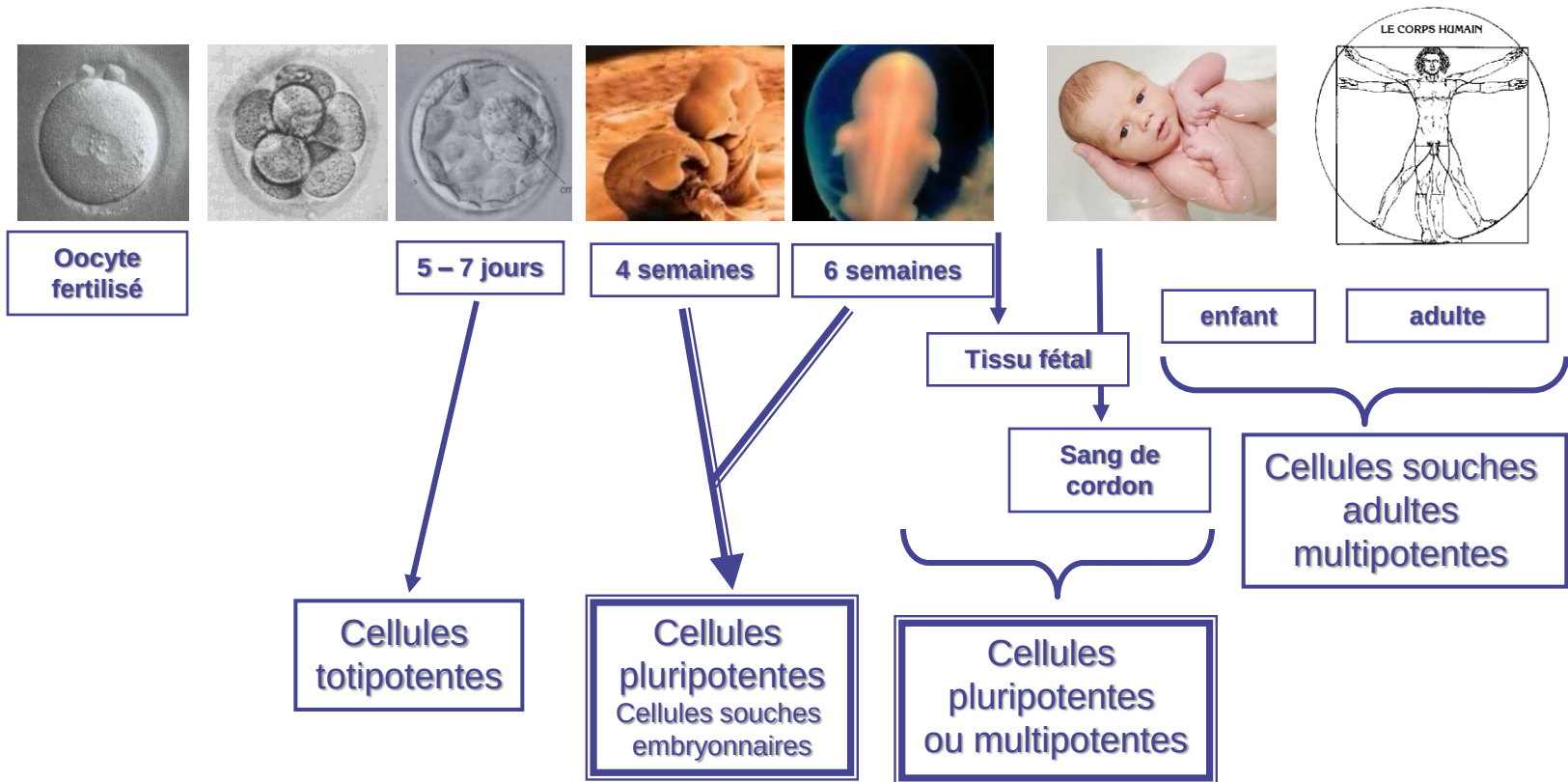


Importance de la caractérisation génomique des cellules souches humaines à pluripotence induite (hiPSCs)

