

Université de Montréal

**Étude des conséquences fonctionnelles de la mutation
SGO1 K23E sur la voie de signalisation TGF- β**

par
Natacha Gosset

Département de Biochimie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade de Maître de Science (M.Sc.)

Juin, 2017

© Natacha Gosset, 2017

RÉSUMÉ

Nous avons identifié un nouveau syndrome d'arythmie généralisée rare dans la population franco-canadienne, CAID syndrome (Chronic Atrial and Intestinal Dysrhythmia) causé par une mutation fondatrice récessive dans le gène Shugoshin-like 1 (*SGO1*). La mutation change une lysine par un acide glutamique à la position 23. Les patients affectés souffrent d'une maladie du nœud sinusal et d'une pseudo-obstruction intestinale chronique. À ce jour, c'est la seule pathologie affectant à la fois le pacemaker cardiaque et le pacemaker intestinal.

Nous avons montré que la mutation *SGO1* K23E stimule la voie de signalisation TGF- β , qui est impliquée dans de très nombreux processus biologiques, et dont le rôle de *SGO1* dans celle-ci reste inconnu. Une étude a identifié la protéine BUB1, impliquée dans la localisation centromérique de *SGO1*, comme régulatrice de la voie TGF- β (2015). Ce qui suggère une implication possible de *SGO1* dans ce processus.

L'objectif de ce projet de Maîtrise est de caractériser ce nouveau rôle de *SGO1* lors du développement du nœud sinusal, ainsi que l'impact de la mutation K23E. L'état de phosphorylation de protéines impliquées dans cette voie TGF- β a été quantifié dans des fibroblastes de peau de patients et de sujets témoins, par la technologie ALPHA (Amplified Luminescence Proximity Homogenous Assay), et les résultats révèlent que la mutation K23E engendre une augmentation de la voie canonique et une inhibition de la voie non-canonique de TGF- β .

Mots-clés : *Syndrome CAID – Maladie du Nœud Sinusal – Pseudo-Obstruction Intestinale Chronique – Protéine SGO1 – Cohésinopathie — Signalisation TGF- β – Cellules hiPS – Différenciation cardiaque – Quantification protéique*

ABSTRACT

We recently identified a novel generalized dysrhythmia syndrome in the French-Canadian population that we termed CAID syndrome (Chronic Atrial and Intestinal Dysrhythmia), caused by a recessive homozygous mutation in the gene Shugoshin-like 1 (*SGO1*). The mutation changes a lysine by a glutamic acid at the position 23. All patients have sick sinus syndrome as well as chronic intestinal pseudo-obstruction, making it the first generalized pace making syndrome affecting both the cardiac and the intestinal pacemaker.

We previously have shown that the *SGO1* K23E mutation affect the TGF- β signaling pathway, which is involved in many crucial biological process, although the role of *SGO1* in this pathway has not been well characterized. A study identified the BUB1 protein involved in the centromeric localization of *SGO1*, as regulator of this pathway (2015). This suggests a possible implication of *SGO1* in this process.

The objective of this Master project is to characterize this new role of *SGO1* during the sinus node development, and the impact of the K23E mutation. The phosphorylation state of some proteins involved in this TGF- β pathway has been quantified in skin fibroblasts of both patients and controls, by using the ALPHA technology (Amplified Luminescence Proximity Homogenous Assay), and the results reveal that the K23E mutation induces an increase of the canonical TGF- β pathway and also, an inhibition of the non-canonical pathway.

Keywords: *CAID syndrome – Sick Sinus Syndrome– Chronic and Intestinal Pseudo-Obstruction – SGO1 protein – Cohesinopathy— TGF- β signaling – hiPS cells – Cardiac differentiation – Protein quantification*

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	i
ABSTRACT	ii
TABLE DES MATIÈRES	iii
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xi
REMERCIEMENTS.....	xv
INTRODUCTION	1
REVUE DE LA LITTÉRATURE	2
1. Le syndrome CAID.....	2
1.1. Le Nœud sinusal et la Maladie du nœud sinusal.....	3
1.1.1. De l'Embryogenèse à la Cardiogenèse	3
1.1.2. Le Développement du nœud sinusal	7
1.1.3. La Maladie du nœud sinusal	9
1.2. La Pseudo-Obstruction Intestinale Chronique	9
1.2.1. Les cellules de Cajal	9
1.2.2. La Pseudo-Obstruction Intestinale Chronique	10
2. Le complexe cohésine et les cohésinopathies	11
2.1. Le complexe cohésine.....	11
2.2. Les cohésinopathies	12
3. La protéine SGO1	13
3.1. Rôle et généralités.....	13
3.2. Pathologies associées	15
3.3. SGO1 et la Cardiogenèse	15
4. Les cellules souches à pluripotence induite	17
5. La voie de signalisation TGF- β	20
5.1. La voie canonique de TGF- β	21

5.2. Voie non canonique	22
5.3. Interaction voies canoniques et non-canonique	23
5.4. SGO1 : nouvel acteur de la voie de signalisation TGF- β ?.....	24
HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS.....	26
MATÉRIELS	29
1. Cellules humaines	29
1.1. Cellules souches embryonnaires	29
1.2. Cellules primaires : Fibroblastes de peau	29
1.3. Lignées cellulaires	29
2. Plasmides et constructions « silencing ».....	30
2.1. Plasmides	30
2.2. shRNA et siRNA.....	31
3. Anticorps.....	32
4. Amorces qPCR relative en temps réel	33
5. Réactifs	34
MÉTHODES.....	36
1. Culture cellulaire.....	36
1.1. Cellules primaires : Fibroblastes et biopsies.....	36
1.2. Lignées cellulaires	38
1.3. Cellules souches embryonnaires	38
1.3.1. Reprogrammation	38
1.3.2. Maintenance hiPSc et HuES9	39
1.3.2.1. Culture sur Matrigel® : « Feeder-free »	39
1.3.2.2. Culture sur MEF : « Feeder dependant »	40
1.4. Test de détection de contamination aux Mycoplasmes.....	41
2. La différenciation cardiaque	42
2.1. Kit « ready-to-use » de Life Technologies™.....	42
2.2. Protocole de différenciation cardiaque	43
2.3. Différenciation en cellules du nœud sinusal	46
3. Isolation et individualisation de cellules cardiaques.....	46

4.	Clonage et lentivirus	47
4.1.	Clonage par recombinaison Gateway™	47
4.2.	Production de lentivirus	48
5.	Profil d'activation de la voie TGF-β : Dual-Luciferase assay	48
6.	Profil d'inhibition de la voie TGF-β : BTR reporter	49
7.	Quantification des phosphoprotéines : AlphaScreen™	51
8.	Expression génique : qPCR relative en temps réel	53
9.	Expression protéique.....	54
9.1.	Immunomarquage cellulaire (immunocytochimie).....	54
9.2.	Immunoblot (western blot)	55
10.	Analyses statistiques	56
RÉSULTATS.....		57
1.	Différenciation cardiaque des cellules souches embryonnaires.....	57
1.1.	Reprogrammation cellulaire et maintenance des cellules.....	57
1.2.	Différenciation cardiaque.....	61
1.1.1.	Validation du potentiel de différenciation des HuES9	61
1.1.2.	Différenciation cardiaque des HuES9.....	66
1.1.1.1.	Morphologie cellulaire.....	66
1.1.1.2.	Caractérisation génique.....	68
2.	Etude de la voie de signalisation TGF-β.....	74
2.1.	Profil d'activation	74
2.1.1.	Expression de SBE_Luc : Dual-Luciferase assay.....	75
2.1.2.	Validation par immunomarquages	77
2.1.3.	Test d'expression CAGA12_Luc et CAGA12_Luc	79
2.2.	Profil d'inhibition : BTR reporter	81
2.2.1.	Validation du système : réponse cellulaire	81
2.2.2.	Validation de la surexpression de SGO1	83
2.2.3.	Effet de SGO1 sauvage et mutée K23E.....	84
2.2.3.1.	Validation de l'innocuité du vecteur vide pLex_307.....	84
2.2.3.2.	Effet de SGO1 sauvage ou K23E.....	86

2.3.	État de la Phosphorylation des protéines : AlphaScreen™	92
2.3.1.	Effet de la mutation SGO1 K23E sur la voie canonique	93
2.3.2.	Effet de la mutation SGO1 K23E sur la voie non-canonique	96
DISCUSSION ET PERSPECTIVES		105
MÉCANISME PROPOSÉ		110
RÉFÉRENCES		i
ANNEXES		xviii

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Comparaison des quatre types de cellules souches selon leur potentiel de différenciation.	18
Tableau II : Augmentation de pSMAD2/3 chez les patients CAID.	26
Tableau III: Liste des plasmides utilisés.	30
Tableau IV: Liste des siRNA SGO1 et contrôles.	31
Tableau V: Anticorps primaires.	32
Tableau VI : Anticorps secondaires.	32
Tableau VII: Amorces humaines qPCR relative en temps réel.	33
Tableau VIII: Réactifs utilisés.	34
Tableau IX: Comparaison du syndrome CAID avec les syndromes de Marfan et de Loeys-Dietz, au niveau de la voie de signalisation TGF- β (139).	111

LISTE DES FIGURES

Figure 1: 1 ^{ère} semaine de développement embryonnaire humain, adaptée de (5).	4
Figure 2: Développement et régulation de la cardiogenèse, adaptée de (7).	5
Figure 3: Cardiogenèse et voies de signalisation, adaptée de (9).	7
Figure 4: Voies moléculaires régulant le développement du nœud sinusal, adaptée de (11). ...	8
Figure 5 : Le complexe cohésine et ses protéines associées, adaptée de (45).	11
Figure 6: Mécanisme moléculaire de la protection centromérique des complexes cohésine dépendant de Shugoshin, adaptée de (2).	14
Figure 7: Voies de signalisation TGF- β et BMPs, adaptée de Cell Signaling Technology®..	20
Figure 8: Résumé et comparaison des protocoles de différenciation cardiaque utilisés.	45
Figure 9: Construction et mécanisme d'action du BTR reporteur, adaptée de (107).	50
Figure 10 : Principe du test AlphaScreen® SureFire® Ultra™ assay, adaptée de Perkin Elmer.	52
Figure 11: Morphologie des HuES9 cultivées sur une matrice de Matrigel® ou de MEF.....	58
Figure 12: Morphologie de fibroblastes de peau d'un sujet témoin et d'un patient CAID en cours de reprogrammation.	59
Figure 13: Morphologie d'une lignée hiPS d'un sujet témoin en différenciation spontanée. .	60
Figure 14: Morphologie des HuES9 à différents stades de différenciation cardiaque (Protocole Life Technologies™).	62
Figure 15: Potentiel de différenciation cardiaque des HuES9.	63
Figure 16: Expression des protéines cardiaques NKX2.5 et cTNT dans des cardiomyocytes dérivées de HuES9 au 14 ^{ème} jour de différenciation.	64
Figure 17: Morphologie des cellules cardiaques isolées par digestion enzymatique.	65
Figure 18: Morphologie des HuES9 à différents stades de différenciation cardiaque (Protocole Dr Pucéat).	67
Figure 19 : Expression des gènes de pluripotence (<i>NANOG</i> et <i>SOX2</i>) des HUES9 en différenciation.	69
Figure 20 : Expression des gènes des trois lignages embryonnaires endoderme (<i>FOXA1</i>), ectoderme (<i>FOXA3</i>) et mésoderme (<i>ISL1</i>) des HUES9 en différenciation.	70

Figure 21 : Expression des gènes du mésoderme (<i>T</i> et <i>MESPI</i>) des HUES9 en différenciation.	70
Figure 22: Expression des gènes du stade progéniteurs cardiaques (<i>MEF2C</i> et <i>NKX2.5</i>) des HUES9 en différenciation.	71
Figure 23: Expression des gènes cardiaques (<i>GATA4</i> et <i>TNNT2</i>) des HUES9 en différenciation.	71
Figure 24: Expression de <i>SSEA1</i> (<i>CD15</i>) des HUES9 en différenciation.	72
Figure 25: Expression de <i>SGO1</i> des HUES9 en différenciation.	73
Figure 26 : Expression relative du plasmide SBE_Luc (Firefly Luciferase) dans des HEK 293T, normalisée avec la Renilla Luciferase (pRT-LK).	75
Figure 27 : Expressions relatives des plasmides pRT-LK (Renilla Luciférase) et SBE_Luc (Firefly Luciférase).	76
Figure 28: Expression et quantification protéiques des HEK 293T du test « Dual-Luciferase assay » (Figure 27).	78
Figure 29: Activités Luciferase relatives et immunoblot des plasmides CAGA12_Luc et SBE4_Luc des HEK 293T traitées avec 10ng/mL de TGF- β 1 pendant 24 heures.	80
Figure 30: Réponse des cellules A549_BTR à la stimulation par le TGF- β 1 et le SB431542, avec 0% ou 0,5% de sérum, dans le temps.	82
Figure 31: Immunoblot des cellules A549_BTR transfectées avec les différentes isoformes de SGO1.	83
Figure 32: Test d'innocuité du vecteur pLex_307 dans les cellules A549_BTR traitées avec du TGF- β 1 et/ou du SB431542.	85
Figure 33: Effet de la surexpression de SGO1 WT ou K23E sur les A549_BTR traitées avec du SB431542 et/ du TGF- β 1, normalisation avec pLex_307.	87
Figure 34: Effet de la surexpression de SGO1 K23E sur les A549_BTR traitées avec du SB431542 et/ du TGF- β 1, normalisation avec SGO1 WT.	90
Figure 35: Quantification de pSMAD3 des fibroblastes WT et K23E aux passages 8 et 14, traitées avec du TGF- β 1.	95
Figure 36: Quantification de phospho-p38 MAPK et de p38 MAPK total des fibroblastes WT et K23E aux passages 8 et 14, traitées avec du TGF- β 1.	98

Figure 37: Quantification de phospho-ERK1/2 et de ERK1/2 total des fibroblastes WT et K23E aux passages 8 et 14, traitées avec du TGF- β 1..... 101

Figure 38: Quantification de phospho-JNK1/2/3 des fibroblastes WT et K23E aux passages 8 et 14, traitées avec du TGF- β 1..... 103

Figure 39: Mécanisme proposé de l'impact de la mutation SGO1 K23E sur la voie de signalisation TGF- β , adaptée de (140)..... 110

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AANE/NEAA: Acides Aminés Non Essentiels, Non Essential Amino Acids

ACTRII: Activin Receptor II

ADN: Acide Désoxyribonucléique

ALK: Activin receptor-Like Kinase

ALPHA: Amplifier Luminescence Proximity Homogeneous Assay

ARN/RNA: Acide Ribonucléique, Ribonucleic Acid

BMP: Bone Morphogenic Protein

BMPRII: BMP receptor II

BTR: Bioluminescence TGF- β Receptor 1

CAID: Chronic Atrial and Intestinal Dysrhythmia

CdLS: Cornelia de Lange Syndrome

CTCF: CCCTC-binding factor

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO: DiMéthylSulfOxyde

EDTA: Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid

FBS: Fœtal Bovine Serum

FGF: Fibroblast Growth Factor

FHF: First Heart Field

FLNA: Filamine A

GDF: Growth and Differentiation Factors

HEK: Human Embryonic Kidney

hiPSc: human induced Pluripotent Stem cells

HP1: Heterochromatin Protein 1

HUES: Human Embryonic Stem cells

Isoformes A2 ET C2: isoformes SGO1 longue (A2) et courte (C2)

IWP2: Inhibitor of Wnt ligand Production 2

KO-DMEM: KnockOut DMEM

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase

MCAK: Mitotic Centromere-Associated Kinesin

MCI: Masse Cellulaire Interne

MEC: Matrice Extra-cellulaire

MEF: Mouse Embryonic Fibroblast

MEK1/2: MAPK kinase Extracellular signal regulated Kinase

MKK3/6/4/7: Mitogen activated protein Kinase Kinase

MNS: Maladie du Nœud Sinusal

MTA: Material Transfert Agreement

NLS: Nuclear Localization Signal

P/S: Penicilline/Streptomycine

POIC: Pseudo-Obstruction Intestinale Chronique

PP2A: Protéine Phosphatase 2A

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

SARA: SMAD Anchor for Receptor Activation

SBE: Smad Binding Element

SGO1: Shugoshin-like 1

SHF: Second Heart Field

SHH: Sonic hedgehog

shRNA: small hairpin RNA

siRNA: small interfering RNA

SMC: Structural Maintenance of Chromosomes

SR: Serum replacement

T: gène codant pour la protéine BRACHYURY

TAK1: TGF- β Associated Kinase

TE: Trophectoderme

TEM: Transition Epithélio-Mésenchymateuse

TGF- β : Transforming Growth Factor β

TGFBRII: TGF- β Receptor II

TNNT2: gène codant pour la Troponine cardiaque de type 2 (cTNT)

TRAF6: TNF Receptor Associated Factor 6).

WT: sauvage

À tous ceux qui m'ont encouragé et accompagné dans ce beau projet

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr Andelfinger pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, pour m'avoir permis de me sentir entourée et accompagnée lors des bons, comme des mauvais moments, et pour m'avoir donné de bonnes adresses à découvrir au Québec.

Je remercie aussi toute l'équipe du Centre de recherche avec qui j'ai passé quatre années enrichissantes, aussi bien sur le plan technique que personnel, et plus particulièrement Jessica Piché qui m'a intégré au sein de sa famille et de ses ami(e)s et qui est devenue une amie très chère.

Je remercie également nos proches collaborateurs, dont le Dr Pucéat qui m'a permis de venir au Québec et qui m'a énormément aidé par ses conseils et expertises.

Et surtout, je remercie infiniment mes parents qui m'ont laissé quitter le nid familial et mon pays d'origine pour poursuivre mes rêves et me permettre de m'épanouir pleinement lors de ces quatre années.

INTRODUCTION

Le corps humain est constitué de différentes cellules qui sont indispensables à son bon fonctionnement *via* la formation des tissus des organes. Parmi ces tissus, deux d'entre-eux doivent se contracter de façon rythmique, et sont présents dans deux organes majeurs: le cœur et les intestins. Chacun de ces organes possède des tissus spécialisés qui stimulent ces contractions régulières: pour le cœur, il s'agit du nœud sinusal, situé dans l'oreillette droite; pour les intestins, ce sont les cellules de Cajal, situées dans la paroi intestinale.

Nous avons identifié le premier syndrome d'arythmie généralisée dans la population franco-canadienne, dans lequel les patients affectés souffrent d'une Maladie du Nœud Sinusal (MNS) associée à une Pseudo-Obstruction Intestinale Chronique (POIC). À ce jour, c'est la seule pathologie affectant à la fois le pacemaker cardiaque et le pacemaker intestinal (1). Ce nouveau syndrome nommé « Chronic Atrial and Intestinal Dysrhythmia » (CAID syndrome), est dû à une mutation fondatrice récessive dans le gène Shugoshin-like 1 (*SGO1*) qui mène à un changement protéique K23E survenant dans un domaine hautement conservé à travers l'évolution.

Les caryotypes d'individus affectés révèlent une apparence caractéristique d'un défaut de cohésion centromérique, identifiant le syndrome CAID comme une nouvelle cohésinopathie. De plus, les fibroblastes de peau de patients montrent une accélération du cycle cellulaire, un haut taux de sénescence et une augmentation de l'activation de la voie TGF- β . Ceci suggère un rôle de *SGO1* dans ce processus, ainsi que dans le développement cardiaque, et plus particulièrement dans le développement du nœud sinusal.

REVUE DE LA LITTÉRATURE

1. Le syndrome CAID

On a identifié un nouveau syndrome caractérisé par une perte progressive de l'activité du pacemaker cardiaque caractéristique de la Maladie du Nœud sinusal (MNS) et une Pseudo-Obstruction Intestinale Chronique (POIC) initialement chez 17 Canadien-français (dont un patient Suédois) (1). Ce syndrome est appelé CAID syndrome (Chronic Atrial and Intestinal Dysrhythmia), et à date 22 patients ont été identifiés.

Tous les patients ont un rythme cardiaque normal à la naissance, comme le montre l'analyse des électrocardiogrammes de deux patients qui ont développé la MNS aux âges de 3 et 6 ans, ce qui suggère un phénotype développemental de la pathologie CAID. En ce qui concerne les symptômes gastro-intestinaux, ceux-ci apparaissent entre 5 et 14 ans, et ne semblent pas être liés avec l'apparition du phénotype cardiaque.

La méthode de « Séquençage de l'Exome Entier » (Whole Exome Sequencing) nous a permis d'identifier une mutation K23E dans le gène *SGOI* chez tous les patients CAID incluant un patient Suédois, et n'a pas été détectée chez plus de 2000 contrôles. Cette mutation mène à un changement d'une lysine hautement conservée dans l'évolution par un acide glutamique, et est prédit comme étant hautement dommageable. Du génotypage à haute-densité associé à des analyses généalogiques nous ont permis de faire le lien entre le patient suédois et les patients Canadien-français : des ancêtres communs de plus de 30 générations ont été identifiés en Europe, ce qui suggère que le syndrome CAID aurait été apporté d'Europe au moment de l'établissement de la Nouvelle France au 17^{ème} siècle.

La seule fonction connue de la protéine SGO1, identifiée avec la mutation K23E chez les patients CAID, est la protection du complexe cohésine lors de la mitose/méiose, et qui se traduit lorsque cette protéine fait défaut, par une instabilité chromosomique menant généralement à l'apparition de cancers du côlon (2-4). Cependant, aucun des patients CAID n'a été diagnostiqué pour ce type de cancer, et ceci malgré le fait que leurs caryotypes (arrangement chromosomique) soient caractéristiques d'un défaut de cohésion centromérique.

Ce qui signifie que le syndrome CAID est une cohésinopathie nouvellement identifiée, et qui propose une nouvelle fonction de la protéine SGO1, qui se situerait au niveau de la voie de signalisation TGF- β , comme le suggère les cultures de fibroblastes de peau de patients qui révèlent une accélération du cycle cellulaire, une sénescence accentuée et une augmentation de l'activation de cette voie de signalisation (1).

1.1.Le Nœud sinusal et la Maladie du nœud sinusal

1.1.1. De l'Embryogenèse à la Cardiogenèse

L'embryogenèse est un mécanisme cellulaire et moléculaire conduisant à la formation de l'embryon *via* une série de divisions du zygote (œuf fécondé), où chaque cellule est appelée blastomère (Figure 1). Cette division débute 24 heures après la fécondation par le stade deux cellules, et à partir du 4^{ème} jour (stade morula, 64 cellules) les cellules situées en périphérie vont former le trophoblaste (paroi) et celles situées au centre, le bouton embryonnaire pour parvenir au 6^{ème} jour au stade blastocyste (de 64 à 128 cellules).



Figure 1: 1^{ère} semaine de développement embryonnaire humain, adaptée de (5).

Le blastocyste est constitué de la Masse Cellulaire Interne (MCI) à l'origine des cellules souches pluripotentes, et du Trophectoderme (TE) à l'origine du placenta (qui va nourrir l'embryon et le protéger de tout rejet immunologique). Ce blastocyste va par la suite s'implanter dans l'utérus pour continuer à se développer, et pour former les 3 feuillets embryonnaires : l'endoderme (formation du tube digestif et du pancréas), l'ectoderme (formation de l'épiderme et du système nerveux), et enfin le mésoderme (formation du squelette, des vaisseaux sanguins et des muscles, dont le cœur).

A partir de la 2^{ème} semaine de développement embryonnaire, la formation du cœur (cardiogenèse) est enclenchée (5). La cardiogenèse est définie comme une formation *de novo* des tissus cardiaques. C'est un mécanisme moléculaire et cellulaire qui mène à la spécification et à l'engagement des progéniteurs cardiaques. Le cœur est le premier organe à se former et à fonctionner chez l'embryon, de ce fait toute anomalie au cours de ce processus peut s'avérer délétère à plus ou moins long terme pour l'embryon, le jeune enfant ou le futur adulte.

Le cœur débute sa formation à partir de deux lignages cardiaques appelés primaire (Champ Cardiaque Primaire ou First Heart Field, FHF) et secondaire (Champ Cardiaque Secondaire ou Second Heart Field, SHF) issus de la fusion des deux régions bilatérales formées au 15^{ème} jour de développement (Figure 2). Ces deux lignages vont former le croissant cardiaque, puis le FHF va donner le tube linéaire cardiaque composé de trois tissus : le myocarde à l'extérieur, l'endocarde sur la couche interne et la gelée cardiaque entre les deux. Le SHF va former les pôles veineux et artériels et engendrer la fermeture du tube pour former *in fine* les chambres cardiaques.

Pour permettre au cœur d'obtenir sa morphologie mature, le tube linéaire doit subir une courbure vers la droite qui est indispensable au développement cardiaque. Les segments cardiaques primitifs (les ventricules droit et gauche, le canal atrioventriculaire et le tronc artériel) commencent alors à se démarquer, puis le cœur continue sa formation (6).

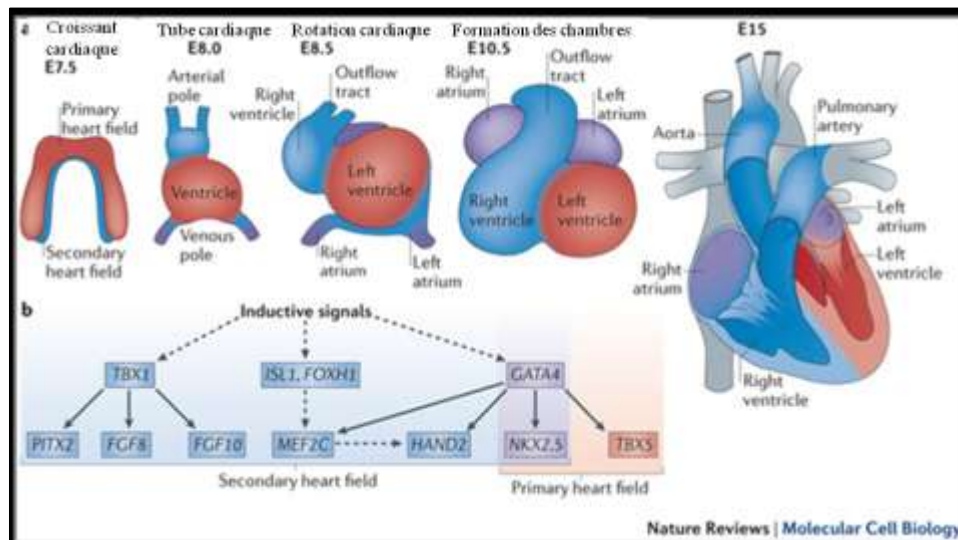


Figure 2: Développement et régulation de la cardiogenèse, adaptée de (7).

La régulation de la cardiogenèse se fait par de nombreux facteurs de transcription qui interviennent à des moments précis du développement, permettant ainsi d'obtenir différents types de cellules spécialisées (8) (Figure 3). Les principales voies de signalisation impliquant ces facteurs sont les suivantes :

- Les voies Nodal et BMPs (Bone Morphogenic Proteins), qui permettent l'établissement des axes embryonnaires, l'induction du mésoderme et la régulation de la différenciation *via* la voie de signalisation TGF- β ,
- La voie des FGFs (Fibroblast Growth Factor), qui sont impliqués dans la survie et la prolifération des progéniteurs cardiaques,
- La voie Wnt, qui permet à la fois de favoriser et de bloquer la formation du cœur. Cette voie se divise en deux classes en fonction du mode de transduction du signal : la voie canonique *via* l'activation de la β -Caténine, et la voie non canonique médiée par du calcium,
- La voie de signalisation de la protéine Hedgehog, *via* l'utilisation de Sonic hedgehog (SHH) qui va permettre l'engagement des progéniteurs cardiaques vers les cardiomyocytes,
- Et la voie Notch, qui intervient à différents moments de la cardiogenèse.

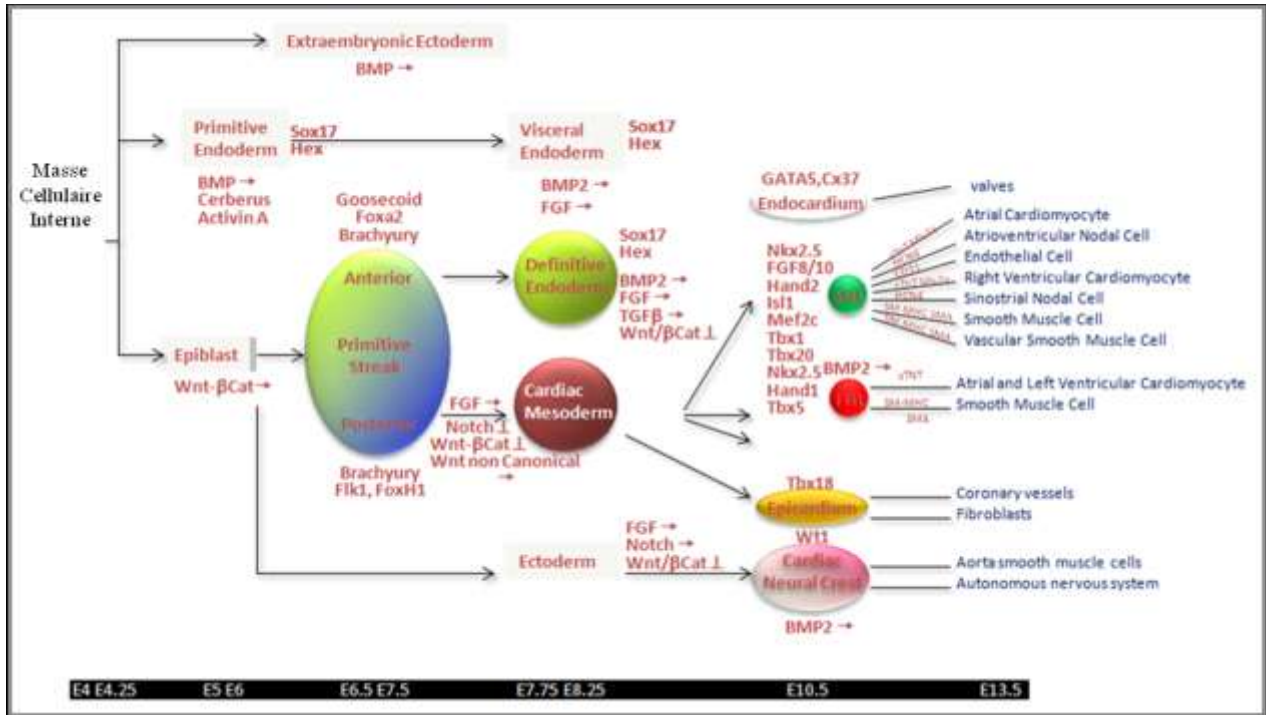


Figure 3: Cardiogenèse et voies de signalisation, adaptée de (9).

1.1.2. Le Développement du nœud sinusal

Le nœud sinusal est une petite structure allongée en forme de « virgule », localisée dans l'oreillette droite du cœur au niveau de la veine cave supérieure, et dont la partie supérieure est appelée « tête (head) », et la partie inférieure, « queue (tail) ». Il est constitué de différentes tailles de myocytes (contenant des filaments contractiles), et de fibroblastes.

Lors de la cardiogenèse, les précurseurs mésenchymateux du mésoderme cardiaque vont permettre la formation des cellules du nœud sinusal, pacemaker principal du cœur qui contrôle la stimulation cardiaque via une impulsion électrique (10-12).

La formation de cette structure spécialisée nécessite l'expression de facteurs de transcription et de marqueurs moléculaires spécifiques, qui vont interagir pour orienter correctement le processus de développement par inhibition et régulation des autres structures, comme la veine cave supérieure et les autres cellules spécialisées de l'oreillette droite.

Parmi ces facteurs, on retrouve les facteurs de transcription TBX18, TBX3 et SHOX2, les canaux ioniques HCN1 et HCN4, ainsi que des gap-jonctions comme Cx30 et Cx30.2 (11, 13-23) (Figure 4).

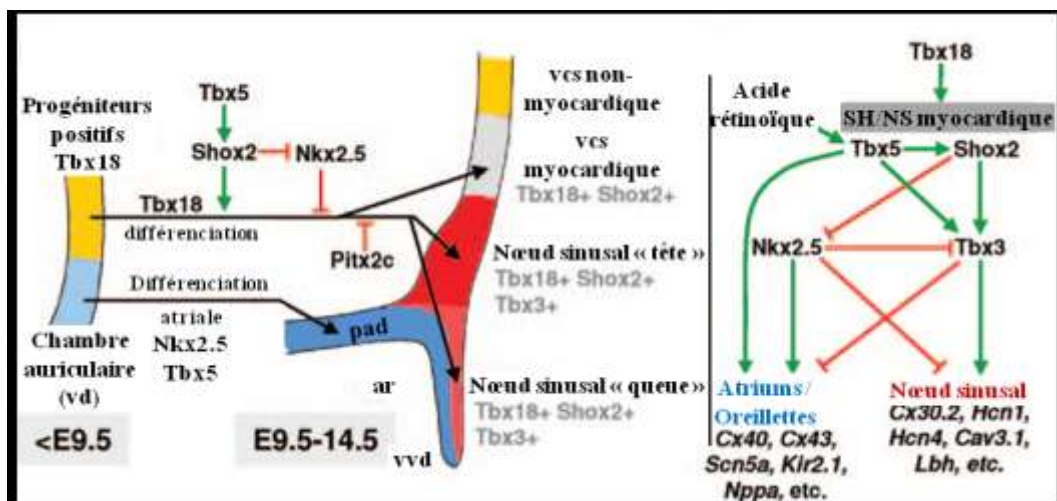


Figure 4: Voies moléculaires régulant le développement du nœud sinusal, adaptée de (11).

ar : atrium droit, ns : nœud sinusal, pad : paroi atriale droite, sh : sinus horn, vcs : veine cave supérieure, vd : ventricule droit, vvd : valve veineuse droite.

Les propriétés électrophysiologiques des cellules sont données par la composition en canaux membranaires de ces dernières qui permettent de générer des mécanismes de polarisation/dépolarisation. Le nœud sinusal a la capacité de se dépolariser spontanément pour générer le rythme cardiaque par propagation de la dépolarisation le long des oreillettes et ventricules (24). Cette dépolarisation est issue du courant spécifique *If* (funny current), retrouvé uniquement dans les cellules sinusales, et induit par le canal HCN4 (24-27)

1.1.3. La Maladie du nœud sinusal

La maladie du nœud sinusal (MNS) est une pathologie cardiaque caractérisée par une fréquence cardiaque trop lente, des épisodes de bloc atrio-ventriculaire (altération de la transmission de l'influx électrique entre les oreillettes et les ventricules), et l'impossibilité d'augmenter la fréquence cardiaque pour faire face à une demande élevée, par exemple lors d'effort physique (28-30).

