

26/01/2017 – C Vigouroux -

## **Avancées principales d'un travail de recherche financé par l'Allocation 2015 SFD-Pierre Fabre Médicament**

**Titre :** Modélisation de l'atteinte du tissu adipeux dans la lipodystrophie familiale partielle de Dunnigan à l'aide de cellules de patients induites à la pluripotence (iPSC)

**Porteur du projet :** Corinne Vigouroux, PU-PH, Centre de Recherche Saint-Antoine (INSERM U938), Equipe « Lipodystrophies génétiques et acquises »

### **Contexte de la recherche :**

Les lipodystrophies génétiques, dans lesquelles un défaut de tissu adipeux s'associe à des complications métaboliques sévères, illustrent les relations complexes entre adipocyte et métabolisme. Pour ce projet, des fibroblastes cutanés de patients lipodystrophiques porteurs de la mutation *LMNA* R482W sont reprogrammés en cellules souches pluripotente induites (iPSC), théoriquement capables de se différencier *in vitro* dans la plupart des types cellulaires. Ce modèle permet d'étudier l'effet des mutations *LMNA*, responsables du syndrome lipodystrophique de Dunnigan, sur la différenciation adipocytaire. Les mutations *LMNA* pouvant également conduire à des syndromes cliniques comprenant lipodystrophie, dystrophie musculaire, cardiomyopathie, et/ou atteintes multi-organes de vieillissement accéléré, nous avons privilégié l'hypothèse d'une altération développementale d'origine mésodermique.

### **Principaux résultats obtenus :**

**1-** Nous avons pu **reprogrammer efficacement des fibroblastes de peau issus de plusieurs sujets témoins ou atteints du syndrome de Dunnigan en iPSC**. Nous avons montré que les iPSC obtenues ont un caryotype normal, expriment les protéines et les ARNm de pluripotence, sont capables d'engager *in vitro* un développement dans les trois feuilletts embryonnaires mésodermique, ectodermique et endodermique et peuvent former des corps embryoïdes, confirmant leur caractère pluripotent. De plus, nous avons pu corriger efficacement la mutation dans plusieurs clones d'iPSC issus d'une patiente, grâce à la technique de recombinaison homologue médiée par des nucléases spécifiques de type TALEN, permettant d'obtenir des cellules iPSC isogéniques, mais non porteuses de la mutation *LMNA* R482W. Ces cellules représentent des témoins de choix pour étudier les effets spécifiques de la mutation.

**2-** Nous avons mis au point un **protocole original de différenciation adipocytaire**, permettant d'obtenir des cellules adipeuses beiges humaines à partir d'iPSC. Grâce à un programme de maturation avec financement complémentaire par la SATT-Lutech, nous avons amélioré ce protocole permettant :

- a) de reproduire le **développement physiologique adipocytaire** :
  - en débutant la différenciation par une induction mésodermique au lieu de passer par l'étape des cellules souches mésenchymateuses
  - sans surexprimer les facteurs adipogéniques comme généralement utilisé, ce qui force artificiellement la différenciation vers le lignage adipocytaire
- b) de faciliter les conditions expérimentales :
  - en mettant au point la culture cellulaire en deux dimensions, sans passer par les corps embryoïdes
  - en raccourcissant la durée du protocole, qui permet d'obtenir des adipocytes en 20 jours, contre au moins 48 jours pour les protocoles existants
- c) d'obtenir des **adipocytes fonctionnels**, permettant après transplantation en région sous-cutanée chez la souris Nude, la **reconstitution *in vivo* d'un tissu adipeux** bien caractérisé,

vascularisé et fonctionnel, capable de répondre physiologiquement à une stimulation bêta-adrénergique.

Notre protocole permet ainsi de fournir un outil pertinent pour l'étude du développement et de la physiologie adipocytaire chez l'homme. Il a permis l'enregistrement d'un **brevet français et international en 2016** et **l'article correspondant est en révision dans *Diabetes***.

**3-** Nous avons étudié en premier lieu la différenciation mésodermale des iPSC porteuses de mutations *LMNA* R482W, en les comparant à des iPSC isogéniques corrigées pour la mutation (TALEN). Nos résultats actuels montrent des défauts spécifiques résultant de la mutation, en faveur d'une altération précoce de la régulation épigénétique de l'expression des gènes. Nous montrons que ces altérations mésodermales précoces s'accompagnent d'un défaut de différenciation endothéliale des cellules mutées, qui sont incapables de former des structures vasculaires organisées *in vitro*, de développer des capacités de migration cellulaire et d'exprimer les protéines de l'endothélium mature. De façon importante, ces défauts sont absents dans les cellules iPSC issues de témoins mais aussi dans les cellules iPSC isogéniques corrigées, confirmant qu'il s'agit d'effets spécifiques liés à la mutation. **Ces résultats, qui valident l'hypothèse d'un défaut précoce du développement dans les laminopathies, sont en cours de rédaction pour publication.**

#### **Valorisation des résultats:**

Brevet 2016: "Method for *in vitro* production of adipocyte progenitors and adipocytes" (WO2016016572/FR3024462) AC. Guénantin, N. Briand, E. Capel, J. Capeau, C. Vigouroux.

Article en revision dans *Diabetes*: Anne-Claire Guénantin, Nolwenn Briand, Emilie Capel, Florent Dumont, Romain Morichon, Claire Provost, Francesca Stillitano, Dorota Jeziorowska, Jean-Pierre Siffroi, Roger J. Hajjar, Bruno Fève, Jean-Sébastien Hulot, Philippe Collas, Jacqueline Capeau, Corinne Vigouroux. Functional Human Beige Adipocytes from Induced Pluripotent Stem Cells

Article en cours de rédaction sur l'altération de la différenciation mésodermale des iPSC de patients porteurs de mutations *LMNA* R482W comparées aux iPSC isogéniques corrigées.

Communication orale : AC. Guénantin, N. Briand, E. Capel, F. Stillitano, D. Jeziorowska, R. Morichon, JP. Siffroi, RJ. Hajjar, B. Fève, JS. Hulot, J. Capeau, C. Vigouroux. Directed 2D Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells Into Beige Adipocytes: a Model for Screening and Therapeutic Approaches *Journée Scientifique ICAN 2015, Paris, 12 octobre 2015, Prix de la meilleure communication orale*

Ces travaux ont par ailleurs permis à Matthieu Mantecon d'obtenir son Master 2 « Biothérapie tissulaire Cellulaire et génique » (UPEC) en juin 2016, avec mention Bien, et aux Drs Nolwenn Briand et Anne-Claire Guénantin, post-doctorantes en charge de ces programmes au laboratoire, d'obtenir des financements prestigieux pour poursuivre leurs recherches, en collaboration avec notre laboratoire: Bourse Européenne Marie Curie pour Nolwenn Briand, pour le projet "Effects of lipodystrophy-associated A-type lamin mutations on dynamic lamin/genome interactions during development using patient-derived iPSCs" (laboratoire Ph Collas, Université d'Oslo, Norvège), et financement du Sanger Institute, Cambridge, UK, pour le post-doctorat d'Anne-Claire Guénantin (laboratoire A Vidal-Puig).

Je remercie très sincèrement la SFD et Pierre Fabre Médicament pour nous avoir permis de mener à bien ces travaux qui apportent des éléments nouveaux permettant de mieux comprendre la physiopathologie des laminopathies.