



**HAL**  
open science

# Pathologies des hélicases et vieillissement précoce : modèle d'étude par dérivation de cellules souches pluripotentes induites (iPS)

Vincent Gatinois

► **To cite this version:**

Vincent Gatinois. Pathologies des hélicases et vieillissement précoce : modèle d'étude par dérivation de cellules souches pluripotentes induites (iPS). Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2017. Français. NNT : 2017MONTT042 . tel-01690758

**HAL Id: tel-01690758**

**<https://theses.hal.science/tel-01690758>**

Submitted on 23 Jan 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Histologie, Embryologie et Cytogénétique

École doctorale : Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

Unité de recherche : Genome and stem cell plasticity in development and aging  
Institute for Regenerative Medicine & Biotherapy (IRMB)

**Pathologies des hélicases et vieillissement précoce :  
modèle d'étude par dérivation de cellules souches pluripotentes induites (iPS)**

Présentée par Vincent Gatinois  
Le 27 novembre 2017

Sous la direction de monsieur le Dr Franck Pellestor

Devant le jury composé de

Monsieur le professeur Thierry Lavabre-Bertrand, Université de Montpellier

Madame le professeur Brigitte Benzacken, Université Paris XIII

Madame le docteur Annachiara De Sandre-Giovannoli, Université Aix-Marseille

Madame le professeur Catherine Yardin, Université de Limoges

Monsieur le docteur Jean-Marc Lemaitre, Université de Montpellier

Monsieur le docteur Franck Pellestor, Université de Montpellier

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur



UNIVERSITÉ  
DE MONTPELLIER



A mon très cher Franck, dit « monsieur le directeur »,

*Le puits de science que tu es ne tarit jamais de précieuses informations sur les chromosomes et les grands classiques du jazz. Tu excelles également dans les arts de la table et les bons mots. Ces années passées à tes côtés sont absolument inoubliables. Je suis tellement fier d'être ton « padawan » !*

A Monsieur le Professeur Thierry Lavabre-Bertrand,

*Le premier vous m'avez ouvert la porte de la cytogénétique. Dans votre laboratoire je suis tombé amoureux des chromosomes. Je suis aujourd'hui très fier et très honoré d'intégrer la grande famille des morphologistes. Je vous suis éternellement reconnaissant pour votre soutien et vos précieux conseils. Je formule ici le vœu de pouvoir suivre vos pas.*

A Madame le Professeur Brigitte Benzacken,

*Vous me faites l'immense honneur de juger ce travail. Je vous remercie très sincèrement pour votre aide et votre gentillesse lors des congrès du CHEC et au CNU. Votre engagement et votre implication dans notre discipline est un modèle que j'essaye de suivre.*

A Madame le Docteur Annachiara De Sandre-Giovannoli,

*Vous avez accepté de juger mon travail de thèse sans hésitation. Je vous en suis très reconnaissant. Vos publications sur le syndrome de la Progéria de Hutchinson-Gilford ont été une source d'inspiration passionnante. J'espère pouvoir poursuivre ces travaux et continuer à échanger avec vous.*

A Madame le Professeur Catherine Yardin,

*Je suis très heureux que vous ayez accepté de participer au jury de cette thèse. Votre gentillesse et vos mots de soutien lors des auditions du CNU sont si rassurants pour le timide candidat. Je vous en remercie du fond du cœur.*

A Monsieur le Docteur Jean-Marc Lemaitre,

*Vous m'avez accueilli au sein de votre laboratoire à l'IGF puis à l'IRBM et m'avez permis de rencontrer tant de personnes formidables. Merci pour votre regard expérimenté en recherche fondamentale et votre passion pour les iPS. Puisse cette thèse être le début de notre fructueuse collaboration.*

A Romain,

*Comment oublier toutes les manip' faites à tes côtés, avec leur lot de galères mais surtout de bonnes surprises !.. Heureusement que tu étais là, à chacun des jours de cette thèse, dimanches et jours fériés compris ! Je ne te dirai jamais assez merci. Merci pour tes conseils, merci pour ta patience. Et Dieu sait qu'il en faut pour expliquer et ré-expliquer à un thésard « clinicien », comme tu dis ! J'espère très sincèrement que nous pourrons continuer à travailler ensemble dans cet esprit sympathique et efficace.*

A Fabienne et Lydiane,

*Mes chères voisines de bureau, merci pour vos conseils avisés notamment en matière de culture cellulaire et en activités cynophiles ! Après tous ces efforts, il est temps de partager quelques bulles dans le jacuzzi !*

