibres ⁶³. Par la suite, des études ont démontré que c'était également possible de convertir efficacement les cellules B et T du système immunitaire en macrophages fonctionnels par la surexpression du facteur de transcription myéloïde C/EBP α ^{64,65}. Récemment, plusieurs groupes de recherche se sont penchés sur la question de la transdifférenciation et ont pu par exemple convertir des cellules acinaires du pancréas en cellules bêta productrices d'insuline ou des fibroblastes en neurones en surexprimant respectivement certains facteurs pancréatiques ⁶⁶ ou neuronaux ⁶⁷. Cette dernière expérimentation démontre entre autres que la transdifférenciation n'est pas limitée à des cellules de la même lignée germinale puisque les fibroblastes ont une origine mésodermale alors que les neurones proviennent plutôt de l'ectoderme.

Ces premières expériences ont permis de mieux comprendre les facteurs de transcription ainsi que leur implication dans différents mécanismes, permettant ainsi la recherche systématique de facteurs de transcription pouvant induire la conversion de cellules différenciées en cellules pluripotentes. Afin d'obtenir des cellules iPS, une étape de reprogrammation s'avère donc nécessaire. Cette étape permet de surexprimer certains facteurs de transcription qui sont nécessaires afin de ramener des cellules différenciées à un stade de cellules souches. Plusieurs étapes de criblage ont été indispensables afin de mener à l'identification d'un noyau minimal de quatre facteurs de transcription requis afin de permettre la reprogrammation ⁶⁸. Le tableau II montre les différentes approches disponibles afin d'évaluer la pluripotence des cellules, leurs avantages ainsi que leurs principaux inconvénients.

Tableau II : Techniques générales d'évaluation de la pluripotence des iPSC

Table 1. Common assays to evaluate the developmental potency of iPSCs

	Assay	Time	Advantages	Disadvantages
<u>Molecular</u>	Morphology	Minutes	Rapid and simple	Not specific to pluripotent cells
	Alkaline phosphatase staining	~1 h	Straightforward colorimetric assay	Not specific to pluripotent cells
	Pluripotency markers	1–2 d	Detection of endogenous pluripotency genes using immunofluorescence, PCR, or reporter alleles	Some genes also activated in partially reprogrammed cells (e.g., <i>Fbxo15</i>)
	Retroviral silencing	1–2 d	Hallmark of pluripotent state; used as surrogate for global epigenetic reprogramming	Requires delivery of factors by retroviral vectors or addition of “indicator” viral vector; nonspecific
	DNA demethylation	1–2 wk	Promoter demethylation of pluripotency genes (e.g., <i>Oct4</i>) is good indicator for epigenetic remodeling.	Some somatic cells show demethylation of pluripotency genes (e.g., <i>Nanog</i> in melanocytes)
	Factor independence	4–7 d	Self-renewal in the absence of dox-inducible <i>trans</i> -genes is good indicator of faithful reprogramming	Requires use of inducible transgenes
<u>Functional</u>	In vitro differentiation	Weeks	Controlled differentiation into cell type of interest	Differentiation protocols and functional assays for only few cell types available
	Teratoma formation	Weeks (mice), months (humans)	Gives information about spontaneous differentiation potential into three germ layers; assay with highest stringency for human cells	Not quantitative; cannot detect abnormal cells
	Chimera development	Weeks	Tests potential to contribute to normal development and adult tissues upon blastocyst injection	Subtle abnormalities may be masked and complemented by host blastocyst-derived cells
	Germline transmission	Months	iPSC-derived offspring document potential to form functional germ cells, indicating genomic integrity	Readout for single, very specialized, nonessential cell type
	Tetraploid complementation	Weeks	Measures potential to direct normal development of an entire mouse, including all cell types	Subtle developmental or postnatal phenotypes may be missed; does not assess the capacity of cells to form extraembryonic tissues

(Stadtfield *et al.*,⁶⁹)

Connus depuis plusieurs années maintenant, les facteurs de transcription indispensables à la reprogrammation de cellules différenciées en cellules pluripotentes ont été nommés facteurs de Yamanaka en l'honneur de ce scientifique qui les a découverts pour la première fois³⁵. Ces quatre facteurs de transcription essentiels correspondent à Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc et sont directement impliqués dans l'auto-renouvellement des cellules. Ils sont nécessaires à la reprogrammation des cellules alors que d'autres facteurs tels que Nanog ou LIN28 sont alternatifs. Il est bien connu que certains de ces facteurs de transcription, comme c-Myc, sont des oncogènes qui sont souvent dérégulés dans les cancers, ce qui permet aux cellules de se renouveler rapidement⁷⁰. Cette caractéristique s'avère essentielle pour les cellules cancéreuses et c-Myc, entre autres, stimule la production d'acides aminés, de protéines et de lipides nécessaires à la prolifération cellulaire. En raison du rôle déterminant de ces facteurs dans la reprogrammation cellulaire, il est d'autant plus important qu'ils soient transitoires et qu'ils ne persistent pas au sein des cellules différenciées.

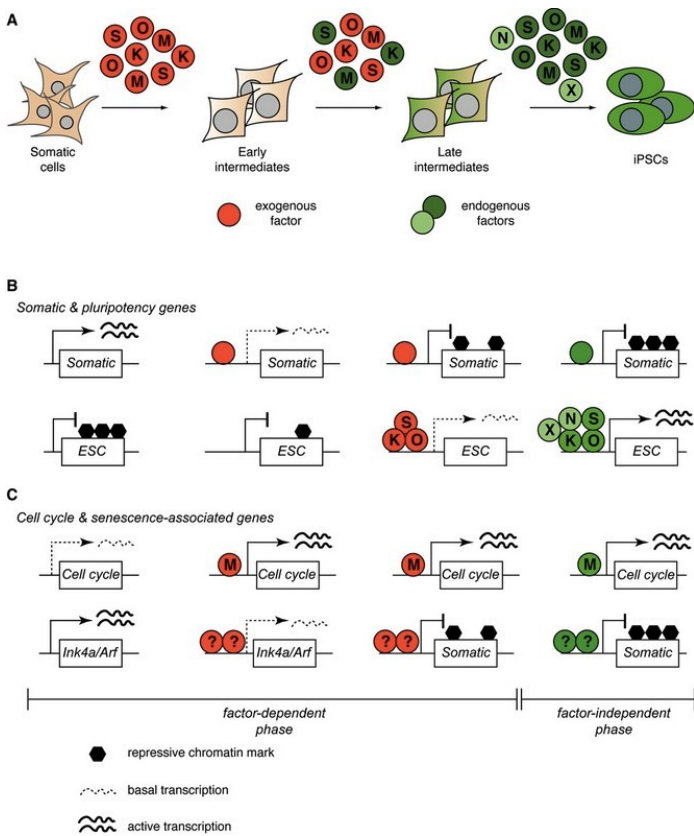


Figure 3 : Rôle putatif des facteurs de reprogrammation pendant la formation d'iPSC. En A, les facteurs exogènes utiles à la reprogrammation sont démontrés en rouge alors qu'ils sont peu à peu remplacés par les facteurs endogènes de ces mêmes protéines ou par leurs cibles telles que Nanog (N) ou d'autres facteurs X inconnus (en vert). En B, le schéma illustre comment les facteurs de reprogrammation peuvent réprimer rapidement les gènes somatiques, par la liaison d'un seul facteur aux régions promotrices et activer graduellement les gènes de pluripotence (ESC) par l'établissement de complexes multiprotéiques. Les deux processus sont probablement induits par Klf4, Sox2 et Oct4. En C, le schéma montre l'activation de gènes qui induisent la division cellulaire par c-Myc et la répression du locus du gène suppresseur de tumeurs Ink4a/Arf, ce qui octroie aux cellules l'immortalité par une combinaison de facteurs de reprogrammation. S : Sox2 O : Oct3/4 M : c-Myc et K : Klf4 (Stadtfeld et al, 2010 ⁶⁹)

1.2.1 Différentes sources de cellules

La reprogrammation de cellules différenciées en cellules souches a été réalisée chez différentes espèces telles que l'humain ⁷¹⁻⁷³, le rat ⁷⁴ et le macaque rhésus ⁷⁵, proposant ainsi l'idée que les mécanismes transcriptionnels régulant l'état de pluripotence soient conservés au cours de l'évolution. De plus, si les iPSCs étaient d'abord dérivées à partir de fibroblastes et de cellules mononuclées sanguines périphériques (PBMCs), elles peuvent l'être à partir de plusieurs autres types cellulaires avec l'ajout des facteurs de Yamanaka nécessaires à leur reprogrammation, mais avec une efficacité variable selon les types. Le tableau III démontre effectivement, du moins chez la souris, que les cellules différenciées de manière terminale se reprogramment

Tableau III : iPSC dérivées à partir de différentes espèces et types cellulaires

Species	Germ layer	Cell type	Factors	Efficiency	Reference
<u>Mouse</u>	MS	Fibroblasts	OKSM	0.02	Takahashi and Yamanaka 2006
			OKS	0.002	Nakagawa et al. 2008; Wernig et al. 2008b
			OSE	ND	Feng et al. 2009
			KSNr	0.002	Heng et al. 2010
			OKSM + C	3%	Hanna et al. 2008
			OKSM	0.02%	Eminli et al. 2009
			OKSM	25%	Eminli et al. 2009
			OKSM	13%	Eminli et al. 2009
			OKSM	0.2%	Sugii et al. 2010
			OKM	1.4%	Tsai et al. 2010
	OK	0.02%	Tsai et al. 2010		
	EN	Pancreatic β cells Hepatic endoderm	OKSM	0.1%	Stadtfeld et al. 2008a
			OKS	ND	Aoi et al. 2008
	EC	Neural stem cells Melanocytes	OK	<0.1%	JB Kim et al. 2008
O			<0.01%	JB Kim et al. 2009a	
OKM			0.2%	Utikal et al. 2009a	
<u>Human</u>	MS	Fibroblasts	OKSM	0.02%	Takahashi et al. 2007
			OSLN	0.02%	Yu et al. 2007
			OKS	0.002	Nakagawa et al. 2008
			OKSM	0.01%	Loh et al. 2009
			OSLN	<0.01%	Haase et al. 2009
			OKSM	ND	Eminli et al. 2009
			OS	<0.01%	Giorgetti et al. 2009
			OKSM	0.5%	Sugii et al. 2010
			OKS	<0.1%	Aoki et al. 2010
			EN	Hepatocytes	OKSM
	EC	Keratinocytes Neural stem cells	OKSM	ND	Aasen et al. 2008
			OKS	ND	Aasen et al. 2008
	EX	Amniotic cells	O	<0.004%	JB Kim et al. 2009b
			OKSM	0.05%–1.5%	C Li et al. 2009
		OSN	0.1%	Zhao et al. 2010	
<u>Rat</u>	MS	Fibroblasts	OKSM	0.05% ^a	Liao et al. 2009
			OKS	0.01% ^b	Chang et al. 2010
	EN	Liver progenitor cells	OKS	ND ^c	W Li et al. 2009a
EC	Neural progenitor cells	OKS	0.01% ^b	Chang et al. 2010	
<u>Pig</u>	MS	Embryonic fibroblasts	OKSM	ND	Esteban et al. 2009
<u>Rhesus monkey</u>	MS	Ear skin fibroblasts	OKSM	ND	Liu et al. 2008
<u>Marmoset</u>	MS	Skin fibroblasts	OKSM	0.1%	Wu et al. 2010

Listed are (1) the first demonstration a given cell type has been reprogrammed, (2) alternative factor cocktails, and (3) the smallest combination of factors reported. Minimum criteria of listed references are teratoma formation (primates) and contribution to chimeras (nonprimates). iPSCs generated with chemicals are not included. (MS) mesoderm; (EN) endoderm; (EC) ectoderm; (EX) extraembryonic; (C) *C/EBP α* ; (E) *Esrrb*; (K) *Klf4*; (L) *Lin28*; (M) *c-Myc*; (Nr) *Nr5a2*; (O) *Oct4*; (S) *Sox2*; (ND) not determined.
^aContinued expression of lentiviral transgenes might have allowed expansion without inhibitors.
^bContinued culture requires chemical inhibition of GSK3 and MEK.
^cContinued culture requires chemical inhibition of GSK3, MEK, and TGF β signaling.
(Stadtfeld et al, 2010 ⁶⁹)

plus difficilement en iPSC lorsqu'elles sont comparées à des cellules progénitrices.

1.2.2 Différentes approches d'acheminement disponibles

La première approche utilisée par l'équipe du Dr Yamanaka afin d'acheminer les différents facteurs de transcription essentiels à la reprogrammation était par infection rétrovirale. Les rétrovirus sont des virus ARN qui utilisent une transcriptase inverse afin de transcrire cet ARN en ADN. C'est connu depuis longtemps que les rétrovirus peuvent s'intégrer au hasard dans l'ADN et ainsi créer des mutations au sein de gènes importants dans la cellule ^{76,77}. En effet, leur insertion au sein de gènes potentiellement oncogéniques est inquiétante puisque c'est difficile de prévoir la séquence du génome qui sera la cible de l'intégration de l'ADN pro-viral.

De plus, malgré le fait que les rétrovirus pourraient s'intégrer au sein d'une partie de l'ADN non codante pour des protéines et que les transgènes rétroviraux sont souvent réprimés vers la fin de la reprogrammation grâce à des méthyltransférases agissant autant sur l'ADN ⁷⁸ directement que sur les histones ⁷⁹, il semblerait que ce processus soit parfois incomplet ^{80,81}. La réactivation de ces transgènes rétroviraux au sein des lignées différenciées est également un obstacle majeur à l'utilisation de cette technique puisque ces lignées cellulaires forment fréquemment des tumeurs dans les animaux ⁸².

Cette approche a donc été remplacée par des techniques plus sécuritaires d'acheminement des différents facteurs de transcription nécessaires à la reprogrammation cellulaire.

Le tableau IV représente un résumé des différentes techniques d'acheminement utilisées.