Meritet Nicole

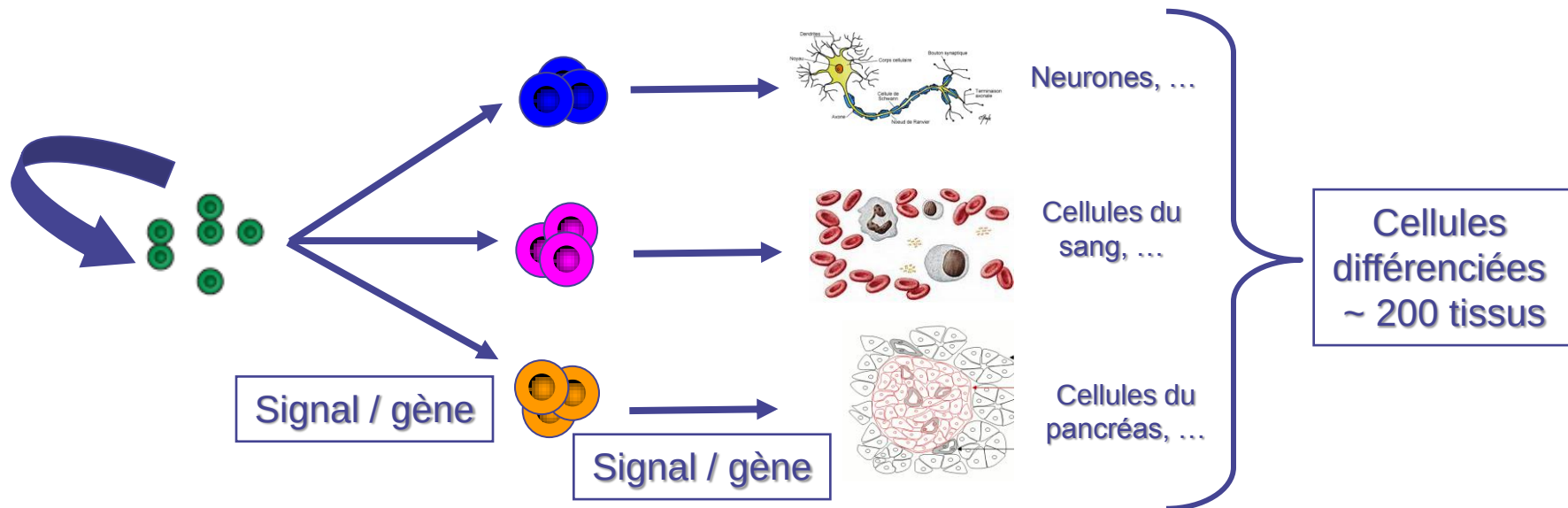
24 Septembre 2015

Rappel: Quelle est l'origine de la cellule souche pluripotente?



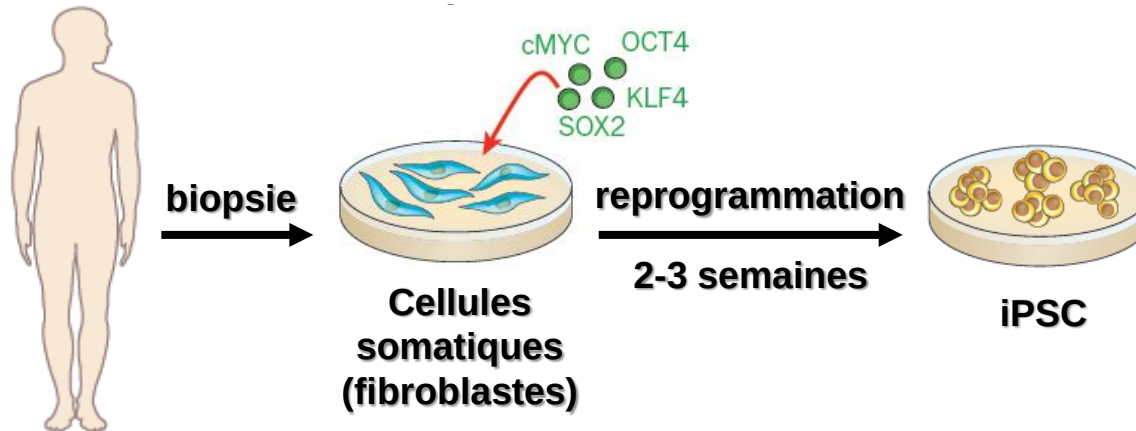
Quelles sont les propriétés des cellules souches pluripotentes ?

- Deux propriétés fondamentales:
 - Auto-renouvellement
 - Différenciation, génération de tous les différents types cellulaires de l'individu



Qu'est – ce qu'une hiPSC ou cellule souche humaine à pluripotence induite ?

- hiPSC: cellule primaire humaine reprogrammée à l'état embryonnaire
- Premières hiPSCs humaines publiées en novembre 2007
 - Capacité théorique de différenciation en n'importe quel type cellulaire
 - Conservation du patrimoine génétique du donneur



Quelles sont les applications thérapeutiques des cellules hiPSCs ?