A toute l'équipe du laboratoire de Jean-Marc,

*A Oll', pour tes discussions passionnées et passionnantes sur les grands sujets scientifiques. A Quentin, pour ton savoir-faire indéniable en immunofluorescence. A Camille, pour ces moments de soutien indispensable entre co-thésards. A Paul et Fanny, pour votre accueil chaleureux et vos conseils toujours aussi pertinents. Aux formidables personnes que j'ai rencontrées pendant ces quelques années : Hélène, Leila, Nelly... Merci à vous tous pour votre gentillesse et ces rares mais bons moments passés ensemble.*

A mes collègues du quotidien, amis cytogénéticiens,

*Anouck et JB, c'est vous qui m'avez tout appris en matière de chromosome !! Je suis tellement fier de vous avoir comme confrères et amis. J'adore nos discussions sur la mécanique chromosomique dans le « bureau du fond » mais aussi nos propos nettement moins sérieux de l'internat ! On mériterait d'être sur la fresque !! Longue vie aux chromosomes !*

A Guilaine,

*Ah, ma chère et tendre Guilaine, il n'est pas si loin le temps de ton arrivée depuis Strasbourg, et pourtant, tu as accompli tant de choses formidables ! J'admire ta ténacité et ton engagement à défendre notre belle profession, ainsi que ton amour des bonnes choses ! « Thésés » le même jour, voici un beau symbole qui nous emmènera loin, je l'espère très sincèrement.*

Aux gens formidables du 1<sup>er</sup> étage d'Arnaud de Villeneuve,

*Mouna, Guillaume, Florian, Paul, Julie, Isabelle... Merci à vous d'être là, dans ce monde un peu « fou, fou, fou, fou où tout le monde est fou » ! Votre bon sens et votre bienveillance sont des repères que j'espère pouvoir garder tout au long de ma carrière. Mes amis molécularistes, je compte sur vous pour construire ensemble la génétique de demain !*

A la jeune génération,

*Carole, Fred, Marion, Kéké, Julie, Mélanie, Camille, Mylène... Vous voir si investis et si impliqués dans nos disciplines est un vrai plaisir quotidien. Vos réflexions et vos initiatives sont réellement très impressionnantes. Je souhaite sincèrement que ce souffle de fraîcheur nous fasse tous réfléchir et évoluer dans nos pratiques professionnelles. A quand la prochaine « escape » ?*

Au personnel du plateau d'histologie RHEM,

*Florence et Yohan, vous m'avez accueilli si gentiment sur votre plateau. Vous avez accompli en un temps record un immense travail d'expertise sur les tératomes. Je ne saurai comment vous remercier pour votre efficacité et votre gentillesse. Merci aussi pour m'avoir montré votre remarquable organisation et vos compétences en Histologie. Vous le savez, je ne suis que débutant dans la discipline mais j'espère beaucoup apprendre, avec mon directeur et à vos côtés.*

A Amélie Sarazin et Julio Matéos Langerak,

*Merci à tous les deux pour votre sympathique accueil sur le plateau d'imagerie à l'IGH et votre expertise en analyse d'image. Là où la difficulté me semblait insurmontable, vous avez su m'aider avec une exceptionnelle efficacité ! J'espère pouvoir continuer à collaborer avec une équipe aussi agréable que la vôtre.*

Aux médecins généticiens de la filière ANDI-Rares,

*L'organisation de cette filière a permis le recrutement des patients inclus dans ce travail. Merci au Pr Pujol (et son bras droit, Carole), au Dr Goldenberg et au Dr Isidor pour leur participation à ce projet ainsi que leur volonté de faire bouger les choses. J'ai également une pensée très émue pour « monsieur MON » dont la conviction et la détermination dans le combat contre la maladie sont un exemple pour nous tous. J'admire son engagement.*

A Rémi,

*A vrai dire, tu n'as pas facile tous les jours... Et pourtant tu es toujours là, à mes côtés ! Merci, merci et encore merci à toi de m'avoir « supporté », dans tous les sens du terme, pendant ces années de labeur. Merci de m'avoir bichonné tous les jours. Merci d'être toi... Bon, on fixe une date ?*