1.2.2.1 Reprogrammation par des virus ou des plasmides

Tout d'abord, les vecteurs lentivirus constitutivement activés ont aussi été utilisés afin d'acheminer les différents facteurs de transcription nécessaires à la reprogrammation. Or, les lentivirus font partie des rétrovirus et s'ils possèdent tous les inconvénients de leurs très proches cousins, ils semblent être encore moins efficacement réprimés vers la fin de la reprogrammation,

Tableau IV : Méthodes d'acheminement des facteurs de transcription

Table 3. Factor delivery methods for iPSC derivation

Vector type	Integrating			Excisable		Nonintegrating		DNA-free	
	Retroviral	Lentiviral	Inducible lentiviral	Transposon	Floxed lentiviral	Adenoviral	Plasmid	Protein	RNA
Cell types	Fibroblasts, neural stem cells, liver cells, keratinocytes, amniotic cells, blood cells, adipose cells	Fibroblasts, keratinocytes	Fibroblasts, β cells, keratinocytes, blood cells, melanocytes	Fibroblasts	Fibroblasts	Fibroblasts, liver cells	Fibroblasts	Fibroblasts	Fibroblasts
Species	m, h, rm, p, r	m, h	m, h, p	m, h	m, h	m, h	m, h	m, h	h
Efficiency	~0.01%–0.5%	~0.1%–1% ^a	~0.1%–1% ^a	~0.1%	~0.1%–1% ^a	~0.001%	~0.001%	~0.001%	~1%
Pros	Reasonable efficiency	Reasonable efficiency	Reasonable efficiency; controlled factor expression	Reasonable efficiency; no integration	Reasonable efficiency; no integration	No integration	No integration	No integration; no DNA	No integration; high efficiency
Cons	Multiple integrations; incomplete silencing	Multiple integrations; incomplete silencing	Multiple integrations; requires transactivator expression	Screening of excised lines laborious	Screening of excised lines laborious, loxP sites remain in genome	Low efficiency	Low efficiency, occasional vector integration	Low efficiency	Multiple rounds of transfection needed

[h] Human; [m] mouse; [p] pig; [rh] rhesus monkey; [r] rat.

^aOne percent efficiency can be achieved when using concentrated lentiviral vectors encoding all factors in one polycistronic transcript.

(Stadtfeld et al, 2010 ⁶⁹)

ce qui peut nuire à la différenciation des cellules ⁸³. L'utilisation de vecteurs lentiviraux inductibles s'avère être une bonne option afin de contrôler l'expression des gènes viraux par l'ajout d'un antibiotique inerte comme la doxycycline. Lorsque la doxycycline est retirée du milieu de culture, les cellules qui ne sont pas pleinement reprogrammées et qui sont encore sous l'influence des gènes lentiviraux cessent de proliférer ^{83,84}. Les vecteurs lentiviraux infectent plus efficacement différentes lignées somatiques que les rétrovirus et pourraient être utilisés afin d'augmenter l'efficacité de la reprogrammation en exprimant par exemple des cassettes polycistroniques comprenant les quatre facteurs de transcription nécessaires ⁸⁵.

L'intégration des virus dans le génome des cellules pose toujours un risque accru de réactivation ou de mutation provoquée par l'intégration elle-même. D'autres méthodes qui ne nécessitent pas d'intégration virale ont donc été développées, ce qui s'avère particulièrement intéressant pour des thérapies basées sur les cellules iPS.

Tout d'abord, les premières approches d'acheminement non-intégratives ont été réalisées avec des adénovirus ⁸⁶ ou des plasmides ⁸². Une nouvelle approche a également été proposée et s'avère fréquemment utilisée jusqu'à présent : le virus Sendai ⁸⁷. Le virus Sendai est un virus

ARN non intégrant qui infecte principalement les mammifères et qui peut donc être utilisé comme vecteur. Malgré le fait que l'efficacité de cette reprogrammation soit moindre que pour les virus intégrant, ces différentes approches confirment donc qu'une expression transitoire de ces quatre facteurs est suffisante afin de permettre la reprogrammation des cellules. Afin d'augmenter l'efficacité tout en limitant les inconvénients reliés à l'intégration de vecteurs viraux dans l'ADN de la cellule hôte, plusieurs équipes ont développé des modèles d'intégration virale avec des séquences LoxP pouvant être excisées par la recombinase Cre lorsque la reprogrammation est complétée^{88,89}. Plusieurs autres laboratoires ont plutôt opté pour la technique des transposons, qui permet une excision plus nette de la séquence intégrée dans le génome grâce à l'expression transitoire d'une transposase^{90,91}.

1.3.4 Gènes suppresseurs de tumeurs

L'apport de facteurs de transcription particuliers aux cellules somatiques n'est pas la seule étape afin de reprogrammer ces cellules en cellules souches. En effet, de nombreux gènes importants dans la régulation de la croissance cellulaire doivent être réprimés de manière transitoire afin de permettre cette reprogrammation. Le génome des cellules souches doit être particulièrement bien protégé puisque ces cellules ont la capacité de former de nombreux autres types cellulaires. Une mutation au sein de ces cellules peut s'avérer catastrophique pour l'individu et la cellule doit posséder des mécanismes puissants afin de maintenir l'intégrité de son génome. C'est le cas, notamment, des gènes suppresseurs de tumeurs tels que p16^{INK4a}, p14^{ARF} et p53, qui régulent négativement la prolifération cellulaire⁹². Ils ont d'abord été découverts grâce à leur rôle dans le cancer, mais jouent probablement un rôle encore plus grand d'homéostasie au sein des tissus normaux afin d'éviter des dérèglements délétères et désastreux au sein des cellules normales.

1.3.4.1 Fonctions

Les gènes suppresseurs de tumeurs possèdent de nombreuses fonctions dont certaines d'entre elles sont méconnues. En effet, les fonctions de ces différents gènes semblent dépendre de leurs niveaux d'expression, mais aussi du contexte et de l'environnement cellulaire. Ils sont en effet

responsables d'un arrêt de croissance cellulaire ou d'une mort par apoptose dans certains cas alors qu'ils peuvent aussi induire les divisions cellulaires dans d'autres contextes ⁹³. Néanmoins, quelques fonctions principales ont été plus amplement étudiées et ont pu leur être attribuées. Tout d'abord, ils régulent le cycle cellulaire en réprimant des gènes importants dans ce mécanisme. Par la suite, ils s'assurent que les cellules endommagées ne puissent pas poursuivre le cycle cellulaire jusqu'à ce que le génome de ces dernières ait été réparé avec succès ; si les dommages sont trop importants, ils induisent plutôt l'apoptose ⁹⁴. Les protéines impliquées dans la réparation de l'ADN sont considérées comme étant des suppresseurs de tumeurs, également, puisque des mutations dans leurs gènes peut s'avérer désastreuses et mener à la formation de cancers ⁹⁵. C'est le cas, notamment, de la protéine BRCA. La perte et/ou le dysfonctionnement des gènes suppresseurs de tumeurs s'avèrent très importantes dans le développement des cancers, probablement même plus importantes encore que l'activation d'oncogènes ^{96,97}.

1.3.4.2 Le gène suppresseur de tumeurs p53

Le gène suppresseur de tumeurs p53 s'avère être plutôt versatile et semble privilégier différentes voies de signalisation selon le contexte et l'environnement cellulaire.

Par exemple, dans des souris ATR mutantes, p53 maintient l'intégrité génomique et favorise la régénération tissulaire en promouvant la réparation de l'ADN ou en induisant l'apoptose des cellules ayant subi de trop gros dommages ⁹⁸. Par contre, en réponse à des stimuli oncogéniques ou à l'usure des télomères dans des cellules souches, par exemple, p53 induit plutôt la mort des cellules ⁹⁹.

Il est connu que des gènes suppresseurs de tumeurs sont inhibés ou réprimés pendant une certaine période de temps afin de permettre la reprogrammation de cellules somatiques en iPSC ¹⁰⁰⁻¹⁰², mais plusieurs autres études ont démontré qu'il était possible d'augmenter l'efficacité de la reprogrammation en supprimant temporairement ou complètement l'expression de p53 ^{103,104}, non sans augmenter les chances de transformation cellulaire ¹⁰⁵. La

reprogrammation des cellules nécessite la répression temporaire de p53 puisqu'elle cause des cassures dans l'ADN qui induisent la sénescence ou la mort des cellules ^{106,107}.

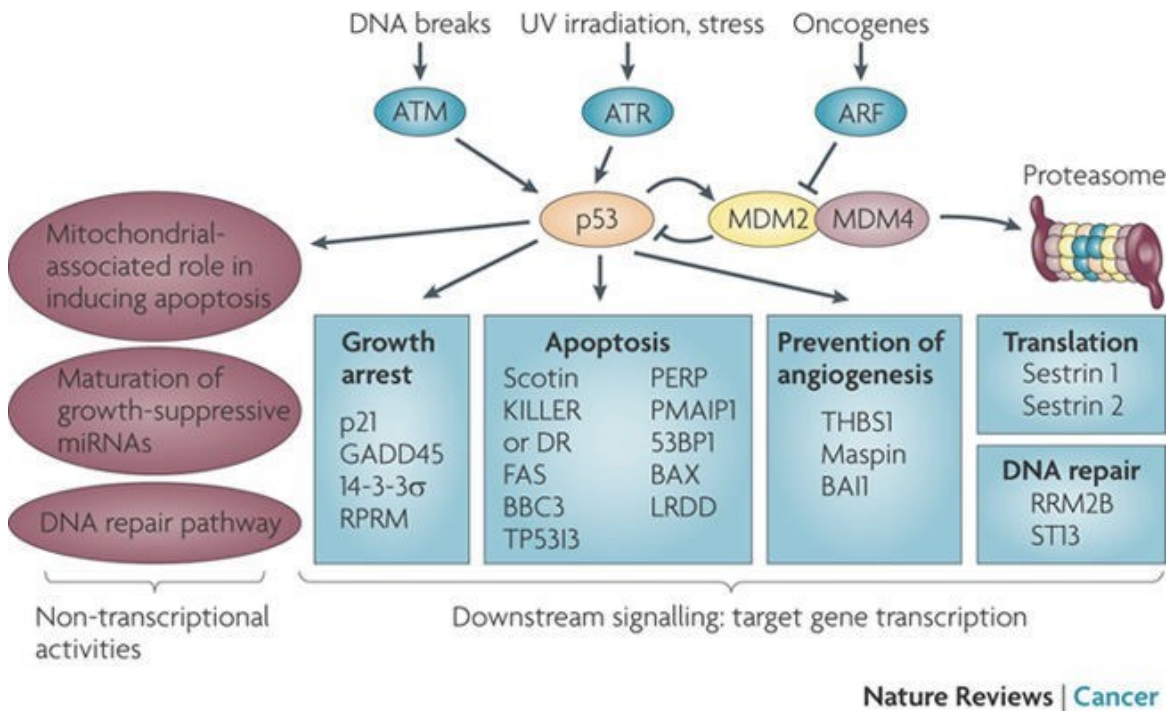


Figure 4 : Voie de signalisation de p53 simplifiée. Plusieurs stimuli peuvent activer la voie p53, c'est le cas, notamment, des cassures d'ADN, de l'irradiation ou du stress. p53 est impliqué au sein de différentes voie de signalisation, entre autres lorsqu'il y a des dommages induits à l'ADN. La cellule peut cesser de croître et donc entrer en sénescence, subir l'apoptose ou même réparer son ADN. La voie p53 est également impliquée afin de prévenir l'angiogenèse, mais aussi dans la traduction de protéines responsables de la réponse au stress. (Brown et al, 2009 ¹⁰⁸)

1.3.4.3 Hypothèse de Knudson

Les mutations dans des gènes suppresseurs de tumeurs sont dangereuses puisqu'elles perturbent les mécanismes de réparation de l'ADN et le bon fonctionnement du cycle cellulaire. Alfred Knudson a formulé une hypothèse qui porte son nom et qui explique la formation des cancers par des mutations successives. Effectivement, un seul allèle fonctionnel d'un gène suppresseur de tumeur s'avère généralement suffisant afin de protéger la cellule et ce n'est que lorsque les deux allèles du même gène sont inactivés que les dommages s'accumulent, même si des études démontrent que certains gènes suppresseurs de tumeurs sont dose-dépendants et que l'inactivation d'un allèle peut promouvoir un phénotype malin.

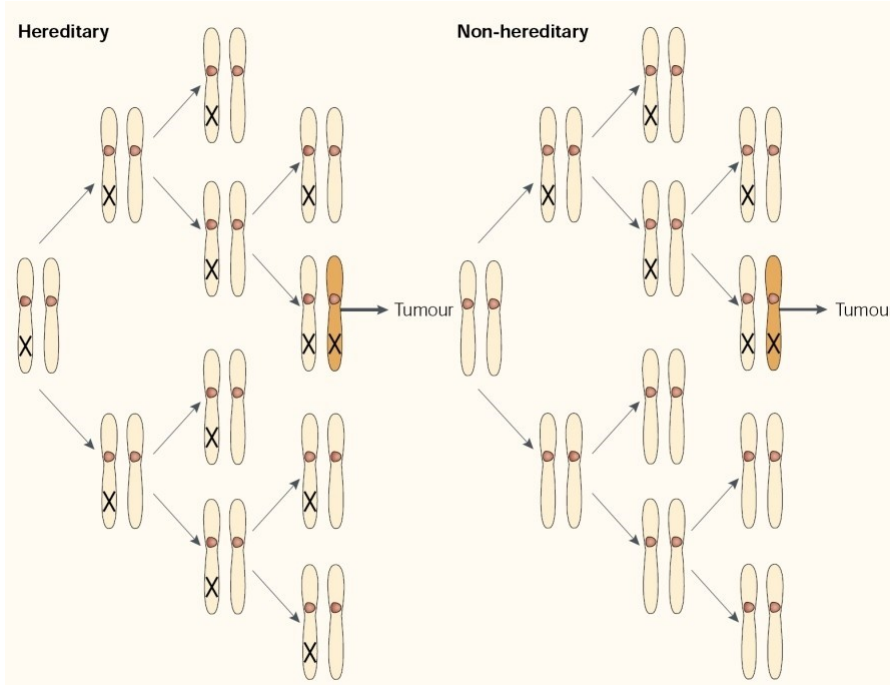


Figure 5 : Hypothèse de Knudson. Le schéma démontre qu'il y a deux formes de mutations, héréditaires ou non-héréditaires. Lors d'un cas héréditaire de formation d'un cancer, l'un des allèle d'intérêt possède déjà une mutation et il ne suffit que d'une seule autre mutation afin d'inactiver le deuxième allèle. Dans un cas non-héréditaire, deux mutations successives sont nécessaires. (Knudson, 2001 ¹⁰⁹)

1.4 Maintien de l'intégrité génomique

Grâce aux gènes suppresseurs de tumeurs et à différents mécanismes mis en place par la cellule afin de contrôler sa prolifération, il est possible de maintenir l'intégrité génomique. Plusieurs mécanismes de réparation de l'ADN existent et sont utilisés dans des cas bien particuliers. Les cassures double-brin dans l'ADN sont les dommages les plus importants générés dans une cellule puisque les polymérases ne peuvent pas se fier sur le deuxième brin afin de réparer celui qui est endommagé. Les deux mécanismes les mieux étudiés et les plus connus seront expliqués à la suite. 53BP1, une protéine liant p53, s'avère d'ailleurs être une protéine clé dans la décision de la cellule d'utiliser l'un ou l'autre des deux mécanismes ¹¹⁰.