Ce trouble du rythme est généralement retrouvé chez les personnes âgées et reste rare chez les enfants; il est la cause principale d'insertion de stimulateur cardiaque, avec plus de 600 000 procédures par année dans le monde. Malgré d'intenses efforts effectués pour comprendre cette maladie *via* de nombreuses études ayant identifié des facteurs de risque génétiques de cette maladie, la cause reste inconnue et le seul moyen de détection actuel reste l'électrocardiogramme.

1.2. La Pseudo-Obstruction Intestinale Chronique

1.2.1. Les cellules de Cajal

La motilité gastro-intestinale est sous le contrôle de cellules spécialisées de l'intestin, les cellules de Cajal, organisées en réseau qui connecte la musculature gastro-intestinale et qui dépolarisent les myocytes avoisinant, contrôlant ainsi la fréquence et la propagation des contractions intestinales (31-33).

Les origines embryonnaire et moléculaire de ces cellules pacemaker restent peu connues, mais il a été montré que leur formation est issue du recrutement de cellules de précurseurs mésenchymateux, tout comme les cellules du nœud sinusal (31).

1.2.2. La Pseudo-Obstruction Intestinale Chronique

La Pseudo-Obstruction Intestinale Chronique (POIC) est une maladie sévère de la motilité intestinale liée à une morbidité et une mortalité élevée, dans laquelle une obstruction du tube digestif survient en absence d'un obstacle mécanique (34, 35). Ce trouble rare et dévastateur requiert souvent une décompression chirurgicale et une hyper-alimentation par voie intraveineuse.

Cette maladie, qui apparait en général de façon sporadique, peut être considérée comme neuropathie, mésenchymopathie ou encore myopathie, selon que le système nerveux entérique, les cellules de Cajal ou les cellules musculaires lisses soient atteints.

Des causes génétiques ont également été identifiées, parmi lesquelles on retrouve des mutations du facteur de transcription *SOX10*, qui a un rôle majeur dans le développement de la crête neurale et du système nerveux périphérique (34, 36) ; ainsi que des mutations « perte de fonction » de la *FLNA* (Filamine A), impliquée dans le remodelage du cytosquelette (37), et qui dans le cas de la POIC induit un défaut de migration des cellules du système nerveux central.

2. Le complexe cohésine et les cohésinopathies

2.1. Le complexe cohésine

La cohésine est un complexe protéique en forme d'anneau appartenant à la famille des protéines SMC (Structural Maintenance of Chromosomes), comprenant également les complexes condensine et SMC5/6, et qui a pour rôle majeur la cohésion des chromatides sœurs lors de la division cellulaire (38-41). Outre ses fonctions de protection des chromatides sœurs, le complexe cohésine est impliqué dans la régulation des gènes contrôlant le développement, la prolifération, et la pluripotence du blastocyste (42-44).

Ce complexe est constitué des sous-unités SMC1 et SMC3 (formant un hétérodimère) qui s'associent avec les protéines RAD21 et STAG1/2 (SA1, SA2) afin de former la structure en anneau de la cohésine (Figure 5) (38, 39). Chez les cellules mammifères, la cohésine s'accumule au niveau des sites CTCF (CCCTC-binding factor), protéine à doigt de zinc qui permet de la charger sur la chromatine à la fin de la mitose par le complexe protéique NIPBL et MAU2 (22).

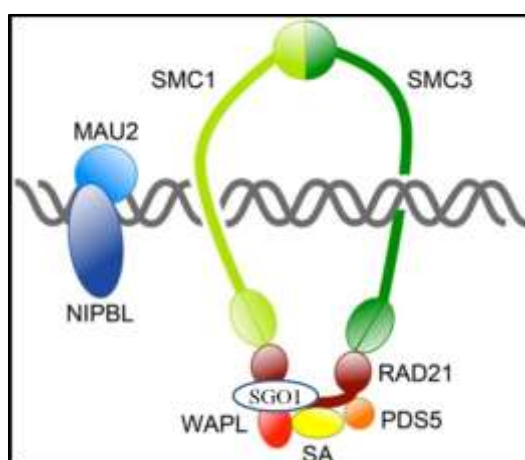


Figure 5 : Le complexe cohésine et ses protéines associées, adaptée de (45).

La fixation stable de la cohésine nécessite l'acétylation de SMC3 par ESCO1 et ESCO2, ce qui permet à la protéine Sororine d'interagir avec l'activité de dissociation de la chromatine de WAP1 et PDS5 lors de la phase S et G2. Au début de la mitose, la Sororine est phosphorylée, ce qui permet à WAP1 et PDS5 d'évincer la majorité de la cohésine des bras chromosomiaux, ce qui coïncide avec l'augmentation de la fixation du complexe condensine qui permet le chargement de la chromatine sur la chromatide mitotique. Il reste néanmoins une petite quantité de cohésine au niveau du centromère, sous la protection du complexe Shugoshin/PP2A (Protéine Phosphatase 2A) localisée au niveau de RAD21 (Figure 5), ce qui est critique pour maintenir les chromatides sœur ensemble au niveau du centromère en évitant leur clivage par la séparase (voir partie « 3. La protéine SGO1 ») (46, 47).

2.2. Les cohésinopathies

Les cohésinopathies sont des maladies rares, causées par des mutations des composants du complexe cohésine. Celles-ci se caractérisent par des phénotypes développementaux, de croissance cellulaire et de différenciation. Parmi les cohésinopathies, on retrouve le syndrome de Cornelia de Lange (CdLS) qui se caractérise par des anomalies craniofaciales, des retards mentaux et de croissance, ainsi que des microcéphalies (48). Un des gènes associés à cette pathologie est *NIPBL* (49), dont la protéine permet de charger la cohésine sur la chromatine (38, 39). L'insuffisance ovarienne précoce, les syndromes de « cassure chromosomique de Varsovie » (Warsaw breakage), de Nimègue, et de Roberts font également partie de la famille des cohésinopathies (41, 44).

3. La protéine SGO1

3.1.Rôle et généralités

La protéine Shugoshin-like1, SGO1, (esprit gardien en japonais) est une protéine hautement conservée dans l'évolution, dont la seule fonction connue est la protection du complexe cohésine du clivage centromérique par la séparase lors de la mitose/méiose (2, 50, 51). Il existe deux isoformes de cette protéine chez l'homme, SGO1 isoforme principale (527 acides aminés), et sSGO1 (292 acides aminés) qui a un rôle important dans le dynamisme des centrosomes en médiant la cohésion du centriole (Figure 6) (4, 52).

La protection du complexe cohésine est assurée par la liaison de SGO1 à PP2A, qui permet la phosphorylation de la sous-unité STAG1 (3, 4, 53, 54). Le ciblage de SGO1 au niveau des centromères est assuré par la protéine BUB1 (qui phosphoryle l'histone H2A), et par la protéine HP1 (Heterochromatin Protein 1) qui protège la cohésion centromérique par ciblage directe de SGO1 au niveau des centromères (55). Lors de l'anaphase, SGO1 est dégradée par le complexe APC permettant ainsi la séparation des chromatides sœurs.

Il existe une autre protéine de la famille des Shugoshin : SGO2, qui n'est pas directement impliqué dans la protection centromérique. En effet, elle n'est pas nécessaire pour garder les chromatides sœurs ensemble, cependant, pendant la mitose elle est requise pour charger MCAK (Mitotic Centromere-Associated Kinesin) aux centromères, ainsi que lors de la méiose (56).

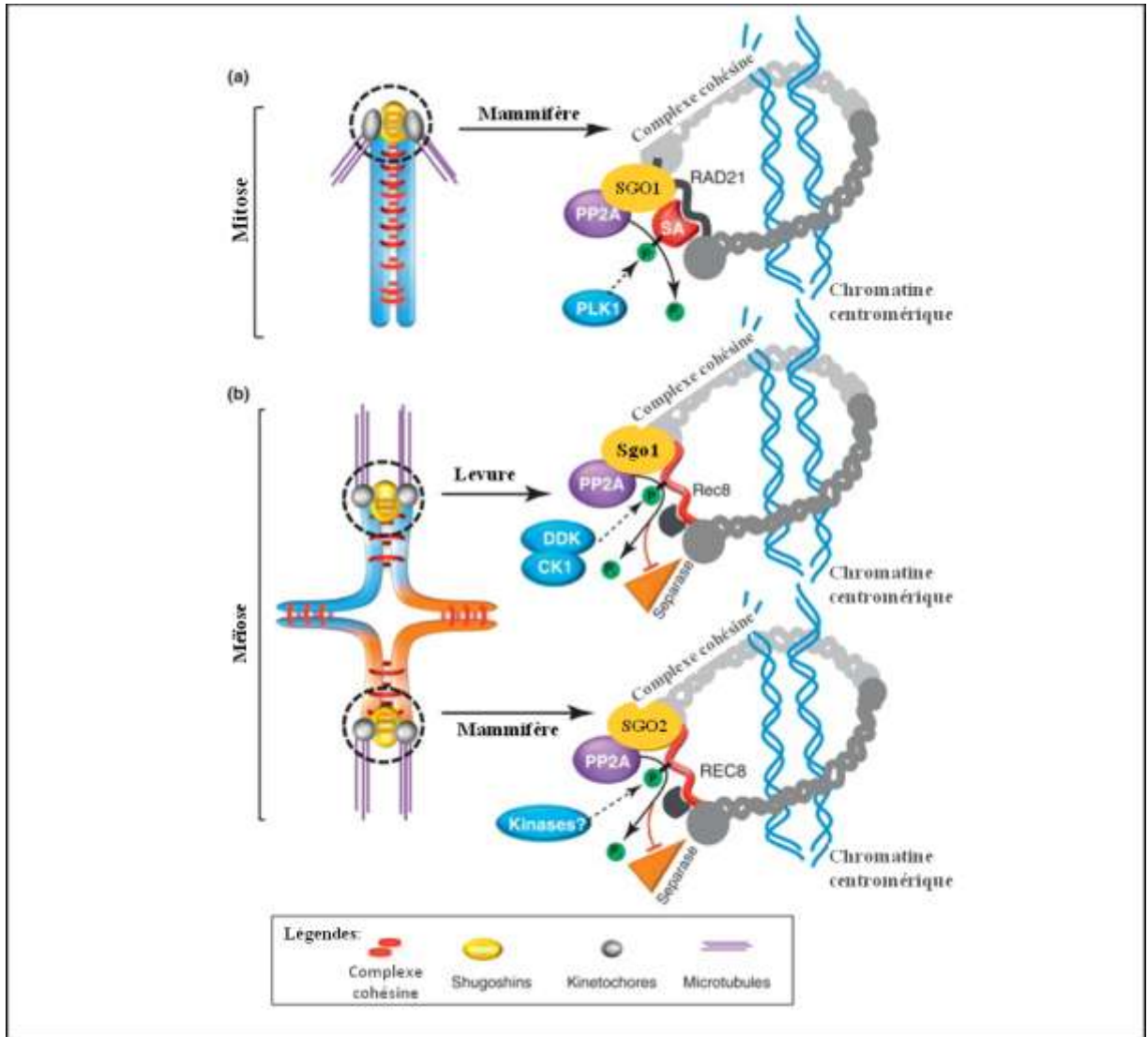


Figure 6: Mécanisme moléculaire de la protection centromérique des complexes cohésine dépendant de Shugoshin, adaptée de (2).

3.2.Pathologies associées

La perte totale de fonction de SGO1 entraîne une létalité embryonnaire précoce, une instabilité génomique due à une perte prématurée de la cohésion centromérique, et un arrêt de la mitose (2, 4), qui ne sont pas retrouvés chez les patients CAID. Chez la souris, une haploinsuffisance de *Sgo1* entraîne des tumeurs colorectales (57-59).

Cependant, les caryotypes d'individus affectés révèlent une apparence caractéristique d'un défaut de cohésion centromérique, identifiant le syndrome CAID comme une nouvelle cohésinopathie.

3.3.SGO1 et la Cardiogenèse

Parmi les fonctions connues de SGO1, aucune ne concernent le développement cardiaque (2, 50, 51). Cependant, de récentes études font le lien entre ce dernier et le complexe cohésine. En effet, ce dernier est la cible de OCT4, un facteur clé pour la pluripotence du blastocyste, mais aussi pour la spécification cellulaire cardiaque précoce (60, 61).

De plus, il a été observé qu'un changement dans la structure de la chromatine induit par le complexe cohésine, est responsable de la transcription de facteurs incluant SOX17 et SALL4, impliqués dans les étapes précoces de la cardiogenèse et potentiellement pour les dérivés de l'endoderme comme l'intestin (62). Chez la souris, l'inactivation génique (knock-down) de PDS5B a révélé des caractéristiques proches des syndromes de Cornelia de Lange et de CAID, incluant des défauts cardiaques et de l'aganglionose du colon distal (absence de cellules ganglionnaires) (38, 47, 63).

Ces résultats révèlent l'implication du complexe cohésine dans le développement cardiaque, et de ce fait il est tout à fait concevable que SGO1 soit elle aussi impliquée dans ce processus par interaction physique ou fonctionnel au niveau des gènes spécifiquement cardiaques, entraînant un remodelage de la chromatine pour faciliter la transcription de ces derniers.

Cette hypothèse est appuyée par des coupes histologiques d'embryon de souris « Knock-in Sgol1-LacZ » à E12.5 qui révèlent l'expression de Sgol1 principalement au niveau du cœur en développement et de l'intestin, les organes cibles chez les patients CAID (Annexe 1, résultats non publiés).

Les mêmes observations ont été faites chez le poisson-zèbre où l'expression de Sgo1 est retrouvée spécifiquement au niveau du sinus venosus (1), progéniteur des tissus pacemakers (11, 12, 14, 17), de manière exclusive de l'expression de NPPA, un marqueur de différenciation terminal cardiaque, non exprimé dans le nœud sinusal. De plus, chez les patients CAID, l'analyse des électrocardiogrammes révèlent que le trouble cardiaque observé se situe au niveau du rythme sinusal lors des premières années de vie.

4. Les cellules souches à pluripotence induite

Afin d'élucider le rôle de SGO1 dans le développement du nœud sinusal et dans la pathologie CAID, des cellules souches pluripotentes seront utilisées comme modèle cellulaire, car ces dernières récapitulent les étapes clés du développement humain *in vitro* (64-66).

Une cellule souche est une cellule non spécialisée qui s'auto-renouvelle et génère un grand nombre de cellules filles pendant une très longue période (67, 68). Les cellules souches sont issues de trois origines cellulaires :

- Embryonnaires et fœtales : pour l'embryon elles proviennent du blastocyste et sont capables de former les trois feuillets embryonnaires (ectoderme, endoderme et mésoderme); et pour le fœtus, des tissus, du sang et de la moelle osseuse,
- Sang de cordon et placenta : elles sont prélevées après la naissance,
- Adulte : elles permettent de maintenir et de réparer les cellules (ex : cellules souches hématopoïétiques pour la moelle osseuse), elles sont retrouvées dans les cellules somatiques dans des cellules différenciées.

Il existe quatre types de cellules souches qui se distinguent par leur potentiel de différenciation (Tableau I) : totipotente, pluripotente, multipotente et unipotente.

Tableau I: Comparaison des quatre types de cellules souches selon leur potentiel de différenciation.

Types de cellules souches	Potentiel de différenciation	Exemple de cellules
Totipotente	Tous les types cellulaires : capables de générer un organisme entier	Zygote
Pluripotente	Toutes les cellules somatiques et les cellules germinales	Cellules embryonnaires
Multipotente	Un nombre limité de cellules spécialisées	Cellules neurales : neurones, astrocytes
Unipotente	Un seul type de cellule ou tissus	Kératinocytes (cellules de la peau)

Les cellules souches les plus utilisées en recherche, sont les HuES (Human Embryonic Stem cells) qui ont la capacité d’auto-renouvellement et de se différencier vers les trois feuillets embryonnaires *in vivo* et *in vitro* et de ce fait, de se développer en tous types cellulaires d’un organisme en fonction de l’environnement.

Ces cellules ont été dérivées de masse cellulaire interne d’embryon produit par fertilisation *in vitro* à des fins cliniques, dans le laboratoire du Dr Thomson (67, 69, 70).

Ces lignées servent de référence lors de l’étude de cellules hiPS (human induced Pluripotent Stem cells) qui sont utilisées aujourd’hui comme modèle pour étudier les maladies génétiques car elles possèdent les mêmes caractéristiques que les HuES (pluripotence, morphologie, expression génique), ont la capacité d’auto-renouvellement et de se différencier vers les trois feuillets embryonnaires *in vivo* et *in vitro* et de ce fait, de se développer en tous types cellulaires d’un organisme en fonction de l’environnement (71-73).

Elles ont été créées dans le laboratoire du Dr Yamanaka en 2006 (récompensé en 2012 pour cette découverte par un prix Nobel), d'abord chez la souris puis chez l'homme par le laboratoire de ce dernier et du Dr Thomson, en utilisant un vecteur adénoviral de Sendai non-intégratif (71, 72, 74).

Le modèle des hiPSc présente en plus l'avantage de provenir de fibroblastes ou autres cellules somatiques de patients reprogrammées, évitant les biais provoqués par l'insertion par génie génétique d'une mutation dans une cellule souche humaine. De plus, il permet d'obtenir des cellules spécifiques de la pathologie qui ne peuvent pas être obtenues facilement chez les patients vivants comme les neurones ou les cardiomyocytes.

5. La voie de signalisation TGF- β

La voie de signalisation TGF- β (Tumor Growth Factor- β) implique de nombreux facteurs comme les protéines TGF- β s, les BMPs (Bone Morphogenetic Proteins), les GDFs (Growth and Differentiation Factors), ou encore les Activines. Ceux-ci participent à la régulation des fonctions cellulaires incluant la prolifération, l'apoptose, la différenciation, la migration ou encore intervient dans l'activation des gènes suppresseurs de tumeurs. Ces effets varient selon les types cellulaires et les facteurs impliqués (Figure 7) (75-78).

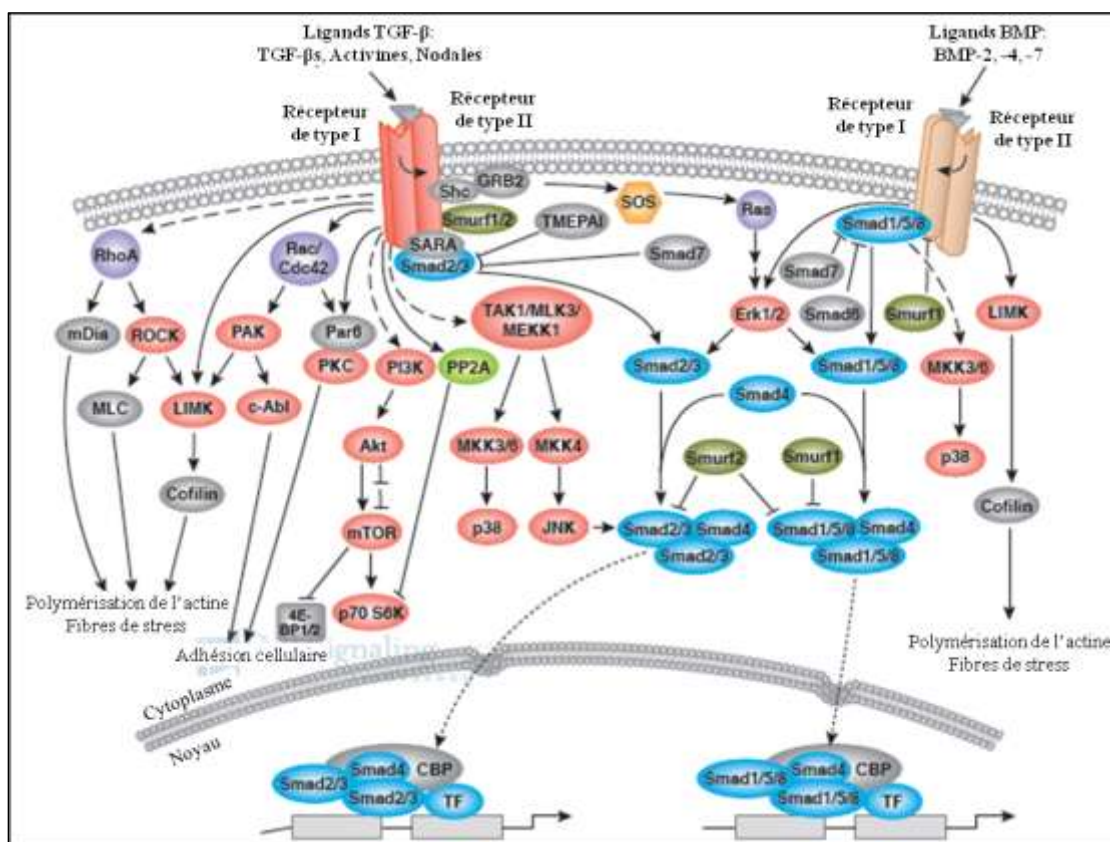


Figure 7: Voies de signalisation TGF- β et BMPs, adaptée de Cell Signaling Technology®.

En conséquence, elle est aussi bien impliquée dans des pathologies cancéreuses, immunitaires que dans des phénomènes de fibrose (79). Au niveau cardiaque, on retrouve des phénomènes de fibrose cardiaque (80, 81), ainsi que plusieurs pathologies monogéniques d'aortopathies comme les syndromes de Loeys-Dietz, ou de Shprintzen-Goldberg (82-85).

On retrouve trois types de récepteurs membranaires activés par ces différents ligands :

- Le type I, ALK (Activin receptor-Like Kinase), composé des isoformes 1 à 7 : ALK5 est activée par les TGF- β s, ALK1, 3 et 6 par les BMPs, ALK2 et 7 par les Activines,
- Le type II, composé de TGFBR2 (TGF- β Receptor II), BMPRII (BMP receptor II) et ActRII (Activin Receptor II),
- Le type III, TGFBR3 spécifique du TGF- β , inhibiteur de la signalisation (86).

Les types I et II sont des protéines transmembranaires contenant un domaine cytoplasmique sérine/thréonine kinase, qui leur permet d'initier le processus de signalisation *via* la voie canonique (SMAD dépendant) ou la non canonique (SMAD indépendant) (87, 88).

5.1. La voie canonique de TGF- β

La voie canonique de la signalisation TGF- β est aussi appelée « SMAD dépendante » car elle implique la phosphorylation de protéines SMADs qui varient en fonction du ligand : les TGF- β s et les Activines vont engendrer la phosphorylation des SMAD2 et 3 ; tandis que les BMPs vont impliquer les SMAD1, 5 et 8 (89-91).

En ce qui concerne les SMAD6 et 7, ces dernières vont avoir un rôle d'inhibition et de régulation de cette voie de signalisation, avec une préférence pour la voie BMP de la part de SMAD6 (92, 93).

L'activation des protéines SMADs est initiée par la liaison du ligand au niveau du récepteur de type II, qui va recruter le type I par phosphorylation, pour à son tour phosphoryler le motif SXS en C-ter des protéines SMADs, et ceci est facilitée par des protéines adaptatrices comme SARA (SMAD Anchor for Receptor Activation) pour SMAD2 et 3.

Cette phosphorylation va activer les SMADs, qui vont recruter la protéine SMAD4 pour former un complexe qui sera transloqué dans le noyau *via* les nucleoporines, pour enfin se lier à un site spécifique SBE (SMAD Binding Element, composé de séquences CAGA) sur l'ADN afin de réguler l'expression génique (75, 76, 93-99).

5.2. Voie non canonique

La voie non canonique de TGF- β , encore appelée « SMAD indépendante », implique notamment les protéines MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase), et TAK1 (TGF- β Associated Kinase), qui interagissent les unes avec les autres *via* des cascades de phosphorylation, dépendamment du contexte cellulaire (78).

TAK1, qui permet la régulation de la survie cellulaire, de la différenciation, ou encore de la réponse immunitaire, est activée au niveau du récepteur de type I par la ligase TRAF6 (TNF Receptor Associated Factor 6).

TAK1 va alors engendrer la phosphorylation de MKK3/6 et MKK4/7 (Mitogen activated protein Kinase Kinase), respectivement activateurs de p38 et cJNK (c-Jun amino terminal kinase) (100, 101).

En ce qui concerne MAPK, impliqué notamment dans le contrôle de la croissance tumorale, les protéines adaptatrices GRB2 (Growth factor Receptor-Bound protein 2) et SOS (Son Of Sevenless homolog) vont interagir avec le récepteur de type I pour activer le complexe protéique RAS/RAF (GTP-binding protein), ce qui va activer la cascade de phosphorylation impliquant notamment MEK1/2 (MAPK kinase Extracellular signal regulated Kinase) et MKK3/6, respectivement activateurs de ERK 1/2, et p38 (102, 103).

5.3.Interaction voies canoniques et non-canonique

Les voies de signalisation canonique et non-canonique de TGF- β interagissent afin de réguler, entre autre, l'expression génique (97, 104).

Parmi ces protéines régulatrices, on retrouve SMAD7 qui agit aussi bien sur la voie canonique par compétition avec SMAD2 et SMAD3 pour la fixation au niveau du récepteur de type I, engendrant une inhibition ; ce qui facilite alors l'activation de la voie non-canonique : SMAD7 est un partenaire d'interaction de TAK1 et MKK3/6 (92).

On retrouve aussi des phénomènes de co-activation, comme par exemple la phosphorylation des SMAD1, 2 et 3 par ERK1/2 (105).

5.4.SGO1 : nouvel acteur de la voie de signalisation TGF- β ?

La protéine SGO1 n'a, à l'heure actuelle, pas de rôle connu dans la voie de signalisation TGF- β . Cependant, dans notre étude publiée en 2014 (1), des analyses en cytométrie de flux ont révélé chez les patients atteints du syndrome CAID une augmentation de pSMAD2/3, et qui est corrélée avec l'apparition de phénomènes de fibrose observée sur des coupes histologiques intestinales de patients.

Ces résultats présument donc une implication possible de SGO1 dans cette voie de signalisation, et cette hypothèse est corrélée avec l'accumulation cytosolique de celle-ci qui est observée chez les fibroblastes de patients (1). Ce qui suggérerait une altération dans l'adressage post-traductionnelle induite par la mutation K23E, et ceci est conforté avec des analyses *in silico* de recherche de signal de localisation nucléaire (NLS, Nuclear Localization Signal, logiciel NLStradamus) dans la séquence protéique de SGO1, qui révèlent que la mutation K23E se situe à proximité de ce dernier.

Ce signal pourrait alors être altéré suite à une modification conformationnelle ou électrostatique de la protéine, et de ce fait, l'importine perd sa spécificité. Cependant, cette dernière est tout de même capable de transporter quelques protéines SGO1, car on observe sa présence au niveau nucléaire, ce qui lui permet d'assurer une partie de ses fonctions et de ne pas engendrer d'instabilité chromosomique.

La pathologie CAID met donc pour la première fois en évidence le lien direct entre la voie TGF- β et les cohésinopathies. De plus, il est aussi intéressant de constater que certaines protéines du complexe cohésine sont impliquées dans cette voie de signalisation, et dont certaines interagissent avec SGO1, comme PP2A (106); ou plus récemment comme la sérine/thréonine kinase BUB1 qui joue un rôle dans la localisation centromérique de SGO1 *via* la phosphorylation de l'histone H2A, et qui a été identifiée en 2015 comme acteur de la voie TGF- β (107). En effet, cette étude révèle que BUB1 facilite le recrutement du récepteur de type I au niveau du type II, ce qui permet alors de réguler à la fois les voies canonique et non-canonique.

HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

Le but de ce projet de recherche est de comprendre l'implication de la protéine SGO1 lors du développement cardiaque normal et plus particulièrement du nœud sinusal, et ceci spécifiquement au niveau de la voie de signalisation TGF- β .

En effet, ce projet de maîtrise est basé sur des résultats précédemment publiés au laboratoire concernant le syndrome CAID, révélant que la mutation homozygote SGO1 K23E chez les patients engendre notamment une augmentation de la voie de signalisation TGF- β (pSMAD2/3), associée à une localisation cytosolique anormale de la protéine, suggérant ainsi que la mutation K23E met en lumière une fonction qui était alors inconnue de SGO1 dans cette voie de signalisation.

Hypothèses

Hypothèse 1 : SGO1 est une protéine clé dans l'activation des gènes du développement embryonnaire du nœud sinusal, et dont la fonction est perturbée par la mutation K23E qui engendre un remodelage de la chromatine.

Hypothèse 2 : La protéine SGO1 régule la voie de signalisation TGF- β par répression de la phosphorylation des protéines SMAD2/3, et cette fonction est levée suite à la mutation K23E qui met en lumière ce nouveau rôle (voir le Tableau II ci-dessous).

Tableau II : Augmentation de pSMAD2/3 chez les patients CAID.

Fibroblastes de peau	Niveau de pSMAD2/3 Sans stimulation TGF- β 1	Niveau de pSMAD2/3 Après stimulation TGF- β 1
Sauvage WT (contrôles)	→	↑
Mutée K23E (patients)	↑	↑ ↑

Objectifs

Objectif 1 : Génération d'un modèle cellulaire du syndrome CAID.

Des fibroblastes de peau de patients et de sujets contrôles seront reprogrammés en cellules hiPS en utilisant les facteurs de Yamanaka (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc) (71). Trois lignées de chaque phénotype seront générées, et leur caractéristique de pluripotence sera vérifiée par qPCR relative et par immunomarquage pour les marqueurs NANOG, SOX2 et POU5F1 (codant pour la protéine OCT4)) (53, 58, 61). Les cellules HuES serviront de référence.

Objectif 2 : Différenciation cardiaque des cellules hiPS générées.

Les hiPS seront différenciées en cellules cardiaques à l'aide d'un protocole préétabli, ainsi qu'en cellules du nœud sinusal à l'aide de constructions lentivirales codant pour des protéines spécifiques de la formation de celui-ci (TBX18, TBX3, SHOX2) (11, 13, 17). Le protocole sera préalablement validé avec des cellules HuES.

Les cellules en différenciation seront phénotypées aux étapes clés par QPCR relative pour des gènes d'intérêts tels que *NANOG*, *SOX2* et *POU5F1* pour vérifier la perte de pluripotence ; *MEF2C* et *T* (codant pour la protéine BRACHYURY) pour le mésendoderme - mésoderme ; *MESPI*, *NKX2.5* et *ISL1* pour le mésoderme cardiaque, et *TBX5*, *GATA4*, *TNNT2* pour les cardiomyocytes (49, 62, 63). Et enfin, pour le nœud sinusal, *HCN4*, *CX30.2*, *TBX18*, *TBX3* et *SHOX2* (3, 5, 8-15). Des immunomarquages seront également effectués aux différentes étapes clés du protocole, ainsi que pour visualiser les transductions lentivirales qui seront également validées par western blot.

Objectif 3 : Impact de la mutation K23E sur la voie de signalisation TGF- β .

Pour comprendre le rôle de la protéine sauvage SGO1 et l'impact de la mutation K23E sur cette voie de signalisation, des analyses des profils d'activation, d'inhibition et d'état de phosphorylation des protéines clés seront effectuées sur différents types cellulaires.

Le profil d'activation sera étudié par la technique du « Dual-Luciferase assay » dans des cellules HEK 293T co-transfectées avec des plasmides d'expression contenant les différentes formes de SGO1 (isoforme longue A2 ou courte C2, forme sauvage WT ou mutée K23E), ainsi qu'avec des plasmides rapporteur Luciferase : SBE_Luc (Smad Binding Element, Firefly Luciferase), et pRT-LK plasmide contrôle exprimant la Renilla Luciferase.

L'étude du profil d'inhibition sera quant à lui effectué sur une lignée cellulaire rapportrice Luciferase A549_BTR, qui a été générée par le laboratoire du Dr Rehemtulla, (qui a révélé le rôle de BUB1 dans la voie TGF- β , (107)). Les cellules seront transfectées avec les mêmes constructions plasmidiques de SGO1 que précédemment, et traitées avec un inhibiteur spécifique du récepteur de type I, SB431542, ainsi qu'avec différentes concentrations de TGF- β 1. La bioluminescence des cellules sera par la suite analysée.

Et enfin, l'état de phosphorylation des protéines clés de la voie canonique (SMAD3) et de la voie non-canonique (p38, ERK, JNK), sera quantifié à l'aide de la technologie ALPHA (Amplified Luminescence Proximity Homogenous Assay, Perkin Elmer) dans des fibroblastes de peau de patients et de sujets contrôles, et ceci dans des cellules « jeunes » et plus « âgées » car chez les patients les premiers symptômes de la pathologie ne sont pas présents à la naissance et apparaissent aux alentours de 5ans, ce qui suppose que le phénotype est accentué avec l'âge. Cette étude permettra également de mesurer l'éventuel impact de la mutation K23E sur la voie de signalisation non-canonique, qui jusqu'à présent n'a pas été démontré.

MATÉRIELS

1. Cellules humaines

1.1. Cellules souches embryonnaires

On dispose au laboratoire de cellules HuES9, qui servent de référence lors de l'étude des cellules hiPS de patients et de sujets contrôles générés. De plus, elles ont également servi à valider les protocoles de différenciation cardiaques. Ces cellules ont été obtenues auprès de la compagnie WiCell® (Produit WA09, lot WB009, passage 24), suite à l'obtention d'un MTA (Material Transfert Agreement).

1.2. Cellules primaires : Fibroblastes de peau

Des fibroblastes de peau de patients et de sujets contrôles ont été obtenus suite à des biopsies cutanées chez ces derniers, après consentement et conformément aux règles d'éthique et de sécurité requise (voir partie Méthodes pour les conditions de culture et de dérivation). Ces cellules ne sont pas amplifiables à long terme (au contraire des lignées cellulaires), en effet à partir du passage 12 (transfert dans une nouvelle boîte), les cellules commencent à entrer en sénescence, de ce fait, les stocks sont limités.

1.3. Lignées cellulaires

Des lignées cellulaires ont également été utilisées suite à l'obtention de MTA: les cellules HEK 293T (Human Embryonic Kidney) obtenus auprès de la compagnie ATCC® (référence : ATCC® CRL-11268), ainsi que la lignée stable rapportrice A549_BTR (isolées de carcinomes de poumon) qui nous a été donnée par le laboratoire du Dr Rehemtulla (108).

2. Plasmides et constructions « silencing »

2.1. Plasmides

Tableau III: Liste des plasmides utilisés.