A mes parents, ma famille Champardennaise, ma famille Axonaise,

*Papa, maman, promis, cette fois-ci c'est la dernière thèse ! Je suis si content et fier que vous soyez là en ce jour de fête. Venez me voir plus souvent, le climat est plus doux ici ! Mon grand frère, tu n'as pas d'excuse, je sais bien que tu traverserais la France entière pour une goutte de champagne ! Merci d'être venu en ce jour anniversaire, je pense bien fort à Amélie, Arsène et Marceau. Mary, l'hiver est passé et tu es toujours là... Merci à toi, pour ta patience, pour ton écoute, tu nous es indispensable. Francine & Clément, Marie-Pascale, merci d'être venus en ce jour si important pour moi. Tous mes cousins/cousines et mes petits-cousins/petites-cousines, quelle belle et grande famille nous formons ! Notre papi doit être si fier de nous. Martine et Thierry, c'est tellement gentil à vous d'être venus en ce jour. J'aimerais partager plus de moments avec vous, ainsi qu'avec Claire et Cécile. Merci de m'accueillir toujours à bras ouverts lors de mes trop rares venues à Laon.*

Aux néo-Montpellierains,

*Julie & Xavier (et le petit Pepito), Alice & Nico, Isa & Alain, JB & Christophe, Sophie, Alix & Baptiste... et à tous ceux d'entre nous qui s'auto-proclament la « mémoire vivante » de Montpellier ! Tous issus d'horizons différents, je suis content de faire partie de vos amis. Au fait, on boit un verre où ce soir ?*



# Table des matières

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>Introduction</b>   | <b>13</b> |
| 1.1      | <b> Vieillesse physiologique : la sénescence cellulaire</b>   | <b>14</b> |
| 1.2      | <b> Biologie des télomères</b>  | <b>17</b> |
| 1.3      | <b> Cycle cellulaire : notions fondamentales</b>  | <b>20</b> |
| 1.4      | <b> Les hélicases répliquatives et leurs fonctions physiologiques</b>   | <b>22</b> |
| 1.4.1    | Rôle des hélicases dans la réparation de l'ADN  | 25        |
| 1.4.1.1  | Réparation par excision de base   | 25        |
| 1.4.1.2  | Réparation des cassures double-brin de l'ADN  | 26        |
| 1.4.2    | Rôle des hélicases dans la répliquion de l'ADN  | 28        |
| 1.4.3    | Rôle des hélicases dans le maintien des télomères   | 30        |
| 1.5      | <b> Descriptions cliniques et génétiques des syndromes du vieillissement précoce</b>                              | <b>32</b> |
| 1.5.1    | Syndromes de vieillissement précoce liés aux hélicases  | 32        |
| 1.5.1.1  | Syndrome de Werner  | 32        |
| 1.5.1.2  | Syndrome de Bloom   | 35        |
| 1.5.1.3  | Syndrome de Rothmund-Thomson  | 38        |
| 1.5.2    | Syndrome de la progéria de Hutchinson-Gilford   | 42        |
| 1.5.2.1  | Aspects cliniques   | 42        |
| 1.5.2.2  | Aspects moléculaires  | 43        |
| 1.6      | <b> Les cellules souches pluripotentes humaines</b>   | <b>45</b> |
| 1.6.1    | Les cellules souches embryonnaires humaines   | 45        |
| 1.6.2    | Les cellules souches pluripotentes induites (iPS)   | 46        |
| 1.6.3    | Cellules souches mésenchymateuses   | 49        |
| 1.7      | <b> Instabilité génétique</b>   | <b>50</b> |
| <b>2</b> | <b> Objectifs</b>   | <b>53</b> |
| 2.1      | <b> Génération de modèles d'étude des pathologies du vieillissement précoce</b>                                   | <b>53</b> |
| 2.2      | <b> Récapitulation des pathologies du vieillissement précoce dans un modèle cellulaire</b>                        | <b>53</b> |
| 2.3      | <b> Evolution du modèle des pathologies du vieillissement précoce au travers des différenciations cellulaires</b> | <b>54</b> |
| <b>3</b> | <b> Matériels et Méthodes</b>   | <b>55</b> |
| 3.1      | <b> Recrutement des patients et prélèvements</b>  | <b>55</b> |
| 3.1.1    | Recrutement national et recueil du consentement des patients  | 55        |
| 3.1.2    | Origines et caractéristiques des prélèvements et cellules   | 55        |
| 3.1.3    | Prélèvements biologiques et cultures primaires  | 56        |
| 3.1.4    | Extraction d'acides nucléiques  | 56        |
| 3.2      | <b> Identification génétique des lignées</b>  | <b>56</b> |
| 3.2.1    | Séquençage Sanger des mutations pathologiques   | 56        |
| 3.2.2    | Polymorphisme de répétition des régions micro-satellitaires   | 57        |
| 3.3      | <b> Génération et culture des cellules souches pluripotentes induites (iPS)</b>                                   | <b>57</b> |
| 3.3.1    | Induction de pluripotence   | 57        |
| 3.3.1.1  | Induction sur cellules fibroblastiques  | 58        |
| 3.3.1.2  | Induction sur PBMC  | 58        |