1.4.1 Jonctions d'extrémités non-homologues

Tout d'abord, la jonction d'extrémités non homologues est un mécanisme de réparation des cassures double-brin qui utilise des microhomologies à la fin du dommage afin de guider la réparation de l'ADN. La réparation inappropriée de la cassure double-brin peut avoir des

effets désastreux sur la cellule telles que des translocations ou des fusions de télomères pouvant mener au cancer ¹¹¹. Plusieurs protéines sont impliquées dans ce mécanisme telles que Ku70/80, Artemis et l'ADN ligase IV ¹¹². Plus rapide que la recombinaison homologue, la jonction d'extrémités non homologues peut aussi introduire davantage de mutations au sein de l'organisme.

1.4.2 Recombinaison homologue

La recombinaison homologue, quant à elle, est un mécanisme plus fidèle que la jonction d'extrémités non homologues, mais demande davantage d'énergie à la cellule et ne peut être utilisée que lorsqu'un ADN homologue est présent dans la cellule, principalement en phase G2 ou S du cycle cellulaire. La cellule se base donc sur la chromatide sœur de la phase G2, par exemple, afin de réparer les dommages du chromosome endommagé. Des protéines comme Rad51, PARP1 ou MRE11 sont impliquées ¹¹³.

1.5 Différenciation cellulaire à partir de cellules iPS

Les mécanismes fonctionnels de réparation de l'ADN sont d'autant plus importants dans les cellules souches afin de prévenir l'apparition de mutations qui pourront être transmises à tous les autres types cellulaires. Lorsque le processus de reprogrammation cellulaire est terminé, l'intérêt s'avère souvent de différencier les iPSC en d'autres types cellulaires, que ce soit pour le criblage de médicaments ou pour la transplantation de cellules autologues. S'il existe de nombreux protocoles de différenciation déjà publiés, tous les types cellulaires ne peuvent pas encore être différenciés à partir d'iPSC puisque certains facteurs nécessaires à la différenciation sont encore inconnus. À partir d'iPSCs, il est toutefois possible de dériver de nombreux types cellulaires comme des cardiomyocytes ¹¹⁴, des hépatocytes ¹¹⁵, des cellules épithéliales de poumons ¹¹⁶, des neurones moteurs ¹¹⁷ ou des cellules musculaires squelettiques ¹¹⁸, pour ne nommer que ceux-là. Ce sont des cellules qui proviennent des couches germinales différentes et qui sont dérivées grâce à l'ajout de facteurs de croissance et de différenciation définis dans leur milieu de culture.

1.6 Projet

Il y a une grande incertitude sur l'innocuité des cellules souches pluripotentes induites ainsi que leurs dérivés cellulaires puisque la reprogrammation implique une répression temporaire de l'expression de certains gènes suppresseurs de tumeurs¹⁰⁰⁻¹⁰². Nous présumons que ces gènes sont ré-exprimés normalement lors de la différenciation des cellules, mais aucune confirmation dans la littérature ne vient appuyer cette conviction et cette certitude est pourtant nécessaire afin de proposer à grande échelle des traitements basés sur les iPSC.

Le but de ce projet est donc de caractériser et de comparer des populations de fibroblastes originellement dérivées d'une biopsie à celles provenant de cellules souches pluripotentes induites autologues.

1.6.1 Hypothèse expérimentale

Tout d'abord, nous croyons que l'efficacité et le succès de la différenciation à partir des cellules iPS sont très importants afin d'obtenir des populations cellulaires qui se rapprochent physiologiquement et métaboliquement des cellules originelles. Si cette différenciation est complétée efficacement et que les mécanismes de réparation de l'ADN (comme p53) sont fonctionnels, nous pensons que les deux populations de cellules devraient posséder les mêmes caractéristiques morphologiques et répondre de la même façon aux dommages à l'ADN.

1.6.2 Objectifs du projet

Tout d'abord, par la cytométrie en flux et l'immunofluorescence, nous caractériserons morphologiquement nos populations cellulaires grâce à des protéines de surface ou à des molécules intracellulaires. Ensuite, nous déterminerons le potentiel de réparation des dommages à l'ADN causés par l'irradiation en observant la formation de foyers de réparation grâce à deux protéines impliquées dans la réparation de l'ADN lors d'une cassure double-brin,

53BP1 et H2AX. Nous caractériserons aussi la capacité de nos populations cellulaires à reprendre et/ou à interrompre leur croissance après deux doses d'irradiation différentes grâce à l'incorporation de bromodeoxyuridine (BrdU), un analogue de la thymidine. De plus, la réponse p21 suite à l'irradiation sera déterminée par PCR quantitative (qPCR).

2. MATÉRIEL ET MÉTHODE

2.1 Culture des fibroblastes

Les fibroblastes sont cultivés dans du DMEM 10% sérum bovin fœtal (FBS), 5% P/S (pénicilline/streptomycine) et incubées en hypoxie à 5% CO₂ et 5% O₂. Le milieu de culture est changé aux quatre jours et les cellules sont passées une ou deux fois par semaine, lorsqu'elle atteignent confluence. Afin de réaliser les passages, les cellules sont rincées avec du PBS, décollées avec la trypsine 0,25% et laissées cinq minutes dans l'incubateur. Elles sont ensuite centrifugées à 1 200 RPM pendant cinq minutes et comptées à l'hématimètre. Environ 500 000 cellules sont déposées dans des T75. Les cellules sont congelées à -80°C dans 50% de milieu de culture originel, 40 % de FBS et 10 % de diméthylsulfoxyde (DMSO). Elles sont conservées à long terme dans des cuves d'azote liquide. Elles sont décongelées à 37°C, centrifugées afin de retirer le DMSO et mises en culture.

2.2 Culture des iPSC

La reprogrammation des cellules a été réalisée précédemment dans le laboratoire par des virus Sendai. Les cellules iPS sont cultivées dans du milieu Essential 8 (E8) sur des plaques précédemment enduites de geltrex, une matrice permettant l'adhésion cellulaire et le milieu est changé tous les jours. Les plaques de 6 puits sont enduites de geltrex (1% geltrex dans du milieu E8 froid), posées trente minutes dans l'incubateur et laissées ensuite trente minutes à la température de la pièce. Elles sont ensuite prêtes à être utilisées.

Tout d'abord, les iPSC sont nettoyées au microscope optique (sous la hotte) afin d'éliminer les zones de différenciation spontanée. Un ml de gentle cell dissociation reagent (GDCR) est déposé par puits afin de fragiliser les colonies d'iPSC. Le GDCR est retiré du milieu lorsque les contours des colonies commencent à s'effriter et remplacé par du milieu E8 avec 10 µM de

rock inhibitor (RI), une molécule qui augmente l'adhésion cellulaire à la matrice. Les colonies sont détachées avec un grattoir de cellules et brisées en petites colonies avec la pipette de 1000 μ l. Le geltrex est retiré des puits et remplacé par le milieu E8 + RI. Avec la pipette de 1000 μ l, les cellules sontensemencées dans les nouveaux puits.

Les cellules sont congelées dans du FBS 10% DMSO directement ajouté sur les colonies fragilisées par le GCDR. Elles sont décollées avec le grattoir cellulaire et pipetées une seule fois avant d'être déposées dans les tubes de congélation et gardées à -80°C . Elles sont ensuite entreposées à long terme dans des cuves d'azote liquide. Elles sont décongelées dans du milieu E8 + RI et déposées en une seule fois dans des puits précédemment enduits de geltrex.

2.3 Différenciation des iPSC en fibroblastes

Afin de différencier les cellules iPS en fibroblastes, le bFGF a été utilisé à une concentration de 4 ng/ml. La différenciation a été réalisée dans des plaques de six puits avec des iPSC confluentes à 40-50%. Le bFGF a été laissé dans le milieu de culture pendant deux semaines et les trois premiers passages ont été réalisés sur des plaques précédemment enduites de geltrex.

2.4 Caractérisation des cellules

2.4.1 Immunofluorescence

Pour les marquages vimentine et FSP-1, les cellules ont été fixées à la paraformaldéhyde (PFA) 4% pendant 7 minutes. Elles ont ensuite été lavées trois fois pendant 5 minutes au PBS et une perméabilisation avec du PBS 0,2% Triton a été réalisée pendant 10 minutes. Trois lavages de 5 minutes au PBS ont été effectués. Un blocage des sites non spécifiques a été réalisé pendant trente minutes au FBS 10%. Les anticorps anti-vimentine (Invitrogen) et anti- FSP-1 (EMD Millipore) ont été ajoutés toute la nuit (à 4°C) à une dilution 1 :250. Trois lavages de 5 minutes ont ensuite été réalisés au PBS et l'anticorps secondaire anti-souris Alexa

594 (Invitrogen) a été ajouté à une dilution 1 :500 pendant trente minutes à la température de la pièce. Trois lavages de 5 minutes ont été faits et le DAPI a été ajouté dans le dernier lavage.

Les marquages SSEA4 et Tra-1-60 ont été réalisés de la même façon que les marquages vimentine et FSP-1 en omettant l'étape de perméabilisation puisqu'il s'agit de marqueurs de surface. La concentration des anticorps était de 1 :200 pour l'anti-SSEA4 et de 1 :500 pour l'anti Tra-1-60, tous deux faits chez la souris et achetés chez Life Technologies.

2.4.2 Cytométrie en flux

Les cellules en culture ont été récupérées, centrifugées et fixées pendant 7 minutes à la formaldéhyde. Des cellules non marquées ont été conservées comme contrôles et différents tubes ont été préparés afin de faire les différents marquages. Les anticorps anti-HLA de classe 1 et anti-CD73 étaient couplés à la phycoérythrine (PE) alors que les anticorps anti-CD44 et anti-CD90 étaient couplés à la fluorescéine (FITC) et ont été achetés chez BD biosciences. Les cellules ont été marquées pendant 30 minutes à 4°C et analysées en cytométrie en flux au BD fortessa. Les cellules d'intérêt ont été récupérées selon leur taille et leur granularité et une acquisition d'environ 10 000 cellules a été réalisée.

2.5 Mesures de la capacité de réparation de l'ADN après irradiation

2.5.1 53BP1 et H2AX

Les deux populations de fibroblastes ont étéensemencées sur des lames à quatre chambres et ont été irradiées à 1 Gy au Faxitron. Elles ont ensuite été fixées à la paraformaldéhyde 1h, 8h, 24h et 48 h post-irradiation. Des cellules contrôles non irradiées ont aussi été fixées. Trois lavages de 5 minutes ont été réalisés au PBS et une perméabilisation de 10 minutes au Triton 0,2% a été effectuée à la température de la pièce. Les sites de liaison non spécifiques ont été bloqués pendant une heure à la température de la pièce dans une solution de PBS 5% sérum de

chèvre et 1% sérum d'albumine bovine (BSA). Les anticorps de lapin anti-53BP1 et de souris anti-H2AX ont été ajoutés à des dilutions respectives de 1 :1500 et de 1 :250 dans une solution de PBS 2,5% sérum de chèvre et 1% BSA et ont été respectivement achetés chez Novus Biologicals et Millipore. Ils ont été laissés toute la nuit à 4°C. Trois lavages de 5 minutes au PBS ont été effectués. Les anticorps secondaires Alexa 594 anti-lapin et Alexa 488 anti-souris achetés chez Invitrogen ont été ajoutés à des dilutions de 1 :750 dans une solution de PBS 1% BSA et ont été laissés une heure à température de la pièce. Trois lavages de cinq minutes ont été réalisés et le DAPI a été ajouté dans le dernier lavage.

2.5.2 Incorporation du BrdU

Les deux populations de fibroblastes ont étéensemencées sur des lames à quatre chambres et ont été irradiées à 2,5 et 5 Gy au Faxitron. Deux jours après l'irradiation, le BrdU (acheté chez Roche) à une concentration de 10 µM a été ajouté dans le milieu de culture et les cellules ont ensuite été fixées à la paraformaldéhyde 4 jours après l'ajout de BrdU. Des cellules non irradiées ont également été fixées afin d'avoir un contrôle de prolifération cellulaire. Les cellules doivent être dénaturées et sont donc incubées 30 minutes à 37°C dans du HCl 1N. L'acide est ensuite neutralisé avec un tampon borate à 0,1 M et de pH 8,5 (acide borique + NaOH) pendant 10 minutes à la température de la pièce. Trois lavages de 5 minutes au PBS sont ensuite effectués. L'anticorps souris anti-BrdU, acheté chez Sigma, est ajouté à une dilution 1 :250 dans une solution de PBS 1% BSA pour la nuit. Trois lavages de 5 minutes au PBS sont réalisés. L'anticorps secondaire anti-souris Alexa 488 est ensuite ajouté à une dilution de 1 :750 dans une solution de PBS 1% BSA pendant une heure à la température de la pièce. Trois lavages sont réalisés et le DAPI est ajouté dans le dernier lavage.