Nom	Caractéristiques	Obtention
pENTR_hSGOL1_A2WT	Plasmides « d'entrée » SGO1 utilisés avec la technologie Gateway™ pour générer des plasmides d'expression (isoformes longue A2 ou courte C2, sauvage WT ou mutée K23E)	Préalablement générés au laboratoire par recombinaison et mutagenèse dirigée (mutation K23E)
pENTR_hSGOL1_A2K23E		
pENTR_hSGOL1_C2WT		
pENTR_hSGOL1_C2K23E		
pLex_307	Vecteur d'expression lentiviral avec un marqueur V5 en C-ter, vecteur de destination avec la technologie Gateway™	Addgene (#41392)
pRT-LK	Plasmide contrôle exprimant la protéine rapportrice <i>Renilla</i> Luciferase	Collaborateur, Promega (#E2241)
SBE_Luc	Plasmide d'expression avec un rapporteur <i>Firefly</i> Luciferase, porteur d'un ou de quatre sites SBE (Smad Binding Element), ou de 12 répétitions du motif CAGA	Addgene (#16527)
SBE4_Luc		Addgene (#16495)
CAGA12-Luc		Collaborateur

2.2.shRNA et siRNA

Le laboratoire dispose de deux systèmes permettant d'induire un knockdown de la protéine SGO1 : des shRNA (small hairpin RNA) et des siRNA (small interfering RNA). Les shRNA ont été générés par une étudiante au Doctorat (Jessica Piché), dont les résultats de validation sont variables d'une expérience à l'autre. De ce fait, nous avons décidé d'utiliser des siRNA validés et commercialisés par la compagnie Dharmacon™, qui sont en cours de validation sur des cellules HEK 293T.

Les siRNA SGO1 et contrôles disponibles au laboratoire sont mentionnés dans le tableau ci-dessous :

Tableau IV: Liste des siRNA SGO1 et contrôles.

Cible	Nom	Référence
SGO1	siGENOME Human SGO1 (151648) siRNA <i>(4 siRNA différents dans un même tube)</i>	M-01545-01-0010
GAPDH	siGENOME GAPD Control siRNA (human)	D-001140-01-05
Aucune (contrôle)	siGENOME Non-Targeting siRNA	D-001210-01-05

3. Anticorps

Tableau V: Anticorps primaires.

Cible	Réactivité	Organisme	Références
GAPDH	Mouse, rat, human	mouse	sc-32233 (Santa Cruz Biotechnology®)
NKX2.5	Mouse, rat, human	rabbit	sc-14033 (Santa Cruz Biotechnology®)
SGO1	Human	mouse	ab58023 (Abcam)
SMAD2	Mouse, rat, human	rabbit	#5339 (Cell Signaling Technology®)
pSMAD2	Mouse, rat, human	rabbit	#3108 (Cell Signaling Technology®)
cTNT	Mouse, rat, human	mouse	MS-295-P0 (Thermo Scientific)

Tableau VI : Anticorps secondaires.

Nom	Références
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	R37116 (Invitrogen™)
Goat anti-Mouse IgG Secondary Antibody, Alexa Fluor 594	R37121 (Invitrogen™)
Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP	31430 (Invitrogen™)
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP	31460 (Invitrogen™)

4. Amorces qPCR relative en temps réel

Tableau VII: Amorces humaines qPCR relative en temps réel.

Gène cible (amplicon pb)	Séquence Forward (5'-3')	Séquence Reverse (3'-5')
FOXA1 (238)	AGCAGGCGCCCAGCAAGATG	TGGCGGCGCAAGTAGCAG
GAPDH (122)	AATCCCATCACCATCTTCCAG	AAATGAGCCCCAGCCTTC
GATA4 (169)	ACCTGGGACTTGGAGGATAGCAAA	TCCCATCAGCGTGTAAGGCATCT
ISL1 (208)	CGCGTGCGGACTGTGCTGAAC	TTGGGCTGCTGCTGCTGGAGT
MEF2C (286)	CGCATGAGAGCCGGACAAACT	TGGCTGGACACTGGGATGGAG
MESP1 (278)	CTCTGTTGGAGACCTGGATG	CCTGCTTGCCTCAAAGTG
NANOG (213)	TTCCTTCCTCCATGGATCTG	TCTGCTGGAGGCTGAGGTAT
NKX2.5 (221)	GCGATTATGCAGCGTGCAATGAGT	AACATAAATACGGGTGGGTGCGTG
PAX3 (200)	GCCAATCAACTGATGGCTTT	GAAGGAATCGTGCTTTGGTG
SGO1 (114)	GAACTTCCAGGACAAGGAGAAT	CACAACAGGATACAAGGAGACA
SOX2 (187)	GACAGTTACGCGCACATGAA	AGCCGTTTCATGTAGGTC
SSEA1 (200)	GCAGGTGGGACTTTGTTGTT	TTCTCCAAGGACAATCCAG
T (212)	CGGGAGGATGAGCT	TGCCGTTCTTGGTCAC
TNNT2 (169)	TTCACCAAAGATCTGCTCCTCGCT	TTATTACTGGTGTGGAGTGGGTGTGG

(*T* : gène codant pour BRACHYURY)

5. Réactifs

Tableau VIII: Réactifs utilisés.

Nom du produit	Référence
2-Mercaptoethanol	M3148 (Sigma-Aldrich®)
B-27™ Supplement (50X), serum free	17504044 (Gibco®)
Beetle Luciferin, Potassium salt	E1602 (Promega)
BMP2	PHC7145 (Gibco®)
Bovine Serum Albumin (BSA), Fraction V	800-095-QG (Wisent Bioproducts)
Collagenase B	11088807001 (Roche)
Collagénase de type IV (Collagenase, Type IV, powder)	17104019 (Gibco®)
DMEM, 1x	319-005-CL (Wisent Bioproducts)
DMEM low glucose, GlutaMAX™ Supplement	10567-014 (Thermo Fisher Scientific)
DMSO	D8414 (Sigma-Aldrich®)
EDTA (0.5M), pH 8.0	AM9261 (Ambion™)
Essential 8™ Medium	A1517001 (Thermo Fisher Scientific)
FBS (Fetal Bovine Serum)	920-060 (Wisent Bioproducts)
Fibronectin Bovine Protein, Plasma	33010018 (Thermo Fisher Scientific)
G418 (Geneticin®)	11811031 (Gibco®)
Gelatin from bovine skin	G9391 (Sigma-Aldrich®)
IWP2	3533 (Tocris®)
KnockOut™ Serum Replacement	A3181502 (Thermo Fisher Scientific)
KO-DMEM (KnockOut DMEM)	10829018 (Thermo Fisher Scientific)

L-Glutamine (200 mM)	A2916801 (Gibco®)
Liberase™ TL Research Grade	5401020001 (Sigma-Aldrich®)
Chemically Defined Lipid Concentrate	11905031 (Thermo Fisher Scientific)
Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent	11668019 (Invitrogen™)
Corning® Matrigel® hESC-Qualified Matrix	354277 (Corning)
MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100X)	11140050 (Gibco®)
Mitomycin C	10107409001 (Sigma-Aldrich®)
Penicillin-Streptomycin	450-201-EL (Wisent Bioproducts)
cOmplete™, Mini Protease Inhibitor Cocktail	4693124001 (Roche)
Recombinant Human FGF-basic	100-18B (PeproTech®)
RPMI 1640, 1x	350-000-CL (Wisent Bioproducts)
Recombinant Human Sonic Hedgehog (SHH)	100-45 (PeproTech®)
Su5402	SML0443 (Sigma-Aldrich®)
Recombinant Human TGF-β1	100-21(PeproTech®)
TRizol	10829018 (Thermo Fisher Scientific)
Trypsine-EDTA (0,05%)	325-043-EL (Wisent Bioproducts)
Recombinant Murine WNT-3A	315-20 (PeproTech®)
Y-27632 (ROCK inhibitor)	S1049 (Selleckchem)

MÉTHODES

1. Culture cellulaire

Toutes les cultures cellulaires ont été effectuées dans une salle de culture de niveau 2, dans un incubateur humide (90-95%) à chambres en cuivre à 37°C avec 5% de CO₂ (Heracell™ 150i, Thermo Fisher Scientific).

1.1. Cellules primaires : Fibroblastes et biopsies

Les fibroblastes de peau de patients et de sujets témoins ont été obtenus suite à des biopsies effectuées par le Dr Andelfinger ou par des infirmières, selon les normes et les règles de sécurité exigées. Lors des expériences qui ont été menées, il n'y a pas eu d'appariement pour l'âge ou le sexe, car des résultats précédemment obtenus au laboratoire ne montrent pas d'effets significatifs de ces deux paramètres (résultats en cours de publication). Cependant, étant donné que tous les patients sont Canadiens-français, les témoins ont été sélectionnés sur ce critère.

Les prélèvements ont été conservés dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) avec 20% de FBS (Fœtal Bovine Serum) et 1% de Penicilline - Streptomycine (P/S) et ont par la suite été manipulés sous une hotte de culture cellulaire. Chaque prélèvement a été cultivé indépendamment, coupé en petits morceaux (0,5mm²) à l'aide de pinces et ciseaux stériles dans une boîte de pétri, puis ont été transférés à l'aide d'une pipette stérile de 1mL dans une flasque (25cm², quatre morceaux par flacon), côté derme au fond de celui-ci.

La flasque a par la suite été mise sur le côté afin de l'assécher et de permettre aux morceaux d'adhérer pendant 15 min, et du milieu de culture (DMEM, 20% FBS et 1% P/S) a été ajouté en faisant attention de ne pas décoller les morceaux. Ce dernier a été remplacé une première fois après une semaine, puis tous les 3-4 jours. Les morceaux qui se sont éventuellement décollés, ont été recollés comme mentionné ci-dessus. Après environ un mois de culture, les flasques contenant des fibroblastes ont été transférés dans une flasque de plus grand volume (75cm²) pour être amplifiés et congelés.

Le transfert des fibroblastes dans une nouvelle flasque (ou autre contenant) est appelé passage, et s'effectue par digestion enzymatique à la Trypsine - EDTA (0,05%) (Éthylène Diamine Tétra Acétique Acide) pendant 3-4 min à 37°C (les cellules sont préalablement rincées avec du PBS (Phosphate Buffer Saline, 1x), l'enzyme va ensuite être inhibée par du milieu de culture, et ce « mélange » va alors être récolté dans un tube, centrifugé pendant 4min à 300 xg, et le culot cellulaire va être resuspendu dans du milieu de culture (DMEM, 10% FBS, 1% P/S) et transféré/dilué dans un nouveau contenant. Les cellules peuvent aussi être congelées dans du milieu contenant 10% de DMSO (DiMéthylSulfOxyde), 40% de milieu de culture et 50% de FBS et transférées dans un tube de cryopréservation placé à -80°C sur la nuit (dans un contenant d'isopropanol permettant ainsi un refroidissement de 1°C par minute pour préserver les cellules), puis dans de l'Azote liquide pour une conservation à long terme (-195°C).

À la suite de cela, les fibroblastes sont maintenus dans du DMEM avec 10% de FBS et 1% de P/S jusqu'au passage 14, qui représente un stade avancé de vieillissement cellulaire de culture primaire (après ce passage les cellules sont difficiles à maintenir en culture en raison du phénomène de sénescence qui s'accroît).

1.2.Lignées cellulaires

Les cellules HEK 293T ont été cultivées dans du DMEM suppléé avec 10% de FBS et 1% de P/S. Les cellules A549_BTR ont été maintenues dans du RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) avec 10% de FBS, 1% de P/S et 250µg/mL G418 (Geneticin®, maintient de la lignée stable). Le passage et la congélation des cellules ont été effectués comme mentionné ci-dessus. De plus, les cellules ont été cultivées maximum un mois avant d'en décongeler de nouvelles, pour éviter des mutations spontanées ou des contaminations qui peuvent survenir chez ces lignées lorsque la culture cellulaire dépasse deux mois.

1.3.Cellules souches embryonnaires

1.3.1. Reprogrammation

Le choix du laboratoire pour la reprogrammation des fibroblastes de patients et de sujets témoins, s'est porté sur l'utilisation du kit « CytoTune®-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit » (Invitrogen™) basé sur les facteurs de Yamanaka (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc) (66). Nous avons généré trois lignées de patients, et trois lignées de sujets témoins.

Deux jours avant la transduction, les fibroblastes sontensemencés dans deux puits d'une plaque 6 puits (DMEM, 10% FBS, 1% P/S) pour atteindre une confluence proche de 60% le jour de la transduction, qui s'effectue en suivant le protocole du kit, et le lendemain le milieu est remplacé par du milieu frais et les cellules sont maintenues ainsi pendant 6 jours, avec changement du milieu tout les 2 jours.

Le 7^{ème} jour, les cellules sont transférées (Trypsine – EDTA (0,05%)) dans une plaque traitée avec du Matrigel® (Corning), et le lendemain le milieu est remplacé par le milieu Essential 8™, suppléé avec 1% de P/S, qui est changé quotidiennement pour permettre l'apparition des premières colonies. Aux alentours du 20^{ème} jour, celles-ci ont atteint une taille suffisante (environ 1mm), et sont passées manuellement à l'aide d'un tip de 200uL, et cultivées individuellement (clones individualisés).

1.3.2. Maintenance hiPSc et HuES9

Les cellules hiPSc et HuES9 ont été majoritairement cultivées sur une matrice de Matrigel®, cependant étant donné qu'un des protocoles de différenciation cardiaque reposait sur l'utilisation de cellules nourricières, les cellules ont aussi été cultivées sur des fibroblastes embryonnaires murins immortalisés (MEF, Mouse Embryonic Fibroblasts).

Ces cellules souches ont été maintenues en culture maximum un mois, pour non seulement éviter les mutations spontanées et les contaminations (tout comme les lignées cellulaires), mais aussi pour éviter qu'elles ne perdent leur potentiel de pluripotence, et de ce fait, se différencient spontanément en cellules mésodermes, ectodermes ou endodermes : ces cellules sont très sensibles à tout changement comme le pH, la température, etc.

1.3.2.1. Culture sur Matrigel® : « Feeder-free »

La culture des cellules souches sur cette matrice de Matrigel® s'effectue dans du milieu Essential 8™ contenant 1% de P/S, qui est changé quotidiennement. Lorsque la confluence atteint 60-70%, les cellules sont passées avec 0,5mM d'EDTA pH 8.0 (37°C, 5-6min), sur une nouvelle matrice de Matrigel®.

Le Matrigel® a la particularité d'être sous forme liquide à 4°C, et de se solidifier rapidement à température ambiante. De ce fait, la préparation des plaques de culture pour le passage des cellules doit s'effectuer rapidement et à froid.

Pour ce faire, un aliquot de Matrigel® de quantité définie par le fournisseur (par exemple 0,5mg pour 1 plaque 6puits), est dilué dans du milieu de culture froid et transféré dans la plaque à traiter, et après 1 heure d'incubation à température pièce, le Matrigel® a formé une couche qui va alors pouvoir servir de support aux cellules.

1.3.2.2. Culture sur MEF : « Feeder dependant »

Les cellules souches sont cultivées sur des fibroblastes embryonnaires murins immortalisés (MEF) qui sont nécessaires pour les maintenir en état de pluripotence pendant toute leur propagation par la libération de facteurs de croissance. Cette culture s'avère être indispensable pour la culture des cellules souches, en effet si la préparation n'est pas optimale, les cellules souches ne pourront pas proliférer normalement et répondre correctement aux traitements, de ce fait, une différenciation anarchique et/ou une mortalité anormale pourraient avoir lieu.

Ces MEF sont obtenus par digestion enzymatique d'embryons de souris (109), et sont entretenues dans un milieu composé de DMEM avec 10% de FBS, 0,1% de L-Glutamine, 0,1% d'Acides Aminés Non Essentiels et 1% de P/S. Elles sont passées au tiers tous les 4 jours par digestion enzymatique à la Trypsine - EDTA (0,05%) (5 min à 37°C) et lorsqu'elles atteignent 90% de confluence au passage 3, elles subissent un traitement anti-mitotique effectué avec 10µg/mL de Mitomycine C pendant 2 heures.

Suite à cela, elles sontensemencées proportionnellement à la taille des boîtes de culture (1,8 millions de cellules pour une boîte de 10 cm de diamètre, 600 000 cellules pour une boîte de 6 cm de diamètre, etc.).

Au préalable, les boîtes sont recouvertes de Gélatine à 0,1% (30min à 37°C), laissant après aspiration un film protecteur sur lequel les MEFs mitomycinées pourront adhérer et servir de support aux cellules souches étudiées.

Les hiPSc et HuES9 cultivées sur cette matrice, ont été maintenues dans du milieu KO-DMEM (KnockOut DMEM), 0,1% de L-Glutamine, 0,1% d'AANE, 100µM de 2-Mercaptoethanol, de 10ng/mL de FGF2 (Fibroblast Growth Factor : Recombinant Human FGF-basic), et de 15% de sérum de remplacement (KnockOut™ Serum Replacement). Le milieu est changé quotidiennement, et le passage des cellules s'effectue avec de la Collagénase de type IV à 1,2mg/mL (37°C, 15 min). De plus, pour faciliter l'adhésion des cellules sur les MEF, 10µM de « ROCK Inhibitor » est utilisé (Y-27632).

1.4. Test de détection de contamination aux Mycoplasmes

Les Mycoplasmes sont des contaminants cellulaires qui entrent en compétition avec les cellules pour capter les nutriments du milieu de culture, et qui de ce fait affectent principalement la prolifération et les réponses des cellules. L'absence de contamination des cultures cellulaires par les Mycoplasmes, a donc été testée à l'aide du kit « MycoAlert™ PLUS Mycoplasma Detection Kit » (Lonza), et a été effectuée en routine toutes les 3-4 semaines.

2. La différenciation cardiaque

Les protocoles de différenciation cardiaque des cellules hiPS et HuES9 utilisés sont basés sur des protocoles publiés, ainsi que sur des protocoles de nos collaborateurs.

Les deux premiers protocoles permettent d'obtenir une population hétérogène de cardiomyocytes (oreillettes, ventricules, etc.), afin de valider les conditions expérimentales (ainsi que les amorces de qPCR relative en temps réel, les anticorps pour l'immunomarquage, etc.), qui seront par la suite modifiées pour diriger la différenciation spécifiquement vers les cellules du nœud sinusal.

2.1.Kit « ready-to-use » de Life Technologies™

Les cellules ont tout d'abord été différenciées en utilisant le kit de différenciation « PSC Cardiomyocyte Differentiation Kit prototype » de Life technologies™, incluant des milieux prêts à l'emploi (qu'on a supplée avec 1% de P/S).

Les cellules ont été cultivées dans des plaques 12 puits, et lorsqu'elles ont atteint une confluence de 60-70% la différenciation a débuté par ajout du milieu « Cardiomyocyte Differentiation Medium A » (Jour 0). Au Jour 2 de différenciation, le milieu a été changé et remplacé par le « Cardiomyocyte Differentiation Medium B », et à partir du Jour 4, le milieu « Cardiomyocyte Maintenance Medium » a été utilisé et changé tous les 2 jours.

Ce protocole n'est pas celui qui sera utilisé pour générer des cellules du nœud sinusal, mais il permet d'obtenir des cardiomyocytes rapidement et simplement pour nous permettre de tester et de perfectionner les techniques d'analyses qui seront utilisées (qPCR relative, électrophysiologie, immunomarquage, etc.). De plus, la composition des différents milieux utilisés est tenue secrète par la compagnie, ce qui ne nous permet pas de moduler les concentrations des différents facteurs présents.

2.2. Protocole de différenciation cardiaque

Le protocole utilisé a été validé et publié par notre collaborateur le Dr Michel Pucéat (110), dans lequel les cellules sont différenciées étape par étape en cellules du mésendoderme, du mésoderme, et du 1^{er}/2nd champ cardiaque pour former des cellules cardiaques non pacemaker, *via* l'utilisation d'activateurs/inhibiteurs des voies canoniques et non-canoniques de la voie de signalisation Wnt (impliquées dans de nombreux processus cellulaires, dont notamment le développement cardiaque), associées avec des traitements de facteurs inducteurs de différenciation cardiaque (111-120).

Les cellules ont été cultivées dans des pétri de 10cm sur une matrice de MEF, et lorsque la confluence a été proche de 50%, elles ont été traitées avec 100ng/mL de Wnt3a dans du milieu RPMI 1640 avec du B27 (complément nutritif) et 1% de P/S (Jour 0). Le Jour 1, elles ont été traitées avec 10ng/mL de BMP2 activateur de la cardiogenèse et 1µM de Su5402, inhibiteur des facteurs de croissance, pour induire la formation du mésoderme, qui s'est poursuivie le Jour 2 avec les mêmes facteurs plus 1µM d'IWP2 inhibiteur de la voie canonique de Wnt (Inhibitor of Wnt ligand Production 2), pour activer la voie non-canonique.

Au Jour 3, les cellules ont été traitées avec 1 μ M d'IWP2 dans du DMEM suppléé de 5% de SR et 1% d P/S, puis le Jour 4, avec 10ng/mL de SHH (Sonic Hedgehog) pour former le mésoderme cardiaque.

Au Jour 5, les cellules ont été triées en utilisant un anticorps anti-CD15 marqueur de différenciation des progéniteurs cardiovasculaires (SSEA1) couplé à des microbilles magnétiques afin de purifier la population de cellules différenciées (EasySep™ HLA CD15 WB Positive Selection Kit, STEMCELL™) (110, 121). A la suite du tri, les cellules ont été mises sur une matrice de Fibronectine (10 μ g/cm²) et traitées pendant 5 jours avec une faible concentration de FGF2 (2ng/mL) pour induire la formation de cardiomyocytes du 1^{er} ou 2nd second champ cardiaque.

La maturation de ces cellules a été menée à l'aide d'un milieu de culture contenant peu de glucose (DMEM low glucose) et beaucoup de lipides (Chemically Defined Lipid Concentrate) pour induire un changement métabolique des cardiomyocytes immatures, utilisant principalement le glucose comme source d'énergie, vers celui de cardiomyocytes mature utilisant principalement les acides gras (122).

Ce protocole a servi de base pour établir le protocole de différenciation des cellules spécifiquement vers les cellules du nœud sinusal (voir section suivante). La Figure 8 présente un résumé des deux protocoles mentionnés ci-dessus.

Étapes de la différenciation	Jours de différenciation	Protocole: Dr Pucéat	Protocole: Life technologies
		Différenciation dirigée Matrice: MEF	Milieux prêt à l'emploi Matrice: Matrigel®
HuES iPS	Jour 0	Wnt3a	Cardiomyocytes Differentiation Medium A
↓	Jour 1	BMP2, Su5402	
Mésoderme	Jour 2	BMP2, Su5402, IWP2	Cardiomyocytes Differentiation Medium B
↓	Jour 3	IWP2	
Mésoderme Cardiaque	Jour 4	SHH	Cardiomyocytes Maintenance Medium
↓	Jour 5 – Jour 10	Tri cellulaire CD15+ Matrice Fibronectine FGF2	
Progéniteurs Cardiaques			
↓		Réduction de glucose Augmentation de lipide	
Cardiomyocytes Immatures	Jour 10-...		
Cardiomyocytes Matures			

Figure 8: Résumé et comparaison des protocoles de différenciation cardiaque utilisés.

2.3. Différenciation en cellules du nœud sinusal

La différenciation des cellules souches en cellules du nœud sinusal n'a pas pu être menée pour des raisons expliquées dans la partie Résultats, cependant le protocole qui aurait dû et qui sera utilisé dans des études futures, est présenté ci-dessous.

Le protocole du Dr Pucéat a été modifié et adapté pour inclure des transductions de lentivirus exprimant TBX18, TBX3 et/ou SHOX2 (11, 13, 15, 16), aux différentes étapes clés du développement embryonnaire, à savoir le mésoderme, et/ou le mésoderme cardiaque.

Les cellules seront transduites avec un seul lentivirus (123), puis selon les résultats obtenus, des co-transductions seront envisagées. De plus, pour tester l'influence de SGO1 sur le développement cardiaque et obtenir des cellules du nœud sinusal, des lentivirus porteurs des cDNA des isoformes longue ou courte de SGO1 sauvage WT ou mutée K23E, pourront également être utilisés.

3. Isolation et individualisation de cellules cardiaques

Les activités électriques des cellules cardiaques générées seront analysées par l'étude des différents courants générés à l'institut de Cardiologie de Montréal où le protocole est établi depuis 1996 (Laboratoire du Dr Stanley Nattel) (124, 125). Mais au préalable, des premiers tests d'isolation et d'individualisation des cellules cardiaques générées avec le protocole de Life Technologies™, ont été effectués par traitement des cellules avec 0,5mg/mL de Collagenase B et 75ug/mL de Liberase pendant 50min à 37°C.

4. Clonage et lentivirus

4.1. Clonage par recombinaison Gateway™

Dans ce projet de recherche, des plasmides d'expression des différentes isoformes de la protéine SGO1 humaine (longue A2 ou courte C2) sauvage ou mutée K23E ont été générés à l'aide de la technologie Gateway™ d'Invitrogen™, dont le principe est basé sur des réactions de recombinaison entre plasmides. Concrètement, notre gène d'intérêt (fragment de PCR) est inséré dans un vecteur « donneur » lors d'une première recombinaison pour générer un clone « d'entrée », qui va à son tour être recombiné avec un vecteur de « destination » pour générer un clone d'expression.

Quatre clones « d'entrée » de la protéine SGO1 ont été générés :

- pENTR_hSGOL1_A2WT (isoforme longue sauvage),
- pENTR_hSGOL1_A2K23E (isoforme longue mutée K23E),
- pENTR_hSGOL1_C2WT (isoforme courte sauvage),
- pENTR_hSGOL1_C2K23E (isoforme courte mutée K23E).

Ces clones ont par la suite été recombines avec le vecteur pLex_307 (porteur d'un tag V5), pour former des plasmides d'expression porteurs d'un tag V5 à leur extrémité C-terminale. Ces plasmides ont été séquencés par la méthode de Sanger, puis validés dans des cellules HEK 293T par transfection, ou la surexpression des protéines d'intérêts a été analysée par immunoblot. De plus, cette même technologie Gateway™ a été utilisée pour générer des plasmides porteurs de TBX18, TBX3, et SHOX2 pour produire des lentivirus.

4.2. Production de lentivirus

Les lentivirus TBX18, TBX3 et SHOX2 ont été générés selon les protocoles standards de production de lentivirus (126, 127), dans le but d'être utilisés lors de la différenciation des cellules HuES9 et hiPS en cellules du nœud sinusal. Ces derniers ont été testés dans des cellules HEK 293T, et titrés à l'aide du kit « Lenti-X™ p24 Rapid Titer Kit » (Takara Bio Company ©).

5. Profil d'activation de la voie TGF- β : Dual-Luciferase assay

Pour étudier le profil d'activation de la voie de signalisation TGF- β , l'activité du rapporteur SBE4_Luc (Smad Binding Element) a été mesurée dans des cellules HEK 293T, en utilisant le kit de détection « Dual-Luciferase® Reporter Assay » (Promega). Ce kit est basé sur la détection séquentielle de l'activité Luciferase de la Firefly (dans notre cas, le plasmide SBE4_Luc), puis de la Renilla qui sert de contrôle (plasmide pRT-LK). Le protocole ci-dessous, est basé sur celui du laboratoire du Dr Rehemtulla (128).

Les cellules HEK 293T ont été cultivées dans des plaques 24 puits (ensemencement de 80 000 cellules par puits), et à 70% de confluence, elles ont été co-transfectées avec 500ng de plasmides d'expression de SGO1 (isoforme longue ou courte, sauvage ou mutée K23E, générés avec le système Gateway™) ou de vecteur vide pLex_307, ainsi qu'avec 250ng de SBE4_Luc et 10ng de pRT-LK. Le PEI (PolyEthylenImine) a été utilisé comme agent de transfection, en suivant les protocoles standards. Le lendemain matin, les cellules ont été starvées (changement de milieu en absence totale de sérum) pendant 6 heures, puis traitées pendant 24 heures avec 10ng/mL de TGF- β 1.

Les résultats obtenus ont été normalisés avec ceux de la Renilla Luciferase, et sont issus de cinq expériences indépendantes, où pour chacune, des triplicata biologiques et techniques ont été effectués. Le lecteur de plaque EnVision™ 2104 a été utilisé pour mesurer la bioluminescence (Perkin Elmer).

6. Profil d'inhibition de la voie TGF- β : BTR reporter

Le profil d'inhibition de la voie TGF- β a été étudié à l'aide de la lignée cellulaire A549_BTR exprimant le rapporteur BTR (Bioluminescent TGF- β Receptor 1 (TGFBRI) reporter), créé dans le laboratoire du Dr Rehemtulla (108).

La Figure 9 présente la construction Firefly Luciferase qui a été modifiée par ce dernier, et qui contient entre les parties N et C-terminales un site de phosphorylation de la protéine SMAD2 (motif SXS), lié à un domaine FHA2 (fixation de peptide phosphorylé). Le système fonctionne de la façon suivante : l'activité de la Luciferase est inhibée en présence de phospho-SMAD2, donc quand il y a activation de la voie TGF- β , et inversement, elle est activée (émission de bioluminescence en présence du substrat Luciférine) quand cette voie est inactive, donc quand il n'y a pas de phospho-SMAD2.

Le choix de ce système « inverse », repose sur l'hypothèse selon laquelle la protéine SGO1 régule la voie TGF- β par inhibition et que celle-ci est levée par la mutation K23E. De ce fait, ce système inverse nous permet d'étudier le récepteur de type I TGFBRI, et d'obtenir un signal de bioluminescence lorsqu'il y a inhibition de la phosphorylation de SMAD2.

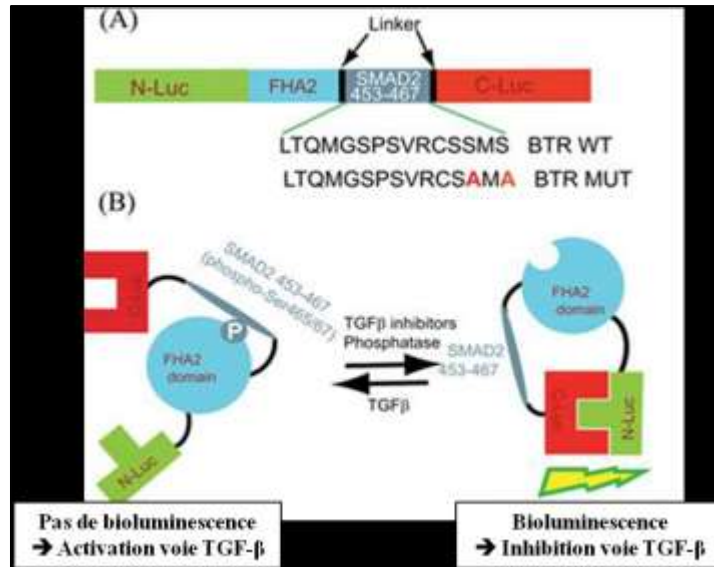


Figure 9: Construction et mécanisme d'action du BTR reporteur, adaptée de (107).

Le protocole qui a été établie, repose sur celui du Dr Rehemtulla. Les cellules A549_BTR ont donc été cultivées dans des plaques 96 puits noires pour ne pas dégrader la Luciférine qui est sensible à la lumière (ensemencement de 5000 cellules par puits), et à 70% de confluence, elles ont été transfectées avec 1000ng des mêmes constructions plasmidiques de SGO1 que pour l'étude de l'activation de la voie TGF- β (ou avec le vecteur vide pLex_307), en utilisant cette fois, la Lipofectamine® 2000 comme agent de transfection selon le protocole préétablie. Le lendemain soir, les cellules ont été starvées sur la nuit (en absence totale de sérum), et le lendemain matin elles ont été stimulées de 0 à 6 heures avec soit 25 μ M de SB431542 (inhibiteur spécifique du récepteur de type I de la voie TGF- β), soit avec 5, 10 ou 20ng/mL de TGF- β 1, ou soit avec la combinaison des deux.

Des tests d'optimisation ont également été faits au préalable, sur des cellules transfectées avec le vecteur vide pLex_307, starvées avec 0% ou 0,5% de sérum, et traitées avec 10ng/mL de TGF- β 1 et différentes concentrations de SB431542 (0, 1, 5, 10, 25 μ M).

La bioluminescence a été lue avec le lecteur de plaque EnVision™ 2104, après ajout de 100µg/mL de D-Luciferin (Beetle Luciferin) et incubation à 37°C pendant 5 min. Les résultats obtenus sont issus de quatre expériences indépendantes, avec pour chacune des quadruplicata biologiques.

7. Quantification des phosphoprotéines : AlphaScreen™

L'état de phosphorylation des protéines de la voie canonique (SMAD3) et de la voie non-canonique (p38, ERK1/2, JNK1/2/3), a été quantifié à l'aide de la technologie ALPHA (Amplified Luminescence Proximity Homogenous Assay, Perkin Elmer), *via* l'utilisation des kits « AlphaScreen® SureFire® Ultra™ assay » spécifiques des protéines cibles (pSMAD3, p-p38 MAPK, pERK1/2, p-JNK1/2/3, ainsi que p38 MAPK Total, ERK1/2 Total).

Cette technique de quantification est basée sur l'utilisation de deux anticorps qui vont reconnaître des domaines spécifiques de la protéine d'intérêt, (dans le cas de la détection de phospho-protéines, un des anticorps va reconnaître un domaine phosphorylé).

En présence, par exemple, de phospho-protéines, ces anticorps vont être captés soit par une bille « donneuse » soit par une bille « acceptrice » qui vont alors se retrouver à proximité l'une de l'autre.

La bille « donneuse » va alors être excitée et va libérer un oxygène singulet qui va être capté par la bille « acceptrice » : ce qui va générer un signal (Figure 10). Donc, s'il n'y a pas de phospho-protéines, il n'y a pas de signal.

De ce fait, la quantité d'émission lumineuse est directement proportionnelle à la quantité de phospho-protéines présente dans l'échantillon.

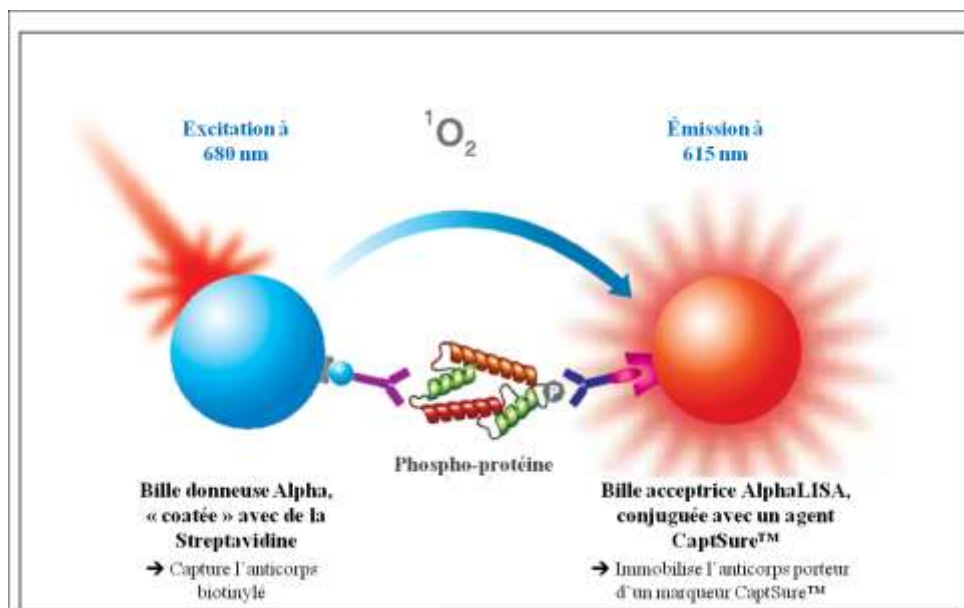


Figure 10 : Principe du test AlphaScreen® SureFire® Ultra™ assay, adaptée de Perkin Elmer.