● Modèles cellulaires

- **Modélisation de pathologie pour les maladies génétiques sans modèles animaux pertinents**
 - Etude des mécanismes de pathologie
 - Test de molécules
 - Evaluation de la toxicité d'une molécule donnée
- **Différenciation parfois difficile, même très difficile**

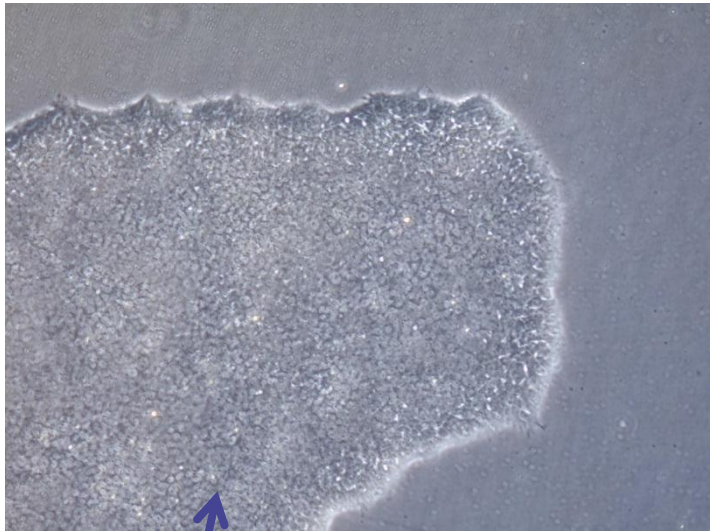
● Initiatives de génération de banques d'hiPSCs en Europe, aux USA et au Japon

● Thérapie cellulaire

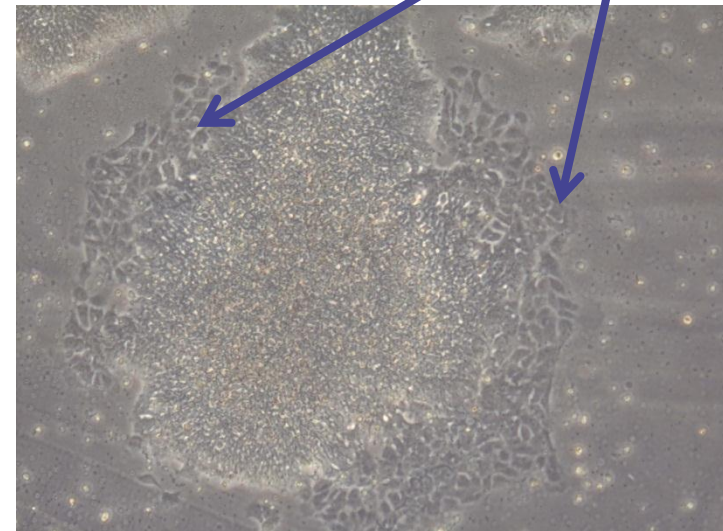
- **Lancement du premier essai au Japon sur une patiente atteinte de dégénérescence maculaire liée à l'âge**

Morphologie des cellules hiPSCs en culture

- Colonies pluripotentes aux bords bien définis mais forte tendance à se différencier spontanément en culture



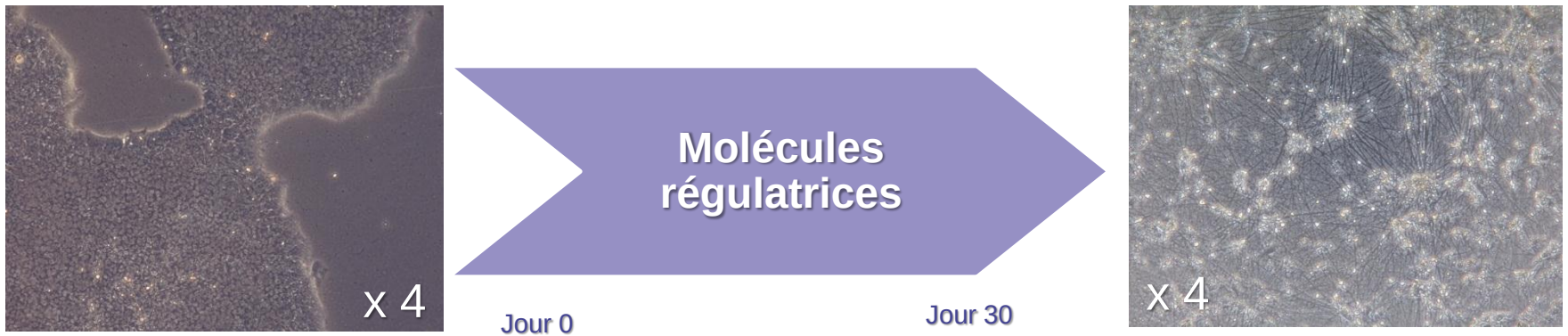
Colonie pluripotente



Colonie différenciée

Differentiation des cellules hiPSC

- Différenciation en différents types cellulaires comme, par exemple des neurones, en présence de molécules régulatrices.