2.5.3 Expression de p21 par qPCR

Les fibroblastes ont étéensemencés dans des boîtes de pétri de 60 mm et irradiées à 10 Gy au Faxitron. Chaque population cellulaire a étéensemencée dans trois boîtes de pétri différentes afin d'avoir une population contrôle non irradiées et deux populations irradiées dont l'ARN a

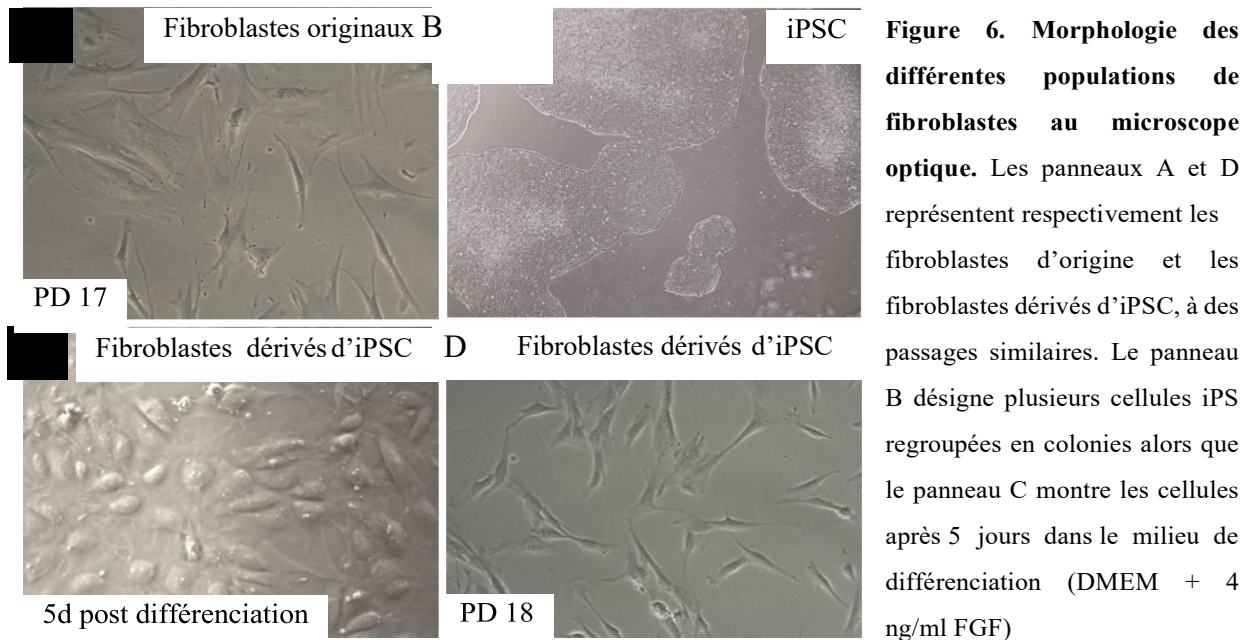
été récupéré à des temps différents. Les cellules ont été lysées et l'ARN a été récupéré avec le kit RNeasy Mini kit de Qiagen. 100 ng d'ARN a ensuite été transcrit en cDNA avec le kit Quantitect – Reverse Transcription Kit de Qiagen. La réaction de qPCR a été réalisée avec le kit Sensimix SYBR Low-ROX Kit de Bioline. Les amorces utilisées pour le 18S sont 5'-CGCCGCTAGAGGTGAAATTCT-3' et 5'-CGAACCTCCGACTTTCGTTCT-3' et les amorces pour p21 sont 5' – GGCAGACCAGCATGACAGATT -3' et 5'-GCGGATTAGGGCTTCCTCTT-3'.

3. RÉSULTATS

3.1 Caractérisation morphologique des différentes lignées cellulaires

Généralement, les cellules différenciées possèdent une morphologie qui leur est propre et qui peut facilement être observée au microscope optique. Les fibroblastes sont des cellules de soutien et constituent le tissu conjonctif ; elles forment donc des projections afin de couvrir un maximum de surface. Les cellules iPS, quant à elles, sont des cellules qui ont un très gros noyau, ne possèdent que très peu de cytoplasme et se regroupent en colonies.

La figure 6 montre la morphologie cellulaire des différentes populations au microscope optique. Le succès et l'efficacité de la différenciation ne peuvent pas être devinés à partir d'observations microscopiques, mais ces dernières peuvent néanmoins donner quelques indications supplémentaires.

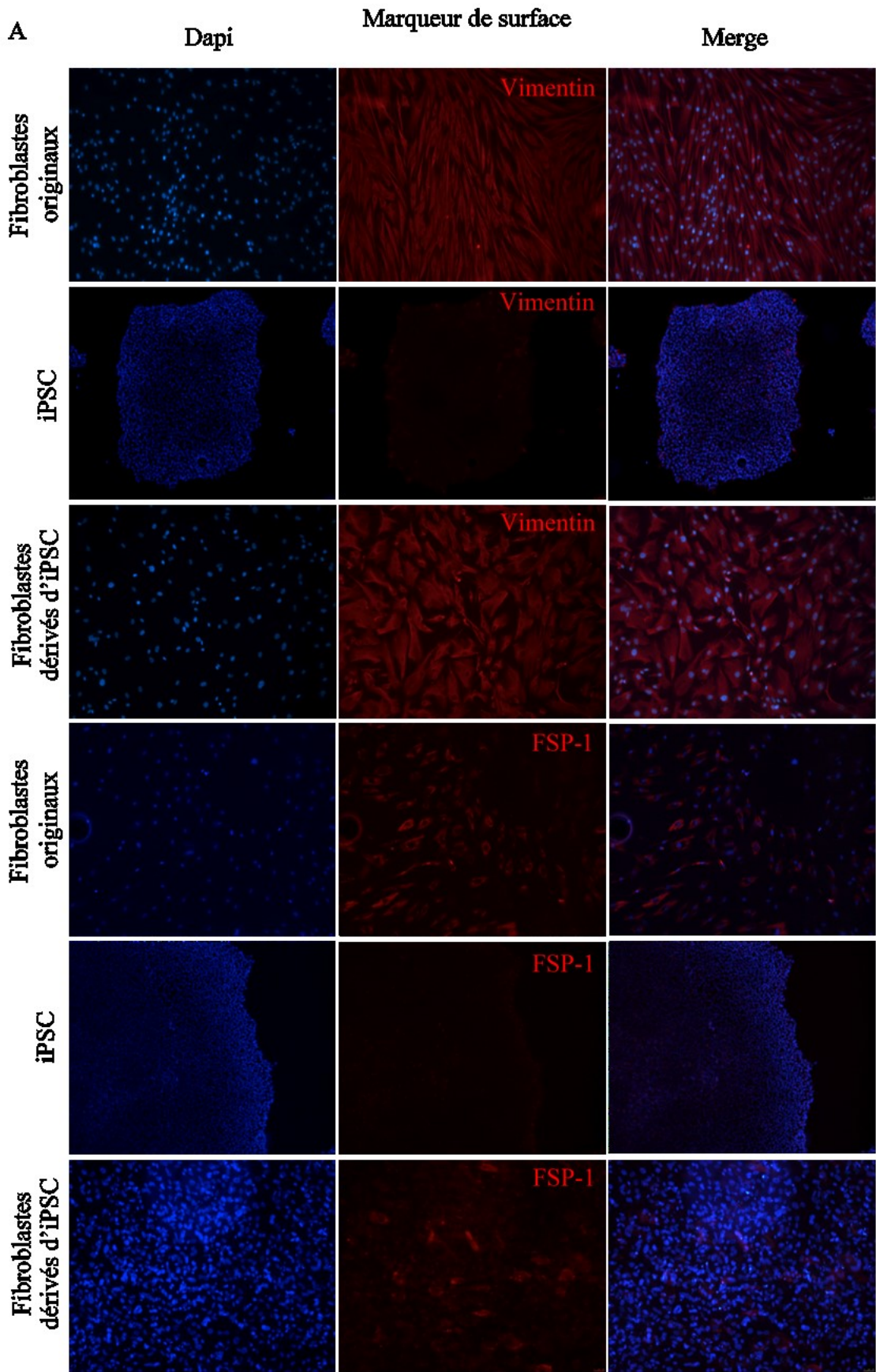


C'est possible de remarquer, dans la figure 6, que les deux populations de fibroblastes sont similaires morphologiquement. À faible confluence et à passage avancé, les cellules forment les projections caractéristiques des cellules de soutien. Les cellules nouvellement différenciées ne ressemblent pas tout à fait à des fibroblastes matures alors que les cellules iPS, quant à elles, sont effectivement regroupées en colonies.

Les fibroblastes épithéliaux sont des cellules différenciées qui ne possèdent que très peu de marqueurs cellulaires uniques et ces derniers sont souvent partagés avec un ou plusieurs autres types cellulaires. Or, certaines protéines sont davantage exprimées chez cette population, c'est le cas, notamment, de la vimentine, un filament intermédiaire, et de FSP-1, une protéine intracellulaire. Plusieurs marqueurs de pluripotence ne sont exprimés que sur les cellules souches, tels que SSEA4 et TRA1-60 ; leur perte sur les cellules différenciées permet d'évaluer l'efficacité de la différenciation. La figure 7 représente ces différents marqueurs en immunofluorescence.

Dans le panneau A de la figure 7, c'est possible de remarquer que les cellules iPS n'expriment pas ou très peu les marqueurs tels que la vimentine et FSP-1 alors que les cellules d'intérêt expriment ces deux marqueurs. Dans le panneau B de cette même figure, c'est possible de constater que les cellules différenciées à partir des cellules iPS ont perdu les marqueurs de pluripotence tels que SSEA4 et Tra1-60.

Une autre technique plus rapide et quantitative afin d'évaluer certains marqueurs cellulaires de surface s'avère être la cytométrie en flux. Elle permet d'obtenir la proportion des cellules positives pour un marqueur donné tout en minimisant le nombre de cellules nécessaires puisqu'il est possible d'optimiser les panneaux de cytométrie grâce aux nombreux lasers disponibles sur les appareils. Encore une fois, les marqueurs cellulaires uniques de fibroblastes sont peu ou pas connus, mais certains d'entre eux sont plus fréquents chez cette population. C'est le cas, notamment, de la glycoprotéine d'adhésion CD44, qui s'avère nécessaire pour de nombreuses fonctions. La figure 8 montre certains de ces marqueurs en cytométrie en flux et



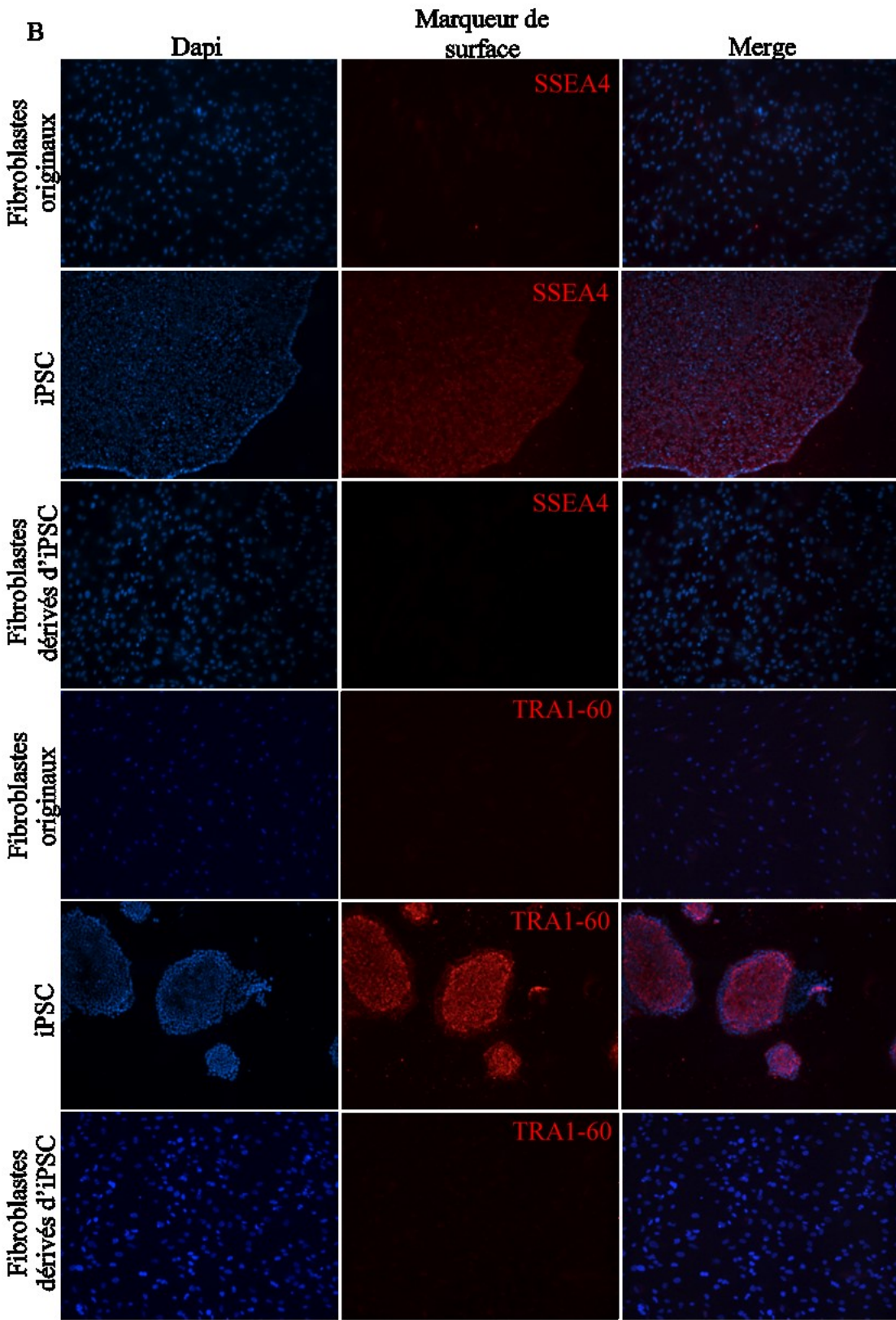


Figure 7. Marqueurs de fibroblastes et de pluripotence en immunofluorescence. Le panneau A représente les différents marqueurs de fibroblastes intracellulaires testés alors que le panneau B représente deux des marqueurs de pluripotence utilisés afin de caractériser les cellules iPS. Les images ont été prises à 10X. Anticorps : SSEA4 1 :200, Tra-1-60 1 :500, vimentine : 1 :200 et FSP-1 : 1 :200. Anticorps secondaires : Alexa 594 1 :500

il est possible de constater que les cellules iPS perdent presque entièrement l'expression du marqueur HLA-1 et complètement CD44 alors que les fibroblastes dérivés d'iPSC retrouvent cette expression.