Pour étudier l'impact de la mutation SGO1 K23E sur cette quantification de protéines des voies canonique et non-canoniques, trois lignées de fibroblastes de peau de patients et trois lignées de sujets témoins ont été utilisées, aux passages 8 et 14 (cellules jeunes et plus âgées).

Les cellules ont été cultivées dans des plaques 24 puits, et l'ensemencement a été de 15 000 cellules par puits pour les cellules de sujets témoins, et de 12 000 cellules pour celles de patients. On a préalablement démontré que la prolifération cellulaire est accélérée chez les cellules de patients, de ce fait elles se multiplient plus rapidement que les cellules de témoins, donc il faut les ensemercer avec moins de cellules pour que lors de la récolte (pour les analyses), on en ait approximativement le même nombre que les cellules de sujets témoins.

Deux jours après avoir été mises en plaques, les cellules ont été starvées sur la nuit en absence totale de sérum, et le lendemain matin, elles ont été stimulées avec différentes concentrations de TGF- β 1 pendant 1 heure (0-0,0001-0,001-0,01-0,1-1-10-100ng/mL), rincées avec du PBS 1x, lysées pendant 20 min à température pièce avec le tampon de lyse du kit (200 μ L par puits et contenant des inhibiteurs de protéases), et enfin placées à -20°C au minimum sur la nuit pour compléter la lyse. Les quantifications ont par la suite été effectuées dans des plaques de 384wp (Proxiplate, Perkin Elmer), conformément aux directives du protocole.

Les résultats ont été mesurés avec le lecteur de plaque EnVision™ 2104, et normalisés avec le nombre de cellules obtenus au moment de la lyse (lors de la stimulation par le TGF- β 1, des puits ayant été traités dans les mêmes conditions que les autres, mais non stimulés, ont été comptés). Les résultats obtenus pour les trois lignées de fibroblastes de patient ont été moyennés, tout comme ceux obtenus avec les trois lignées de fibroblastes de sujets témoins. Pour chaque condition, des sextuplicata ont été effectués.

8. Expression génique : qPCR relative en temps réel

Des analyses d'expression génique ont été menées pour valider les protocoles de différenciation cardiaque utilisés. L'extraction des ARN a été effectuée selon les protocoles standards (extraction au TRIzol™, Invitrogen™), et la Transcription inverse à l'aide de la « SuperScript™ III Reverse Transcriptase » (Invitrogen™).

Pour les expériences de PCR quantitative (qPCR) relative en temps réel, le kit « FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) » (Roche) a été utilisé selon les recommandations du protocole, avec 10ng d'ADNc et 10 μ M d'amorces (Forward et Reverse, voir Tableau VII de la partie Matériels), dans des plaques 384 puits avec un volume final de 20 μ L. La réaction s'est déroulée dans un Thermocycleur « 7900HT Fast Real-Time PCR System » de Thermo Fisher Scientific.

Les résultats ont été normalisés avec ceux obtenus avec les ADNc des HuES9 ; ou soit avec les ADNc de corps embryoides (EB, obtenus *via* le Dr Pucéat), qui servent de contrôle car ils expriment les gènes des trois feuilletts embryonnaires.

9. Expression protéique

9.1.Immunomarquage cellulaire (immunocytochimie)

Des immunomarquages ont été effectuées sur des cellules HuES9 en différenciation avec le protocole de Life technologies™. Ces dernières ont été cultivées et différenciées dans les mêmes conditions que les autres, sauf que les puits contenaient des « coverslips » (lamelles en verre), pré-traités avec 0,1% de gélatine (30min, 37°C) avant l'ajout de la matrice Matrigel®.

Le protocole a été effectué selon les recommandations standards : les cellules ont été rincées avec du PBS 1x, fixées avec du Paraformaldéhyde 3% 5 min, traitées avec 0,3% de Triton X-100 5 min pour perméabiliser les membranes, puis les sites non spécifiques ont été bloqués avec 5% de goat serum pendant 1 heure dans une chambre humide.

Les anticorps primaires ont été incubés sur la nuit à 4°C (1/200), et enfin, les secondaires ont été utilisés au 1/1000 1 heure (Alexa Fluor 488 Goat anti-Rabbit IgG, et Alexa Fluor 594 Goat anti-Mouse IgG). Le montage des lames s'est effectué à l'aide du « ProLong™ Gold Antifade Mountant with DAPI » (Invitrogen™).

Les images ont été obtenues à l'aide d'un microscope inversé Leica DMI6000B contrôlant le système « Ultraview Vox spinning-disc confocal system » (PerkinElmer).

9.2. Immunoblot (western blot)

Les protocoles standards ont été suivis pour lyser et extraire les protéines dans du tampon de lyse composé d'inhibiteurs de protéases et de RIPA (RadioImmunoPrecipitation Assay), puis un dosage par la méthode BCA (BiCinchoninic acid Assay) a été effectué.

Les protéines ont par la suite migrées dans un gel SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) à 12%, puis transférées sur une membrane de nitrocellulose. Les sites non spécifiques ont été bloqués dans 5% de lait, sauf dans le cas de la détection de la protéine SGO1, où le blocage s'est fait dans 5% de BSA (Bovine Serum Albumine). Les anticorps primaires ont été incubés 1 heure à température ambiante et dilués au 1/1000 pour anti-pSMAD2 et anti-SMAD2), 1/500 pour anti-GAPDH, et 1/200 pour anti-SGO1.

Les anticorps secondaires couplés à l'enzyme HRP (HorseRadish Peroxidase) ont été incubés 1 heure à température ambiante et dilués 1/20 000 (Goat anti-Mouse IgG (H+L) HRP, et Goat anti-Rabbit IgG (H+L) HRP).

La révélation des protéines s'est effectuée par chimiluminescence à l'aide du substrat « SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate » (Thermo Fisher Scientific), qui a été détectée avec le système de détection ImageQuant LAS 500 de GE Healthcare.

10. Analyses statistiques

Le logiciel Microsoft® Excel 2010 a été utilisé pour extraire les données brutes issues des différents fichiers générés par les instruments de mesure. Par la suite, toutes les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le logiciel GraphPad Prism® v7.

Des tests statistiques ANOVA à deux facteurs ont été menés et ont permis de déterminer les p-values des différents résultats obtenus (qPCR).

Pour les quantifications protéiques obtenus avec l'AlphaScreen™, des analyses de régression non-linéaire (équation : $\log(\text{agoniste})$ vs réponse, à « pente variable ») ont permis de déterminer les coefficients de détermination R^2 , ainsi que les concentrations efficaces EC50 (concentration produisant 50% de l'effet maximal observé).

Concernant l'intensité de signal des immunoblots, ceux-ci ont été mesurés en utilisant le logiciel d'analyse Image J 1.48v (129).

RÉSULTATS

1. Différenciation cardiaque des cellules souches embryonnaires

Les cellules souches sont un excellent modèle pour comprendre et étudier les phénomènes qui se produisent lors de l'embryogenèse, car leur propriété de pluripotence leur permet de se différencier en n'importe quel type de tissus, cellules, d'un organisme selon des stimuli spécifiques. C'est cette propriété que l'on a exploité afin de comprendre l'impact de la mutation SGO1 K23E sur le développement cardiaque, et plus spécifiquement du nœud sinusal chez nos patients CAID.

1.1.Reprogrammation cellulaire et maintenance des cellules

On dispose au laboratoire de cellules souches embryonnaires humaine HuES9 (Human Embryonic Stem cells) dont le potentiel de différenciation a été validé (69), et qui servent de référence pour les tests de reprogrammation et de différenciation (morphologie, expressions géniques et protéiques). Ces cellules présentent une morphologie spécifique des cellules souches embryonnaires : deux nucléoles visibles avec un cytoplasme peu abondant (Figure 11).

Celles-ci sont majoritairement maintenues en culture sur une matrice composée de Matrigel®. Cependant lors de la différenciation cardiaque, un des protocoles utilise une matrice composée de fibroblastes embryonnaires murins immortalisés (MEF, Mouse Embryonic Fibroblasts), cellules nourricières libérant de nombreux facteurs tels que des facteurs de croissance.

De ce fait, les cellules ont été également cultivées sur cette matrice, et la Figure 11 montre que la morphologie des HuES9 est similaire quelque soit la matrice utilisée.

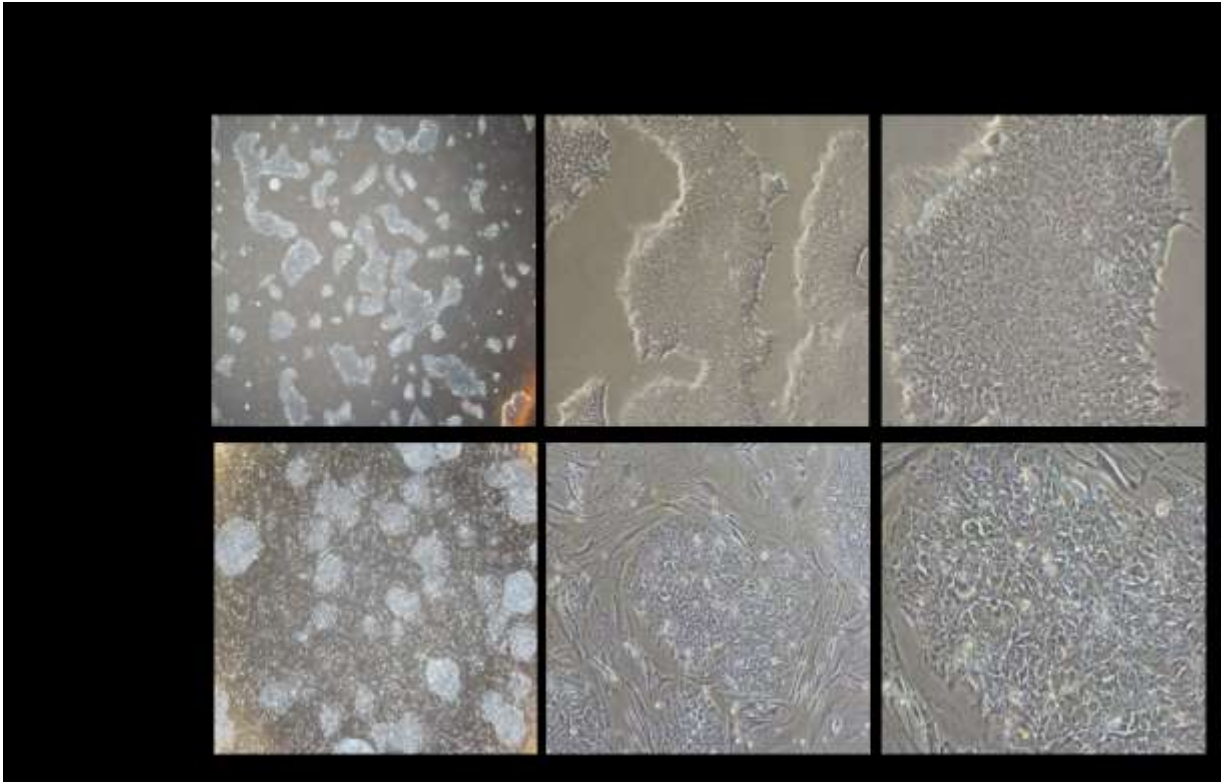


Figure 11: Morphologie des HuES9 cultivées sur une matrice de Matrigel® ou de MEF. Microscope optique inversé à contraste de phase, grossissement 40x, 100x et 200x.

Concernant les lignées hiPS de patients et de contrôles, trois lignées de chaque génotype ont été générées à l'aide du kit « CytoTune®-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit » (Invitrogen™) basé sur les facteurs de Yamanaka (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc). Initialement, une vingtaine de clones par lignées a été obtenu. La Figure 12, représente l'évolution de la morphologie des cellules lors du processus de reprogrammation pour les 30 premiers jours (un exemple est donné pour chaque génotype).

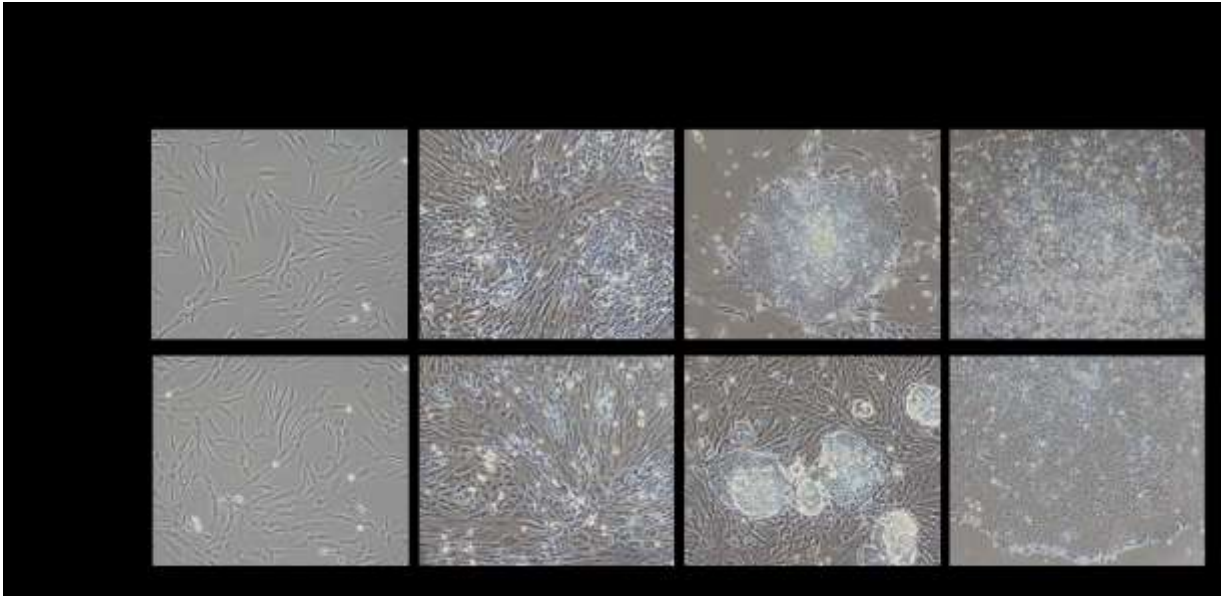


Figure 12: Morphologie de fibroblastes de peau d'un sujet témoin et d'un patient CAID en cours de reprogrammation.

Microscope optique inversé à contraste de phase, grossissement 100x.

On remarque une évolution dans la morphologie des fibroblastes : ils se sont arrondis et leur membrane cellulaire s'est éclaircie, et au 7^{ème} jour post-transduction on observe l'ébauche de la formation des premières colonies. Puis au 15^{ème} jour, les premières colonies se sont amplifiées et dès qu'elles ont atteint une taille suffisante aux alentours du 20^{ème} jour (environ 1mm), elles ont été passées manuellement et cultivées individuellement dans des puits préalablement traités avec du Matrigel®, et sont donc de ce fait devenues des clones individualisés.

Au bout du 30^{ème} jour post-transduction, on constate que les différents clones ont acquis la même morphologie que les cellules HuES9 : deux nucléoles visibles avec un cytoplasme peu abondant, caractéristique des cellules souches pluripotente.

En ce qui concerne les caractérisations phénotypique et génotypique des clones générés, elles n'ont pas pu avoir lieu en raison de la perte des cellules après 35-40 jours de reprogrammation, ceci étant causé par des problèmes de non-adhérence (décollement) des cellules sur le Matrigel®. Afin de pallier à ce problème, des tests de culture sur des MEF ont été menés, mais n'ont pas été concluants. De plus, certains clones ont subi des phénomènes de « différenciation spontanée » comme le montre la Figure 13, où on constate que la morphologie des cellules est totalement différente de la Figure 12, ce qui signifie qu'elles ont perdu leur potentiel de pluripotence et se sont différenciées.

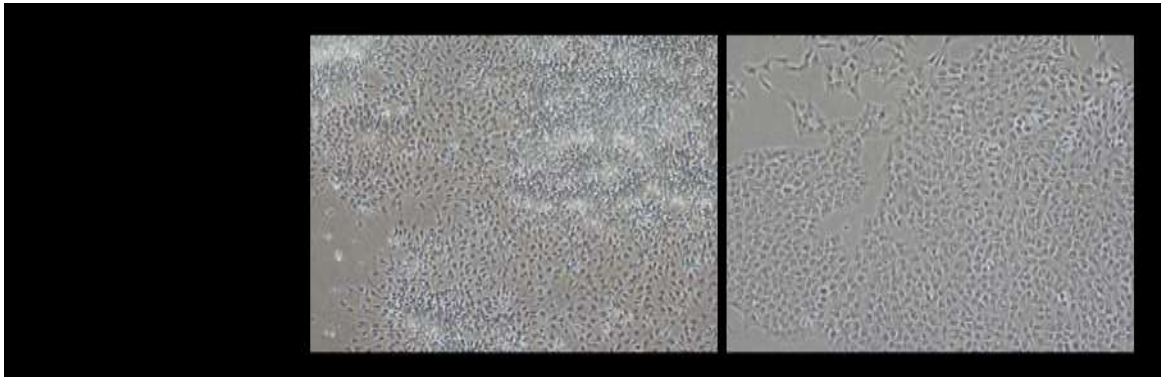


Figure 13: Morphologie d'une lignée hiPS d'un sujet témoin en différenciation spontanée. Microscope optique inversé à contraste de phase, grossissement 100x.

Cette perte totale des clones hiPS générés a pu être causée par de nombreux phénomènes : contamination du milieu de culture, de la matrice, erreurs de manipulation, ou encore altération de la qualité du plastique des plaques de culture, etc. Pour éviter que ce problème ne se reproduise, nous avons décidé d'envoyer des lignées de fibroblastes de peau de patients et de sujets contrôles à nos proches collaborateurs (Dr Michel Pucéat et Dr Massimiliano Paganelli), qui possèdent d'excellentes compétences en reprogrammation cellulaire et en culture de cellules hiPS, afin que ces derniers génèrent les clones attendus dans des conditions optimales.

1.2. Différenciation cardiaque

Afin de pouvoir étudier le rôle de SGO1 lors de la cardiogenèse et plus spécifiquement lors de la formation du nœud sinusal, les cellules HuES9 ont été différenciées dans un premier temps en cardiomyocytes (sans ciblage de cellules spécifiques comme le nœud sinusal par exemple), afin de valider le protocole qui pourra par la suite être modifié et adapté pour inclure des transductions de lentivirus TBX18, TBX3, et/ou SHOX2, afin de pouvoir diriger la différenciation spécifiquement vers les cellules du nœud sinusal (13, 15, 16).

1.1.1. Validation du potentiel de différenciation des HuES9

Dans un premier temps, la capacité des HuES9 à se différencier en cellule cardiaque a été effectuée à l'aide du kit «PSC Cardiomyocyte Differentiation Kit» (Gibco®, Life Technologies™) composé de milieux prêts à l'emploi et qui permet de ce fait, d'obtenir facilement des cardiomyocytes.

La Figure 14 présente les changements de morphologie des cellules lors du processus de différenciation. On constate qu'au 3^{ème} jour de différenciation, les colonies sont de plus en plus denses, et à partir du 7^{ème} jour celles-ci commencent à former des structures de type «réseau» qui est nécessaire pour que l'influx électrique puisse se transmettre de cellules en cellules. Ce phénomène est observable dès le 10^{ème} jour, par des battements cellulaires caractéristiques de cellules possédant un potentiel de dépolarisation, et dans notre cas, de cellules cardiaques qui vont acquérir leur structure finale vers le 14^{ème} jour (Annexe 2, vidéos).

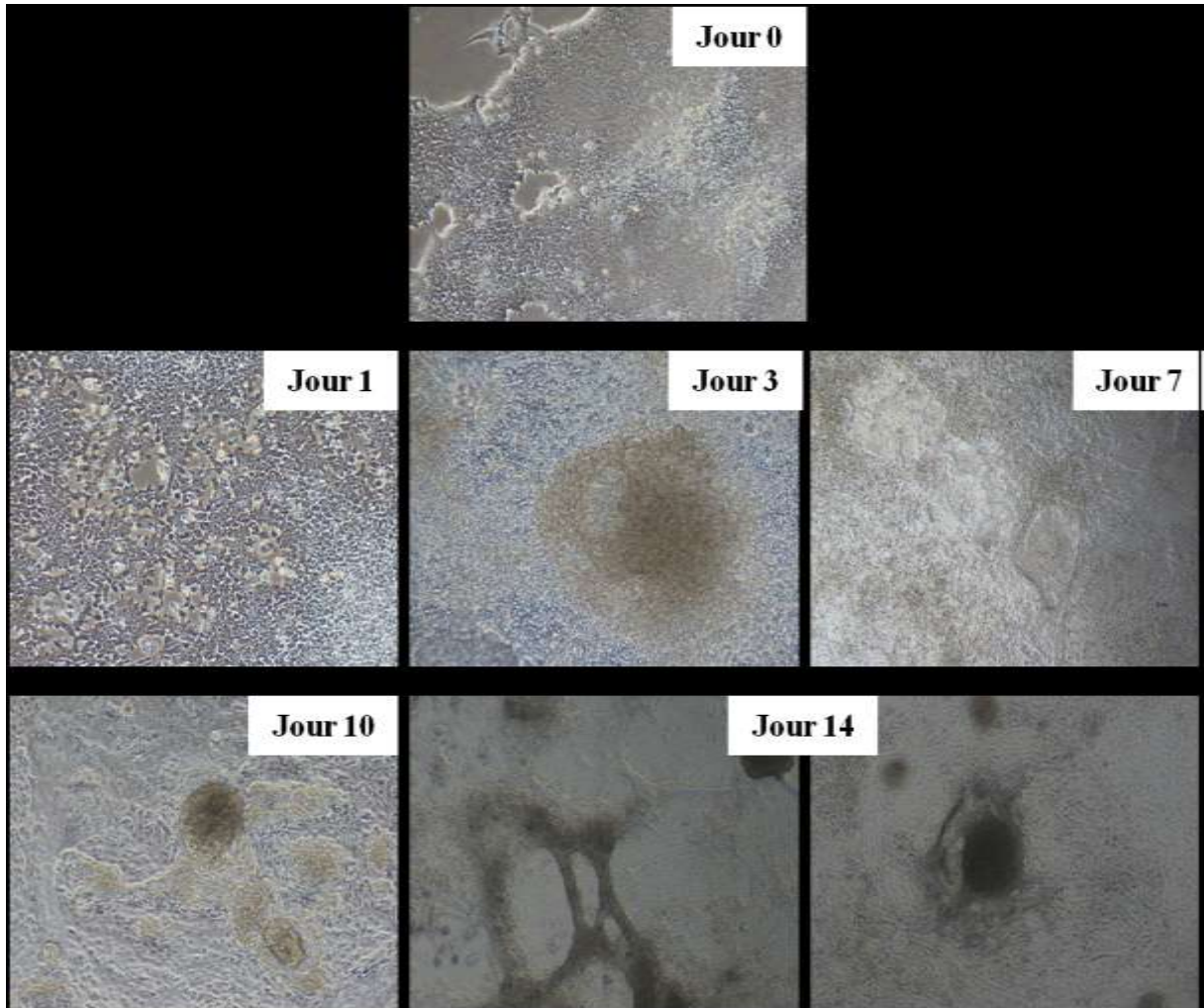


Figure 14: Morphologie des HuES9 à différents stades de différenciation cardiaque (Protocole Life Technologies™).

Microscope optique inversé à contraste de phase, grossissement 100x.

On peut observer différents « types » de battements, ce qui est principalement dû au stade de maturation et au nombre de cellules cardiaques exprimant la Troponine cardiaque de type 2 (TNNT2, marqueur des sarcomères), localisée sur les filaments fins des muscles striés, et qui régule la contraction des muscles.

Les résultats obtenus par qPCR relative en temps réel (Figure 15), indiquent que les HuES9 ont perdu leur potentiel de pluripotence (*NANOG*) dès le 2^{ème} jour de différenciation au profit de ceux des cellules cardiaques lors des différents stades de différenciation comme le mésoderme (expression des gènes *MESP1* et *T* (Brachyury)), et le mésoderme cardiaque (*GATA4*) (64, 130, 131).

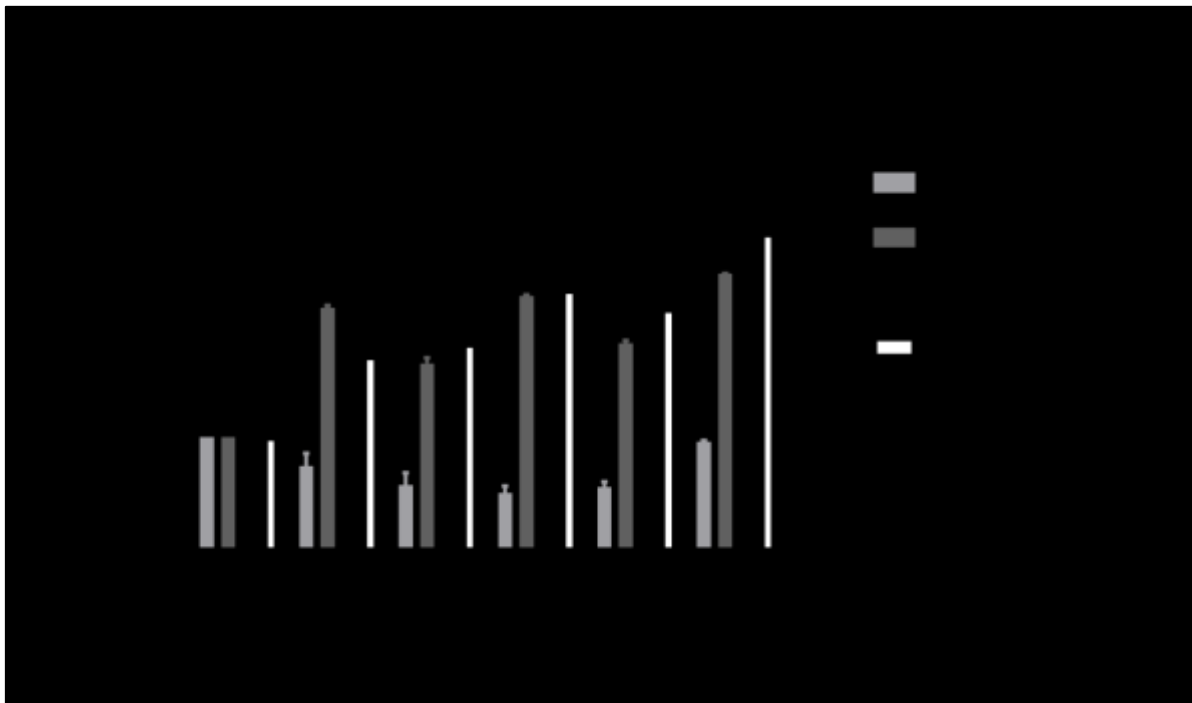


Figure 15: Potentiel de différenciation cardiaque des HuES9.

Les HuES9 différenciées avec le protocole de Life Technologies™ expriment les principaux marqueurs des différents stades de différenciation cardiaque : Mésoderme (*T/BRACHYURY* et *MESP1*), cellule cardiaque (*GATA4*), et ont perdu leur potentiel de pluripotence (*NANOG*). Les résultats ont été normalisés avec ceux obtenus pour les HUES9 non différenciées, qui de ce fait n'expriment que le marqueur *NANOG*.

Les données sont représentées comme la Moyenne ± la Déviation Standard de triplicata.

**** $p < 0.0001$, ** $p < 0.001$, * $p < 0.01$, ns : non significatif. Test ANOVA à deux facteurs.*

Ces résultats ont été confirmés par marquage immunocytochimique au 14^{ème} jour de différenciation (Figure 16), en ciblant les protéines cTNT (Troponine Cardiaque T, marqueur des sarcomères) et NKX2.5 (facteur de transcription, marqueur cardiaque nucléaire) afin de valider le phénotype cardiaque de ces cellules.

L'expression de la protéine nucléaire NKX2.5 semble faible et non exprimée dans tous les noyaux cellulaires, ce qui peut être expliquée par le fait que les cardiomyocytes sont composés de plusieurs couches de cellules (structures tridimensionnelles), et de ce fait, la superposition des différentes cellules peut « perturber » l'analyse des résultats.

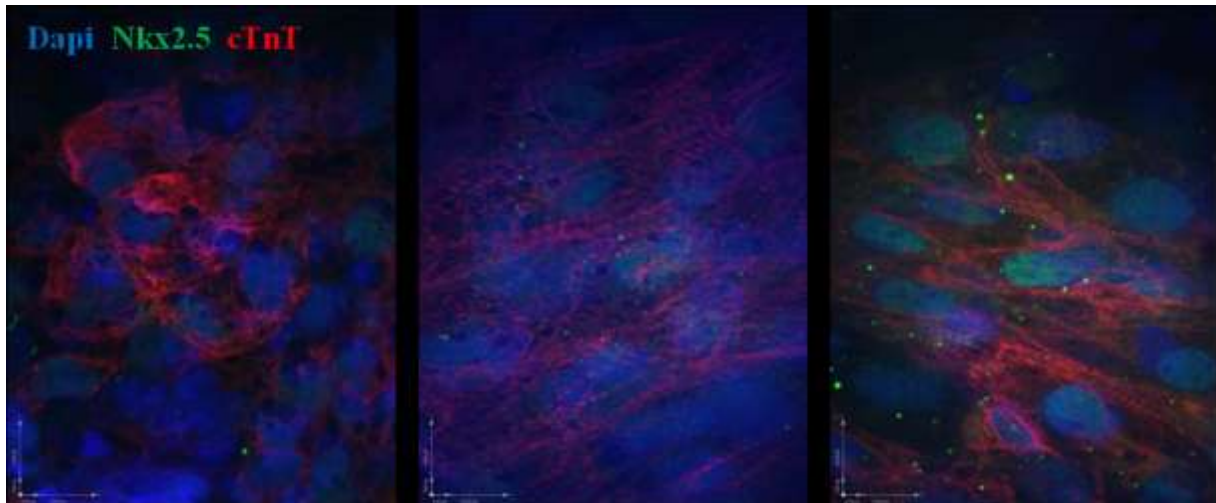


Figure 16: Expression des protéines cardiaques NKX2.5 et cTNT dans des cardiomyocytes dérivées de HuES9 au 14^{ème} jour de différenciation.

Le Dapi marque spécifiquement les noyaux cellulaires, NKX2.5 est une protéine nucléaire et cTNT marque spécifiquement les sarcomères. Microscope confocal à fluorescence inversé, 1000x.

De plus, les cardiomyocytes générés nous ont permis d'amorcer la mise au point d'un protocole d'isolement de cellules individuelles en vue de mesures électrophysiologiques qui seront faites à l'Institut de Cardiologie De Montréal au sein du laboratoire du Dr Stanley Nattel (125). Sur la Figure 17, la flèche rouge représente la morphologie cellulaire « idéale » pour pouvoir mener les analyses d'électrophysiologie : cytosol, noyau, et membrane cellulaire intacts, et on constate que le protocole est à optimiser car il engendre beaucoup de dégradation des cellules.

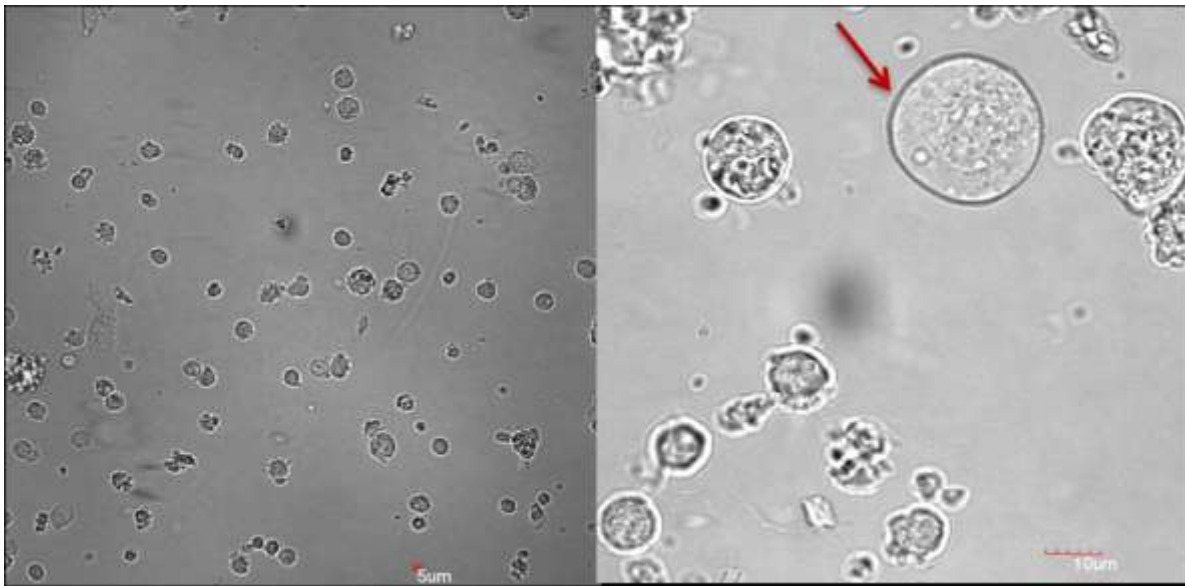


Figure 17: Morphologie des cellules cardiaques isolées par digestion enzymatique.

La flèche rouge représente la morphologie cellulaire « idéale » pour pouvoir mener les analyses d'électrophysiologie. Microscope optique inversé à contraste de phase, grossissement 100x (photo de gauche) et 200x (photo de droite).

1.1.2. Différenciation cardiaque des HuES9

Une fois le potentiel de différenciation des HuES9 validé, le protocole de différenciation cardiaque de notre collaborateur le Dr Michel Pucéat a pu être appliqué. Ce protocole, qui une fois validé sera utilisé pour induire la formation de cellules du nœud sinusal *via* l'utilisation de lentivirus, nécessite une matrice composée de MEF, et est basé sur l'utilisation d'activateurs et d'inhibiteurs des voies canoniques et non-canoniques de la voie de signalisation Wnt qui est majoritairement exprimé lors de la cardiogenèse (voir Figure 3 partie Revue de la Littérature) (112-116). De plus, au 5^{ème} jour de différenciation les cellules sont triées à l'aide d'un anticorps anti-CD15 marqueur des progéniteurs cardiovasculaires (EasySep™ HLA CD15 WB Positive Selection Kit, STEMCELL™) (110, 121).