- Outil unique pour la génération de nouveaux modèles cellulaires
 - Comparaison de cellules de donneurs sains et de cellules de patients malades
 - Capacité de modification du genome
 - Capacité d'amplification "sans" limite
 - Différenciation en type cellulaire non accessible
 - Neurones pour la maladie de Parkinson
 - Cardiomyocytes pour la maladie de Fabry

Mais apparition d'altérations génomiques dans les cellules hiPSCs...

- Au cours de la reprogrammation ou de la culture, apparition possible d'altérations génomiques

STEM CELLS

The dark side of induced pluripotency

Induced pluripotent stem cells have great therapeutic potential. But genomic and epigenomic analyses of these cells generated using current technology reveal abnormalities that may affect their safe use. [SEE ARTICLES P.58, P.63 & P.68](#)

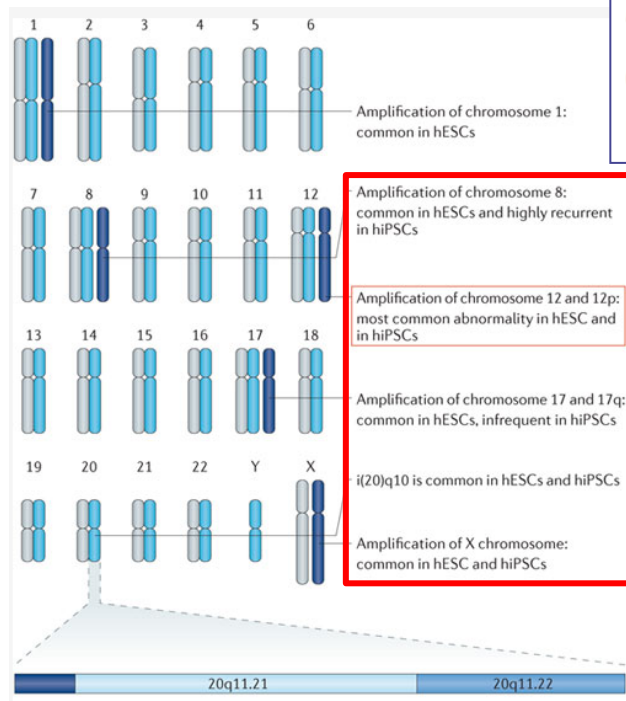
Cell Stem Cell. 2011 Jan 7;8(1):106-18. doi: 10.1016/j.stem.2010.12.003.

Dynamic changes in the copy number of pluripotency and cell proliferation genes in human ESCs and iPSCs during reprogramming and time in culture.

Laurent LC¹, Ulitsky I, Slavin I, Tran H, Schork A, Morey R, Lynch C, Harness JV, Lee S, Barrero MJ, Ku S, Martynova M, Semechkin R, Galat V, Gottesfeld J, Izpisua Belmonte JC, Murry C, Keirstead HS, Park HS, Schmidt U, Laslett AL, Muller FJ, Nievergelt CM, Shamir R, Loring JF.

Altérations génomiques les plus fréquentes des cellules hiPSCs

- Amplification des chromosomes 8,12, 17 et X ainsi que l'amplification du locus BCL2L1 (Lund et al.)
 - Etude sur 1163 échantillons issus de 40 lignées hESCs et 552 échantillons issus de 219 lignées de hiPSCs



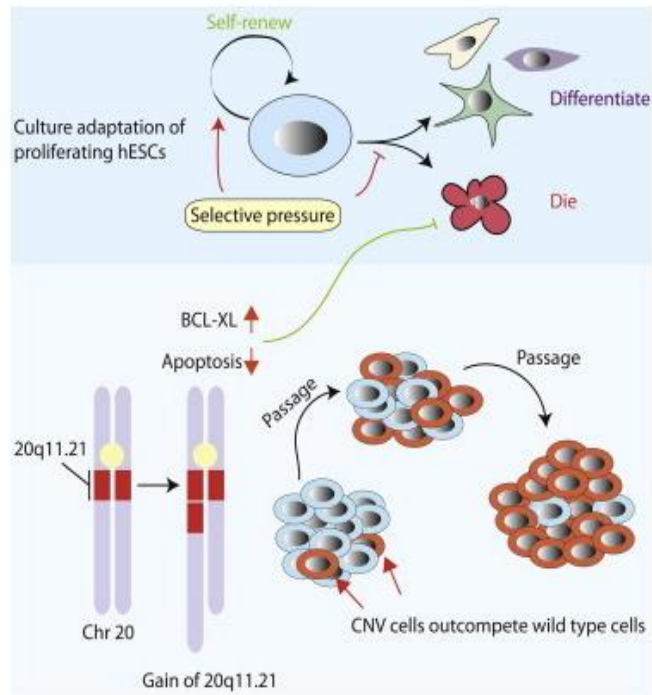
Nature Reviews Genetics **13**, 732-744 (October 2012) | doi:10.1038/nrg3271