|             |   |           |
|-------------|---|-----------|
| 3.3.2       | Culture des colonies iPS .....  | 58        |
| <b>3.4</b>  | <b>Caractérisation de la pluripotence .....</b>   | <b>59</b> |
| 3.4.1       | Détection de l'activité phosphatase alcaline.....   | 59        |
| 3.4.2       | Marqueurs de surface et marqueurs nucléaires.....   | 59        |
| 3.4.2.1     | Immunofluorescence .....  | 59        |
| 3.4.2.2     | Cytométrie en flux.....   | 60        |
| 3.4.3       | Tératomes sur souris.....   | 60        |
| <b>3.5</b>  | <b>Transcriptome .....</b>  | <b>61</b> |
| <b>3.6</b>  | <b>Etude du cycle cellulaire.....</b>   | <b>61</b> |
| <b>3.7</b>  | <b>Etude de la stabilité génomique .....</b>  | <b>62</b> |
| 3.7.1       | Caryotype .....   | 62        |
| 3.7.2       | FISH .....  | 63        |
| 3.7.3       | Analyse Chromosomique par Puce à ADN (ACPA).....  | 63        |
| <b>3.8</b>  | <b>Phénotypes cellulaires spécifiques des pathologies du vieillissement précoce.....</b>                  | <b>65</b> |
| 3.8.1       | Etude des télomères par Q-FISH.....   | 65        |
| 3.8.2       | Echange entre chromatides sœurs .....   | 65        |
| 3.8.3       | Perméabilité membranaire des mitochondries.....   | 66        |
| <b>3.9</b>  | <b>Dérivation des cellules iPS en cellules souches mésenchymateuses .....</b>                             | <b>67</b> |
| <b>3.10</b> | <b>Caractérisation des cellules MSC .....</b>   | <b>67</b> |
| 3.10.1      | Etude des marqueurs de surface .....  | 67        |
| 3.10.2      | Etude de la différenciation terminale des cellules souches mésenchymateuses.....                          | 68        |
| <b>3.11</b> | <b>Activité <math>\beta</math>-galactosidase associée à la sénescence.....</b>                            | <b>70</b> |
| <b>3.12</b> | <b>Outils statistiques .....</b>  | <b>70</b> |
| <b>4</b>    | <b>Résultats .....</b>  | <b>71</b> |
| <b>4.1</b>  | <b>Génération des cellules iPS .....</b>  | <b>71</b> |
| 4.1.1       | Morphologies des colonies iPS et dépistage de l'activité phosphatase alcaline.....                        | 71        |
| 4.1.2       | Marqueurs de surface et nucléaires associés à la pluripotence.....  | 72        |
| 4.1.3       | Profil d'expression des gènes de pluripotence .....   | 73        |
| 4.1.4       | Formation de tératomes humains chez la souris.....  | 76        |
| <b>4.2</b>  | <b>Identification des mutations causales par séquençage.....</b>  | <b>78</b> |
| <b>4.3</b>  | <b>Identification du profil génétique des lignées étudiées. ....</b>                                      | <b>81</b> |
| <b>4.4</b>  | <b>Expression des hélicases dans les cellules iPS.....</b>  | <b>82</b> |
| <b>4.5</b>  | <b>Expression de la lamine A dans les cellules iPS.....</b>   | <b>83</b> |
| <b>4.6</b>  | <b>Etude du cycle cellulaire des cellules iPS .....</b>   | <b>84</b> |
| <b>4.7</b>  | <b>Estimation de la longueur des télomères des cellules iPS.....</b>                                      | <b>85</b> |
| <b>4.8</b>  | <b>Etude des échanges entre chromatides sœurs.....</b>  | <b>86</b> |
| <b>4.9</b>  | <b>Etude de la fonction de membranaire des mitochondries .....</b>  | <b>88</b> |
| <b>4.10</b> | <b>Induction des cellules iPS en cellules souches mésenchymateuses.....</b>                               | <b>89</b> |
| 4.10.1      | Morphologie des cellules induites .....   | 89        |
| 4.10.2      | Marqueurs de surface .....  | 89        |
| 4.10.3      | Dépistage de la sénescence dans les cellules MSC .....  | 90        |
| <b>4.11</b> | <b>Différenciation terminale des MSC dans les voies adipogénique, ostéogénique et chondrogénique.....</b> | <b>91</b> |
| <b>4.12</b> | <b>Etude de la stabilité génomique des lignées en culture.....</b>  | <b>93</b> |
| 4.12.1      | Stabilité génomique des cellules natives .....  | 93        |
| 4.12.2      | Stabilité génomique des cellules iPS.....   | 96        |
| 4.12.3      | Stabilité génomique des cellules MSC.....   | 99        |