1.1.1.1. Morphologie cellulaire

La Figure 18 représente l'évolution de la morphologie des cellules lors de leur différenciation. La première chose que l'on constate, c'est que cette dernière diffère de la morphologie obtenue avec le kit « PSC Cardiomyocyte Differentiation Kit » (Gibco®) utilisé pour la validation du potentiel de différenciation, les cellules ne semblent pas former des colonies aussi denses, ni de réseaux (Figure 14).

À la suite du tri cellulaire, les deux populations de cellules obtenues (CD15+ et CD15-) sont cultivées sur une matrice de Fibronectine afin de les comparer et de valider le triage cellulaire.

On constate tout d'abord, qu'il y a plus de cellules CD15-, donc à priori lors des cinq premiers jours de différenciation les cellules ne sont pas toutes engagées dans la voie mésodermale, le protocole serait donc à optimiser. Cependant, à partir du 8^{ème} jour, la morphologie des populations CD15+ et CD15- diffère, ce qui indique qu'on est en présence de deux populations bien distinctes, et que le tri cellulaire aurait bien fonctionné.

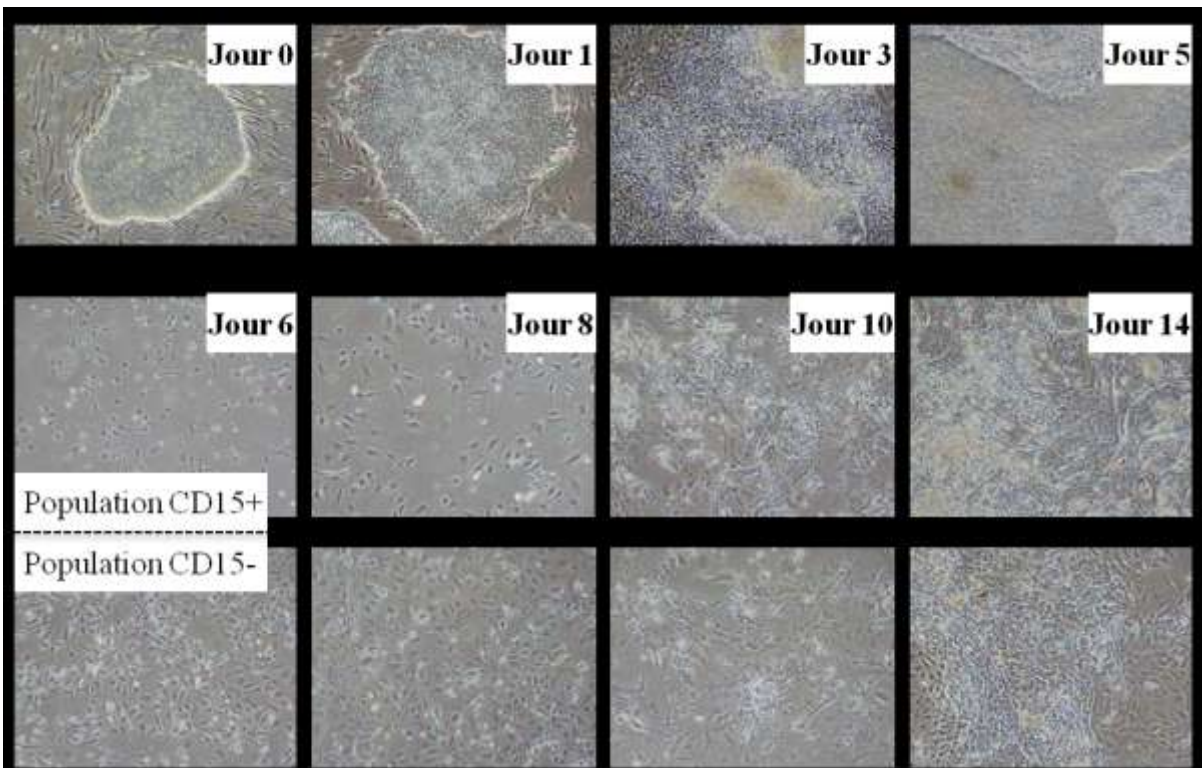


Figure 18: Morphologie des HuES9 à différents stades de différenciation cardiaque (Protocole Dr Pucéat).

Au Jour 5, les cellules sont triées pour le marqueur CD15 (progéniteurs cardiovasculaires) et les deux populations résultantes (CD15+ et CD15-) sont cultivées en parallèle sur une matrice de Fibronectine. Microscope optique inversé à contraste de phase, grossissement 100x.

Une des différences majeures avec le protocole de Life Technologies™ qui n'est pas représentée ici, c'est l'absence de battements cardiaques. En effet, avec ce protocole il n'est pas toujours possible d'en observer car les premières étapes se déroulent sur des MEF, qui induisent indirectement un changement d'adhérence et de morphologie finale des cellules *via* la sécrétion de nombreux facteurs comme des facteurs de croissance, etc. Cependant, cela n'affecte en rien le potentiel de différenciation des cellules.

1.1.1.2. Caractérisation génique

N'ayant pas pu observer de battements cardiaques, des expériences de qPCR relative en temps réel ont été menées (Figures 19 à 25, résultats normalisés avec ceux obtenus pour les corps embryoïdes). Les résultats obtenus semblent indiquer que le protocole de différenciation fonctionne, mais que des ajustements doivent être faits ainsi que des analyses supplémentaires. Les différents résultats obtenus ont été séparés en fonction des principaux stades de différenciation que l'on devrait retrouver lors de la différenciation :

- Stade mésoderme entre les Jours 1 et 5 (*MESP1* et *T/BRACHYURY*),
- Stade des progéniteurs cardiaques entre les Jours 5 et 10 (*NKX2.5*, *MEF2C*),
- Stade cellules cardiaques à partir du 10^{ème} jour (*TNNT2*, *GATA4*).

Des marqueurs des trois lignages embryonnaires, à savoir le mésoderme (*ISLI*), l'endoderme (*FOXA1*) et l'ectoderme (*PAX3*) ont également été testés, ainsi que des marqueurs de pluripotence (*NANOG*, *SOX2*) pour en vérifier la perte lors de la différenciation.

La première chose que l'on remarque, c'est que globalement les cellules HuES9 ont perdu leur potentiel de pluripotence lors de leur différenciation (Figure 19), même s'il y a possiblement eu un problème avec les échantillons des Jours 3 et 5.



Figure 19 : Expression des gènes de pluripotence (*NANOG* et *SOX2*) des HUES9 en différenciation.

*Les données sont représentées comme la Moyenne \pm la Déviation Standard de triplicata. Les p -values ont été calculées avec le test ANOVA à deux facteurs, et ont donné $p < 0.001$ pour toutes les données, sauf pour la donnée obtenue à Jour 5 pour *NANOG* (ns : non significatif).*

Les Figures 20 et 21 nous confirment que les cellules sont en différenciation et que majoritairement celles-ci se dirige vers la voie mésodermale : *T (BRACHYURY)* et *MESPI* sont majoritairement exprimés lors des cinq premiers jours de différenciation.

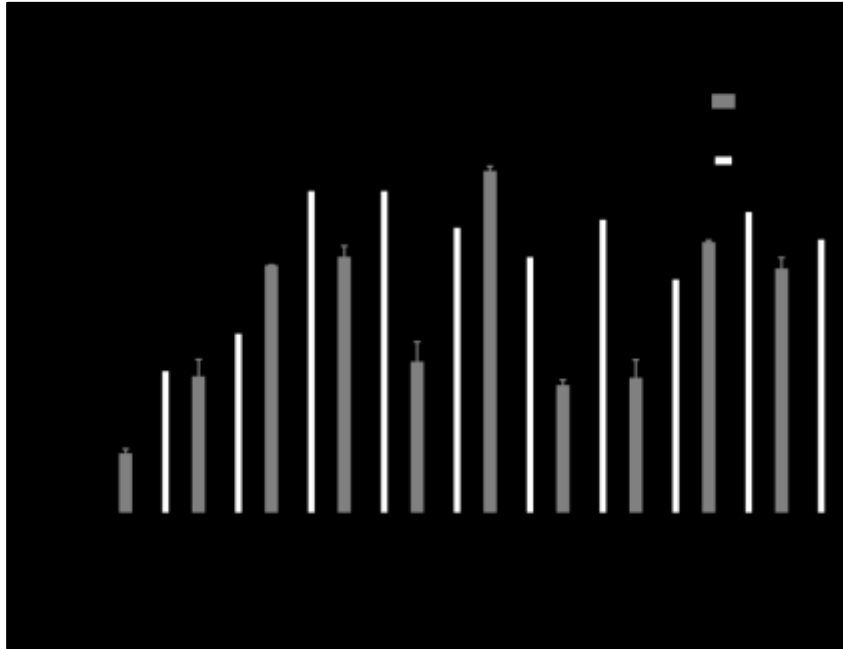


Figure 20 : Expression des gènes des trois lignages embryonnaires endoderme (*FOXA1*), ectoderme (*FOXA3*) et mésoderme (*ISL1*) des HUES9 en différenciation.



Figure 21 : Expression des gènes du mésoderme (*T* et *MESP1*) des HUES9 en différenciation.

On observe à partir du 5^{ème} jour, le maintien de l'expression de *NKX2.5* (Figure 22), puis l'expression de *GATA4* marqueur des cellules cardiaques (Figure 23).

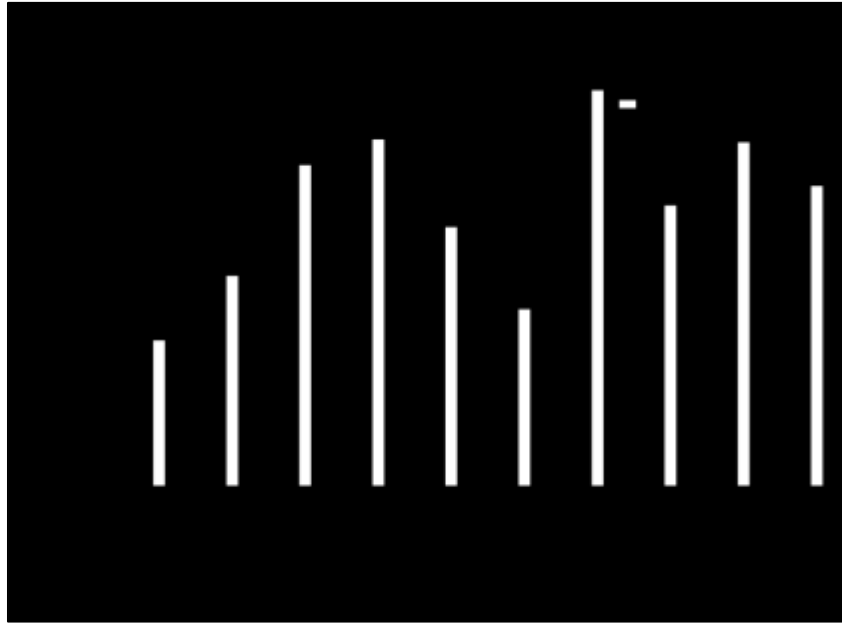


Figure 22: Expression des gènes du stade progéniteurs cardiaques (*MEF2C* et *NKX2.5*) des HUES9 en différenciation.



Figure 23: Expression des gènes cardiaques (*GATA4* et *TNNT2*) des HUES9 en différenciation.

Figures 22 à 23 : Les données sont représentées comme la Moyenne \pm la Déviation Standard de triplicata. *** $p < 0.0001$, ** $p < 0.001$, * $p < 0.01$, ns : non significatif. Test ANOVA à deux facteurs.

Malgré des problèmes pour certains échantillons (Pluripotence Jours 3 et 5), et pour certains gènes (*MEF2C*, *TNNT2*) pouvant être causés par des erreurs de manipulations (contaminations d'échantillons, d'amorces qPCR, etc.), ces résultats sont encourageants, d'autant plus que le tri cellulaire CD15 au 5^{ème} jour semble avoir relativement bien fonctionné (Figure 24). On observe aux 10^{ème} et 15^{ème} jours une perte de ce gène, ce qui est attendu, car l'expression de celui-ci se situe aux alentours du 5^{ème} jour (stade des progéniteurs cardiovasculaires).

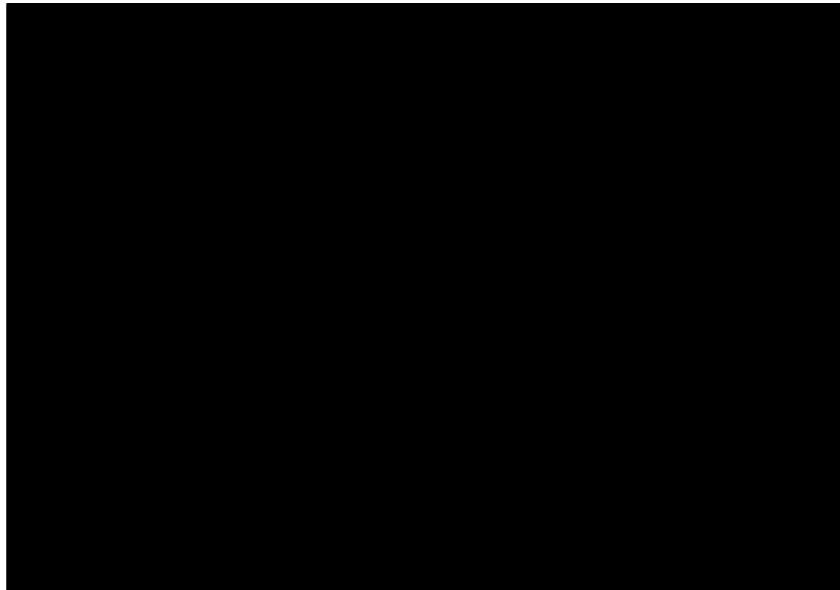


Figure 24: Expression de *SSEA1* (*CD15*) des HUES9 en différenciation.

*Les données sont représentées comme la Moyenne ± la Déviation Standard de triplicata. *** $p < 0.0001$, ** $p < 0.001$, ns : non significatif. Test ANOVA à un facteur.*

Concernant l'expression de *SGO1* (Figure 25) il semblerait que cette dernière soit nécessaire pour permettre d'une part, aux cellules de s'engager vers la voie mésodermale et pour exprimer les progéniteurs cardiaques (Jours 3 et 5), et d'autre part pour la maturation des cellules au Jour 15. Cependant, ceci n'étant que des suppositions basées sur un test unique d'expression génique, des analyses supplémentaires devront être menées.

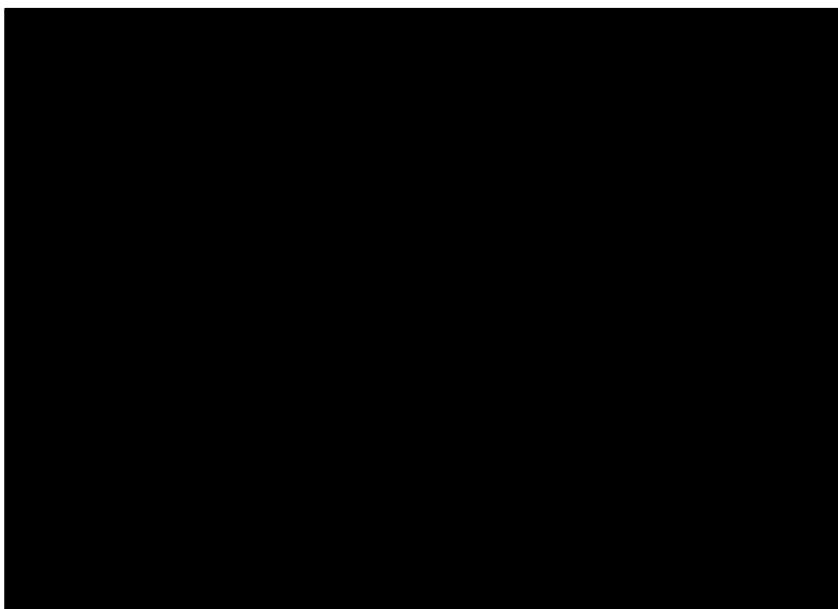


Figure 25: Expression de *SGOI* des HUES9 en différenciation.

*Les données sont représentées comme la Moyenne \pm la Déviation Standard de triplicate. ** $p < 0.001$, * $p < 0.01$, ns : non significatif. Test ANOVA à un facteur.*

Les résultats obtenus ne nous ont pas permis de tester le protocole de différenciation en cellules du nœud sinusal. En effet, même si les résultats obtenus révèlent que le protocole du Dr Pucéat permet de former des cellules cardiaques, des ajustements doivent être faits, notamment au niveau du tri cellulaire, pour garantir une différenciation plus spécifique.

De plus, d'autres analyses d'expression génique doivent être menées, et des immunomarquages devront être faits pour s'assurer que les cardiomyocytes générés expriment les protéines cardiaques (NKX2.5, cTNT, etc.)

2. Etude de la voie de signalisation TGF- β

Dans notre étude publiée en 2014 (1), nous avons montré que les fibroblastes de patients CAID présentaient un niveau plus important de pSMAD2/3 que les sujets contrôles, suggérant ainsi que la mutation SGO1 K23E aurait un impact sur la voie de signalisation TGF- β . De plus, cette hypothèse s'est confortée avec la publication en 2015 d'une étude montrant l'implication de la protéine BUB1 (partenaire de SGO1 lors de la cohésion centromérique) dans le recrutement du récepteur de type I TGFBR1, induisant ainsi son activation (107). En vue de comprendre l'implication de SGO1 dans ce processus ainsi que l'impact de la mutation K23E, trois expériences complémentaires furent menées dans le but d'étudier les profils d'activation et d'inhibition de cette voie de signalisation, ainsi que l'état de phosphorylation de protéines d'intérêts comme SMAD3, p38, ERK1/2 et JNK1/2/3.

2.1. Profil d'activation

L'activation de la voie TGF- β se traduit *in fine* par l'activation de la transcription de gènes d'intérêts impliqués dans des phénomènes de prolifération cellulaire, de développement embryonnaire, etc. Cette activation est médiée par la fixation du complexe pSMAD2/3-SMAD4 sur l'ADN au niveau du site SBE (Smad Binding Element) composé de séquences répétées CAGA (128). C'est cette propriété qui a été utilisée afin de comprendre l'impact de SGO1 sur l'activation de la voie TGF- β , *via* l'utilisation d'un gène rapporteur Luciferase contenant un site SBE (plasmide SBE_Luc, Addgene #16527) (132).

2.1.1. Expression de SBE_Luc : Dual-Luciferase assay

Pour étudier cette activation, des expériences de Dual Luciferase assay ont été menées sur des cellules HEK 293T, préalablement transfectées avec les plasmides Luciferase SBE_Luc et pRT-LK (plasmide contrôle exprimant la Renilla Luciferase), ainsi qu'avec différents plasmides exprimant SGO1 (isoforme longue A2 ou courte C2, sauvage WT ou mutée K23E), ou avec le vecteur vide pLex_307 pour pouvoir analyser nos résultats.

Les cellules ont été traitées pendant 24h avec 10ng/mL de TGF- β 1 (après une starvation en absence totale de sérum). Les résultats obtenus en Figure 26 suggèrent que la stimulation avec le TGF- β 1 n'a pas fonctionné, et que les transfections avec les plasmides SGO1 induiraient une baisse de signal (quelque soit la construction). Ce qui va à l'encontre de notre théorie selon laquelle la mutation K23E induirait une augmentation de pSMAD2/3, donc de formation du complexe pSMAD2/3-SMAD4, et en conséquence, il y aurait plus de fixation au niveau des sites SBE, donc plus de signal Luciferase.



Figure 26 : Expression relative du plasmide SBE_Luc (Firefly Luciferase) dans des HEK 293T, normalisée avec la Renilla Luciferase (pRT-LK).

(voir page suivante analyses statistiques)

Figures 26 et 27 : Les données sont représentées comme la Moyenne \pm la Déviation Standard de cinq expériences indépendantes (quadruplicata pour chaque expérience). *** $p < 0.0001$, ** $p < 0.001$, * $p < 0.01$, ns : non significatif. Test ANOVA à deux facteurs.

Pour être en mesure d'analyser et de comprendre ces résultats, nous avons regardé séparément les résultats générés par les plasmides SBE_Luc (Firefly Luciferase) et pRT-LK (Renilla Luciferase, contrôle). La Figure 27a, représente les données obtenues pour la Renilla Luciferase, plasmide contrôle permettant la normalisation des résultats, et qui ne devraient pas être modifiées suite à la stimulation avec le TGF- β 1. On constate en effet qu'il y a peu de variation, sauf pour les données du « vecteur vide » où le signal est plus faible ce qui supposerait une transfection moins efficace du plasmide pRT-LK; au contraire de la condition « A2WT » qui semble avoir eu une meilleure efficacité de transfection.

Concernant les résultats obtenus avec le plasmide SBE_Luc (Firefly Luciferase) présentés sur la Figure 27b, ceux-ci montrent que le traitement avec le TGF- β 1 n'a, à priori, eu aucun effet significatif sauf pour la condition « SGO1_A2WT ».



Figure 27 : Expressions relatives des plasmides pRT-LK (Renilla Luciférase) et SBE_Luc (Firefly Luciférase).

a : expression relative de pRT-LK, **b** : expression relative de SBE_Luc.

Cette expérience de Dual-Luciferase assay n'a pas été concluante, et suggère donc qu'il y a eu un problème soit au niveau du kit de détection en lui-même, même si des contrôles internes ont été faits et qu'ils ont donné les résultats attendus, soit au niveau des conditions de transfection, des plasmides utilisés, ou encore de la stimulation par le TGF- β 1.

2.1.2. Validation par immunomarquages

Pour vérifier les conditions de transfection des plasmides SGO1, des immunomarquages ont été effectués sur les mêmes lysats protéiques que précédemment (Figure 28), et les résultats indiquent clairement que les cellules surexpriment bien les différentes isoformes de SGO1, que ce soit la forme sauvage WT ou mutée K23E (Figure 28a). En effet, la protéine SGO1 endogène a une taille d'environ 60kda pour l'isoforme longue (majoritairement exprimée) et de 40kda pour la courte; et on constate bien que les transfections ont fonctionnées et qu'elles ont généré des protéines de taille supérieure à la forme endogène (ce qui est dû à la présence d'un marqueur V5, et de la construction utilisée).

La stimulation par le TGF- β 1 a fonctionné comme l'indique la présence de protéines pSMAD2 (52kDa) dans les échantillons stimulés. De plus, dans la Figure 28b, on constate que la surexpression des différentes isoformes de SGO1 induit une augmentation significative des protéines pSMAD2 suite à la stimulation par le TGF- β 1. On remarque également, que la surexpression des formes mutées de SGO1 (isoformes longue A2K23E et courte C2K23E) en absence de TGF- β 1, induit une augmentation de pSMAD2, ce qui est en accord avec l'hypothèse de ce projet de Recherche et avec les résultats préalablement publiés (1).

La réponse des cellules au stimulus induit par le TGF- β 1, n'est donc pas la cause des résultats obtenus précédemment avec les expériences de « Dual-Luciferase assay ».

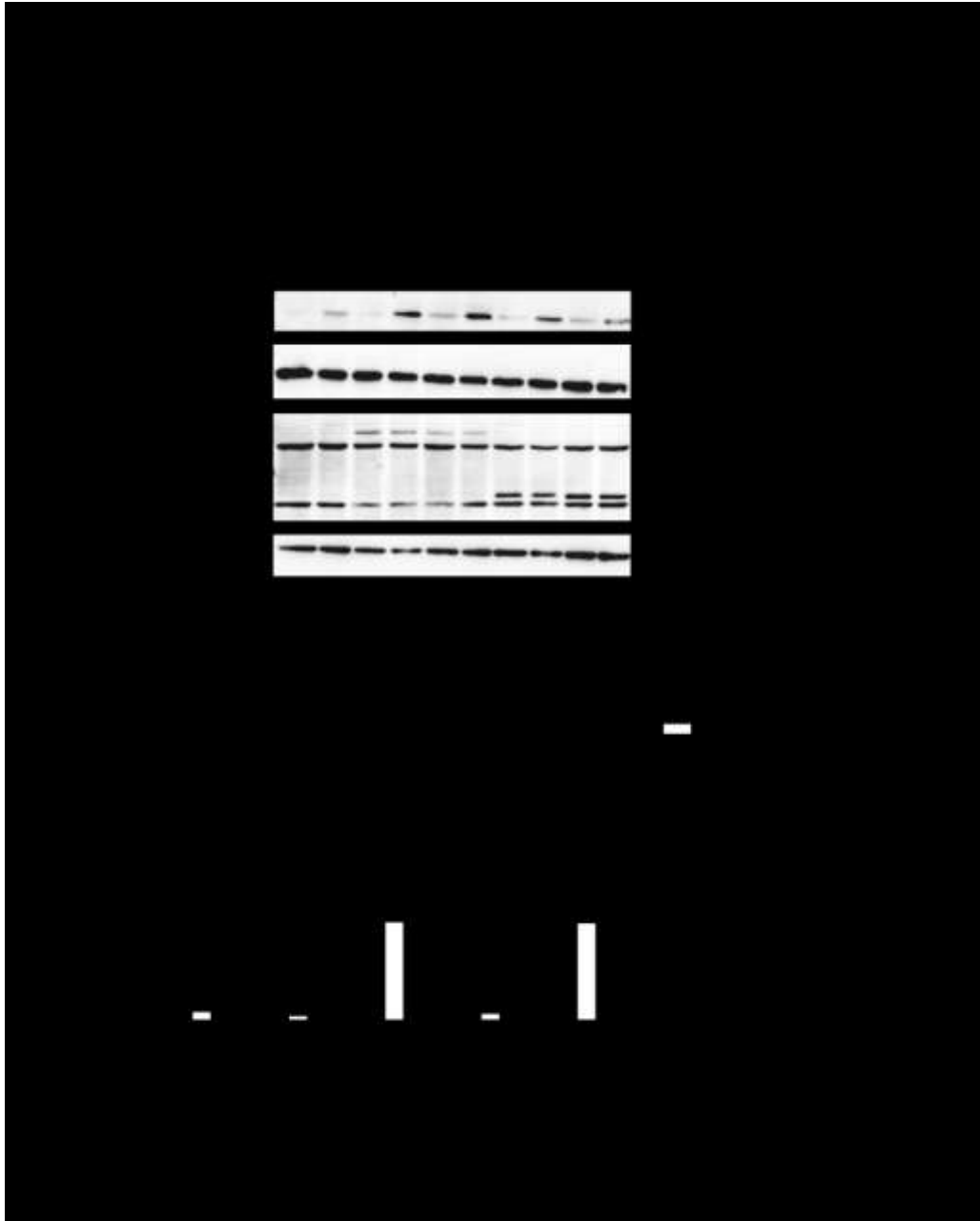


Figure 28: Expression et quantification protéiques des HEK 293T du test « Dual-Luciferase assay » (Figure 27).

a : immunoblot des protéines pSMAD2, SMAD2, SGO1 (isoformes longue et courte), et GAPDH des HEK 293T transfectées avec SBE_Luc, pRT-LK et les différentes isoformes de SGO1 (ou plasmide vide pLex_307), traitées avec 10ng/mL de TGF- β 1 pendant 24h.

b : densité relative de pSMAD2 normalisée avec GAPDH de l'immunoblot de la figure a.

*** $p < 0.0001$, ** $p < 0,001$, test ANOVA à deux facteurs.

2.1.3. Test d'expression CAGA12_Luc et CAGA12_Luc

Afin de vérifier que la construction SBE_Luc et le kit « Dual-Luciferase® Reporter Assay » sont fonctionnels, deux autres constructions Luciferase ont été testées : CAGA12_Luc (obtenu par un de nos collaborateurs aux Pays-Bas (133), composé de 12 répétitions du motif CAGA : site SBE), et SBE4_Luc (contient quatre sites SBE)

Les cellules HEK 293T ont été transfectées, starvées et stimulées dans les mêmes conditions que précédemment, en utilisant 1000 ou 2000ng (quantité maximale à la limite de la cytotoxicité) des plasmides CAGA12_Luc et SBE4_Luc (sans oublier le plasmide contrôle pRT-LK), dans le but d'obtenir le maximum de réponse des cellules.

Les résultats sont données en Figure 29, où comme précédemment, le test de « Dual-Luciferase assay » n'a pas donné les résultats escomptés : il n'y a pas d'augmentation du signal suite à la stimulation avec le TGF- β 1. Cependant, ceci n'est pas dû aux plasmides utilisés car on observe une nette différence avec le contrôle non transfecté (de l'ordre de 10 000, figures en échelle logarithmique). De plus, les résultats d'immunomarquages montrent que les cellules ont répondu au stimulus induit par le TGF- β 1.

Malgré le fait que l'analyse du profil d'activation de la voie de signalisation TGF- β ne s'est pas révélée concluante, on a tout de même montré que les cellules HEK 293T sont transfectables, qu'elles répondent aux stimuli du TGF- β 1, et que la surexpression des isoformes longue A2 sauvage et mutée K23E de SGO1 augmenterait la phosphorylation de SMAD2.

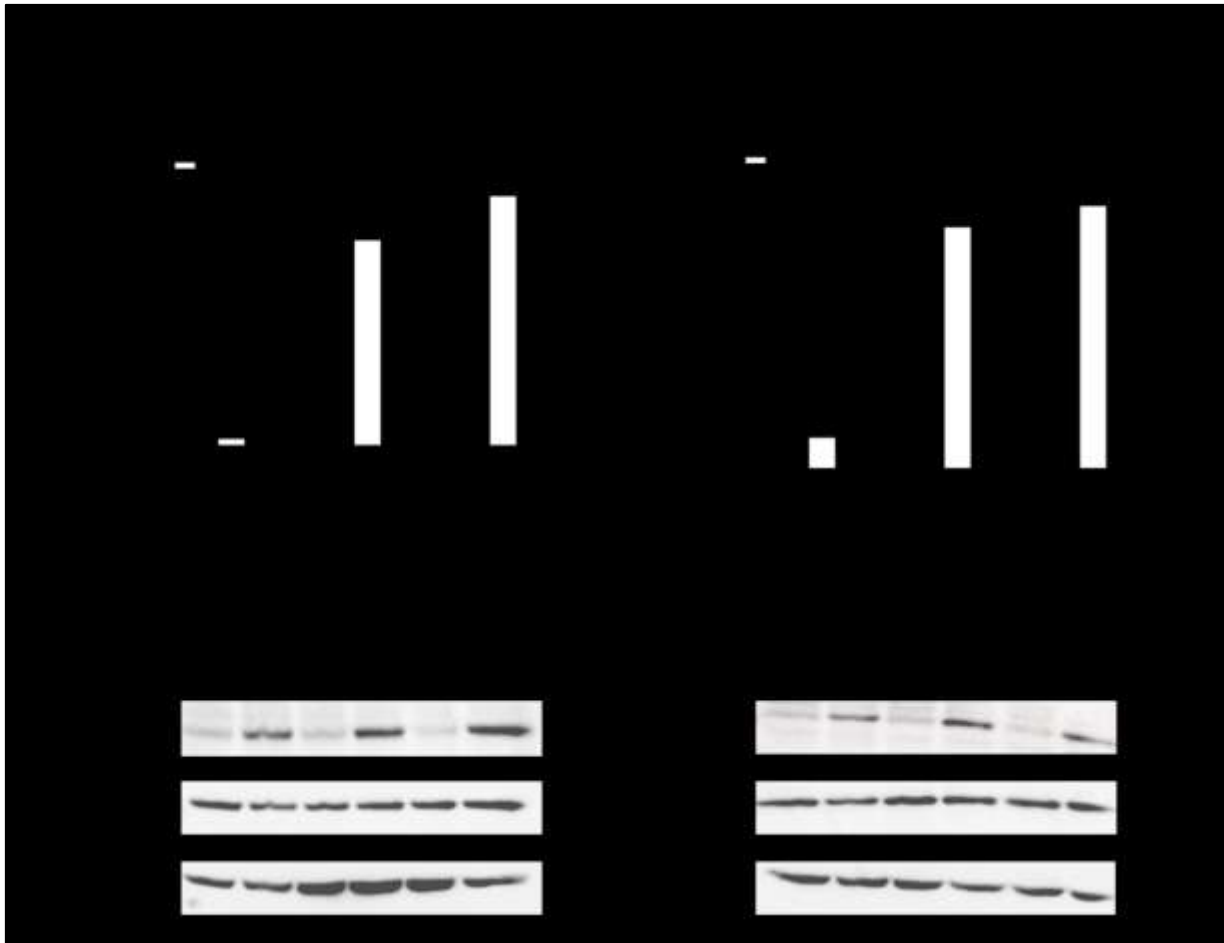


Figure 29: Activités Luciferase relatives et immunoblot des plasmides CAGA12_Luc et SBE4_Luc des HEK 293T traitées avec 10ng/mL de TGF- β 1 pendant 24 heures.

a : résultats du plasmide CAGA12_Luc, **b :** résultats du plasmide SBE4_Luc.

Figures du haut : résultats « Dual-Luciferase assay », **figures du bas :** immunoblot des protéines pSMAD2, SMAD2, et GAPDH des HEK 293T transfectées avec CAGA12_Luc ou SBE4_Luc, pRT-LK, et traitées avec 10ng/mL de TGF- β 1 pendant 24h.

*Les données sont représentées comme la Moyenne \pm la Déviation Standard de trois expériences indépendantes (quadruplicata pour chaque expérience). *** $p < 0.0001$, ** $p < 0.001$. Test ANOVA à deux facteurs.*

2.2. Profil d'inhibition : BTR reporter

Nous avons étudié le profil d'inhibition de la voie TGF- β *via* l'utilisation d'un inhibiteur spécifique du récepteur de type I (ALK5), afin d'en étudier les effets sur la mutation SGO1 K23E. L'inhibiteur utilisé est le SB431542 qui cible spécifiquement le site de fixation de l'ATP (134, 135).

Afin de visualiser les effets de cet inhibiteur, nous avons utilisé le système rapporteur Luciferase « (Bioluminescent TGF- β Receptor 1 (TGFBR1) reporter » (BTR), qui s'active en absence d'activité de la voie TGF- β , et plus spécifiquement en absence de phosphorylation de SMAD2 (voir partie Méthodes, Figure 9) (108). Nous disposons au laboratoire de la lignée stable A549_BTR qui a été créée par le laboratoire du Dr Rehemtulla.

2.2.1. Validation du système : réponse cellulaire

La réponse des cellules A549_BTR a été mesurée par luminescence après que celles-ci aient été traitées de 0 à 6H avec différentes concentrations de SB431542 (0, 1, 5, 10 et 25 μ M), et avec 10ng/mL de TGF- β 1, suite à une starvation en sérum sur la nuit (0 ou 0,5% de sérum) pour éviter les interférences avec les composés de ce dernier (facteurs de croissances, cytokines, etc.) (Figure 30).

On constate que les cellules répondent bien aux stimuli (augmentation de la luminescence, donc augmentation de l'inhibition), que cette réponse est dose-dépendante, et est beaucoup plus stable/spécifique en absence totale de sérum (Figure 30a). Pour les tests subséquents, les cellules A549_BTR ont donc été starvées en absence totale de sérum, traitées avec 25 μ M de SB431542, et la luminescence a été mesurée à 0H, 1H, 2H, 4H et 6H (résultats similaires entre 3H, 4H, et 5H).