Genetic and epigenetic stability of human pluripotent stem cells

Riikka J. Lund^{1,2}, Elisa Närvä^{1,2} & Riitta Lahesmaa¹ [About the authors](#)

Amplification du locus BCL2L1

- L'amplification du locus BCL2L1 donne aux cellules une pression de sélection positive en augmentant la résistance à l'apoptose (Avery et al.)



[Stem Cell Reports](#), 2013 Oct 31;1(5):379-86. doi: 10.1016/j.stemcr.2013.10.005. eCollection 2013.

BCL-XL mediates the strong selective advantage of a 20q11.21 amplification commonly found in human embryonic stem cell cultures.

[Avery S¹](#), [Hirst AJ](#), [Baker D](#), [Lim CY](#), [Alagaratnam S](#), [Skotheim RI](#), [Lothe RA](#), [Pera ME](#), [Colman A](#), [Robson P](#), [Andrews PW](#), [Knowles BB](#).

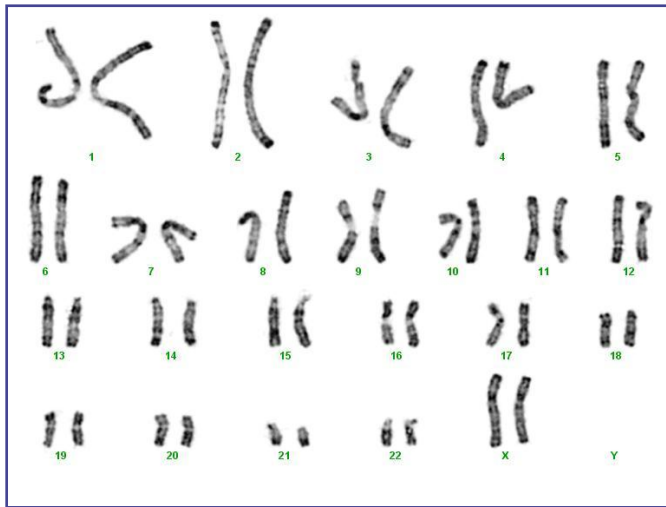
- >>> Verification de la stabilité chromosomique fortement recommandée

Contrôle qualité des cellules hiPSCs implémenté chez Sanofi

- 1 – Contrôle du caryotype et de l'amplification du locus BCL2L1
- 2 – Contrôle des réarrangements de l'ADN: deletions, duplications, inversions, and translocations
 - Vérification de l'intégrité des gènes d'intérêt
- 3 – Contrôle de la filiation

1-A: Contrôle du caryotype

- 1 – Vérification de l'absence d'aneuploïdie:
 - Exemple de caryotype de l'échantillon Z à passage 24



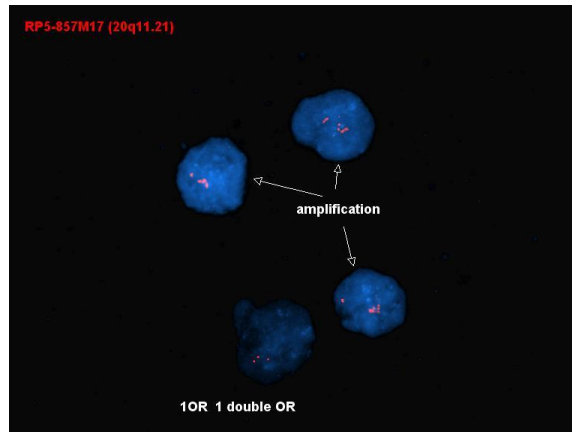
>>> Caryotype féminin sans anomalie

1-B: Analyse du locus BCL2L1

● 2 – Verification de l'absence d'amplification au locus BCL2L1

- Exemple de caryotype de l'échantillon Z à passage 19
 >>> 46,XX.nucish(RP5-857M17x2)[179/200]
 - Pas d'amplification ou de délétion certaine de la région 20q11

- Exemple du même échantillon Z à passage 24 (5 passages en plus – 1 mois en culture)