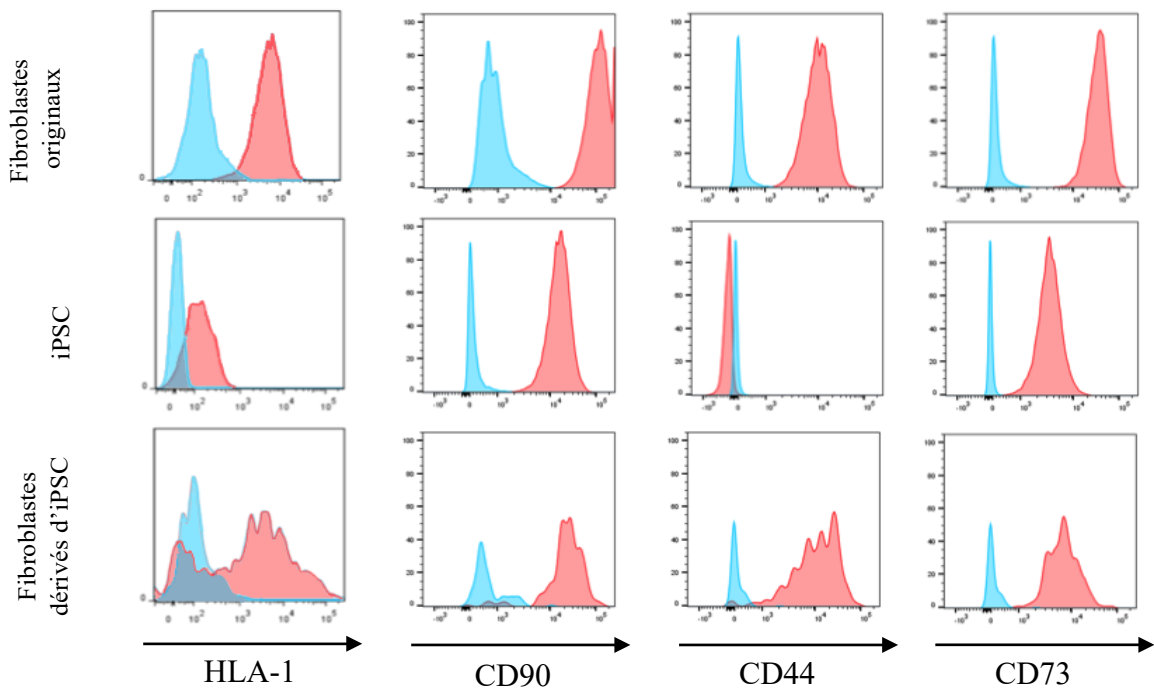


Figure 8. Marqueurs de surface des fibroblastes et des iPSC en cytométrie en flux. Les courbes en bleu représentent les cellules non marquées alors que les courbes en rouge représentent l'expression des marqueurs d'intérêt.

3.2 Capacité de réparation de l'ADN

De nombreuses expériences ont été réalisées afin de caractériser la réponse des fibroblastes à des dommages à l'ADN induits par irradiation. Les mécanismes de réparation de l'ADN sont régulés, entre autres, par p53. Or, de nombreux gènes suppresseurs de tumeurs, dont p53, doit

être temporairement réprimée afin de permettre la reprogrammation en cellules iPS, tel que discuté précédemment. La figure 9 expose une expérience réalisée afin de déterminer la capacité des différentes populations de fibroblastes à reprendre une croissance cellulaire normale ou à arrêter complètement de croître après deux

ion (2,5 et 5 Gy)

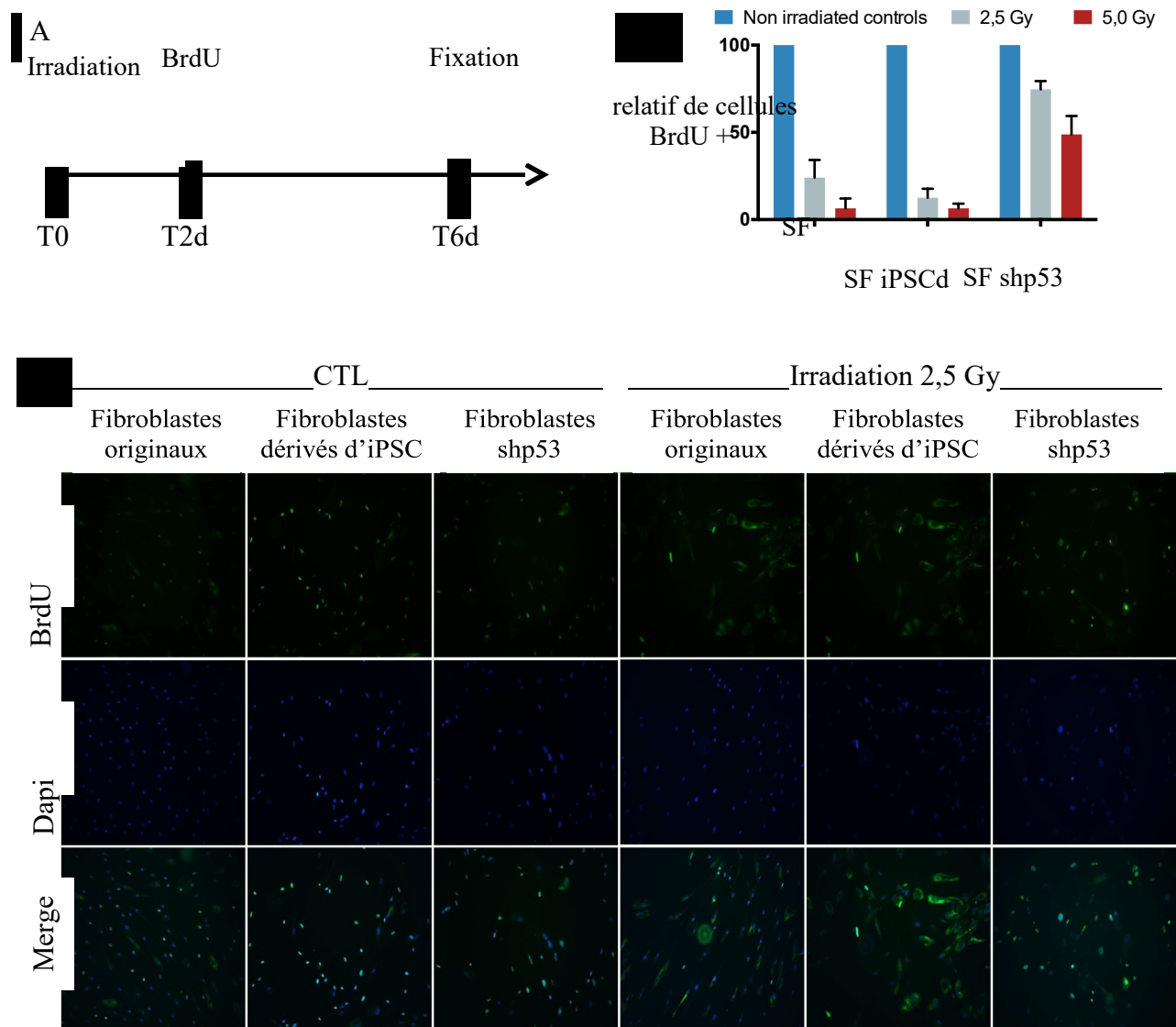
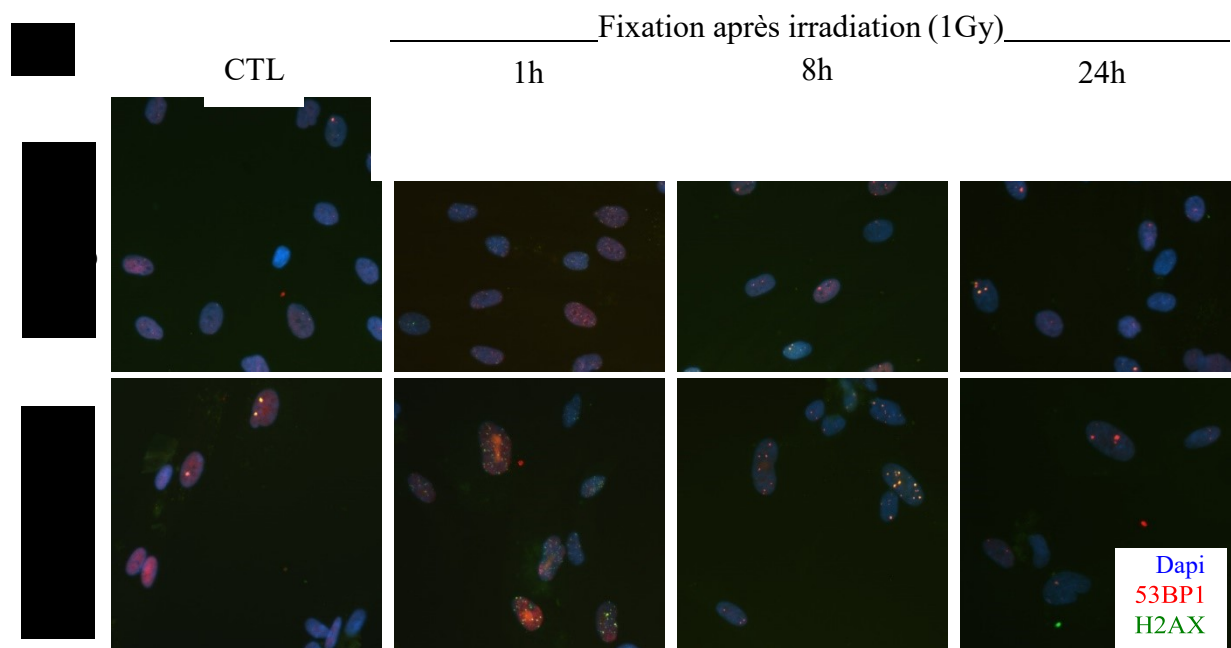


Figure 9. Incorporation de BrdU après irradiation. La chronologie de l'expérience est illustrée en A. Le panneau C représente l'incorporation de BrdU en immunofluorescence (10X) au sein des deux populations de fibroblastes. Les contrôles représentent la prolifération des cellules non irradiées. Les cellules ont été fixées 4 jours après le traitement au BrdU. Le graphique en B représente l'incorporation de BrdU de manière relative aux contrôles et selon deux doses d'irradiation, 2,5 et 5 Gy. Anticorps : BrdU : 1 :250. Anticorps secondaire : Alexa 488 1 :750.

Après irradiation à 2,5 et 5 Gy, les lignées cellulaires dérivées de cellules iPS semblent arrêter de croître plus efficacement que les fibroblastes originaux. La lignée cellulaire shp53 s'avère être un bon contrôle positif de prolifération puisque les fibroblastes se divisent malgré l'irradiation.

La capacité de réparation de l'ADN peut également être évaluée grâce à des protéines directement impliquées dans ce mécanisme. 53BP1 et H2AX sont deux protéines recrutées lors des cassures double-brin de l'ADN, entre autres lorsqu'elles sont causées par l'irradiation. La figure 10 montre en A des exemples de foyers de réparation de l'ADN. Les cellules ont été irradiées à 1 Gy puis fixées à différents moments après l'irradiation afin de déterminer la capacité de réparation de ces cellules à travers le temps. Les graphiques en B montrent les profils de chacune des populations cellulaires selon le nombre de foyers de réparation de l'ADN après irradiation.

Une heure après l'irradiation, de multiples foyers de réparation de l'ADN sont présents dans toutes les cellules. Toutefois, à partir de 24 heures, les deux populations de fibroblastes semblent retrouver un profil similaire à celui des cellules non irradiées.