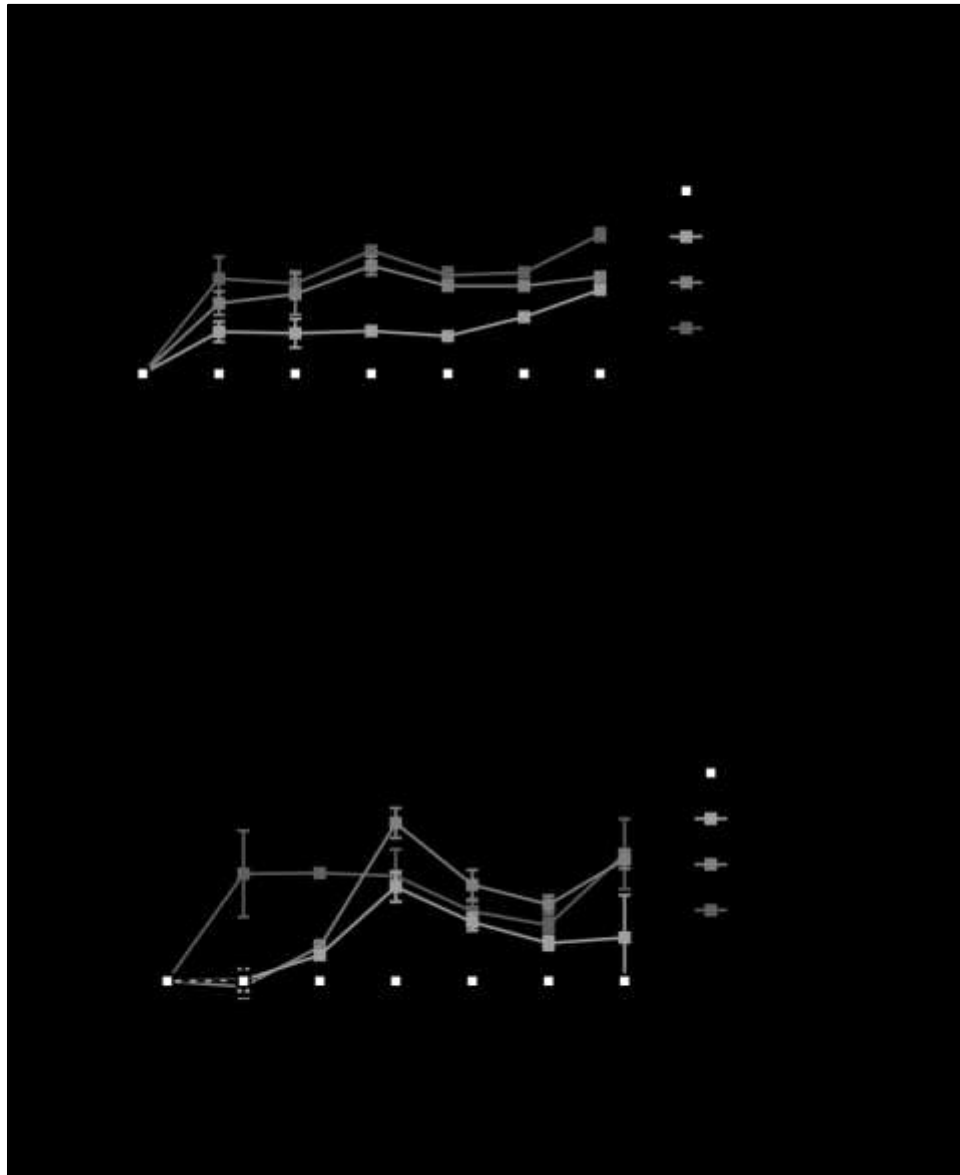


Figure 30: Réponse des cellules A549_BTR à la stimulation par le TGF- β 1 et le SB431542, avec 0% ou 0,5% de sérum, dans le temps.

a: réponse cellulaire en absence de sérum, **b :** réponse cellulaire avec 0,5% de sérum. Les cellules A549_BTR ont été starvées avec 0% ou 0,5% de FBS sur la nuit, traitées avec 10ng/mL de TGF- β 1 et différentes concentrations de SB431542 de 0 à 6 heures. *Les résultats ont été normalisés avec la condition 0 μ M de SB431542, et sont représentés comme la Moyenne \pm la Déviation Standard de quatre expériences indépendantes (quadruplicata pour chaque expérience). *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$. Test ANOVA à deux facteurs.*

2.2.2. Validation de la surexpression de SGO1

La réponse des cellules face au traitement avec le SB431542 ayant été validée, leur potentiel de « transfectabilité » a également été testé avec différents plasmides : vecteur vide pLex_307, isoforme longue sauvage WT ou mutée K23E de SGO1 (voir Méthodes).

La Figure 31 révèle tout d'abord, que les cellules expriment préférentiellement l'isoforme longue de SGO1 (60kDa), en effet il y a peu de signal pour l'isoforme courte. On observe également que les transfections ont fonctionné, et comme pour les HEK 293T (Figure 28), celles-ci ont généré des protéines de taille supérieure à la forme endogène.

De ce fait, les cellules A549_BTR peuvent être utilisées pour étudier l'effet de l'inhibition de la voie de signalisation TGF- β sur la mutation SGO1 K23E.

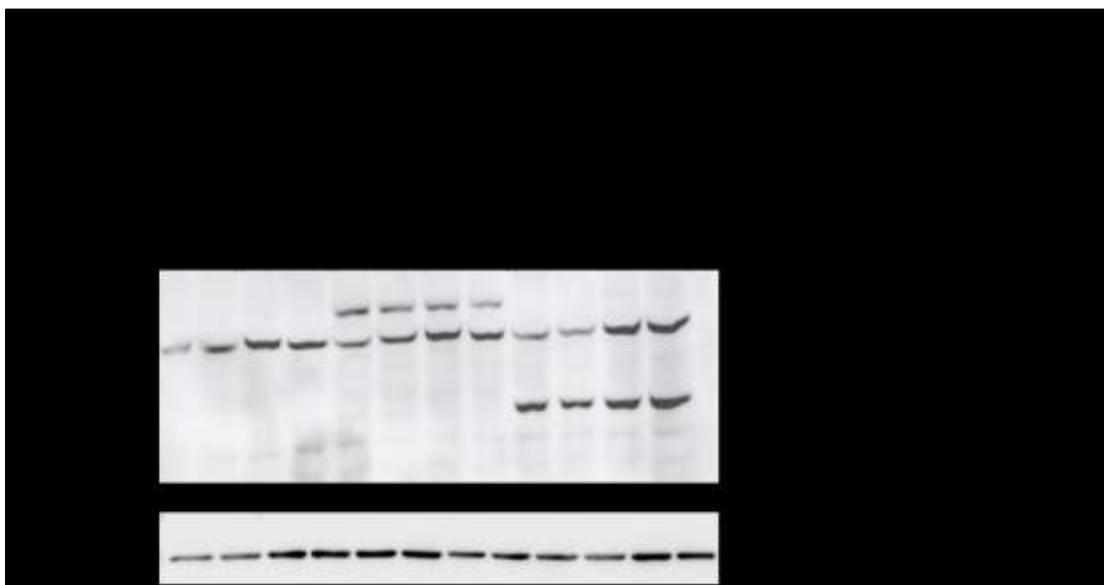


Figure 31: Immunoblot des cellules A549_BTR transfectées avec les différentes isoformes de SGO1.

Immunoblot des protéines SGO1 (isoformes longue et courte) et GAPDH des cellules A549_BTR transfectées avec les différentes isoformes de SGO1 (ou le plasmide vide pLex_307).

2.2.3. Effet de SGO1 sauvage et mutée K23E

2.2.3.1. Validation de l'innocuité du vecteur vide pLex_307

Les conditions expérimentales ayant été validées (transfections, starvation 0% de sérum, 25 μ M de SB431542), il a fallu vérifier l'innocuité de la transfection du plasmide vide sur la réponse cellulaire, étant donné que celui-ci sert de référence pour l'étude de l'effet de SGO1. Les cellules ont donc été traitées de 0 à 6 heures avec soit 25 μ M de SB431542, soit du TGF- β 1 (5, 10 ou 20ng/mL), ou soit avec les deux facteurs combinés (Figures 32).

Les résultats de la Figure 32a sont relativement similaires à ceux obtenus avec la Figure 30a (réponse des cellules non transfectées), la réponse des cellules au traitement par le SB431542 n'est donc pas influencée par l'expression du vecteur pLex_307.

La Figure 32b présente les résultats avec le traitement par le TGF- β 1 seul, et la première chose qu'on remarque c'est qu'après 1H de traitement, il y a une faible baisse significative du signal ($p < 0.1$), ce qui signifie que les cellules répondent aux stimuli par le TGF- β 1, et donc il y a augmentation de phosphorylation des protéines SMAD2. Cependant, à partir de 2H, il semble que le mécanisme d'auto-inhibition des cellules se mette en place, d'où l'augmentation de signal observée. Ces résultats reflètent donc la réponse cellulaire attendue, même s'il n'y a pas de différences selon les différentes concentrations de TGF- β 1 utilisées, ce qui pourraient être expliquées par le fait que ces concentrations sont saturantes pour les cellules. De ce fait, pour vérifier cette hypothèse, des expériences complémentaires pourraient être menées avec des concentrations logarithmiques de TGF- β 1 (0, 0,001, 0,01..100 ng/mL).

Concernant les résultats du traitement combiné (Figure 32c), il semble que l'inhibition causée par le SB431542 soit plus spécifique que la stimulation par le TGF- β 1, et de ce fait on ne remarque pas de différence significative entre les différentes combinaisons et le traitement par le SB431542 seul, sauf à 4H où on observe une très légère diminution du signal.

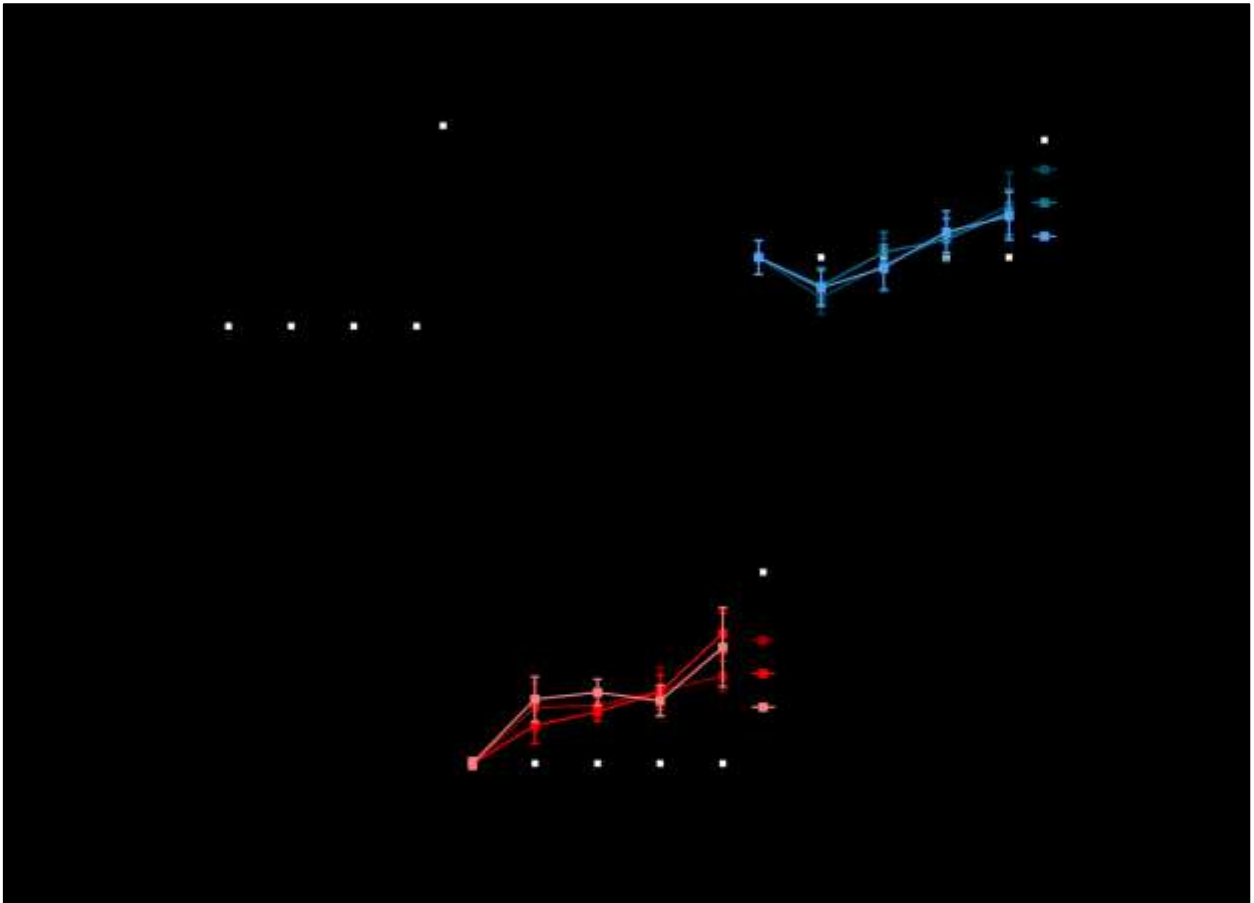


Figure 32: Test d'innocuité du vecteur pLex_307 dans les cellules A549_BTR traitées avec du TGF- β 1 et/ou du SB431542.

Les cellules A549_BTR ont été starvées avec 0% de FBS sur la nuit, traitées de 0 à 6 heures avec 25 μ M de SB431542 seul **(a)**, 5, 10 ou 20ng/mL de TGF- β 1 seul **(b)**, ou 25 μ M de SB431542 et 5, 10 ou 20ng/mL de TGF- β 1 **(c)**. Les résultats sont normalisés avec la condition « sans stimulation », et sont représentés comme la Moyenne \pm la Déviation Standard de quatre expériences indépendantes (quadruplicata pour chaque expérience). *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.1$. Test ANOVA à deux facteurs.

Les résultats obtenus avec la surexpression du vecteur vide pLex_307, suggèrent que ceux-ci peuvent être utilisés comme référence pour la suite des analyses.

2.2.3.2. Effet de SGO1 sauvage ou K23E

Afin de mesurer l'effet de SGO1 sauvage WT ou mutée K23E sur la réponse des cellules A549_BTR aux différents traitements avec le SB431542, le TGF- β 1 ou la combinaison des deux, celles-ci ont été transfectées avec l'isoforme longue sauvage WT ou mutée K23E de SGO1, sans oublier le vecteur vide pLex_307 qui sert de référence (voir Méthodes). L'isoforme courte n'a pas été utilisée dans cette expérience, car les cellules A549_BTR exprime très faiblement celle-ci, au contraire de l'isoforme longue (Figure 31).

Afin de pouvoir analyser les résultats obtenus, deux normalisations ont été nécessaires :

- La 1^{ère} avec le vecteur vide pLex_307: pour comparer l'effet général des transfections (Figure 33),
- La 2^{nde} avec l'isoforme WT de SGO1 : pour comparer l'effet de la mutation K23E (Figure 34).

➤ **Effet général**

Dans un premier temps, les résultats obtenus ont été normalisés avec ceux du vecteur vide pLex_307 (Figures 33). Ce qu'on peut constater, c'est que globalement les résultats sont similaires pour les deux conditions de transfections (WT et K23E).

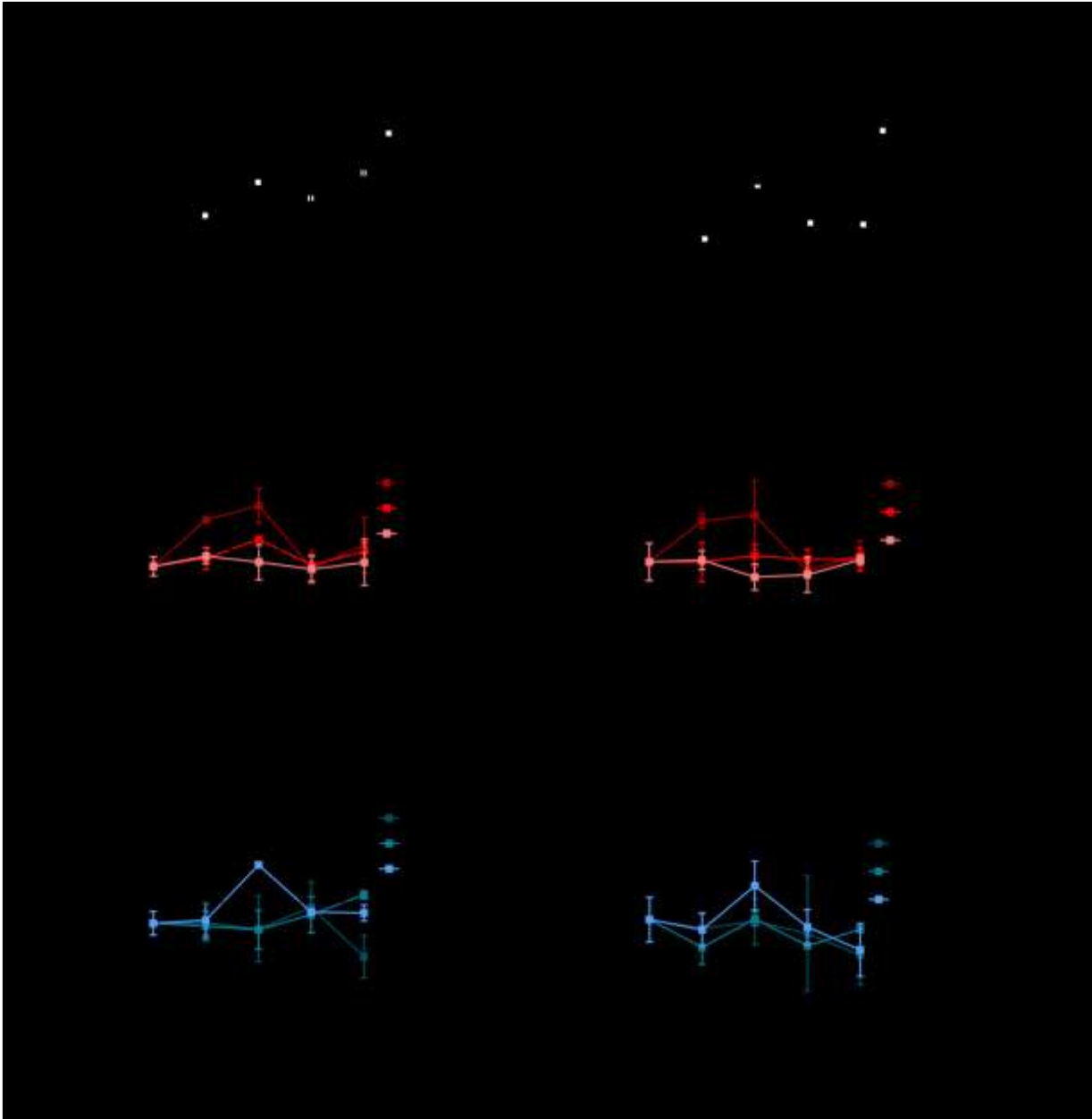


Figure 33: Effet de la surexpression de SGO1 WT ou K23E sur les A549_BTR traitées avec du SB431542 et/ du TGF- β 1, normalisation avec pLex_307.

Les cellules ont été transfectées avec l'isoforme longue SGO1 WT (**gauche**) ou K23E (**droite**) (ou avec pLex_307, normalisation), starvées avec 0% de FBS sur la nuit, traitées de 0 à 6 heures avec 25 μ M de SB431542 (**a**), 5, 10 ou 20ng/mL de TGF- β 1 (**b**), ou avec la combinaison des deux (**c**).

(voir page suivante analyses statistiques)

*Les résultats sont normalisés avec ceux du vecteur vide pLex_307, et sont représentés comme la Moyenne \pm la Déviation Standard de quatre expériences indépendantes (quadruplicata pour chaque expérience). **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.1$, ns : non significative. Test ANOVA à deux facteurs.*

L'effet du SB431542 ne semble pas être affecté par les transfections en Figure 33a, sauf au temps 0H où on observe une légère baisse de signal qui indiquerait que les cellules ont une plus forte activité TGF- β 1 (pSMAD2) avant stimulation. De plus, il semble qu'à 2H de traitement pour la transfection de l'isoforme WT il y ait eu un problème, cependant ceci n'altère en rien l'analyse des autres durées de stimulation. Pour la condition en absence de stimulation, en théorie on s'attendrait à ce que le signal engendré soit similaire tout au long de l'étude, car aucuns traitements n'a été fait. Cependant, on observe des variations qui se situent en général en dessous du seuil de normalisation, ce qui laisserait donc suggérer que même en absence de stimuli, les cellules ont une plus forte activité de phosphorylation de SMAD2, et que des mécanismes d'auto-inhibition seraient tout de même présents.

L'effet de la concentration du TGF- β 1 a également été testé en Figure 33b, les résultats sont similaires entre les deux conditions de transfection. En effet, la stimulation par le TGF- β 1 à 10 ou 20ng/mL induit une baisse similaire de signal (sauf à 2H, où il y a eu un problème), ce qui indique que les cellules surexprimant SGO1 WT ou K23E répondent plus fortement aux stimuli, car la voie TGF- β est déjà activée (il y a plus de pSMAD2 avant stimulation, voir résultats ci-dessus) donc qu'elles génèrent encore plus de pSMAD2. Les résultats obtenus avec la concentration de 5ng/mL de TGF- β 1 sont surprenants et semblent être dus à une erreur de manipulation, en effet il semblerait que les cellules répondent aux stimuli par augmentation de l'inhibition lors des deux premières heures de traitement.

Et enfin, les résultats de l'effet de la combinaison du SB431542 et des différentes concentrations de TGF- β 1 en Figure 33c, où mis à part des erreurs de manipulation à 2H de traitement, sont similaires pour les deux surexpressions de SGO1 : on observe une baisse de signal, donc de l'inhibition, indiquant une augmentation de l'activité de la voie TGF- β et ceci indépendamment de la présence de SB431542. Ce qui suggère soit que ce dernier a perdu sa spécificité et n'est plus capable d'inhiber le récepteur de type I (ALK5), ou soit que la forte concentration de pSMAD2 inhibe sa fixation/activité par encombrement stérique par exemple.

De plus, comme précédemment il n'y a pas de différences de signal avec les différentes doses de TGF- β 1, et ce même avec la combinaison du SB431542 et 5ng/mL de TGF- β 1, ce qui comme précédemment, pourrait s'expliquer par une concentration saturante de TGF- β 1.

➤ **Comparaison surexpression SGO1 K23E et WT**

Afin de pouvoir analyser l'impact de la mutation SGO1 K23E sur le profil d'inhibition de la voie TGF- β , les résultats obtenus pour cette condition de transfection ont été normalisés avec ceux de l'isoforme WT, et sont présentés en Figure 34.

De façon général, quelque soit le traitement utilisés (SB431542 seul, TGF- β 1 seul, ou combinaison des deux), on remarque que le signal est légèrement diminué, indiquant que l'expression de l'isoforme K23E de SGO1 dans les cellules A549_BTR induirait une plus forte activation de la voie TGF- β , donc une plus forte production de pSMAD2 qu'avec des cellules exprimant l'isoforme WT.

De plus, la combinaison de traitement SB431542 et TGF- β 1 (Figure 34 c), nous indique que les cellules ne réagissent pas ou très peu au SB431542, car on obtient les mêmes résultats que pour le TGF- β 1 seul, suggérant donc que non seulement la forme mutée K23E de SGO1 induit une plus forte phosphorylation de SMAD2 que la forme WT, mais qu'en plus, cette dernière inhibe/bloque plus fortement l'activité de l'inhibiteur SB431542.

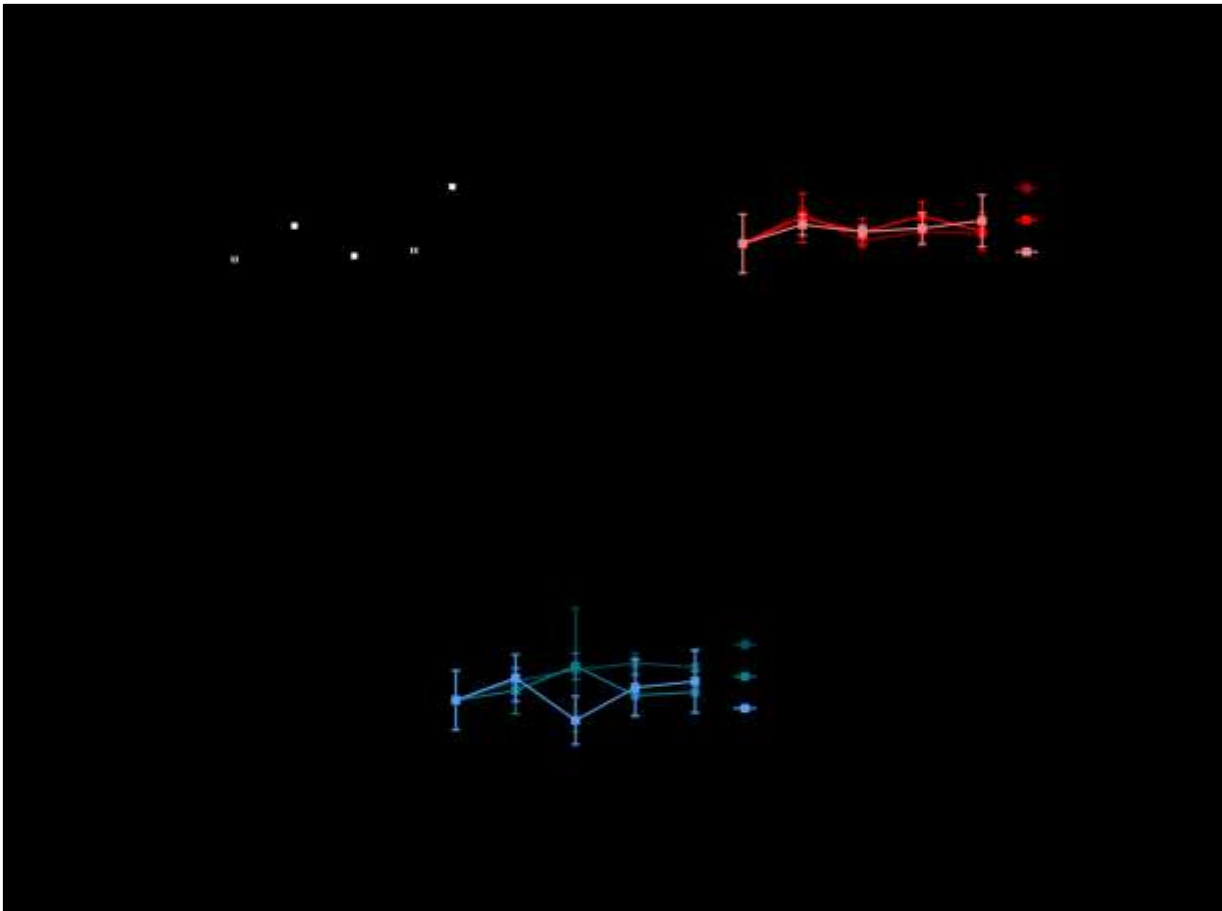


Figure 34: Effet de la surexpression de SGO1 K23E sur les A549_BTR traitées avec du SB431542 et/ du TGF- β 1, normalisation avec SGO1 WT.

Mêmes conditions expérimentales que la Figure 33, mais la normalisation a été faite avec SGO1 WT. **a** : traitement avec 25 μ M de SB431542, **b** : traitement avec 5, 10 ou 20ng/mL de TGF- β 1, **c** : combinaison des deux traitements. *Les résultats sont représentés comme la Moyenne \pm la Déviation Standard de quatre expériences indépendantes (quadruplicata pour chaque expérience).* ** $p < 0.01$, * $p < 0.1$, ns : non significative. Test ANOVA à deux facteurs.

Cette expérience d'étude du profil d'inhibition du récepteur de type I TGFBR1 semble suggérer que la protéine SGO1 joue un rôle dans l'activation de cette voie de signalisation et dans la régulation négative des mécanismes d'auto-inhibition, et que, à priori, cette fonction n'est assurée que lors d'une surexpression de la protéine sauvage, et est accentuée avec la mutation SGO1 K23E. Cette nouvelle fonction pourrait être causée par la mislocalisation cytosolique de la protéine, qui a déjà été montrée chez les patients CAID, et pour vérifier cette hypothèse, des marquages immunocytochimique pourraient être faits sur les cellules A549_BTR surexprimant la protéine SGO1 WT, et SGO1 K23E.

2.3.État de la Phosphorylation des protéines : AlphaScreen™

Les résultats obtenus suite à l'étude des profils d'activation et d'inhibition de la voie TGF- β , suggèrent que la mutation SGO1 K23E a un impact majeur dans cette voie de signalisation, à la fois au niveau de la phosphorylation des protéines SMADs, qu'au niveau des mécanismes d'auto-inhibition. Ces résultats sont prometteurs mais pas suffisamment robustes pour conclure. De ce fait, une nouvelle approche quantitative a été utilisée pour étudier l'impact de la mutation SGO1 K23E sur la voie canonique de la voie TGF- β (comme précédemment), mais également sur la voie non-canonique qui n'a jamais été étudiée.

Nous avons donc détecté et quantifié les protéines pSMAD3 (voie canonique, revalidation des résultats précédents et de notre étude publiée en 2014 (1)), p38, pERK (isoformes 1 et 2, ERK1/2), et pJNK (isoformes 1, 2 et 3, pJNK1/2/3) pour la voie non-canonique. La quantification a été effectuée en utilisant le kit « AlphaScreen® SureFire® Ultra™ » (Perkin Elmer, voir Méthodes) qui utilise la technologie ALPHA (Amplified Luminescence Proximity Homogenous Assay).

Pour cette étude, étant donné la spécificité et la sensibilité de la technique utilisée, nous avons préféré utiliser le seul modèle viable en notre possession : les cellules de patients CAID, afin d'être en mesure d'analyser uniquement les effets de la mutation SGO1 K23E. En effet, la transfection de cellules HEK 293T par exemple, ne permet pas de reproduire entièrement le phénotype des patients, car la protéine endogène SGO1 non mutée est toujours présente (car dans notre cas, la transfection est transitoire).

De ce fait, des fibroblastes de peau de sujets contrôles WT et de patients CAID K23E ont été cultivés (trois lignées pour chaque phénotype), starvées sur la nuit en absence totale de sérum, stimulées pendant 1H avec des concentrations logarithmiques de TGF- β 1 (de 0 à 100ng/mL), et enfin récoltées pour être analysées (résultats normalisés avec le nombre de cellules au moment de la récolte).

De plus, nous avons voulu savoir si « l'âge » (le passage) des cellules avait un impact sur les résultats, car chez les patients CAID les premiers symptômes de la pathologie ne sont pas présents à la naissance mais apparaissent plutôt aux alentours de 5ans, ce qui suppose que le phénotype est accentué avec l'âge. On a donc effectué les expériences sur les cellules au passage 8 (cellules jeunes) et au passage 14 (cellules en sénescence).

2.3.1. Effet de la mutation SGO1 K23E sur la voie canonique

Tout d'abord, on a voulu confirmer l'effet de la mutation SGO1 K23E sur la voie canonique, à savoir une augmentation de phosphorylation des protéines SMAD2/3. Les résultats sont présentés en Figure 35, où la quantification de pSMAD3 a été mesurée (SMAD2 et SMAD3 sont présentes en quantité égale et assurent les mêmes fonctions dans les cellules).

La Figure 35a, permet de comparer la quantité de pSMAD3 entre les passages 8 et 14 des deux génotypes étudiés, WT et K23E. On constate que ce soit pour les fibroblastes WT ou K23E, qu'il y a une augmentation significative de la quantité de pSMAD3 entre les deux passages de cellules ($p < 0.001$), ce qui indique que les cellules de patients K23E se comportent comme celles des témoins.

Par la suite, les Figures 35b et 35c, nous permettent d'étudier les différences au sein des deux génotypes.

Concernant les résultats pour les cellules « jeunes » (passage 8, Figure 35b), les concentrations efficaces EC50 (concentration produisant 50% de l'effet maximal observé) ont été calculées et sont respectueusement pour les WT et les K23E de 1.009ng/mL et de 1.003ng/mL, donc relativement identiques. La concentration de TGF- β 1 n'a donc pas d'impact sur l'effet maximal observé. Cependant, la quantité de pSMAD3 est statistiquement plus importante chez les cellules de patients jusqu'à 0.001ng/mL de TGF- β 1 ($p < 0.001$), et ce même sans stimulation, et à partir de 0.1ng/mL, il y a une « inversion » des courbes : il y a statistiquement moins de pSMAD3 chez les patients ($p < 0.001$). Ceci pourrait être expliqué par le fait que les fibroblastes de patients au passage 8 sont plus sensibles à la cytotoxicité induite par le TGF- β 1.

Pour le passage « tardif » (passage 14, Figure 35c), la quantité de pSMAD3 est statistiquement plus importante chez les fibroblastes de patients ($p < 0.001$), quelque soit la concentration de TGF- β 1 utilisée, et ceci même sans stimulation. De plus, les EC50 sont différents pour les deux génotypes : 0.8743ng/mL pour les WT, et 1.023ng/mL pour les K23E. Il faut donc légèrement plus de TGF- β 1 aux cellules de patients pour atteindre 50% de l'effet maximal observé.

Ces résultats valident ce qu'on a préalablement publié en 2014 (1) : la mutation SGO1 K23E induit une augmentation de pSMAD3 à la fois avec et sans stimulation. De plus, ces résultats montrent que cet effet est accentué avec l'âge des cellules.