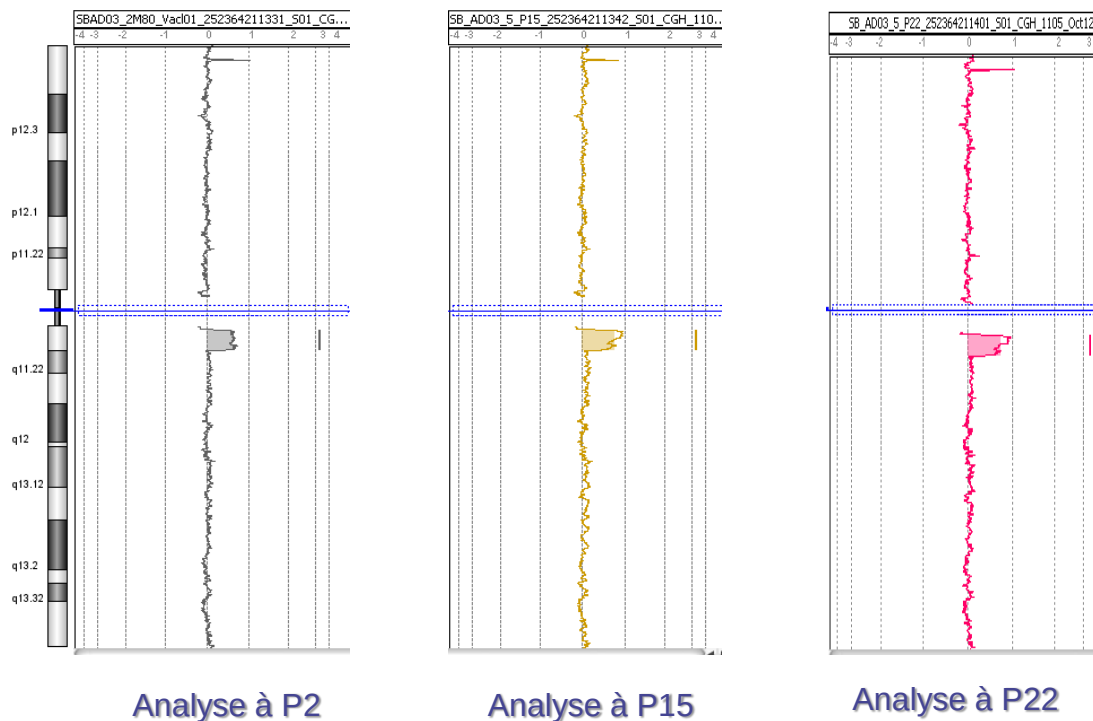


>>> 46,XX.nucish(RP5-857M17x3)[20/200]/(RP5-857M17amp)[43/200]

- Mise en évidence de 10% de cellules avec 3 signaux d'hybridation
- Mise en évidence de 21% de cellules avec amplification du locus BCL2L1

2- Contrôle des réarrangements de l'ADN

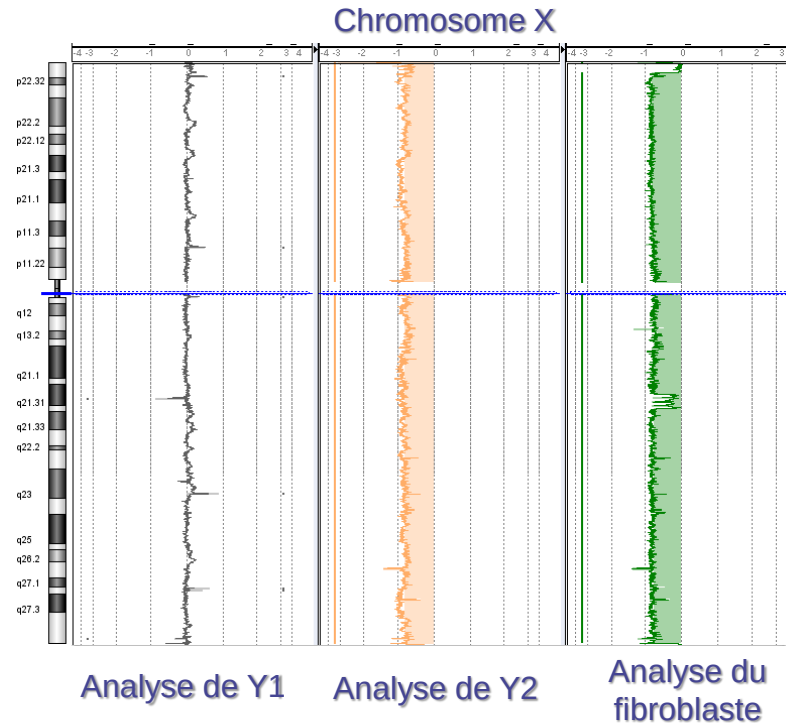
- 3 – Contrôle des deletions, duplications, inversions, et translocations par analyse CGH (Comparative Genomic Hybridization)
 - Exemple de l'échantillon Z à différents passages en culture