|           |   |            |
|-----------|---|------------|
| <b>5</b>  | <b>Discussion.....</b>  | <b>101</b> |
| 5.1       | L'induction de pluripotence par le vecteur virus Sendai est efficace.....           | 101        |
| 5.2       | Le modèle Werner généré se distingue des autres modèles existants.....              | 102        |
| 5.3       | Le syndrome de Bloom est caractérisé par son instabilité .....                      | 103        |
| 5.4       | La fonction mitochondriale des pathologies du vieillissement précoce serait altérée | 105        |
| 5.5       | Sénescence et cycle cellulaire .....  | 105        |
| 5.6       | Qu'en est-il des hélicases RECQL1 et RECQL5 ?.....                                  | 106        |
| <b>6</b>  | <b>Conclusion et perspectives.....</b>  | <b>108</b> |
| <b>7</b>  | <b>Références bibliographiques .....</b>  | <b>110</b> |
| <b>8</b>  | <b>Figures et Tables.....</b>   | <b>120</b> |
| <b>9</b>  | <b>Annexes .....</b>  | <b>123</b> |
| <b>10</b> | <b>Publications.....</b>  | <b>168</b> |

## Listes des abréviations

|                    |  |
|--------------------|--|
| ACLF               | Association des Cytogénéticiens de Langue Française                        |
| ACPA               | Analyse Chromosomique par Puce à ADN                                       |
| AOI JC             | Appel d'Offre Interne « Jeune Chercheur »                                  |
| ATM                | <i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>                                       |
| BLM                | Bloom  |
| BrdU               | BromodésoxyUridine   |
| CCCP               | Carbonyl Cyanide 3-ChloroPhenylhydrazone                                   |
| CD                 | Cluster de différenciation   |
| CDK                | Kinases Cycline-Dépendante   |
| CNV                | <i>Copy Number Variation</i> (variation du nombre de copie)                |
| EFS                | Etablissement Français du Sang   |
| ExAC               | <i>Exome Aggregation Consortium</i>  |
| FGF                | <i>Fibroblast Growth Factor</i>  |
| FISH               | Hybridation Fluorescente <i>In Situ</i>                                    |
| FITC               | IsoThioCyanate de Fluorescéine   |
| HES                | Hémalun Eosine Safran  |
| hESC               | <i>human Embryonic Stemcell</i> (cellule embryonnaire humaine)             |
| HGPS               | Progéria de Hutchinson-Gilford   |
| HR                 | Recombinaison Homologue  |
| IGH                | Institut de Génétique Humaine  |
| iPS                | <i>induced Pluripotent Stem cell</i> (cellule souche pluripotente induite) |
| IRBM               | Institut de Biothérapie et de Médecine Régénérative                        |
| IRCM               | Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier                       |
| kb                 | kilobase   |
| log <sub>2</sub> R | Logarithme à base 2 du rapport de fluorescence « patient » sur « témoin »  |
| Mb                 | Mégabase   |
| miRNA              | Micro-ARN  |
| MMEJ               | Jonction des Extrémités médiée par Micro-Homologie                         |
| MOI                | <i>Multiple Of Infection</i>   |
| MRI                | Montpellier Ressources Imagerie  |
| MSC                | <i>Mesenchymal Stem Cell</i> (cellules souches mésenchymateuses)           |