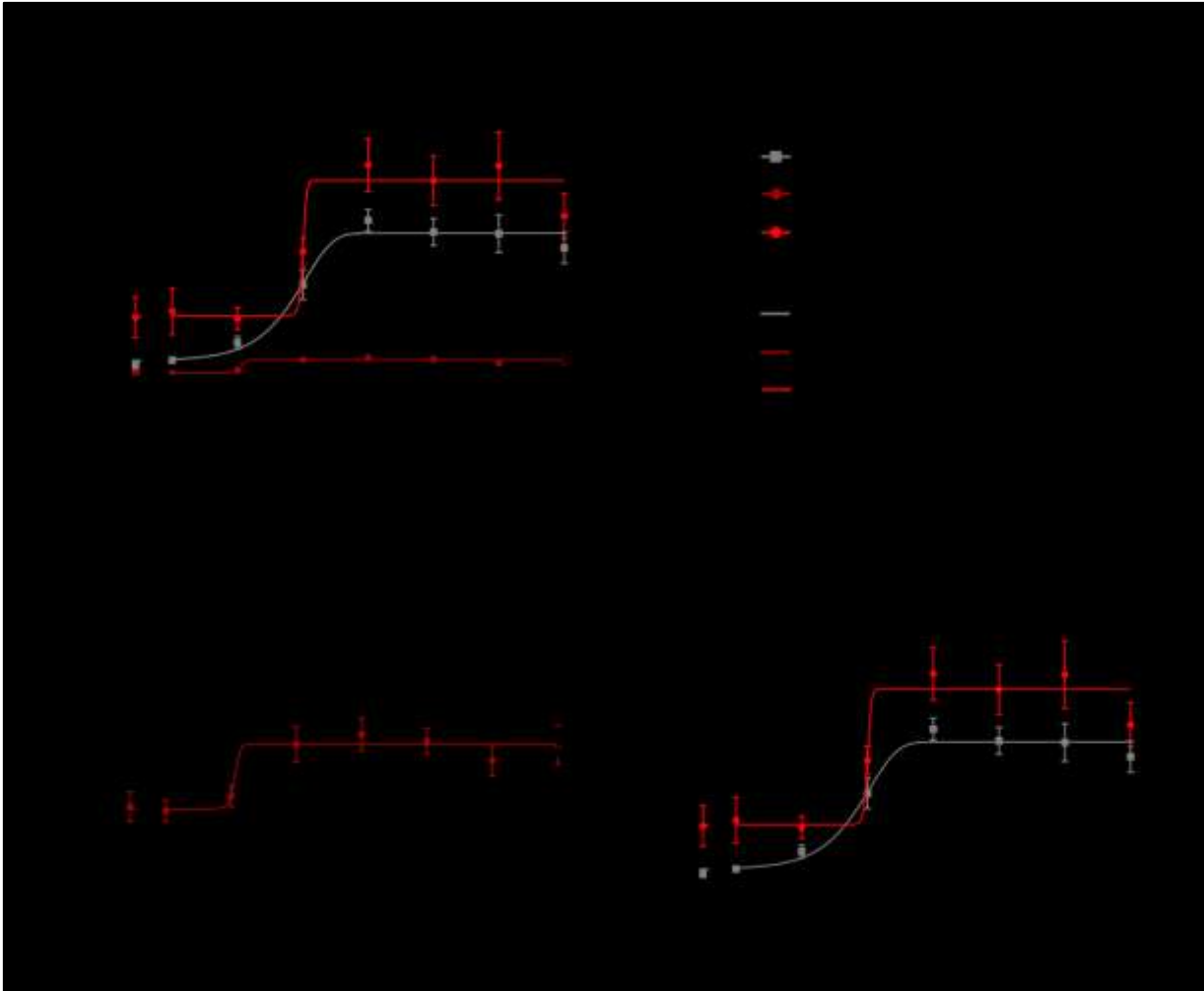


Figure 35: Quantification de pSMAD3 des fibroblastes WT et K23E aux passages 8 et 14, traitées avec du TGF- β 1.

Trois lignées de fibroblastes de témoins WT et de patients K23E ont été starvées avec 0% de sérum et traitées avec des concentrations logarithmiques de TGF- β pendant 1H. La quantification de pSMAD3 a été effectuée avec la technologie ALPHA, et les résultats présentés montrent la moyenne des trois lignées pour chaque génotype. **a** : passages 8 et 14 pour les deux génotypes, **b** : passage 8, **c** : passage 14.

*Les données expérimentales sont normalisées avec le nombre de cellules, et sont représentés comme la Moyenne \pm la Déviation Standard de sextuplicata.*** $p < 0.001$, * $p < 0.1$, ns : non significative, erreurs calculées avec un test ANOVA à deux facteurs. Les analyses de régression linéaire ont permis de déterminer les coefficients de détermination R^2 , qui sont tous > 0.75 .*

2.3.2. Effet de la mutation SGO1 K23E sur la voie non-canonique

Pour l'étude de la voie de signalisation non-canonique de TGF- β 1, la quantification s'est portée sur les protéines phosphorylées p38, pERK1/2 et pJNK1/2. On a également quantifié les protéines totales p38 et ERK1/2, afin d'avoir un 2^{ème} outil de normalisation de ces protéines (en plus de la normalisation avec le nombre de cellules). Pour SMAD3 et JNK1/2/3, les kits de détection des protéines totales n'étant pas disponibles dans le format souhaité, la normalisation a donc été faite avec le nombre de cellules, ce qui est suffisant pour l'analyse des résultats.

➤ **Quantification de p38**

La Figure 36, présente les résultats pour phospho-p38 (Figure a) et p38 total (Figure b).

Pour la quantité de phospho-p38 entre les passages 8 et 14 des deux génotypes étudiés, WT et K23E (Figure 35, panneaux du haut), on constate que pour les fibroblastes WT, il y a une augmentation significative de la quantité de protéines entre les deux passages ($p < 0.001$), au contraire des fibroblastes de patients ($p > 0.1$, pas de différences significatives).

En ce qui concerne la quantité totale de p38, une légère augmentation significative à passage 8 est observée pour les fibroblastes WT ($p < 0.001$, sauf à 0.1ng/mL : non significatif). Tandis que pour les fibroblastes de patients, c'est le contraire, il y a légèrement plus de protéines totales à passage 14 uniquement à partir de 1ng/mL de TGF- β 1 ($p < 0.1$).

Les résultats pour les cellules à passage 8 sont présentés dans la Figure 35, panneaux du milieu. Les concentrations efficaces EC50 pour l'étude de phospho-p38 (les résultats obtenus pour les protéines totales ne permettent pas d'analyse de régression linéaire), sont pour les fibroblastes WT de 0.000578ng/mL, et de 0.000769ng/mL pour les fibroblastes de patients. Il faut donc légèrement plus de TGF- β 1 aux cellules de patients pour observer 50% de l'effet maximal.

Concernant la quantité de phospho-p38, on observe une baisse significative chez les fibroblastes de patients à partir de 0.1ng/mL ($p < 0.001$ jusqu'à $p < 0.1$). De plus, cette baisse est également observée au niveau des protéines totales ($p < 0.001$), ce qui suggérerait que la production de p38 (phosphorylée et non-phosphorylée) est inhibée par la mutation K23E, et de ce fait, il y est logique d'observer moins de phosphorylation de p38.

Pour le passage 14 (Figure 35, panneaux du bas), les EC50 pour l'étude de phospho-p38 sont similaires pour les deux génotypes, à savoir de 0.000747ng/mL pour les WT et de 0.000713ng/mL pour les K23E. Il n'y a donc pas d'effet de la concentration de TGF- β 1 sur l'effet maximal observé.

En revanche, pour la quantité de phospho-p38, on remarque une baisse significative d'un facteur supérieur à 2 chez les fibroblastes K23E ($p < 0.001$). Pour la quantité totale de p38, il n'y a pas de différences significatives entre les deux génotypes, sauf pour 10 et 100ng/mL de TGF- β 1 (concentration proche de la cytotoxicité), où une faible augmentation est observée chez les patients ($p < 0.01$ et $p < 0.1$).

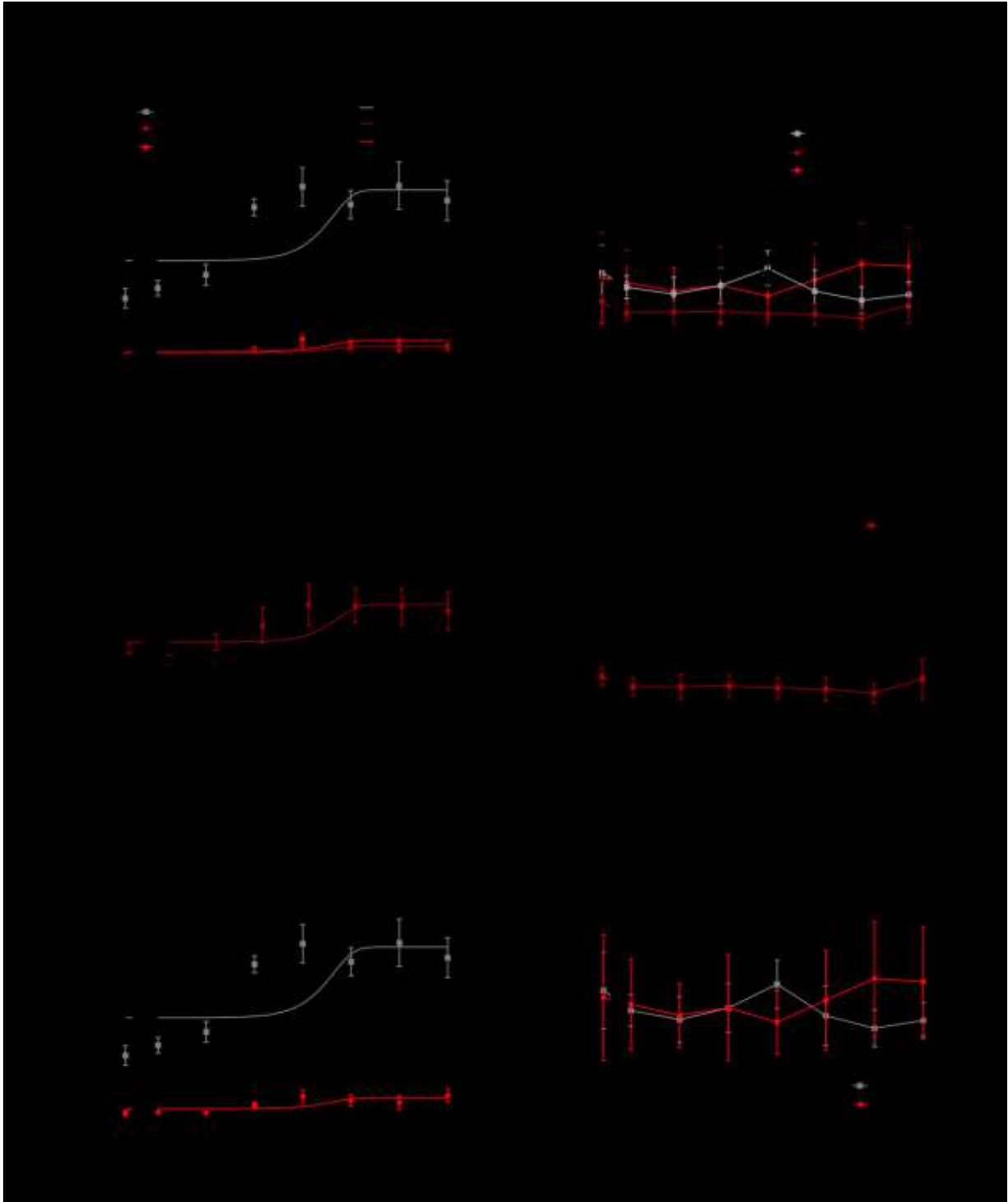


Figure 36: Quantification de phospho-p38 MAPK et de p38 MAPK total des fibroblastes WT et K23E aux passages 8 et 14, traitées avec du TGF- β 1.

(suite en page suivante)

Trois lignées de fibroblastes de témoins WT et de patients K23E ont été starvées avec 0% de sérum et traitées avec des concentrations logarithmiques de TGF- β 1 pendant 1H.

La quantification de phospho-p38 MAPK **(a)** et p38 MAPK total **(b)** a été effectuée avec la technologie ALPHA, et les résultats présentés montrent la moyenne des trois lignées pour chaque génotype.

*Les données expérimentales sont normalisées avec le nombre de cellules, et sont représentés comme la Moyenne \pm la Déviation Standard de sextuplicata.*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.1$, ns : non significative, erreurs calculées avec un test ANOVA à deux facteurs. Les analyses de régression linéaire ont permis de déterminer les coefficients de détermination R^2 , qui sont > 0.90 pour les WT et > 0.60 pour les K23E.*

L'analyse de ces résultats de quantification de p38 pourraient laisser penser que la phosphorylation de p38 est ralentie, sauf que la quantité de phospho-p38 est identique à celle du passage 8, donc les cellules ne sont plus capables d'activer cette protéine : la mutation SGO1 K23E entraîne de ce fait une inhibition plus forte, voire totale, de la phosphorylation de p38 plus les cellules vieillissent.

➤ **Quantification de ERK1/2**

La quantification des protéines ERK1/2 phosphorylées et totales est présentée en Figure 37 (a et b).

Tout d'abord, la comparaison des deux passages pour les génotypes étudiés de la quantité de phospho-ERK1/2 (Figure 37, panneaux du haut), indique tout comme pour phospho-p38, qu'il n'y a pas de différences significatives entre les deux passages pour les fibroblastes K23E, au contraire des WT, où une augmentation significative est observée à passage 14 ($p < 0.001$). Il en est de même pour la quantité totale de ERK1/2.

Concernant le passage 8 (Figure 37, panneaux du milieu), il n'y a pas de différences significatives entre les deux génotypes pour la quantité de phospho-ERK1/2. En revanche, la quantité totale de ERK1/2 est augmentée significativement d'un facteur proche de 2 chez les cellules de patients ($p < 0.001$), donc on aurait dû s'attendre à une augmentation de la quantité de phospho-ERK1/2, ce qui n'est pas le cas, donc les cellules de patients ont atteint leur limite de phosphorylation de ERK1/2, et ne peuvent donc pas en produire d'avantage.

Pour le passage 14 (Figure 37, panneaux du bas), on constate une baisse significative à la fois de la quantité de phospho-ERK1/2 d'un facteur proche de 6 ($p < 0.001$), et de la quantité totale de ERK1/2 d'un facteur proche de 2 ($p < 0.001$) chez les fibroblastes de patients. De plus, il est intéressant de constater, que la stimulation par le TGF- β 1, n'induit pas de phosphorylation de ERK1/2. Il semblerait qu'au passage 14, le TGF- β 1 ne soit plus capable d'activer la phosphorylation chez les patients. Des expériences supplémentaires pourraient alors être menées en utilisant d'autres ligands comme le BMP2.

Ces résultats suggèrent que la mutation SGO1 K23E impacte la phosphorylation et la quantité totale de ERK1/2 lorsque les cellules vieillissent.

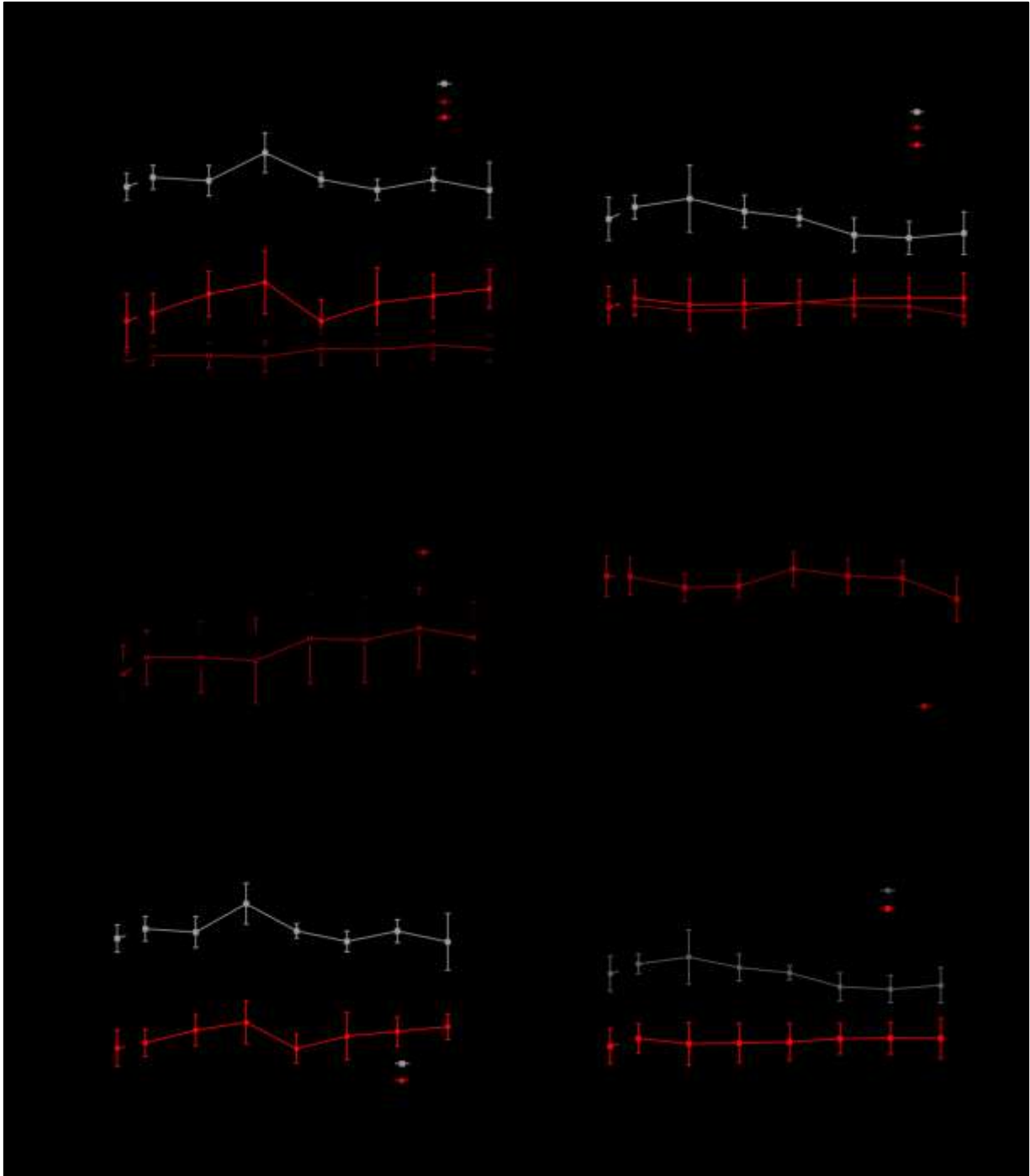


Figure 37: Quantification de phospho-ERK1/2 et de ERK1/2 total des fibroblastes WT et K23E aux passages 8 et 14, traitées avec du TGF- β 1.

La quantification de phospho-ERK1/2 **(a)** et ERK1/2 total **(b)** a été effectuée avec la technologie ALPHA, et les résultats montrent la moyenne des trois lignées pour chaque génotype. (voir page suivante : analyses statistiques)

*Les données expérimentales sont normalisées avec le nombre de cellules, et sont représentées comme la Moyenne \pm la Déviation Standard de sextuplicata.*** $p < 0.001$, ns : non significative, erreurs calculées avec un test ANOVA à deux facteurs. Ces résultats ne nous permettent pas de faire des analyses de régression linéaire.*

➤ **Quantification de pJNK1/2/3**

Pour finir, la quantification de la phosphorylation des protéines JNK1/2/3 est présentée en Figure 38.

L'impact du passage des cellules sur la quantification de phospho-JNK1/2/3 (Figure 38, panneau du haut), indique qu'il y a une augmentation significative de cette protéine entre les passages 8 et 14 des fibroblastes de patients ($p < 0.001$).

Concernant la quantification de phospho-JNK1/2/3 au passage 8 (Figure 38, panneau en bas à gauche), on constate tout d'abord qu'il y a plus de protéines chez les fibroblastes K23E d'un facteur proche de 2 ($p < 0.001$), et de plus, il est intéressant de constater que la stimulation par le TGF- β 1 n'engendre pas d'augmentation de la phosphorylation pour les deux génotypes comparativement à la condition sans TGF- β 1. Le TGF- β 1 n'est probablement pas le ligand idéal pour étudier la phosphorylation de JNK1/2/3.

Et enfin, pour le passage 14, il n'y a pas de différences significatives entre les deux génotypes, à la fois au niveau de la quantité de phospho-JNK1/2/3, mais aussi, au niveau de la réponse des cellules à la stimulation par le TGF- β 1.

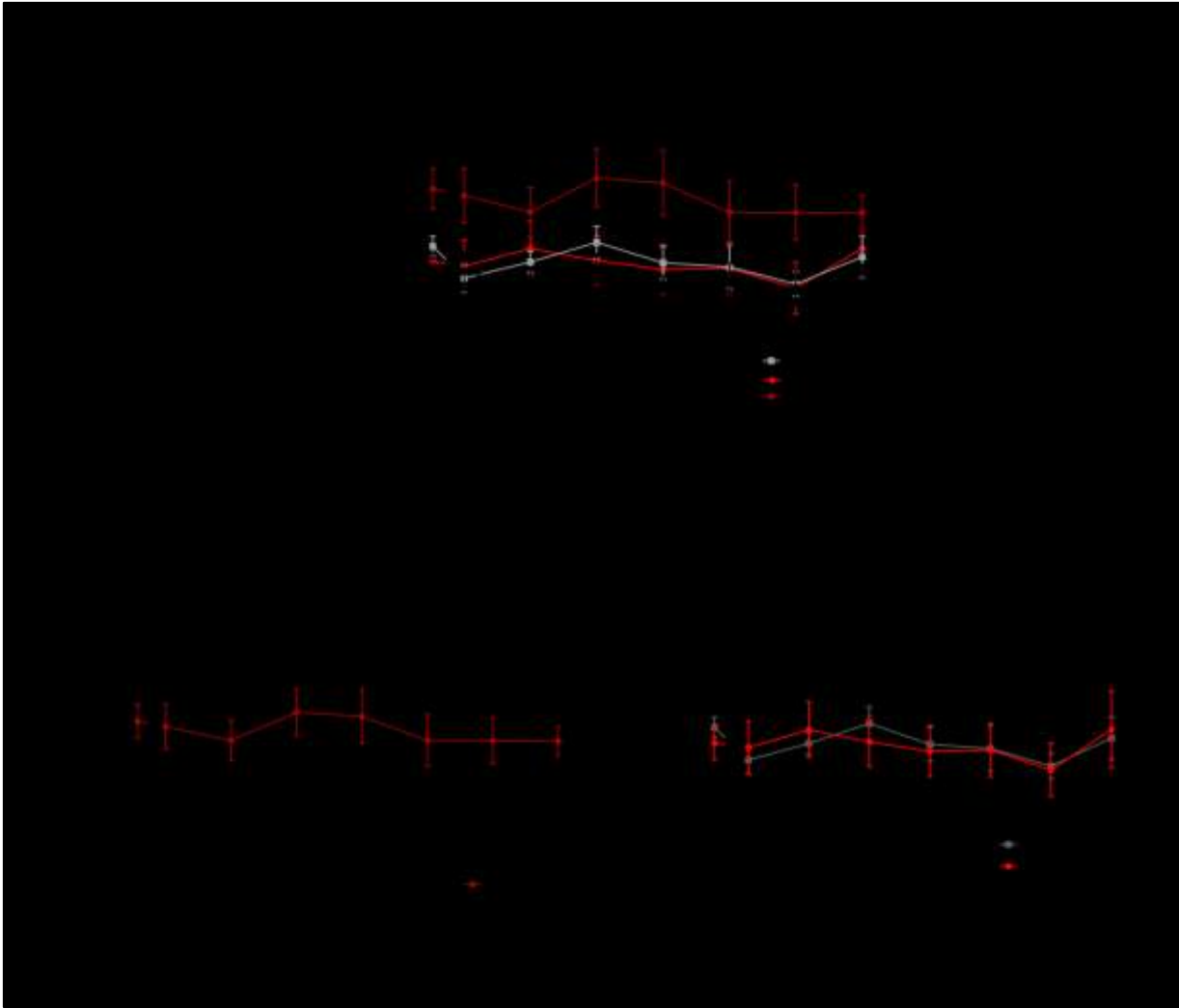


Figure 38: Quantification de phospho-JNK1/2/3 des fibroblastes WT et K23E aux passages 8 et 14, traitées avec du TGF- β 1.

La quantification de phospho-JNK1/2/3 a été effectuée avec la technologie ALPHA, et les résultats montrent la moyenne des trois lignées pour chaque génotype.

*Les données expérimentales sont normalisées avec le nombre de cellules, et sont représentés comme la Moyenne \pm la Déviation Standard de sextuplicata.*** $p < 0.001$, ns : non significative, erreurs calculées avec un test ANOVA à deux facteurs. Ces résultats ne nous permettent pas de faire des analyses de régression linéaire.*

Ces résultats suggèrent que le comportement des protéines JNK1/2/3 est différent de celui de p38 et ERK1/2 face à la mutation SGO1 K23E, qui de façon générale les inhibe.

Cependant, étant donné que ces différentes protéines de la voie non-canonique interagissent les unes avec les autres, on s'attendrait à ce qu'elles se comportent de la même façon. De ce fait, des expériences supplémentaires de quantification des protéines JNK1/2/3 doivent être menées comme augmenter la durée de stimulation par le TGF- β 1, utiliser d'autres ligands (TGF- β 2, β 3, BMP2...), et surtout quantifier la quantité totale de ces protéines.

➤ **Bilan**

En conclusion, l'analyse de la quantification de l'état de phosphorylation des protéines de la voie-canonique (SMAD3) et non-canonique (p38, ERK1/2 et JNK1/2/3), révèle que la mutation SGO1 K23E impacte ces deux voies de signalisation, et ce à la fois de façon contraire, mais aussi que ceci est accrue avec le vieillissement des cellules.

En effet, au niveau de la voie canonique on observe une augmentation de pSMAD3, tandis que pour la voie non-canonique (en excluant pJNK1/2/3, des analyses complémentaires doivent être menées), contrairement aux témoins, la quantité de protéines phosphorylées ne varie pas ou est diminuée entre les deux passages. De plus, on remarque également que la quantité totale de ERK1/2 reste stable entre les deux passages, ce qui n'est pas le cas chez les témoins où on observe une augmentation.

De plus, cette expérience a permis également de constater que la réponse des fibroblastes de peau (patients ou témoins) face aux stimuli TGF- β 1 est dose-dépendante, avec une réponse maximale aux alentours de 0,1-1ng/mL qui se maintient jusqu'à une concentration de 10ng/mL, puis de la cytotoxicité apparait avec une stimulation de 100ng/mL.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

1. Objectif 1 : Génération d'un modèle cellulaire du syndrome CAID

La reprogrammation des fibroblastes de patients et de sujets témoins a été perturbée par des problèmes de décollement et de différenciation spontanée des colonies. Ceci a quand même permis de comprendre et d'appivoiser la culture des cellules hiPS, qui de nos jours sont très largement utilisées. Cependant, les expériences de différenciation cardiaque (voir objectif 2) on tout de même pu être menées avec des HuES9.

De plus, des hiPS de patients et de sujets contrôles ont été générés et caractérisés par nos collaborateurs, le Dr Michel Pucéat et le Dr Massimiliano Paganelli, à partir des fibroblastes de peau que nous leur avons donné. Ils sont disponibles au laboratoire et donc prêts à être utilisés.

2. Objectif 2 : Différenciation cardiaque des cellules hiPS générées

La différenciation cardiaque a été effectuée sur les cellules HuES9 ce qui nous a permis de tester et d'optimiser à la fois les protocoles de différenciation, mais aussi les techniques de caractérisation (qPCR relative, immunomarquage), qui pourront alors être appliquées sur les lignées hiPSc de patients et de contrôles. Cependant, lors de ce projet de maîtrise, les cellules n'ont pas été différenciées spécifiquement en cellules du nœud sinusal, car des optimisations au protocole de différenciation de notre collaborateur le Dr Pucéat doivent être menées, avant d'inclure des transductions lentivirales TBX18, TBX3 et/ou SHOX2 pour diriger spécifiquement la différenciation.

Le protocole de Life Technologies nous a permis de vérifier le potentiel de différenciation des HuES9, par expression des marqueurs spécifiques GATA4 et cTNT, ainsi que par la présence de battements caractéristiques de cellules pacemaker. De plus, des tests d'isolation de cellules ont pu être menés sur les cardiomyocytes générés, en vue de faire des études électrophysiologiques.(136, 137).

Par la suite, le protocole du Dr Pucéat (basé sur l'utilisation de différents facteurs spécifiques), a révélé que les cellules HuES9 se sont différenciées majoritairement en cellules cardiaques (expression des marqueurs GATA4, NKX2.5, etc.), cependant, des ajustements doivent être faits notamment pour optimiser le tri CD15+ afin de réduire la population de cellules de l'ectoderme et l'endoderme, qui sont encore présentes après le tri. Le protocole devra également être testé sur une matrice de Matrigel®, ce qui permettrait d'observer des battements cardiaques.

Une fois validé, ce protocole pourra être utilisé et modifié pour générer des cellules du nœud sinusal, *via* l'utilisation de lentivirus spécifiques (TBX18, TBX3, SHOX2). De plus, le nœud sinusal étant une structure très petite contenant très peu de cellules, un triage par FACS (Cytométrie en Flux) pourra être fait avec un marqueur HCN4, spécifique du nœud sinusal, lors des dernières étapes de différenciation. Ce protocole devra dans un premier temps être validé avec des cellules HuES9, puis appliqué sur les hiPSc de patients et de sujets témoins, où des expériences d'électrophysiologie pourront être menées.

3. Objectif 3 : Impact de la mutation SGO1 K23E sur la voie de signalisation TGF- β

On a précédemment montré que la mutation SGO1 K23E augmente la phosphorylation des SMAD2/3 dans des fibroblastes de peau de patients, à la fois sans et après stimulation par le TGF- β 1 (1). Les expériences qui ont été menées dans ce projet de recherche avaient pour but d'élucider le rôle de la protéine SGO1 sauvage, *via* l'impact de la mutation K23E dans cette voie de signalisation, en étudiant ses profils d'activation et d'inhibition, ainsi que les états de phosphorylation des protéines clés au niveau des voies canonique et non-canonique.

L'étude du profil d'activation de la voie TGF- β effectuée sur des HEK 293T n'a pas été concluante et ce, d'une part, à cause du test « Dual-Luciferase assay » qui n'a pas fonctionné (et ceci quelque soit le plasmide Luciferase utilisé : SBE_Luc, SBE4_Luc ou CAGA_Luc). Cependant, les résultats des immunoblots ont révélé l'impact de la mutation K23E sur la phosphorylation de la protéine SMAD2, en adéquation à ce qui a précédemment été publié.

De plus, il semblerait que les HEK 293T ne soient pas le meilleur modèle pour étudier la voie TGF- β , en effet la majorité des études utilisent des lignées cellulaires de cancer du poumon, ou du sein, et lorsque les HEK 293T sont utilisées, généralement elles sont co-transfectées avec différents plasmides exprimant SMAD2/3, SMAD4 ou les récepteurs de type I ou II (138, 139). Il existe également des lignées HEK 293T stables pour ces différents composants (HEK-Blue™ TGF- β Cells) qui pourraient alors être utilisées pour poursuivre cette étude.

L'étude du profil d'inhibition de la voie TGF- β effectuée sur des lignées stables A549_BTR suggère quand à elle que la protéine sauvage SGO1 à un rôle clé au niveau du récepteur de type I, et plus spécifiquement, un rôle de régulation des mécanismes d'auto-inhibition.

En effet, la surexpression de la protéine SGO1 sauvage induit une baisse d'inhibition de la voie TGF- β , quelque soit la combinaison de traitement (SB431542 ou TGF- β , ou la combinaison des deux), et également sans stimulation. Ce qui signifie d'une part, que le système est déjà activé avant même la stimulation, et/ou que les mécanismes d'auto-inhibition sont moins efficaces; et d'autre part suite à la stimulation, l'affinité du récepteur pour le SB431542 diminue. De plus, cette baisse d'inhibition est accentuée avec la surexpression de la forme mutée SGO1 K23E.

Ces résultats révèlent donc que la surexpression de la forme sauvage ou mutée K23E de SGO1 entraîne une baisse d'inhibition au niveau du récepteur de type I de la voie TGF- β (ALK5), qui se traduit de ce fait par une augmentation de la phosphorylation des SMADs, et qui est accentuée dans le cas de la mutation K23E. Cette nouvelle fonction pourrait être corrélée avec une mislocalisation cytosolique de la protéine (qui a déjà été montrée chez les cellules de patients), ce qui engendrerait soit un encombrement stérique (perturbation des mécanismes d'auto-inhibition), soit une interaction directe de la protéine avec la voie TGF- β .

Il serait également intéressant de refaire la même expérience avec l'utilisation de siRNA de SGO1, pour étudier l'effet du knockdown.

La dernière étude qui a été faite sur l'impact de la mutation SGO1 K23E sur la voie de signalisation TGF- β , s'est penchée sur les états de phosphorylation des protéines des voies canoniques (SMAD3), ainsi que des non-canoniques, qui n'ont pas encore été étudiées (p38, ERK1/2, JNK1/2/3). Des fibroblastes de peau de patients et de sujets témoins ont été utilisés, et l'impact de « l'âge » des cellules a également été mesuré, étant donné que chez les patients les premiers symptômes de la pathologie ne sont pas présents à la naissance.

Les résultats montrent, comme précédemment publié, que la voie canonique est augmentée (augmentation de pSMAD3), mais surtout, que la voie non-canonique est ralentie et que les fibroblastes ne répondent pratiquement plus au stimulus induit par le TGF- β 1 au niveau de la phosphorylation de p38 et ERK1/2 (des analyses supplémentaires devront être menées concernant JNK1/2/3). De plus, ces effets sont accentués avec le vieillissement des cellules, ce qui reflète ce qui est observé chez les patients. Ce vieillissement induit également une inhibition de la production de ERK1/2 totale (au contraire des témoins).

Des expériences complémentaires pourraient être effectuées en utilisant d'autres ligands comme les TGF- β 2 ou β 3, ou encore le BMP2 pour voir si ces effets sont TGF- β dépendant; ainsi que des inhibiteurs comme le SB431542; sans oublier l'utilisation de siRNA.

Cette expérience de quantification des phosphoprotéines a, pour la première fois, révélée l'impact de la mutation SGO1 K23E sur la voie non-canonique de la signalisation TGF- β dans des fibroblastes de peau. De ce fait, les expériences futures seront menées sur des cellules hiPS de patients (versus témoins), et surtout sur des cellules cardiaques et du nœud sinusal dérivées de celles-ci, ce qui va avoir un impact majeur sur la compréhension du rôle de SGO1 lors de la cardiogenèse.