>>> Mise en évidence de l'amplification de la région 20q11 dès le passage 2

3 - Contrôle de la filiation parentale

- 3 – Vérification de la filiation de 2 cellules hiPSCs issus d'un même fibroblaste parental
 - Exemple de la filiation de l'échantillon Y



>>> Mise en évidence de la non-filiation de l'échantillon Y1 (femme) avec les 2 autres cellules males

Pourquoi un tel contrôle qualité ?

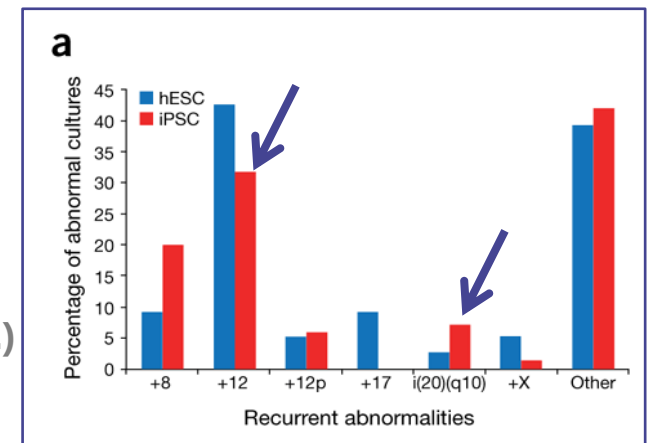
● Analyse complète de la cellule hiPSC

- Caryotype: faible résolution, mais grande sensibilité
- CGH: haute résolution, mais faible sensibilité
- Importance de la filiation
- >>> Ces 3 contrôles nous donnent des informations différentes et doivent donc être réalisés en parallèle

● Analyse des résultats de nos cellules hiPSCs en quelques chiffres

- En 2014, 8 caryotypes / 18 testés étaient normaux: 44 % !!
- En 2015, 18 / 27 : 66%
 - Aberrations les plus fréquentes:
 - Amplification du locus BCL11
 - Mosaïcisme avec des trisomies 12 et 20

>>> Ces alterations font parties des aberrations décrites comme les plus fréquentes (Set M Taapken, et al.)



>>> Contrôle du caryotype à refaire régulièrement au cours de la culture

Conclusion

- Les hiPSCs:
 - >>>> un outil unique pour la génération de nouveaux modèles cellulaires
- Mais les hiPSCs doivent être régulièrement contrôlées pour s'assurer de la qualité des modèles cellulaires générés

Remerciements

- Biomnis

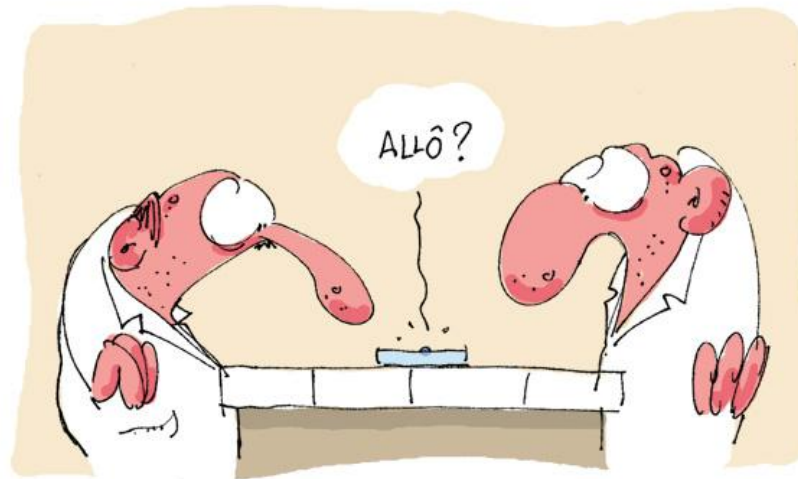
- Nadege Casson
- Luc Druart
- Aurore Dupuis
- Delphine Evenat
- Catherine Gauffriau
- Véronique Moro
- Sylvie Tapia

- Sanofi

- Aurélie Daury
- Florence Massey
- Cecile.Orsini

Que sera le futur des hiPSCs ???