|                  |   |
|------------------|---|
| NHEJ             | Jonction des Extrémités Non Homologues                                    |
| NLS              | Signal de Localisation Nucléaire  |
| NMD              | <i>Nonsense-Mediated Decay</i> (dégradation des ARNm non-sens)            |
| OKSM             | Ensemble des 4 facteurs de transcription Oct4, Sox2, Klf4 and c-Myc       |
| PAS              | <i>Periodic Acid Schiff</i>   |
| PBMC             | <i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i> (cellules mononuclées du sang)   |
| PBS              | <i>Phosphate Buffered Saline</i> (tampon phosphate salin)                 |
| PCR              | <i>Polymerase Chain Reaction</i>  |
| PNA              | <i>Peptide Nucleic Acid</i> (acide nucléique peptidique)                  |
| Q-FISH           | FISH Quantitative   |
| Rb               | protéine du Rétinoblastome  |
| RecQ             | Hélicase réplivative (Procaryotes)  |
| RecQL            | Hélicase réplivative (Mammifères)   |
| RHEM             | Réseau d'Histologie Expérimentale de Montpellier                          |
| RT               | Rothmund-Thomson  |
| SAHF             | Foyers de Chromatine Associés à la Sénescence                             |
| SASP             | Phénotype Sécrétoire Associé à la Sénescence                              |
| SA- $\beta$ -Gal | $\beta$ -Galactosidase Associée à la Sénescence                           |
| SCARS            | Segments d'ADN avec Altérations de la Chromatine Renforçant la Sénescence |
| SDSA             | <i>Synthesis-Dependent Strand Annealing</i> (Appariement)                 |
| shRNA            | <i>short hairpin RNA</i> (ARN en épingle à cheveux)                       |
| TIF              | Foyers Induits par les dysfonctionnements Télomériques                    |
| UV               | Ultra-Violet  |
| WRN              | Werner  |

# 1 Introduction

Les syndromes du vieillissement précoce représentent un groupe de pathologies humaines dans lesquelles les tissus et les organes des patients présentent des signes de vieillissement d'apparition plus rapide que ceux observés dans la population générale. Les exemples les plus connus sont le syndrome de Werner (WRN) et la progéria de Hutchinson-Gilford (HFPS), communément appelés progéria de l'adulte et progéria de l'enfant respectivement.

Le syndrome de Werner est associé à deux autres syndromes, celui de Bloom (BLM) et de Rothmund-Thomson (RT), pour former le groupe des pathologies du vieillissement précoce liées aux hélicases répliquatives. Le rôle précis des hélicases dans ces syndromes n'est pas entièrement connu et établir un modèle cellulaire de ces pathologies permettrait certainement de mieux les explorer.

La comparaison du vieillissement pathologique avec le vieillissement physiologique *in vitro* pourrait mettre en évidence des points communs sur les plans moléculaires et cellulaires. Une modélisation cellulaire du processus de vieillissement permettrait certainement de mieux comprendre ces pathologies, de mettre en évidence des marqueurs épigénétiques et de tester des stratégies moléculaires anti-vieillessements. L'une des stratégies biologiques les plus adaptées pour ces pathologies consiste à utiliser les cellules souches pluripotentes induites (iPS). En effet, la modélisation par les iPS présente l'avantage d'un auto-renouvellement quasiment infini et d'un potentiel de différenciation dans les cellules spécialisées d'intérêt.

Dans cette introduction, il est fait rappel des notions biologiques liées au vieillissement cellulaire : sénescence à l'échelle de la cellule, cycle cellulaire et rôles des télomères. Puis les fonctions des hélicases répliquatives ainsi que les descriptions cliniques et physiopathologiques des syndromes évoqués sont détaillées. Enfin, les possibilités de modélisation par utilisation de cellules souches sont évoquées.

## 1.1 Vieillesse physiologique : la sénescence cellulaire.

La sénescence cellulaire est un mécanisme indispensable de protection de l'organisme contre le potentiel de prolifération incontrôlé des cellules pouvant entraîner le cancer. Le processus de sénescence favorise également la réparation tissulaire et des phénomènes d'inflammation qui sont les supports du développement tumoral. Globalement, la cellule sénescence participe à quatre processus biologiques complexes qui peuvent pourtant paraître contradictoires : la suppression de tumeur, la croissance tumorale, le vieillissement et la réparation tissulaire.

La sénescence cellulaire a été décrite par Hayflick et Moorhead en 1965<sup>1</sup> comme étant un processus limitant la croissance cellulaire *in vitro* (Figure 1A d'après Shay JW *et al.*<sup>2</sup>). Il décrit ainsi que seules les cellules cancéreuses sont capables de s'affranchir de cette limite biologique et que cette observation correspond certainement à un mécanisme du vieillissement *in vivo*.