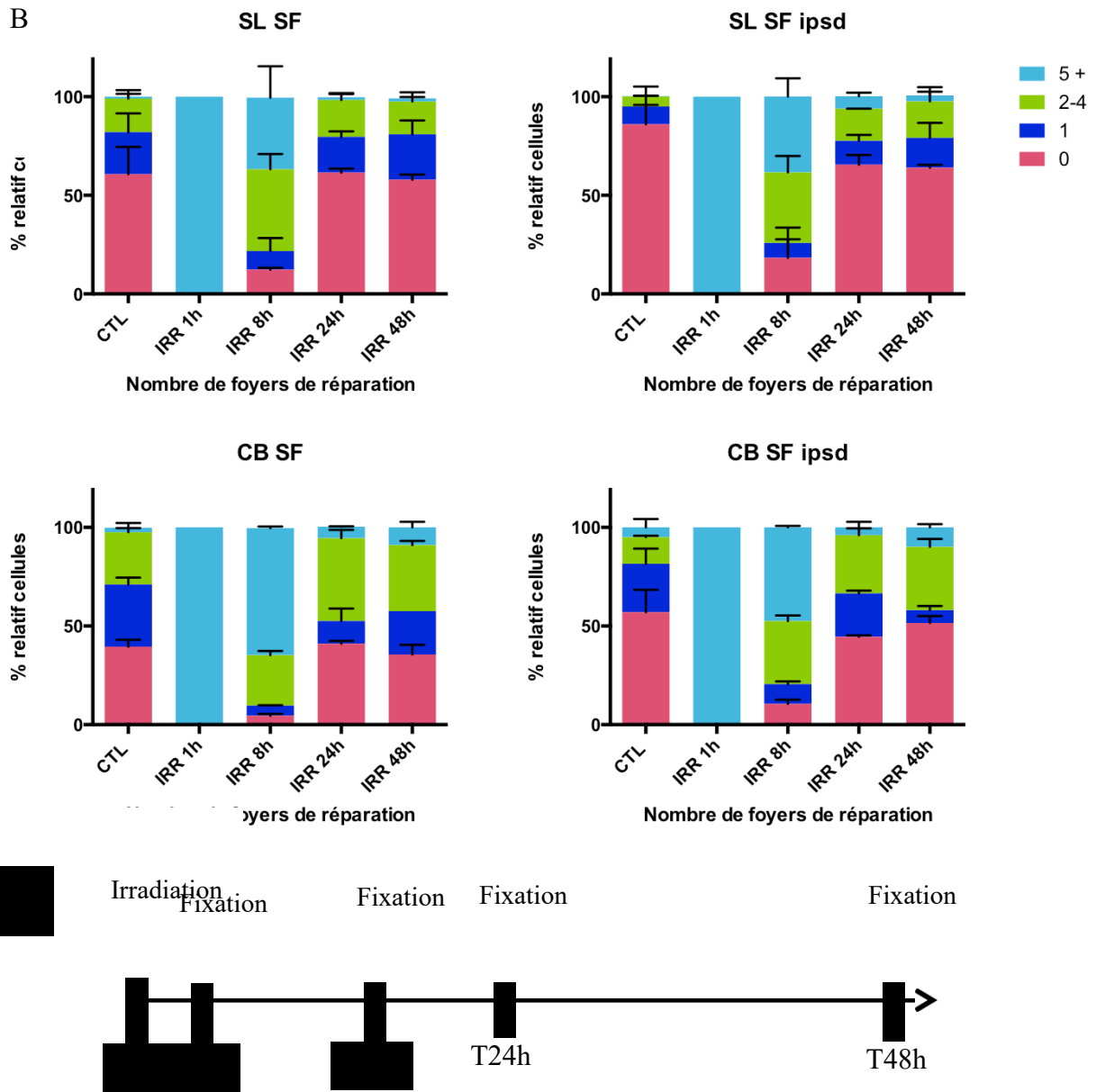


Figure 10. Profils de réparation de l'ADN en fonction du temps après une irradiation de 1Gy. Dans des chambres à quatre puits, 5 000 et 10 000 cellules ont été déposées respectivement pour les conditions contrôle et irradiées. Trente-six heures après, les cellules qui devaient être irradiées l'ont été à 1Gy et les cellules contrôle ont été fixées. Différents temps post-irradiation, des cellules ont été fixées afin de faire un marquage 53BP1 et H2AX. Le panneau A montre un exemple de marquage, à 20X. Les points en rouge, en vert et en orange représentent respectivement les marquages pour 53BP1, H2AX et une colocalisation des deux. Le panneau B, quant à lui, représente les profils de réparation de l'ADN en fonction du temps. Les différentes couleurs de la légende montrent le nombre de foyers de réparation pour chaque lignée cellulaire et pour chaque temps. En C, la chronologie de l'expérience est illustrée. SL et CB : lignées cellulaires, SF : Fibroblastes de peau, ipsd : dérivés d'iPSC, CTL : contrôles non irradiés, IRR : irradiés, h : heures. Anticorps : 53BP1 1 :1500 et H2AX 1 :250. Anticorps secondaires : Alexa 594 et Alexa 488 1 :750

Par la suite, l'expression de p21 différents temps après une irradiation à 10 Gy a été analysée par qPCR. La figure 11 montre l'augmentation de l'expression de p21 dans les différentes lignées cellulaires afin de comparer leurs capacités à induire les mécanismes de réparation de l'ADN par l'entremise de p21.

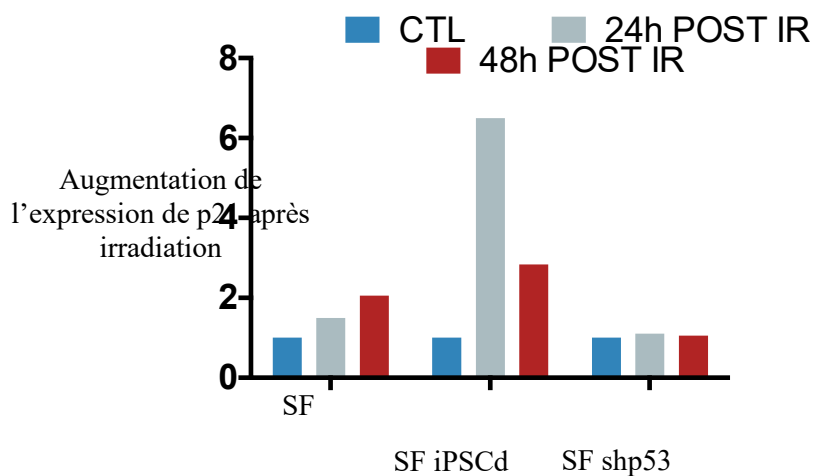


Figure 11. Expression de p21 après irradiation par qPCR. Plusieurs temps après une irradiation à 10 Gy, les cellules sont récoltées et lysées afin d'en extraire l'ARN. Une RT-PCR a permis d'obtenir le cDNA à partir de 100ng d'ARN. Une qPCR a ensuite été réalisée afin d'évaluer l'augmentation de l'expression de p21 après irradiation. Les valeurs obtenues sont relatives à l'ARN de référence, le 18S.

De manière générale, on peut voir dans la figure 11 que l'expression de p21 dans les différentes lignées cellulaires augmente après l'irradiation, ce qui n'est pas le cas pour la lignée shp53.

4. DISCUSSION

Le but de ce projet était de caractériser deux populations de fibroblastes, récupérées directement à partir d'une biopsie et dérivées de cellules souches pluripotentes induites autologues, quant à leur morphologie et à leur capacité de réparation de l'ADN après des dommages causés par l'irradiation.

4.1 Caractérisation morphologique et phénotypique

Tout d'abord, les deux populations de fibroblastes ont été observées au microscope optique afin d'évaluer leur morphologie. La figure 6 montre bel et bien que les deux populations de fibroblastes se ressemblent morphologiquement lorsqu'elles atteignent sensiblement le même passage. L'une des particularités des cellules de soutien est leur capacité de former des projections afin de couvrir une plus grande surface et c'est exactement ce qui est montré dans les panneaux A et D de la figure 6. Le nombre de passages s'avère important puisqu'un trop faible passage après la différenciation en fibroblastes ne montre pas tout à fait la cellule allongée représentative du type cellulaire (Figure 6C). De plus, les fibroblastes utilisés sont des fibroblastes primaires qui n'ont pas été immortalisés et qui possèdent donc un nombre de divisions limité. Les différentes expériences ont été réalisées sur des fibroblastes ayant un PD (doublement de population) entre 20 et 30 afin de s'assurer d'avoir des lignées stables qui sont encore dans une phase de croissance. Lors de la culture cellulaire, les fibroblastes de l'une des deux lignées dérivée d'iPSC s'avéraient morphologiquement plus petits que leur population d'origine, mais conservaient le même phénotype. De nombreux facteurs, tels que le donneur¹¹⁹, peuvent influencer la reprogrammation cellulaire et donc par le fait même le phénotype des cellules différenciées à partir d'iPSC.

Contrairement aux cellules primaires, les iPSC se stabilisent lorsqu'elles montent en passage¹²⁰ et les iPSC utilisées afin d'induire la différenciation se trouvaient entre les passage 20 et 25 et étaient confluentes à 40-50 %.

L'évaluation morphologique n'est pas suffisante afin de caractériser phénotypiquement les deux populations de fibroblastes, mais les marqueurs de surface ou intracellulaires spécifiques et uniques à ce type cellulaire sont inexistant. Les fibroblastes expriment plusieurs protéines importantes dans le cadre de leurs fonctions, mais l'expression de ces protéines s'avère généralement partagée avec d'autres types cellulaires. Toutefois, des marqueurs comme vimentine, FSP-1 et CD44 sont des protéines qui ne sont pas, ou très peu, exprimées chez les iPSC, ce qui permet de confirmer leur expression chez les cellules provenant de la biopsie, leur perte d'expression lors du passage à la cellule iPS et leur réexpression chez les cellules différenciées.

La figure 7 (panneau A) montre deux de ces marqueurs en immunofluorescence. Tout d'abord, pour ce qui est du marquage avec l'anti-vimentine, il est possible de remarquer une différence morphologique entre les deux populations, ce qui peut s'expliquer par la taille différente des cellules. En effet, malgré la confluence des noyaux similaire des deux lignées de fibroblastes, la lignée dérivée d'iPSC s'avère plus petite morphologiquement, ce qui pourrait diminuer la confluence réelle des cellules. Lorsque les fibroblastes sont confluent, ils se rapprochent, abandonnent leurs projections et s'allongent plutôt, ce qui est montré avec l'image représentant les fibroblastes provenant de la biopsie. Les fibroblastes dérivés d'iPSC semblent plutôt se comporter comme ce qui est montré dans la figure 6. L'expression de la vimentine, un filament intermédiaire qui se trouve généralement dans les cellules de soutien nécessitant un cytosquelette important, est optimale dans les deux populations de fibroblastes alors qu'elle est très faible au sein de la population d'iPSC. D'autres études démontrent également que la vimentine peut être marquée en immunohistochimie plutôt que par immunofluorescence, sur des fibroblastes ¹²¹. Le marqueur FSP-1 est un facteur associé aux filaments et qui lie le calcium cytoplasmique ¹²², mais encore une fois, ce marqueur n'est pas spécifique au type cellulaire d'intérêt puisque des équipes ont démontré qu'il était également exprimé sur certains types cellulaires dans un cadre inflammatoire ¹²³. Toutefois, les iPSC ne l'expriment pas, ou très peu, alors que les deux populations de fibroblastes l'expriment effectivement, bien que ce soit avec des niveaux différents d'expression.

Les marqueurs de pluripotence ne sont exprimés que par les cellules iPS et les cellules différenciées dérivées d'iPSC perdent cette expression à la suite de la différenciation. D'autres marqueurs de pluripotence tels que Sox2, Oct3/4 ou Klf4 auraient également pu être analysés, mais l'expression de Sox2 semble également présente chez d'autres types cellulaires comme les neurones ¹²⁴.

La figure 8 montre l'expression de plusieurs marqueurs différents analysée en cytométrie en flux. Tout d'abord, l'expression du HLA-1 dans les cellules iPS diminue considérablement lorsqu'elle est comparée à celle des populations de fibroblastes. Les iPSC perdent le HLA de classe 1 lors de la reprogrammation, ce qui explique pourquoi elles sont la cible des cellules NK. Les fibroblastes, comme la majorité des cellules du corps, expriment ce marqueur qui s'avère unique pour la très grande majorité des individus. Les marqueurs CD90 et CD73 sont respectivement une protéine de surface et une enzyme convertissant l'AMP en adénosine et elles sont toutes les deux présentes autant chez les populations de fibroblastes que chez les iPSC. L'expression de CD44, toutefois, est absente chez les iPSC, mais augmente considérablement chez les deux populations de fibroblastes. L'une des principales fonctions de cette glycoprotéine est d'assurer l'adhésion entre les cellules, ce qui pourrait expliquer les niveaux élevés chez les cellules épithéliales. La protéine est graduellement perdue au cours de la reprogrammation et est absente des cellules reprogrammées efficacement ¹²⁵. CD44 peut donc être un bon marqueur de différenciation de fibroblastes à partir de cellules iPS.

4.2 Capacité de réparation de l'ADN

L'étude morphologique et phénotypique des cellules permet de les caractériser. Il est cependant primordial d'établir leur capacité de réparation de l'ADN suite à des dommages dans l'optique de développer des thérapies cellulaires basées sur les cellules iPS. Plusieurs expériences ont donc été réalisées afin de caractériser cette réponse, autant dans les fibroblastes originaux que dans les fibroblastes dérivés d'iPSC.

4.2.1 Incorporation de BrdU

Tout d'abord, l'incorporation de BrdU est une méthode importante d'évaluation des capacités de prolifération cellulaire. En tant qu'analogue de la thymidine, l'incorporation de BrdU s'avère une mesure fiable de la division cellulaire puisque la cellule en division incorporera le BrdU dans son ADN. Si les mécanismes de réparation de l'ADN sont intacts, les cellules devraient cesser de croître après l'irradiation afin de réparer leur ADN (si les dommages ne sont pas trop importants, à faible dose d'irradiation). Les fibroblastes primaires sont des cellules qui se divisent aux trente-six heures, ce qui rend difficile le choix des temps de fixation après l'ajout de BrdU dans le milieu de culture. En fixant les fibroblastes quatre jours après l'ajout de BrdU, il devenait possible d'avoir une mesure claire du pourcentage de cellules ayant réparé leur ADN et s'étant divisées.

À faible dose d'irradiation, 2,5 Gy, les fibroblastes dérivés d'iPSC arrêtent de croître de manière beaucoup plus efficace lorsqu'ils sont comparés à leurs analogues originaux et ce, dans deux lignées différentes. À ce stade-ci, c'est difficile de savoir si c'est parce qu'ils sont plus sensibles à l'irradiation ou parce que le système de réparation de l'ADN est moins efficace et ne leur permet donc pas de reprendre leur croissance en demeurant dans un stade quiescent. À plus forte dose d'irradiation (5 Gy), le phénomène se reproduit, mais à moins grande échelle étant donné qu'une forte proportion des fibroblastes originaux arrête également de croître. Plus la dose d'irradiation est importante, plus les dommages sont conséquents et il serait intéressant d'augmenter la dose d'irradiation davantage jusqu'à ce qu'il n'y ait plus aucune cellule contrôlée BrdU +. Le processus de mutations est sporadique au sein d'une population de cellules, mais la culture prolongée de fibroblastes peut également provoquer des mutations. L'écart entre les deux populations pourrait aussi y être lié. Les fibroblastes shP53 sont une population contrôlée de prolifération puisque les cellules ont un p53 inactivé, dans la majorité des cas. L'inactivation ne semble pas être totale, néanmoins, puisque le pourcentage de cellules BrdU + diminue également avec l'irradiation. D'autres mécanismes peuvent aussi être impliqués afin de réguler la croissance cellulaire après l'irradiation.

Il semblerait néanmoins que les cellules dérivées d'iPSC possèdent des mécanismes de régulation de la prolifération cellulaire après des dommages à l'ADN tout autant efficaces que les cellules provenant directement de la biopsie.