MÉCANISME PROPOSÉ

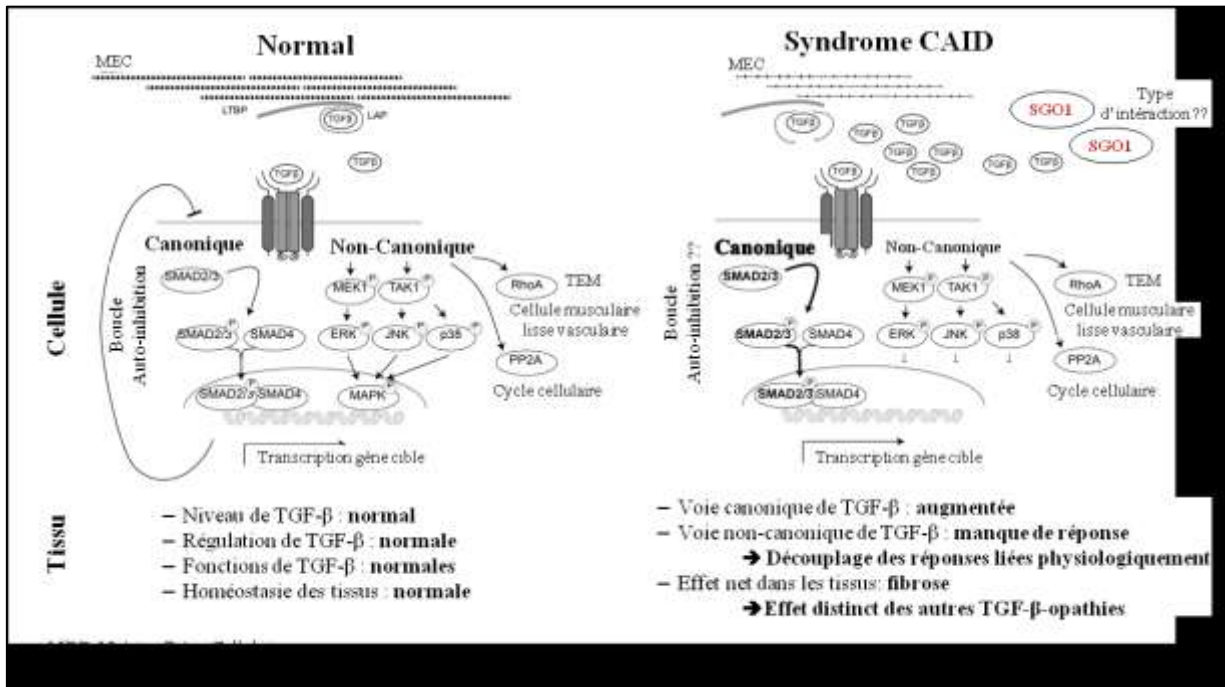


Figure 39: Mécanisme proposé de l'impact de la mutation SGO1 K23E sur la voie de signalisation TGF-β, adaptée de (140).

Figure de gauche : témoin, **Figure de droite :** syndrome CAID.

La pathologie CAID, a mis pour la première fois en évidence le lien direct entre la voie de signalisation TGF-β et les cohésinopathies, Ce projet de Recherche a apporté une nouvelle compréhension des mécanismes impliqués, notamment au niveau de la voie non-canonique.

Le mécanisme proposé est le suivant (Figure 39): La mutation homozygote SGO1 K23E retrouvée chez les patients CAID, induit une mislocalisation de la protéine SGO1 au niveau du cytosol, se traduisant par une nouvelle fonction de SGO1 au niveau de la voie de signalisation TGF-β. Celle-ci induit une augmentation de la voie canonique (phosphorylation SMAD2/3), et une inhibition de la non-canonique (ERK, JNK, p38).

Ce découplage des voies canonique et non-canonique, induirait un défaut au niveau de l'auto-inhibition, et au fur et à mesure du vieillissement des cellules qui est accéléré chez les patients CAID (1), cette auto-inhibition serait encore plus affectée car les cellules ne seraient plus (ou moins) capables de répondre à tous les phénomènes impliqués lors de la sénescence. De ce fait, ce découplage des voies de signalisation TGF- β serait alors beaucoup plus marqué.

De plus, la sur-activation de la voie canonique engendre de la fibrose au niveau des tissus, qui de ce fait ne permet plus une bonne régulation du taux de TGF- β (1, 2 ou 3), et ceci entraîne un « cercle vicieux », car plus il y a de TGF- β disponible, plus la voie de signalisation va être activée.

Ce mécanisme proposé fait du syndrome CAID une pathologie unique, qui ne ressemble à aucune autre pathologie cardiaque et cohésinopathie, dans lesquelles la voie canonique n'est pas affectée et où la non-canonique est suractivée (Tableau IX) (140).

Tableau IX: Comparaison du syndrome CAID avec les syndromes de Marfan et de Loeys-Dietz, au niveau de la voie de signalisation TGF- β (140).

	Syndrome CAID	Syndrome de Marfan	Syndrome de Loeys-Dietz
Biodisponibilité du TGF- β	Augmenté	Fortement augmentée	
Voie-canonique	Augmentée	Non affectée	
Voie non-canonique	Manque de réponse	Fortement augmentée	
Mécanisme d'auto-inhibition	Ralentie ?	Non fonctionnel	
Phénotype tissulaire	Fibrose	Destruction	Fibrose

Cependant, le type d'interaction de SGO1 au sein de ce processus n'est pas encore élucidé. En effet, cette interaction pourrait être indirecte et causée par un encombrement stérique de la protéine au niveau de sites de fixation d'inhibiteurs ou d'activateurs, ou encore ce pourrait être une interaction directe, et cette hypothèse serait mesurée suite à des co-immunoprécipitations de SGO1 avec différents composants de cette voie de signalisation TGF- β (comme BUB1 ou le récepteur de type I).

Dans le futur, ces résultats prometteurs permettront d'effectuer un criblage de médicaments afin d'améliorer le traitement de cette maladie incurable, notamment *via* l'utilisation de Losartan, antagoniste du récepteur de l'angiotensine II, induisant une perte d'expression du TGF- β (141).

RÉFÉRENCES

1. Chetaille P, Preuss C, Burkhard S, Cote JM, Houde C, Castilloux J, et al. Mutations in SGOL1 cause a novel cohesinopathy affecting heart and gut rhythm. *Nature Genet.* 2014;46(11):1245-9.
2. Gutiérrez-Caballero C, Cebollero LR, Pendás AM. Shugoshins: from protectors of cohesion to versatile adaptors at the centromere. *Trends in Genetics.* 2012;28(7):351-60.
3. Kitajima TS, Sakuno T, Ishiguro K, Iemura S, Natsume T, Kawashima SA, et al. Shugoshin collaborates with protein phosphatase 2A to protect cohesin. *Nature.* 2006;441(7089):46-52.
4. Yamada HY, Yao Y, Wang X, Zhang Y, Huang Y, Dai W, et al. Haploinsufficiency of SGO1 results in deregulated centrosome dynamics, enhanced chromosomal instability and colon tumorigenesis. *Cell cycle.* 2012;11(3):479-88.
5. Available from: <http://cvirtuel.cochin.univ-paris5.fr/Embryologie/Animentre/Animentre1.html>.
6. High FA, Epstein JA. The multifaceted role of Notch in cardiac development and disease. *Nat Rev Genet.* 2008;9(1):49-61.
7. Xin M, Olson EN, Bassel-Duby R. Mending broken hearts: cardiac development as a basis for adult heart regeneration and repair. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14(8):529-41.
8. Blin G, Neri T, Stefanovic S, Puceat M. Human embryonic and induced pluripotent stem cells in basic and clinical research in cardiology. *Current stem cell research & therapy.* 2010;5(3):215-26.

9. Arimura T, Helbling-Leclerc A, Massart C, Varnous S, Niel F, Lacene E, et al. Mouse model carrying H222P-Lmna mutation develops muscular dystrophy and dilated cardiomyopathy similar to human striated muscle laminopathies. *Hum Mol Genet.* 2005;14(1):155-69.
10. Opthof T. The mammalian sinoatrial node. *Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy.* 1988;1(6):573-97.
11. Christoffels VM, Smits GJ, Kispert A, Moorman AF. Development of the pacemaker tissues of the heart. *Circulation research.* 2010;106(2):240-54.
12. Boyett MR, Honjo H, Kodama I. The sinoatrial node, a heterogeneous pacemaker structure. *Cardiovascular research.* 2000;47(4):658-87.
13. Wiese C, Grieskamp T, Airik R, Mommersteeg MT, Gardiwal A, de Gier-de Vries C, et al. Formation of the sinus node head and differentiation of sinus node myocardium are independently regulated by Tbx18 and Tbx3. *Circulation research.* 2009;104(3):388-97.
14. Christoffels VM, Mommersteeg MT, Trowe MO, Prall OW, de Gier-de Vries C, Soufan AT, et al. Formation of the venous pole of the heart from an Nkx2-5-negative precursor population requires Tbx18. *Circulation research.* 2006;98(12):1555-63.
15. Liu H, Espinoza-Lewis RA, Chen C, Hu X, Zhang Y, Chen Y. The role of Shox2 in SAN development and function. *Pediatric cardiology.* 2012;33(6):882-9.
16. Hoogaars WMH, Engel A, Brons JF, Verkerk AO, de Lange FJ, Wong LYE, et al. Tbx3 controls the sinoatrial node gene program and imposes pacemaker function on the atria. *Genes & development.* 2007;21(9):1098-112.
17. Mommersteeg MT, Hoogaars WM, Prall OW, de Gier-de Vries C, Wiese C, Clout DE, et al. Molecular pathway for the localized formation of the sinoatrial node. *Circulation research.* 2007;100(3):354-62.

18. Wahl-Schott C, Fenske S, Biel M. HCN channels: new roles in sinoatrial node function. *Current Opinion in Pharmacology*. 2014;15:83-90.
19. Stieber J, Herrmann S, Feil S, Loster J, Feil R, Biel M, et al. The hyperpolarization-activated channel HCN4 is required for the generation of pacemaker action potentials in the embryonic heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(25):15235-40.
20. Garcia-Frigola C, Shi Y, Evans SM. Expression of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel HCN4 during mouse heart development. *Gene expression patterns : GEP*. 2003;3(6):777-83.
21. Gros D, Theveniau-Ruissy M, Bernard M, Calmels T, Kober F, Sohl G, et al. Connexin 30 is expressed in the mouse sino-atrial node and modulates heart rate. *Cardiovascular research*. 2010;85(1):45-55.
22. Kwong KF, Schuessler RB, Green KG, Laing JG, Beyer EC, Boineau JP, et al. Differential Expression of Gap Junction Proteins in the Canine Sinus Node. *Circulation research*. 1998;82(5):604-12.
23. Davis LM, Rodefeld ME, Green K, Beyer EC, Saffitz JE. Gap junction protein phenotypes of the human heart and conduction system. *Journal of cardiovascular electrophysiology*. 1995;6(10 Pt 1):813-22.
24. Baruscotti M, Barbuti A, Bucchi A. The cardiac pacemaker current. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2010;48(1):55-64.
25. Yamamoto M, Dobrzynski H, Tellez J, Niwa R, Billeter R, Honjo H, et al. Extended atrial conduction system characterised by the expression of the HCN4 channel and connexin45. *Cardiovascular research*. 2006;72(2):271-81.

26. Barbuti A, DiFrancesco D. Control of cardiac rate by "funny" channels in health and disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008;1123:213-23.
27. DiFrancesco D. The Role of the Funny Current in Pacemaker Activity. *Circulation research*. 2010;106(3):434-46.
28. Rodriguez RD, Schocken DD. Update on sick sinus syndrome, a cardiac disorder of aging. *Geriatrics*. 1990;45(1):26-30, 3-6.
29. Schulze-Bahr E, Neu A, Friederich P, Kaupp UB, Breithardt G, Pongs O, et al. Pacemaker channel dysfunction in a patient with sinus node disease. *The Journal of clinical investigation*. 2003;111(10):1537-45.
30. Anderson JB, Benson DW. Genetics of sick sinus syndrome. *Cardiac electrophysiology clinics*. 2010;2(4):499-507.
31. Young HM. Embryological origin of interstitial cells of Cajal. *Microscopy research and technique*. 1999;47(5):303-8.
32. Al-Shboul OA. The importance of interstitial cells of cajal in the gastrointestinal tract. *Saudi journal of gastroenterology : official journal of the Saudi Gastroenterology Association*. 2013;19(1):3-15.
33. Horowitz B, Ward SM, Sanders KM. Cellular and molecular basis for electrical rhythmicity in gastrointestinal muscles. *Annual review of physiology*. 1999;61:19-43.
34. Antonucci A, Fronzoni L, Cogliandro L, Cogliandro RF, Caputo C, Giorgio RD, et al. Chronic intestinal pseudo-obstruction. *World Journal of Gastroenterology : WJG*. 2008;14(19):2953-61.

35. De Giorgio R, Sarnelli G, Corinaldesi R, Stanghellini V. Advances in our understanding of the pathology of chronic intestinal pseudo-obstruction. *Gut*. 2004;53(11):1549-52.
36. Pingault V, Girard M, Bondurand N, Dorkins H, Van Maldergem L, Mowat D, et al. SOX10 mutations in chronic intestinal pseudo-obstruction suggest a complex physiopathological mechanism. *Human genetics*. 2002;111(2):198-206.
37. Gargiulo A, Auricchio R, Barone MV, Cotugno G, Reardon W, Milla PJ, et al. Filamin A is mutated in X-linked chronic idiopathic intestinal pseudo-obstruction with central nervous system involvement. *American journal of human genetics*. 2007;80(4):751-8.
38. Seitan VC, Merckenschlager M. Cohesin and chromatin organisation. *Curr Opin Genet Dev*. 2012;22(2):93-100.
39. Dorsett D. Cohesin: genomic insights into controlling gene transcription and development. *Curr Opin Genet Dev*. 2011;21(2):199-206.
40. Farcas AM, Uluocak P, Helmhart W, Nasmyth K. Cohesin's concatenation of sister DNAs maintains their intertwining. *Molecular cell*. 2011;44(1):97-107.
41. Bose T, Gerton JL. Cohesinopathies, gene expression, and chromatin organization. *J Cell Biol*. 2010;189(2):201-10.
42. Parelho V, Hadjur S, Spivakov M, Leleu M, Sauer S, Gregson HC, et al. Cohesins functionally associate with CTCF on mammalian chromosome arms. *Cell*. 2008;132(3):422-33.
43. Wendt KS, Yoshida K, Itoh T, Bando M, Koch B, Schirghuber E, et al. Cohesin mediates transcriptional insulation by CCCTC-binding factor. *Nature*. 2008;451(7180):796-801.

44. Ball AR, Jr., Chen YY, Yokomori K. Mechanisms of cohesin-mediated gene regulation and lessons learned from cohesinopathies. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1839(3):191-202.
45. Horsfield JA, Print CG, Mönnich M. Diverse Developmental Disorders from The One Ring: Distinct Molecular Pathways Underlie the Cohesinopathies. *Frontiers in Genetics*. 2012;3:171.
46. Nishiyama T, Ladurner R, Schmitz J, Kreidl E, Schleiffer A, Bhaskara V, et al. Sororin Mediates Sister Chromatid Cohesion by Antagonizing Wapl. *Cell*.143(5):737-49.
47. Carretero M, Ruiz-Torres M, Rodriguez-Corsino M, Barthelemy I, Losada A. Pds5B is required for cohesion establishment and Aurora B accumulation at centromeres. *Embo j*. 2013;32(22):2938-49.
48. Liu J, Krantz ID. Cohesin and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2008;9:303-20.
49. Zuin J, Franke V, van Ijcken WF, van der Sloot A, Krantz ID, van der Reijden MI, et al. A cohesin-independent role for NIPBL at promoters provides insights in CdLS. *PLoS Genet*. 2014;10(2):e1004153.
50. Kitajima TS, Kawashima SA, Watanabe Y. The conserved kinetochore protein shugoshin protects centromeric cohesion during meiosis. *Nature*. 2004;427(6974):510-7.
51. Salic A, Waters JC, Mitchison TJ. Vertebrate shugoshin links sister centromere cohesion and kinetochore microtubule stability in mitosis. *Cell*. 2004;118(5):567-78.
52. Wang X, Yang Y, Duan Q, Jiang N, Huang Y, Darzynkiewicz Z, et al. sSgo1, a major splice variant of Sgo1, functions in centriole cohesion where it is regulated by Plk1. *Developmental cell*. 2008;14(3):331-41.

53. Riedel CG, Katis VL, Katou Y, Mori S, Itoh T, Helmhart W, et al. Protein phosphatase 2A protects centromeric sister chromatid cohesion during meiosis I. *Nature*. 2006;441(7089):53-61.
54. Xu Z, Cetin B, Anger M, Cho US, Helmhart W, Nasmyth K, et al. Structure and function of the PP2A-shugoshin interaction. *Molecular cell*. 2009;35(4):426-41.
55. Kang J, Chaudhary J, Dong H, Kim S, Brautigam CA, Yu H. Mitotic centromeric targeting of HP1 and its binding to Sgo1 are dispensable for sister-chromatid cohesion in human cells. *Molecular biology of the cell*. 2011;22(8):1181-90.
56. Tanno Y, Kitajima TS, Honda T, Ando Y, Ishiguro K, Watanabe Y. Phosphorylation of mammalian Sgo2 by Aurora B recruits PP2A and MCAK to centromeres. *Genes & development*. 2010;24(19):2169-79.
57. Rao CV, Sanghera S, Zhang Y, Biddick L, Reddy A, Lightfoot S, et al. Antagonizing pathways leading to differential dynamics in colon carcinogenesis in Shugoshin1 (Sgo1)-haploinsufficient chromosome instability model. *Molecular carcinogenesis*. 2015.
58. Yamada HY, Zhang Y, Reddy A, Mohammed A, Lightfoot S, Dai W, et al. Tumor-promoting/progressing role of additional chromosome instability in hepatic carcinogenesis in Sgo1 (Shugoshin 1) haploinsufficient mice. *Carcinogenesis*. 2015;36(4):429-40.
59. Wang LH, Yen CJ, Li TN, Elowe S, Wang WC, Wang LH. Sgo1 is a potential therapeutic target for hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2015;6(4):2023-33.
60. Zeineddine D, Papadimou E, Chebli K, Gineste M, Liu J, Grey C, et al. Oct-3/4 dose dependently regulates specification of embryonic stem cells toward a cardiac lineage and early heart development. *Developmental cell*. 2006;11(4):535-46.

61. Stefanovic S, Abboud N, Desilets S, Nury D, Cowan C, Puceat M. Interplay of Oct4 with Sox2 and Sox17: a molecular switch from stem cell pluripotency to specifying a cardiac fate. *J Cell Biol.* 2009;186(5):665-73.
62. Abboud N, Moore-Morris T, Hiriart E, Yang H, Bezerra H, Gualazzi MG, et al. A cohesin-OCT4 complex mediates Sox enhancers to prime an early embryonic lineage. *Nat Commun.* 2015;6:6749.
63. Zhang B, Jain S, Song H, Fu M, Heuckeroth RO, Erlich JM, et al. Mice lacking sister chromatid cohesion protein PDS5B exhibit developmental abnormalities reminiscent of Cornelia de Lange syndrome. *Development.* 2007;134(17):3191-201.
64. Van Vliet P, Wu SM, Zaffran S, Puceat M. Early cardiac development: a view from stem cells to embryos. *Cardiovascular research.* 2012;96(3):352-62.
65. Yoshida Y, Yamanaka S. iPS cells: a source of cardiac regeneration. *Journal of molecular and cellular cardiology.* 2011;50(2):327-32.
66. Inoue-Yokoo T, Tani K, Sugiyama D. Mesodermal and hematopoietic differentiation from ES and iPS cells. *Stem cell reviews.* 2013;9(4):422-34.
67. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* 1981;292(5819):154-6.
68. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1981;78(12):7634-8.
69. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998;282(5391):1145-7.

70. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1981;78(12):7634-8.
71. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131(5):861-72.
72. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-76.
73. Lagarkova MA, Shutova MV, Bogomazova AN, Vassina EM, Glazov EA, Zhang P, et al. Induction of pluripotency in human endothelial cells resets epigenetic profile on genome scale. *Cell cycle*. 2010;9(5):937-46.
74. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007;318(5858):1917-20.
75. Massague J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:753-91.
76. Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF- β Signaling from Cell Membrane to the Nucleus. *Cell*. 2003;113(6):685-700.
77. Schmidt-Weber CB, Blaser K. Regulation and role of transforming growth factor-beta in immune tolerance induction and inflammation. *Current opinion in immunology*. 2004;16(6):709-16.
78. Miyazono K, Kamiya Y, Morikawa M. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *Journal of biochemistry*. 2010;147(1):35-51.

79. Blobel GA, Schiemann WP, Lodish HF. Role of Transforming Growth Factor β in Human Disease. *New England Journal of Medicine*. 2000;342(18):1350-8.
80. Lijnen PJ, Petrov VV, Fagard RH. Induction of cardiac fibrosis by transforming growth factor-beta(1). *Molecular genetics and metabolism*. 2000;71(1-2):418-35.
81. Kapur NK. Transforming growth factor-beta: governing the transition from inflammation to fibrosis in heart failure with preserved left ventricular function. *Circ Heart Fail*. 2011;4(1):5-7.
82. Loeys BL, Schwarze U, Holm T, Callewaert BL, Thomas GH, Pannu H, et al. Aneurysm Syndromes Caused by Mutations in the TGF- β Receptor. *New England Journal of Medicine*. 2006;355(8):788-98.
83. Lindsay ME, Schepers D, Bolar NA, Doyle JJ, Gallo E, Fert-Bober J, et al. Loss-of-function mutations in TGFB2 cause a syndromic presentation of thoracic aortic aneurysm. *Nature genetics*. 2012;44(8):922-7.
84. Loeys BL, Schwarze U, Holm T, Callewaert BL, Thomas GH, Pannu H, et al. Aneurysm syndromes caused by mutations in the TGF-beta receptor. *N Engl J Med*. 2006;355(8):788-98.
85. Loeys BL, Chen J, Neptune ER, Judge DP, Podowski M, Holm T, et al. A syndrome of altered cardiovascular, craniofacial, neurocognitive and skeletal development caused by mutations in TGFBR1 or TGFBR2. *Nature genetics*. 2005;37(3):275-81.
86. Jenkins LM, Singh P, Varadaraj A, Lee NY, Shah S, Flores HV, et al. Altering the Proteoglycan State of Transforming Growth Factor beta Type III Receptor (TbetaRIII)/Betaglycan Modulates Canonical Wnt/beta-Catenin Signaling. *The Journal of biological chemistry*. 2016;291(49):25716-28.

87. Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massague J. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature*. 1994;370(6488):341-7.
88. Massague J, Weis-Garcia F. Serine/threonine kinase receptors: mediators of transforming growth factor beta family signals. *Cancer surveys*. 1996;27:41-64.
89. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*. 2003;425(6958):577-84.
90. Moustakas A, Souchelnytskyi S, Heldin CH. Smad regulation in TGF-beta signal transduction. *J Cell Sci*. 2001;114(Pt 24):4359-69.
91. Liu F, Ventura F, Doody J, Massague J. Human type II receptor for bone morphogenic proteins (BMPs): extension of the two-kinase receptor model to the BMPs. *Molecular and cellular biology*. 1995;15(7):3479-86.
92. Nakao A, Afrakhte M, Moren A, Nakayama T, Christian JL, Heuchel R, et al. Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature*. 1997;389(6651):631-5.
93. Nakao A, Imamura T, Souchelnytskyi S, Kawabata M, Ishisaki A, Oeda E, et al. TGF-beta receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4. *Embo j*. 1997;16(17):5353-62.
94. Ross S, Hill CS. How the Smads regulate transcription. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2008;40(3):383-408.
95. Xu L, Kang Y, Col S, Massague J. Smad2 nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins CAN/Nup214 and Nup153 feeds TGFbeta signaling complexes in the cytoplasm and nucleus. *Molecular cell*. 2002;10(2):271-82.

96. Matsuo SE, Fiore AP, Siguematu SM, Ebina KN, Friguglietti CU, Ferro MC, et al. Expression of SMAD proteins, TGF-beta/activin signaling mediators, in human thyroid tissues. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*. 2010;54(4):406-12.
97. Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*. 2003;113(6):685-700.
98. Tang WB, Ling GH, Sun L, Liu FY. Smad anchor for receptor activation (SARA) in TGF-beta signaling. *Frontiers in bioscience (Elite edition)*. 2010;2:857-60.
99. Massagué J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors. *Genes & development*. 2005;19(23):2783-810.
100. Sorrentino A, Thakur N, Grimsby S, Marcusson A, von Bulow V, Schuster N, et al. The type I TGF-beta receptor engages TRAF6 to activate TAK1 in a receptor kinase-independent manner. *Nat Cell Biol*. 2008;10(10):1199-207.
101. Adhikari A, Xu M, Chen ZJ. Ubiquitin-mediated activation of TAK1 and IKK. *Oncogene*. 2007;26(22):3214-26.
102. Mu Y, Gudey SK, Landstrom M. Non-Smad signaling pathways. *Cell and tissue research*. 2012;347(1):11-20.
103. Katz M, Amit I, Yarden Y. Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases. *Biochimica et biophysica acta*. 2007;1773(8):1161-76.
104. Feng XH, Derynck R. Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2005;21:659-93.
105. Kretschmar M, Doody J, Timokhina I, Massagué J. A mechanism of repression of TGFβ/ Smad signaling by oncogenic Ras. *Genes & development*. 1999;13(7):804-16.

106. Batut J, Schmierer B, Cao J, Raftery LA, Hill CS, Howell M. Two highly related regulatory subunits of PP2A exert opposite effects on TGF-beta/Activin/Nodal signalling. *Development*. 2008;135(17):2927-37.
107. Nyati S, Schinske-Sebolt K, Pitchiaya S, Chekhovskiy K, Chator A, Chaudhry N, et al. The kinase activity of the Ser/Thr kinase BUB1 promotes TGF-beta signaling. *Science signaling*. 2015;8(358):ra1.
108. Nyati S, Schinske K, Ray D, Nyati M, Ross BD, Rehemtulla A. Molecular Imaging of TGFβ-Induced Smad2/3 Phosphorylation Reveals a Role for Receptor Tyrosine Kinases in Modulating TGFβ Signaling. *Clinical Cancer Research*. 2011;17(23):7424-39.
109. Jozefczuk J, Drews K, Adjaye J. Preparation of mouse embryonic fibroblast cells suitable for culturing human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2012(64).
110. Leschik J, Stefanovic S, Brinon B, Puceat M. Cardiac commitment of primate embryonic stem cells. *Nature protocols*. 2008;3(9):1381-7.
111. Xu C. Differentiation and enrichment of cardiomyocytes from human pluripotent stem cells. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2012;52(6):1203-12.
112. Lian X, Zhang J, Azarin SM, Zhu K, Hazeltine LB, Bao X, et al. Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/beta-catenin signaling under fully defined conditions. *Nature protocols*. 2013;8(1):162-75.
113. Brade T, Männer J, Kühl M. The role of Wnt signalling in cardiac development and tissue remodelling in the mature heart. *Cardiovascular research*. 2006;72(2):198-209.
114. Fedon Y, Bonnieu A, Vernus B, Bacou F, Bernardi H, Gay S. Role and Function of Wnts in the Regulation of Myogenesis: When Wnt Meets Myostatin 2012 2012-08-22.

115. Flaherty MP, Kamerzell TJ, Dawn B. Chapter 7 - Wnt Signaling and Cardiac Differentiation. In: Yaoliang T, editor. Progress in Molecular Biology and Translational Science. Volume 111: Academic Press; 2012. p. 153-74.
116. Lian X, Hsiao C, Wilson G, Zhu K, Hazeltine LB, Azarin SM, et al. Robust cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells via temporal modulation of canonical Wnt signaling. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2012;109(27):E1848-57.
117. Schlange T, Andree B, Arnold HH, Brand T. BMP2 is required for early heart development during a distinct time period. Mechanisms of development. 2000;91(1-2):259-70.
118. Minami I, Yamada K, Otsuji Tomomi G, Yamamoto T, Shen Y, Otsuka S, et al. A Small Molecule that Promotes Cardiac Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells under Defined, Cytokine- and Xeno-free Conditions. Cell Reports. 2012;2(5):1448-60.
119. Washington Smoak I, Byrd NA, Abu-Issa R, Goddeeris MM, Anderson R, Morris J, et al. Sonic hedgehog is required for cardiac outflow tract and neural crest cell development. Dev Biol. 2005;283(2):357-72.
120. Dyer LA, Kirby ML. Sonic hedgehog maintains proliferation in secondary heart field progenitors and is required for normal arterial pole formation. Dev Biol. 2009;330(2):305-17.
121. Menasche P, Puceat M, Larghero J, Blin G, Nury D, Stefanovic S. Method for generating primate cardiovascular progenitor cells for clinical use from primate embryonic stem cells or embryonic-like state cells, and their applications. Google Patents; 2011.
122. Kim C, Wong J, Wen J, Wang S, Wang C, Spiering S, et al. Studying arrhythmogenic right ventricular dysplasia with patient-specific iPSCs. Nature. 2013;494(7435):105-10.

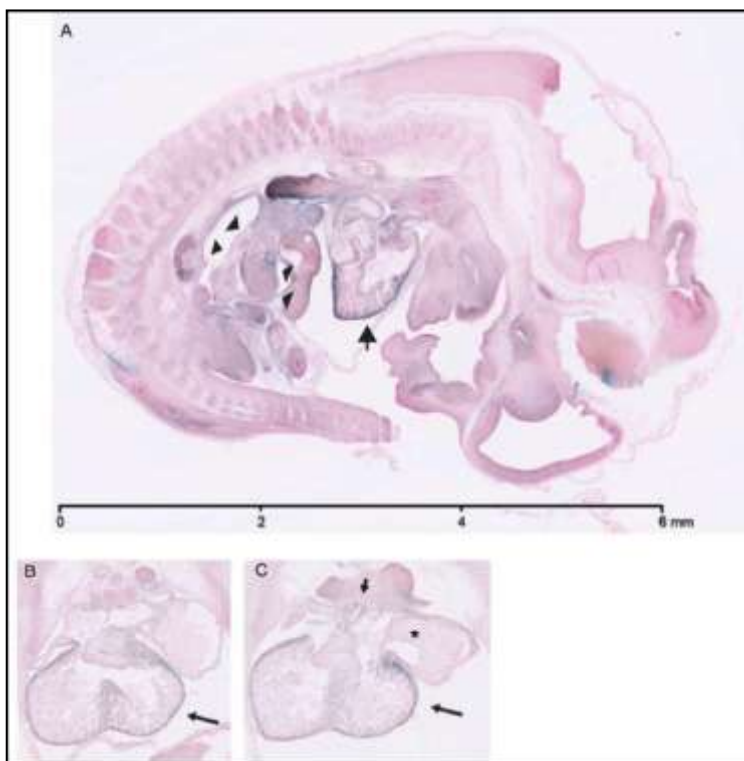
123. Kita-Matsuo H, Barcova M, Prigozhina N, Salomonis N, Wei K, Jacot JG, et al. Lentiviral vectors and protocols for creation of stable hESC lines for fluorescent tracking and drug resistance selection of cardiomyocytes. *PloS one*. 2009;4(4):e5046.
124. Grant AO. Cardiac Ion Channels. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*. 2009;2(2):185-94.
125. Yue L, Feng J, Li GR, Nattel S. Transient outward and delayed rectifier currents in canine atrium: properties and role of isolation methods. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. 1996;270(6):H2157-H68.
126. Tiscornia G, Singer O, Verma IM. Production and purification of lentiviral vectors. *Nat Protocols*. 2006;1(1):241-5.
127. Wang X, McManus M. Lentivirus Production. 2009(32):e1499.
128. Jonk LJC, Itoh S, Heldin C-H, ten Dijke P, Kruijer W. Identification and Functional Characterization of a Smad Binding Element (SBE) in the JunB Promoter That Acts as a Transforming Growth Factor- β , Activin, and Bone Morphogenetic Protein-inducible Enhancer. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(33):21145-52.
129. . Available from: <http://lukemiller.org/index.php/2010/11/analyzing-gels-and-western-blot-with-image-j/>.
130. Brade T, Pane LS, Moretti A, Chien KR, Laugwitz KL. Embryonic heart progenitors and cardiogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2013;3(10).
131. Sturzu AC, Wu SM. Developmental and regenerative biology of multipotent cardiovascular progenitor cells. *Circulation research*. 2011;108(3):353-64.
132. Zhou S, Zawel L, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Characterization of human FAST-1, a TGF beta and activin signal transducer. *Molecular cell*. 1998;2(1):121-7.

133. Piek E, Westermark U, Kastemar M, Heldin CH, van Zoelen EJ, Nister M, et al. Expression of transforming-growth-factor (TGF)-beta receptors and Smad proteins in glioblastoma cell lines with distinct responses to TGF-beta1. *International journal of cancer*. 1999;80(5):756-63.
134. Inman GJ, Nicolas FJ, Callahan JF, Harling JD, Gaster LM, Reith AD, et al. SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Molecular pharmacology*. 2002;62(1):65-74.
135. Callahan JF, Burgess JL, Fornwald JA, Gaster LM, Harling JD, Harrington FP, et al. Identification of novel inhibitors of the transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) type 1 receptor (ALK5). *Journal of medicinal chemistry*. 2002;45(5):999-1001.
136. Morikawa K, Bahrudin U, Miake J, Igawa O, Kurata Y, Nakayama Y, et al. Identification, isolation and characterization of HCN4-positive pacemaking cells derived from murine embryonic stem cells during cardiac differentiation. *Pacing and clinical electrophysiology : PACE*. 2010;33(3):290-303.
137. Später D, Abramczuk MK, Buac K, Zangi L, Stachel MW, Clarke J, et al. A HCN4+ cardiomyogenic progenitor derived from the first heart field and human pluripotent stem cells. *Nat Cell Biol*. 2013;15(9):1098-106.
138. Wicks SJ, Lui S, Abdel-Wahab N, Mason RM, Chantry A. Inactivation of Smad-Transforming Growth Factor β Signaling by Ca(2+)-Calmodulin-Dependent Protein Kinase II. *Molecular and cellular biology*. 2000;20(21):8103-11.
139. Rozen-Zvi B, Hayashida T, Hubchak SC, Hanna C, Platanias LC, William Schnaper H. TGF- β /Smad3 activates mammalian target of rapamycin complex-1 to promote collagen production by increasing HIF-1 α expression. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. 2013;305(4):F485-F94.

140. Andelfinger G, Loeys B, Dietz H. A Decade of Discovery in the Genetic Understanding of Thoracic Aortic Disease. *Canadian Journal of Cardiology*.32(1):13-25.

141. Lim DS, Lutucuta S, Bachireddy P, Youker K, Evans A, Entman M, et al. Angiotensin II blockade reverses myocardial fibrosis in a transgenic mouse model of human hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*. 2001;103(6):789-91.

ANNEXES



Annexe 1 : Expression et fonction spatiotemporelles de Sgol1 chez la souris knock-in Sgol1-LacZ. A, B et C montrent des coupes histologiques d'embryon de souris au jour embryonnaire 12.5 (E12.5). Le marquage bleu révèle la présence de LacZ, équivalent à l'expression de Sgol1. A: coupe sagittale qui montre que Sgol1 est exprimé principalement dans le cœur en développement (flèche) et dans les intestins (pointes de flèches). B et C: vue des quatre chambres cardiaques révélant une forte expression dans la totalité du cœur.

Annexe 2 : Vidéos de battements cardiaques. Les trois vidéos (fichiers multimédia joints à ce présent rapport), présentent des battements cellulaires caractéristiques de cellules pacemaker, obtenus suite à la différenciation des HuES9 avec le protocole de Life Technologies™.