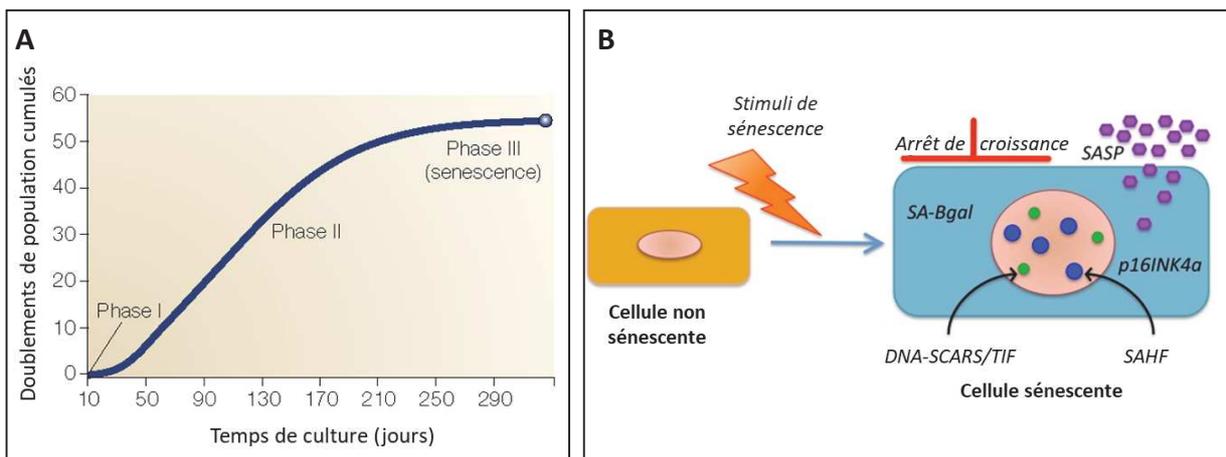


Figure 1 - Notion de sénescence cellulaire.

A. La limite de Hayflick. Culture cellulaire habituellement décomposée en 3 phases :

Phase I : culture primaire

Phase II : croissance cellulaire exponentielle

Phase III : maintien du métabolisme malgré une prolifération diminuée

B. Les marques de la sénescence.

1. Arrêt irréversible de la pousse cellulaire
2. Taille de la cellule augmentée
3. Activité SA-β-galactosidase
4. Expression de p16INK4a et foyers nucléaires de type SAHF
5. Foyers nucléaires de type SCARS et TIF
6. SASP = Phénotype Sécrétoire Associé à la Sénescence

Les cellules sénescents sont distinguées des cellules quiescentes et des cellules qui ont atteint leur différenciation terminale. Il n'existe pas de trait spécifique à la sénescence mais un ensemble de marqueurs caractéristiques, qui pris ensemble caractérisent cet état cellulaire (Figure 1B d'après Rodier F *et al.*<sup>3</sup>). On peut le décomposer ainsi :

1. La sénescence correspond à un arrêt de croissance cellulaire permanent et non réversible par des stimuli physiologiques associé à l'apparition d'une résistance à l'apoptose.
2. Les cellules sénescents augmentent de taille, souvent plus de deux fois la taille des mêmes cellules non sénescents, avec un étalement caractéristique en culture.
3. Elles expriment une  $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence (SA- $\beta$ -gal) en milieu acide reflétant une augmentation des lysosomes.
4. La plupart d'entre elles expriment p16INK4a qui n'est pas retrouvée dans les cellules quiescentes ou ayant atteint leur différenciation terminale. Cet inhibiteur des kinases cycline-dépendantes active la protéine pRB et provoque la formation de foyers de chromatine associés à la sénescence (SAHF). Ces foyers correspondent à l'extinction de gènes de la prolifération cellulaire.
5. Les cellules sénescents présentent souvent des lésions de l'ADN non réparées entraînant la formation de foyers nucléaires particuliers appelés SCARS (segments d'ADN avec altérations de la chromatine renforçant la sénescence). Ces foyers peuvent également se former au niveau des télomères ; on parle alors de TIF (foyers induits par les dysfonctionnements télomériques).
6. Ces cellules sénescents avec accumulation de lésions de l'ADN sécrètent un mélange particulier de signaux moléculaires : facteurs de croissance, protéases, cytokines et autres protéines à activité autocrine et paracrine. On parle de phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP).

Les facteurs déclenchant la sénescence sont multiples. Le premier facteur identifié est une réduction ultime de la taille des télomères qui, lorsqu'ils atteignent une taille minimum critique, provoque l'arrêt du cycle cellulaire (Cf. paragraphe 1.2 Biologie des télomères). Egalement, l'accumulation de lésions de l'ADN mène aussi à l'arrêt de croissance cellulaire : les cassures double-brin de l'ADN sont notamment de puissants inducteurs de la sénescence, ainsi que le stress oxydant<sup>4</sup>. Enfin, l'activation de certains oncogène a été décrit comme facteur de sénescence<sup>5</sup>.