4.2.2 Évaluation des foyers de réparation de l'ADN

Une autre façon d'analyser la capacité de réparation de l'ADN des cellules est de les marquer pour des protéines participant à la réparation telles que 53BP1 ou H2AX. L'irradiation à faible dose (1 Gy) des deux populations de fibroblastes devrait permettre une réparation de l'ADN et une reprise de croissance cellulaire. Les cellules non irradiées possèdent un niveau basal de foyers de réparation de l'ADN et de nombreux facteurs contribuent à cette situation. En effet, le métabolisme normal des cellules participe à l'augmentation de composés qui peuvent s'avérer toxiques pour les cellules et ainsi induire des bris d'ADN tels que les dérivés réactifs de l'oxygène ou de l'azote, la peroxydation des lipides et les agents alkylants, pour ne nommer que ceux-là ¹²⁶. Toutefois, au niveau basal, les fibroblastes dérivés d'iPSC possèdent moins de cellules endommagées que les fibroblastes originaux, comme le montre la figure 10 (panneau B). La majorité des cellules contrôle n'a pas de foyers de réparation de l'ADN. Lorsque les cellules sont fixées et marquées une heure après l'irradiation, une multitude de foyers de réparation de l'ADN sont présents dans les noyaux. Les rayons ionisants induisent la formation de plusieurs cassures double-brin pouvant être dangereuses pour les cellules, ce qui nécessite une intervention. Déjà, huit heures après l'irradiation, les foyers de dommage à l'ADN sont moins nombreux au sein des cellules et les profils cellulaires se ressemblent d'une lignée à l'autre. Vingt-quatre heures après l'irradiation, les profils cellulaires retrouvent presque les niveaux basaux des cellules contrôle. Une étude a déjà montré que les niveaux de 53BP1 après une faible dose d'irradiation chez la souris semblaient décroître graduellement à partir de vingt-quatre heures ¹²⁷.

Les profils obtenus vingt-quatre et quarante-huit heures après irradiation confirment notamment que les fibroblastes dérivés d'iPSC possèdent une machinerie fonctionnelle de réparation de l'ADN.

4.2.3 Expression de p21 après irradiation

Une autre expérience a été réalisée afin de caractériser la réponse face aux dommages à l'ADN. L'expression de p21 a été analysée comme marqueur de l'activité p53 puisque p21 se trouve en aval de p53 dans la voie de signalisation. Une PCR quantitative a été réalisée afin d'évaluer l'augmentation de l'expression de l'ARN de p21 par rapport au gène 18s, qui se trouve dans toutes les cellules. Tout d'abord, un contrôle shp53 a été utilisé et il est possible de constater que l'expression du gène p21 n'augmente pas avec l'irradiation. Néanmoins, une faible expression de ce gène demeure présente dans les trois conditions testées : cellules contrôle non irradiées et cellules fixées huit et vingt-quatre heures post irradiation. Il est donc probable que l'efficacité de l'ARN en épingle à cheveu ne soit pas totale ¹²⁸ ou que d'autres mécanismes moins importants entrent également en jeu afin d'augmenter la réponse p21. En effet, l'inhibition de contact des cellules peut également augmenter l'expression du marqueur p21 ¹²⁹. Toutefois, les profils obtenus en qPCR semblent néanmoins aller dans le même sens que les précédents résultats, même si certaines données semblent étonnantes. En effet, quarante-huit heures semble être un temps trop court pour que l'expression de p21 diminue autant que dans la lignée SL SF ipsd (figure 11) alors que l'expression de p21 dans la lignée SL SF diminue après vingt-quatre heures pour remonter ensuite après quarante-huit heures. Un temps intermédiaire de trente-six heures pourrait être une bonne option afin de comprendre la diminution de l'expression de p21 après quarante-huit heures et l'expérience pourrait être réalisée une nouvelle fois afin d'augmenter l'exactitude et la fiabilité des résultats. La différence de taille des cellules rend l'analyse de la confluence cellulaire plus difficile et il se pourrait que les fibroblastes originaux aient été plus confluent au départ, augmentant ainsi l'expression des niveaux basaux de p21.

Toutefois, malgré certaines incohérences dans les données obtenues, les fibroblastes dérivés d'iPSC semblent, encore une fois, posséder des mécanismes fonctionnels de réparation de l'ADN et de contrôle du cycle cellulaire puisque l'expression de p21 dans ces cellules est plus grande que celle dans les fibroblastes originaux.

Perspectives

De nombreuses avenues restent encore à explorer afin de mieux caractériser la réponse des cellules dérivées d'iPSC à des dommages à l'ADN. En effet, si les deux populations de fibroblastes semblent réagir de la même façon face à l'irradiation, le potentiel de formation tumorale de ces cellules demeure encore incertain. Le gène suppresseur de tumeur p53 semble réguler efficacement l'expression du gène p21 *in vitro*, mais la fonctionnalité de ces deux gènes n'a pas encore été démontrée. Afin d'évaluer le potentiel tumoral *in vivo* et en sachant que nous somme confrontés à de nombreux carcinogènes au cours de notre vie, les cellules pourraient être traitées avec un carcinogène comme le 4-nitroquinoline-1-oxide ou l'étoposide afin de reproduire en partie ce qui peut survenir chez l'humain et injectées chez des souris NSG immunosupprimées. Le potentiel tumoral de chacune des lignées pourrait donc être investigué puisque les cellules dérivées de cellules iPS ne devraient pas former davantage de tumeurs chez la souris si leurs mécanismes de réparation des dommages à l'ADN sont intacts.

De plus, d'autres données sont nécessaires afin d'affirmer que les résultats obtenus sont valides pour tous les types cellulaires différenciés à partir d'iPSC. L'expression de p21 est utilisée dans ces travaux afin de démontrer la présence et l'efficacité de p53 puisque ce dernier se trouve en amont de p21 dans la cascade d'événements. Les travaux présentés ici pourraient être valides au sein de toutes les lignées différenciées à partir d'iPSC si p53, et donc, p21 sont fonctionnels dans les clones iPS. En effet, l'expression de p21 semble être réprimée dans les cellules souches embryonnaires, mais également dans les iPSC¹³⁰. La capacité des iPSC à réparer des dommages à leur ADN est encore inconnue et si cette aptitude ne s'acquiert qu'avec la différenciation des cellules, l'efficacité de cette différenciation s'avère d'autant plus importante afin d'offrir aux lignées cellulaires de bonnes possibilités de réparation de leur ADN suite à des dommages. La complexité des différenciations varie beaucoup selon les types cellulaires souhaités et plusieurs de ces cellules ne se multiplient plus lorsqu'elles sont différenciées, ce qui pourrait entraver et prolonger considérablement les recherches si ces vérifications devaient s'avérer nécessaires.

Par contre, si p53 s'avère fonctionnel au niveau de la cellule iPS elle-même, les risques reliés à la différenciation incomplète des cellules s'amointrissent. Il est connu que l'irradiation induit des changements importants dans les cellules irradiées, mais aussi dans les cellules qui sont en communication avec les cellules irradiées ¹³¹. Il serait donc intéressant de vérifier la capacité de réparation de l'ADN des différentes populations de fibroblastes après un arrêt de croissance induit par l'oncogène RAS, par exemple.

Quelques variations existent entre les deux populations de fibroblastes, que ce soit au niveau de l'intensité des marqueurs de surface ou dans leur réponse aux dommages à l'ADN. Les fibroblastes qui sont dérivés des cellules iPS semblent répondre de manière plus efficace aux dommages à l'ADN, mais expriment moins le marqueur FSP-1, par exemple. Les cellules ont été conservées longtemps en culture, ce qui pourrait expliquer certaines variations puisqu'il est possible qu'elles aient acquis des mutations lors de la culture cellulaire. Des mutations dans des gènes suppresseurs de tumeurs ne sont pas à exclure, autant du côté des fibroblastes originaux que du côté des fibroblastes dérivés d'iPSC, mais peu probables puisque les deux populations répondent généralement assez bien aux dommages à l'ADN. Puisque les séquences des gènes suppresseurs de tumeurs sont connues, il serait intéressant de séquencer les génomes des deux populations en les comparant aux populations d'origine à faible passage. L'analyse du caryotype des deux populations (PD 12-15) n'a démontré aucune anomalie, mais le séquençage demeure un outil puissant afin de détecter des mutations génétiques. Puisqu'il est également connu que certaines conditions de culture (l'ajout d'antibiotiques, par exemple) ¹³² peuvent influencer le patrimoine épigénétique des cellules, un séquençage de la méthylation de l'ADN pourrait également être effectué sur les deux populations.

Conclusions

Pour conclure, il semblerait que les populations de fibroblastes dérivées de cellules souches pluripotentes induites sont très proches, morphologiquement, des cellules provenant de la biopsie. De plus, des marqueurs de fibroblastes comme vimentine, FSP-1 ou CD44 ne semblent être exprimés que par les deux populations de fibroblastes alors que les iPSC expriment plutôt

des marqueurs de pluripotence comme SSEA4 et TRA-1-60. Pour ce qui est des profils obtenus par l'incorporation du BrdU après une irradiation à 2,5 ou 5 Gy, les fibroblastes dérivés d'iPSC arrêtent plus efficacement de croître lorsqu'ils sont comparés aux cellules d'origine. Les deux populations semblent également répondre de la même façon aux dommages à l'ADN puisque les comptes de foyers de réparation sont similaires dans le temps et que les profils se ressemblent beaucoup d'une population à l'autre. L'expression de p21 semble augmenter davantage dans les populations cellulaires dérivées d'iPSC, ce qui pourrait vouloir dire qu'elles seraient tout autant susceptibles que les populations d'origine d'arrêter de croître après des dommages conséquents à l'ADN. Les fibroblastes dérivés d'iPSC semblent néanmoins posséder des mécanismes de réparation de l'ADN intacts.

BIBLIOGRAPHIE

1. Gage, F.H. Cell therapy. *Nature* **392**, 18-24 (1998).
2. Tyler, H.R. & Tyler, K.L. Charles Edouard Brown-Sequard: professor of physiology and pathology of the nervous system at Harvard Medical School. *Neurology* **34**, 1231- 1236 (1984).
3. Miller, N.L. & Fulmer, B.R. Injection, ligation and transplantation: the search for the glandular fountain of youth. *J Urol* **177**, 2000-2005 (2007).
4. Graham, J.M. William Harvey and the early days of blood transfusion. *Edinb Med J* **60**, 65-76 (1953).
5. Yaddanapudi, S. & Yaddanapudi, L. Indications for blood and blood product transfusion. *Indian J Anaesth* **58**, 538-542 (2014).
6. Hauben, D.J., Baruchin, A. & Mahler, A. On the history of the free skin graft. *Ann Plast Surg* **9**, 242-245 (1982).
7. Henig, I. & Zuckerman, T. Hematopoietic stem cell transplantation-50 years of evolution and future perspectives. *Rambam Maimonides Med J* **5**, e0028 (2014).
8. Nemet, D. [Autologous bone marrow transplantation--a new approach in the treatment of neoplastic hematologic diseases. I. Scientific principles and methodology of the treatment]. *Lijec Vjesn* **111**, 466-474 (1989).
9. Pas, H.I., *et al.* Stem cell injections in knee osteoarthritis: a systematic review of the literature. *Br J Sports Med* **51**, 1125-1133 (2017).
10. Bielec, B. & Stojko, R. [Stem cells of umbilical blood cord - therapeutic use]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* **69**, 853-863 (2015).
11. Morrison, C. Fresh from the biotech pipeline-2016. *Nat Biotechnol* **35**, 108-112 (2017).
12. Sullenger, B.A. & Nair, S. From the RNA world to the clinic. *Science* **352**, 1417-1420 (2016).
13. Usmani, S.S., *et al.* THPdb: Database of FDA-approved peptide and protein therapeutics. *PLoS One* **12**, e0181748 (2017).
14. Sharfstein, S.T. Non-protein biologic therapeutics. *Curr Opin Biotechnol* **53**, 65-75 (2017).
15. Zhang, J., *et al.* Transplantation of CREG modified embryonic stem cells improves cardiac function after myocardial infarction in mice. *Biochem Biophys Res Commun* (2018).
16. Sundberg, M. & Isacson, O. Advances in stem-cell--generated transplantation therapy for Parkinson's disease. *Expert Opin Biol Ther* **14**, 437-453 (2014).
17. Ma, H., Wert, K.J., Shvartsman, D., Melton, D.A. & Jaenisch, R. Establishment of human pluripotent stem cell-derived pancreatic beta-like cells in the mouse pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, 3924-3929 (2018).
18. Thomson, J.A., *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**, 1145-1147 (1998).

19. Hentze, H., Graichen, R. & Colman, A. Cell therapy and the safety of embryonic stem cell-derived grafts. *Trends Biotechnol* **25**, 24-32 (2007).
20. Keller, G. Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. *Genes Dev* **19**, 1129-1155 (2005).
21. Vogel, G. Cell biology. Ready or not? Human ES cells head toward the clinic. *Science* **308**, 1534-1538 (2005).
22. Ideguchi, M., Palmer, T.D., Recht, L.D. & Weimann, J.M. Murine embryonic stem cell-derived pyramidal neurons integrate into the cerebral cortex and appropriately project axons to subcortical targets. *J Neurosci* **30**, 894-904 (2010).
23. Fu, X., Cui, K., Yi, Q., Yu, L. & Xu, Y. DNA repair mechanisms in embryonic stem cells. *Cell Mol Life Sci* **74**, 487-493 (2017).
24. Cowan, C.A., *et al.* Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. *N Engl J Med* **350**, 1353-1356 (2004).
25. Reubinoff, B.E., Pera, M.F., Fong, C.Y., Trounson, A. & Bongso, A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol* **18**, 399-404 (2000).
26. Dhar, D. & Hsi-En Ho, J. Stem cell research policies around the world. *Yale J Biol Med* **82**, 113-115 (2009).
27. Murray, F. & Spar, D. Bit player or powerhouse? China and stem-cell research. *N Engl J Med* **355**, 1191-1194 (2006).
28. Leite, M. Cell biology. Overcoming opposition, Brazil banks on stem cells. *Science* **324**, 26 (2009).
29. Boyd, A.S., Rodrigues, N.P., Lui, K.O., Fu, X. & Xu, Y. Concise review: Immune recognition of induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* **30**, 797-803 (2012).
30. Brivanlou, A.H., *et al.* Stem cells. Setting standards for human embryonic stem cells. *Science* **300**, 913-916 (2003).
31. Wesselschmidt, R.L. The teratoma assay: an in vivo assessment of pluripotency. *Methods Mol Biol* **767**, 231-241 (2011).
32. Wang, Y., *et al.* Long-term cultured mesenchymal stem cells frequently develop genomic mutations but do not undergo malignant transformation. *Cell Death Dis* **4**, e950 (2013).
33. Rosler, E.S., *et al.* Long-term culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions. *Dev Dyn* **229**, 259-274 (2004).
34. Xie, X., *et al.* Effects of long-term culture on human embryonic stem cell aging. *Stem Cells Dev* **20**, 127-138 (2011).
35. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663-676 (2006).
36. Yamanaka, S. Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **1**, 39-49 (2007).
37. Zhao, T., Zhang, Z.N., Rong, Z. & Xu, Y. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature* **474**, 212-215 (2011).
38. Okita, K., Nagata, N. & Yamanaka, S. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Circ Res* **109**, 720-721 (2011).
39. Kruse, V., *et al.* Human Induced Pluripotent Stem Cells Are Targets for Allogeneic and Autologous Natural Killer (NK) Cells and Killing Is Partly Mediated by the Activating NK Receptor DNAM-1. *PLoS One* **10**, e0125544 (2015).