RECHERCHE
UN MINI-CERVEAU OBTENU
À PARTIR DE CELLULES Souches

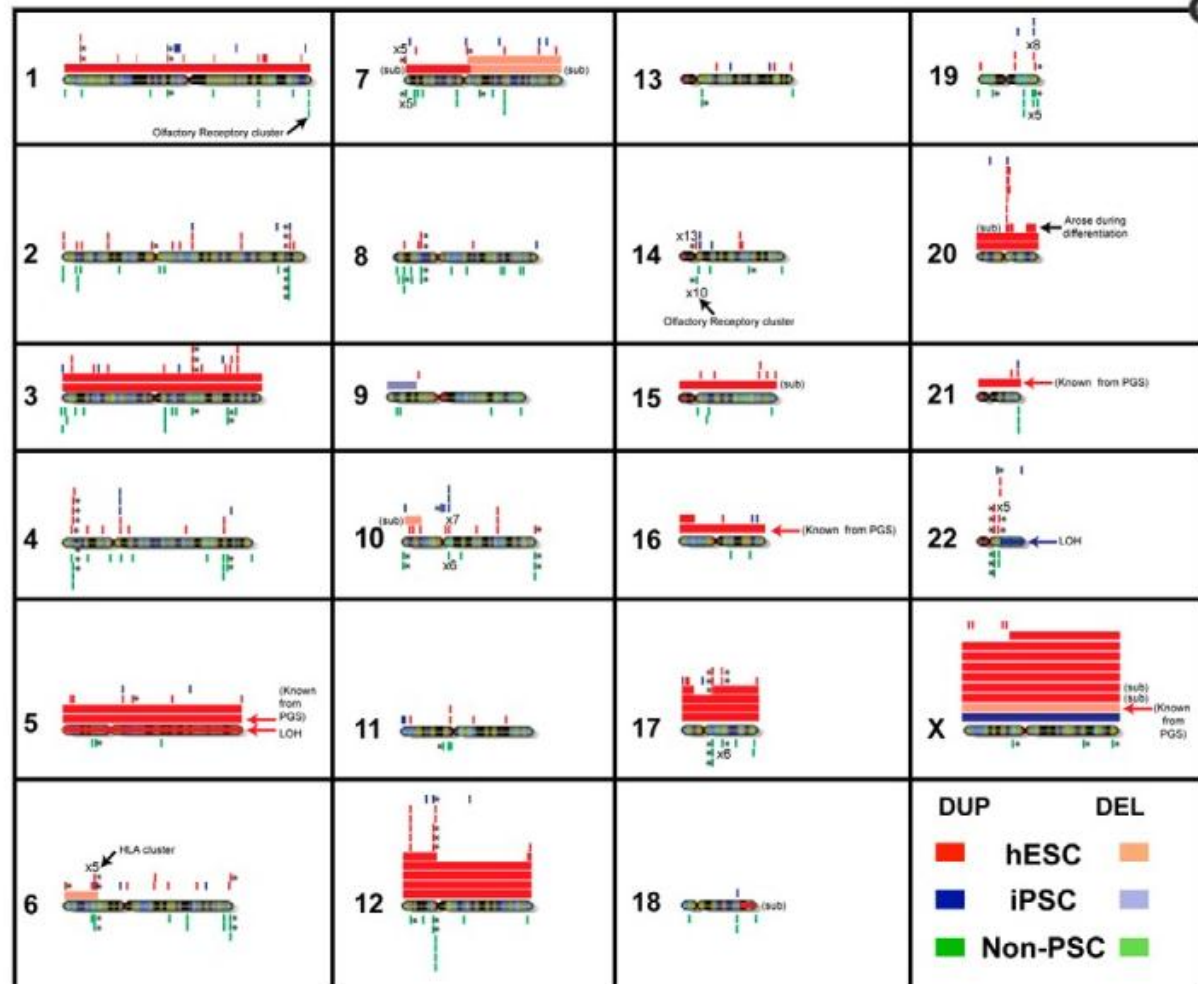


Olivepo

Merci pour votre attention

Genomic Instability in Pluripotent Stem Cells: Implications for Clinical Applications*

Suzanne E. Peterson and Jeanne F. Loring¹



Common genomic alterations in hPSCs. High-resolution SNP analysis was performed on 186 pluripotent (both hESC and hiPSC samples) and 119 non-pluripotent samples. Duplications (*DUP*; red for hESCs, blue for hiPSCs, and green for non-pluripotent cells) and deletions (*DEL*; lighter versions of each color) were mapped onto each chromosome. The most frequent duplications (whole chromosome and subchromosomal regions) in pluripotent cells were seen on chromosomes 12, 17, and X. In addition, many pluripotent cells showed amplification of a region on the long arm of chromosome 20 (modified from Ref. 11). *PGS*, pre-implantation genetic screening; *LOH*, loss of heterozygosity.