40. de Almeida, P.E., *et al.* Transplanted terminally differentiated induced pluripotent stem cells are accepted by immune mechanisms similar to self-tolerance. *Nat Commun* **5**, 3903 (2014).
41. Araki, R., *et al.* Negligible immunogenicity of terminally differentiated cells derived from induced pluripotent or embryonic stem cells. *Nature* **494**, 100-104 (2013).
42. Guha, P., Morgan, J.W., Mostoslavsky, G., Rodrigues, N.P. & Boyd, A.S. Lack of immune response to differentiated cells derived from syngeneic induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **12**, 407-412 (2013).
43. Morizane, A., *et al.* Direct comparison of autologous and allogeneic transplantation of iPSC-derived neural cells in the brain of a non-human primate. *Stem Cell Reports* **1**, 283-292 (2013).
44. Tennessen, J.A., *et al.* Evolution and functional impact of rare coding variation from deep sequencing of human exomes. *Science* **337**, 64-69 (2012).
45. Nelson, M.R., *et al.* An abundance of rare functional variants in 202 drug target genes sequenced in 14,002 people. *Science* **337**, 100-104 (2012).
46. Eiges, R., *et al.* Developmental study of fragile X syndrome using human embryonic stem cells derived from preimplantation genetically diagnosed embryos. *Cell Stem Cell* **1**, 568-577 (2007).
47. Bradley, C.K., *et al.* Derivation of Huntington's disease-affected human embryonic stem cell lines. *Stem Cells Dev* **20**, 495-502 (2011).
48. Kim, C., *et al.* Studying arrhythmogenic right ventricular dysplasia with patient-specific iPSCs. *Nature* **494**, 105-110 (2013).
49. McGonigle, P. & Ruggeri, B. Animal models of human disease: challenges in enabling translation. *Biochem Pharmacol* **87**, 162-171 (2014).
50. Kim, C. Disease modeling and cell based therapy with iPSC: future therapeutic option with fast and safe application. *Blood Res* **49**, 7-14 (2014).
51. Kim, C. iPSC technology--Powerful hand for disease modeling and therapeutic screen. *BMB Rep* **48**, 256-265 (2015).
52. Soldner, F. & Jaenisch, R. Medicine. iPSC disease modeling. *Science* **338**, 1155-1156 (2012).
53. Hsu, P.D., Lander, E.S. & Zhang, F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* **157**, 1262-1278 (2014).
54. Kaufmann, K.B., Buning, H., Galy, A., Schambach, A. & Grez, M. Gene therapy on the move. *EMBO Mol Med* **5**, 1642-1661 (2013).
55. Vogenberg, F.R., Isaacson Barash, C. & Pursel, M. Personalized medicine: part 1: evolution and development into theranostics. *P T* **35**, 560-576 (2010).
56. Inak, G., *et al.* Concise Review: Induced Pluripotent Stem Cell-Based Drug Discovery for Mitochondrial Disease. *Stem Cells* **35**, 1655-1662 (2017).
57. Khurana, V., Tardiff, D.F., Chung, C.Y. & Lindquist, S. Toward stem cell-based phenotypic screens for neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurol* **11**, 339-350 (2015).
58. Shi, Y., Inoue, H., Wu, J.C. & Yamanaka, S. Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress. *Nat Rev Drug Discov* **16**, 115-130 (2017).
59. Doyle, M.J., *et al.* Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes as a Model for Heart Development and Congenital Heart Disease. *Stem Cell Rev* **11**, 710-727 (2015).

60. Singh, V.K., Kalsan, M., Kumar, N., Saini, A. & Chandra, R. Induced pluripotent stem cells: applications in regenerative medicine, disease modeling, and drug discovery. *Front Cell Dev Biol* **3**, 2 (2015).
61. Hansel, M.C., *et al.* The Use of Induced Pluripotent Stem Cells for the Study and Treatment of Liver Diseases. *Curr Protoc Toxicol* **67**, 14 13 11-14 13 27 (2016).
62. Mandai, M., Kurimoto, Y. & Takahashi, M. Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *N Engl J Med* **377**, 792-793 (2017).
63. Davis, R.L., Weintraub, H. & Lassar, A.B. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* **51**, 987-1000 (1987).
64. Xie, H., Ye, M., Feng, R. & Graf, T. Stepwise reprogramming of B cells into macrophages. *Cell* **117**, 663-676 (2004).
65. Laiosa, C.V., Stadtfeld, M., Xie, H., de Andres-Aguayo, L. & Graf, T. Reprogramming of committed T cell progenitors to macrophages and dendritic cells by C/EBP alpha and PU.1 transcription factors. *Immunity* **25**, 731-744 (2006).
66. Zhou, Q., Brown, J., Kanarek, A., Rajagopal, J. & Melton, D.A. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature* **455**, 627-632 (2008).
67. Vierbuchen, T., *et al.* Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* **463**, 1035-1041 (2010).
68. Tokuzawa, Y., *et al.* Fbx15 is a novel target of Oct3/4 but is dispensable for embryonic stem cell self-renewal and mouse development. *Mol Cell Biol* **23**, 2699-2708 (2003).
69. Stadtfeld, M. & Hochedlinger, K. Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. *Genes Dev* **24**, 2239-2263 (2010).
70. Miller, D.M., Thomas, S.D., Islam, A., Muench, D. & Sedoris, K. c-Myc and cancer metabolism. *Clin Cancer Res* **18**, 5546-5553 (2012).
71. Takahashi, K., *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**, 861-872 (2007).
72. Yu, J., *et al.* Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* **318**, 1917-1920 (2007).
73. Park, I.H., Lerou, P.H., Zhao, R., Huo, H. & Daley, G.Q. Generation of human- induced pluripotent stem cells. *Nat Protoc* **3**, 1180-1186 (2008).
74. Li, W., *et al.* Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors. *Cell Stem Cell* **4**, 16-19 (2009).
75. Liu, H., *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts. *Cell Stem Cell* **3**, 587-590 (2008).
76. Robinson, H.L. Retroviruses and cancer. *Rev Infect Dis* **4**, 1015-1025 (1982).
77. Blattner, W.A. Human retroviruses: their role in cancer. *Proc Assoc Am Physicians* **111**, 563-572 (1999).
78. Lei, H., *et al.* De novo DNA cytosine methyltransferase activities in mouse embryonic stem cells. *Development* **122**, 3195-3205 (1996).
79. Matsui, T., *et al.* Proviral silencing in embryonic stem cells requires the histone methyltransferase ESET. *Nature* **464**, 927-931 (2010).
80. Mikkelsen, T.S., *et al.* Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature* **454**, 49-55 (2008).
81. Sridharan, R., *et al.* Role of the murine reprogramming factors in the induction of pluripotency. *Cell* **136**, 364-377 (2009).

82. Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T. & Yamanaka, S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* **322**, 949-953 (2008).
83. Brambrink, T., *et al.* Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell Stem Cell* **2**, 151-159 (2008).
84. Stadtfeld, M., *et al.* Aberrant silencing of imprinted genes on chromosome 12qF1 in mouse induced pluripotent stem cells. *Nature* **465**, 175-181 (2010).
85. Carey, B.W., *et al.* Reprogramming of murine and human somatic cells using a single polycistronic vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 157-162 (2009).
86. Stadtfeld, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G. & Hochedlinger, K. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* **322**, 945-949 (2008).
87. Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K. & Hasegawa, M. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* **85**, 348-362 (2009).
88. Kaji, K., *et al.* Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature* **458**, 771-775 (2009).
89. Soldner, F., *et al.* Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell* **136**, 964-977 (2009).
90. Woltjen, K., *et al.* piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* **458**, 766-770 (2009).
91. Yusa, K., Rad, R., Takeda, J. & Bradley, A. Generation of transgene-free induced pluripotent mouse stem cells by the piggyBac transposon. *Nat Methods* **6**, 363-369 (2009).
92. Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature* **386**, 761, 763 (1997).
93. Lin, Y.C., *et al.* Role of tumor suppressor genes in the cancer-associated reprogramming of human induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res Ther* **5**, 58 (2014).
94. Sherr, C.J. Principles of tumor suppression. *Cell* **116**, 235-246 (2004).
95. Markowitz, S. DNA repair defects inactivate tumor suppressor genes and induce hereditary and sporadic colon cancers. *J Clin Oncol* **18**, 75S-80S (2000).
96. Hanahan, D. & Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70 (2000).
97. Hanahan, D. & Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674 (2011).
98. Ruzankina, Y., *et al.* Deletion of the developmentally essential gene ATR in adult mice leads to age-related phenotypes and stem cell loss. *Cell Stem Cell* **1**, 113-126 (2007).
99. Lee, J.Y., *et al.* mTOR activation induces tumor suppressors that inhibit leukemogenesis and deplete hematopoietic stem cells after Pten deletion. *Cell Stem Cell* **7**, 593-605 (2010).
100. Gore, A., *et al.* Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature* **471**, 63-67 (2011).
101. Mayshar, Y., *et al.* Identification and classification of chromosomal aberrations in human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **7**, 521-531 (2010).
102. Lister, R., *et al.* Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature* **471**, 68-73 (2011).

103. Rasmussen, M.A., *et al.* Transient p53 suppression increases reprogramming of human fibroblasts without affecting apoptosis and DNA damage. *Stem Cell Reports* **3**, 404- 413 (2014).
104. Marion, R.M., *et al.* A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity. *Nature* **460**, 1149-1153 (2009).
105. Sarig, R., *et al.* Mutant p53 facilitates somatic cell reprogramming and augments the malignant potential of reprogrammed cells. *J Exp Med* **207**, 2127-2140 (2010).
106. Kawamura, T., *et al.* Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature* **460**, 1140-1144 (2009).
107. Hong, H., *et al.* Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53- p21 pathway. *Nature* **460**, 1132-1135 (2009).
108. Brown, C.J., Lain, S., Verma, C.S., Fersht, A.R. & Lane, D.P. Awakening guardian angels: drugging the p53 pathway. *Nat Rev Cancer* **9**, 862-873 (2009).
109. Knudson, A.G. Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer* **1**, 157-162 (2001).
110. Li, J. & Xu, X. DNA double-strand break repair: a tale of pathway choices. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **48**, 641-646 (2016).
111. Espejel, S., *et al.* Mammalian Ku86 mediates chromosomal fusions and apoptosis caused by critically short telomeres. *EMBO J* **21**, 2207-2219 (2002).
112. Lieber, M.R. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu Rev Biochem* **79**, 181-211 (2010).
113. Li, X. & Heyer, W.D. Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res* **18**, 99-113 (2008).
114. Burridge, P.W., *et al.* Chemically defined generation of human cardiomyocytes. *Nat Methods* **11**, 855-860 (2014).
115. Si-Tayeb, K., *et al.* Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells. *Hepatology* **51**, 297-305 (2010).
116. Huang, S.X., *et al.* Efficient generation of lung and airway epithelial cells from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* **32**, 84-91 (2014).
117. Karumbayaram, S., *et al.* Directed differentiation of human-induced pluripotent stem cells generates active motor neurons. *Stem Cells* **27**, 806-811 (2009).
118. Maffioletti, S.M., *et al.* Efficient derivation and inducible differentiation of expandable skeletal myogenic cells from human ES and patient-specific iPS cells. *Nat Protoc* **10**, 941-958 (2015).
119. Heslop, J.A., *et al.* Donor-Dependent and Other Nondefined Factors have Greater Influence on the Hepatic Phenotype than the Starting Cell Type in Induced Pluripotent Stem Cell Derived Hepatocyte-Like Cells. *Stem Cells Transl Med* **6**, 1751 (2017).
120. Meissner, A., Wernig, M. & Jaenisch, R. Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* **25**, 1177-1181 (2007).
121. Goodpaster, T., *et al.* An immunohistochemical method for identifying fibroblasts in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *J Histochem Cytochem* **56**, 347-358 (2008).
122. Wray, S., *et al.* Creation of an open-access, mutation-defined fibroblast resource for neurological disease research. *PLoS One* **7**, e43099 (2012).

123. Osterreicher, C.H., *et al.* Fibroblast-specific protein 1 identifies an inflammatory subpopulation of macrophages in the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 308-313 (2011).
124. Hong, N., Kim, M.H., Min, C.K., Kim, H.J. & Lee, J.H. The co-expression of Neogenin with SOX2 in hippocampal neurons. *Biochem Biophys Res Commun* **490**, 453-459 (2017).
125. Quintanilla, R.H., Jr., Asprer, J.S., Vaz, C., Tanavde, V. & Lakshmipathy, U. CD44 is a negative cell surface marker for pluripotent stem cell identification during human fibroblast reprogramming. *PLoS One* **9**, e85419 (2014).
126. De Bont, R. & van Larebeke, N. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis* **19**, 169-185 (2004).
127. Le, W., *et al.* Low-dose ionizing irradiation triggers a 53BP1 response to DNA double strand breaks in mouse spermatogonial stem cells. *Syst Biol Reprod Med* **62**, 106-113 (2016).
128. Ge, Q., *et al.* Minimal-length short hairpin RNAs: the relationship of structure and RNAi activity. *RNA* **16**, 106-117 (2010).
129. Leontieva, O.V., Demidenko, Z.N. & Blagosklonny, M.V. Contact inhibition and high cell density deactivate the mammalian target of rapamycin pathway, thus suppressing the senescence program. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 8832-8837 (2014).
130. Itahana, Y., *et al.* Histone modifications and p53 binding poise the p21 promoter for activation in human embryonic stem cells. *Sci Rep* **6**, 28112 (2016).
131. Sabin, R.J. & Anderson, R.M. Cellular Senescence - its role in cancer and the response to ionizing radiation. *Genome Integr* **2**, 7 (2011).
132. Nestor, C.E. *et al.* Rapid reprogramming of epigenetic and transcriptional profiles in mammalian culture systems. *Genome Biol* **16** (1):11 (2015).