De plus, l'état de compaction de la chromatine joue un rôle important dans l'induction de la sénescence : par exemple, les inhibiteurs d'histone désacétylase peuvent provoquer une décondensation excessive de la chromatine activant ATM et p53 et induire la sénescence<sup>6</sup>. D'autres signaux mitogènes peuvent déclencher l'entrée en sénescence comme l'activité de certains oncogènes ou la surexpression de gènes de la prolifération cellulaire. Ces signaux

mitogènes peuvent créer des lésions persistantes de l'ADN créant un « stress répliatif » conduisant à des défauts de répliation.

Aussi, un stress lié à la culture peut provoquer la sénescence sans diminution de la taille des télomères. Ce stress est peut-être dû à un support de culture inapproprié comme le plastique des boîtes de culture, un milieu de culture non adéquat ou encore au stress oxydatif<sup>7</sup>.

Le rôle central de p53 dans le contrôle du cycle cellulaire et donc dans le contrôle de la sénescence doit être évoqué. Cette protéine capable de ralentir ou de stopper le cycle cellulaire, considérée comme le « gardien du génome », est essentielle dans l'activité suppresseur de tumeur de cellules. L'augmentation d'activité de p53 est liée l'apparition de la sénescence : il a été montré que des souris surexprimant p53 sont exemptes de cancer mais présentent rapidement un phénotype progéroïde, laissant apparaître précocement de l'ostéoporose, une hypofertilité, une sarcopénie, une finesse de peau, une perte des graisses sous-cutanées et une diminution de l'espérance de vie<sup>8</sup>. La protéine p53 est également capable d'activer l'expression des gènes à action antioxydante, réduisant ainsi le stress oxydant et contribuant à un maintien de la stabilité du génome<sup>9</sup>.

Des anomalies de la lamine A, impliquées dans la progéria de Hutchinson-Gilford, sont responsables de l'entrée en sénescence, sans toutefois montrer une sensibilité accrue aux cancers. Les cellules exprimant cette forme altérée de la lamine A, appelée progérine, montrent plus de lésions persistantes de l'ADN, une activation chronique de p53 et une sénescence cellulaire<sup>10</sup>.

D'autres acteurs comme Pten, les CDKi et p63 entrent en jeu dans l'induction de la sénescence<sup>11</sup>. Enfin, l'hormone Klotho est un sujet d'étude des agents antiviellissement. Cette hormone stimule la sécrétion des hormones parathyroïdes, favorise la voie du FGF (pro-mitotique) et s'oppose à la voie WNT (maintien de l'état indifférencié). Ainsi les souris sans activité Klotho présentent également une sénescence prématurée<sup>12</sup>.

## 1.2 Biologie des télomères

Chez les Mammifères, l'extrémité des chromosomes, appelée télomère, contient une séquence de 6 nucléotides répétées en tandem. Dans les cellules somatiques de l'Homme, on retrouve entre 600 et 2000 répétitions du motif 5'-TTAGGG-3' représentant une taille de 4 à 12 kilobases par télomère.

Pour la plupart des régions du génome, l'apparition d'une cassure double-brin est réparée principalement par les voies NHEJ (*Non Homologous End Joining*) et HR (*Homologous Recombination*). Dans les régions télomériques, ces voies de réparation sont délétères et provoqueraient des recombinaisons chromosomiques ou des fusions de ces séquences répétées. Des mécanismes de protection spécifiques des télomères sont donc indispensables : (Figure 2A, d'après Lange T. et al. 2006 <sup>13</sup>)

- Un complexe protéique appelé le télosome fixé spécifiquement sur le télomère, comprenant notamment TRF2 et POT1, est capable d'inhiber les voies habituelles de réparation de l'ADN.
- La partie distale des télomères est une séquence simple-brin de 100 à 200 nucléotides qui est capable d'envahir une région double-brin plus proximale du même télomère. Cette insertion s'appelle boucle-D. Le repliement obtenu du télomère sur lui-même forme une structure particulière, appelée boucle-T. La formation des boucles-D et des boucle-T empêche ainsi le recrutement des protéines de reconnaissance des cassures de l'ADN.

Lors de la phase de réplication de l'ADN, les régions télomériques souffrent d'une réplication incomplète. En effet, le brin retardé de la fourche de réplication ne peut pas être synthétisé jusqu'à l'extrémité de la séquence (Figure 2B, d'après *Becker's World of the Cell* 2015 <sup>14</sup>).

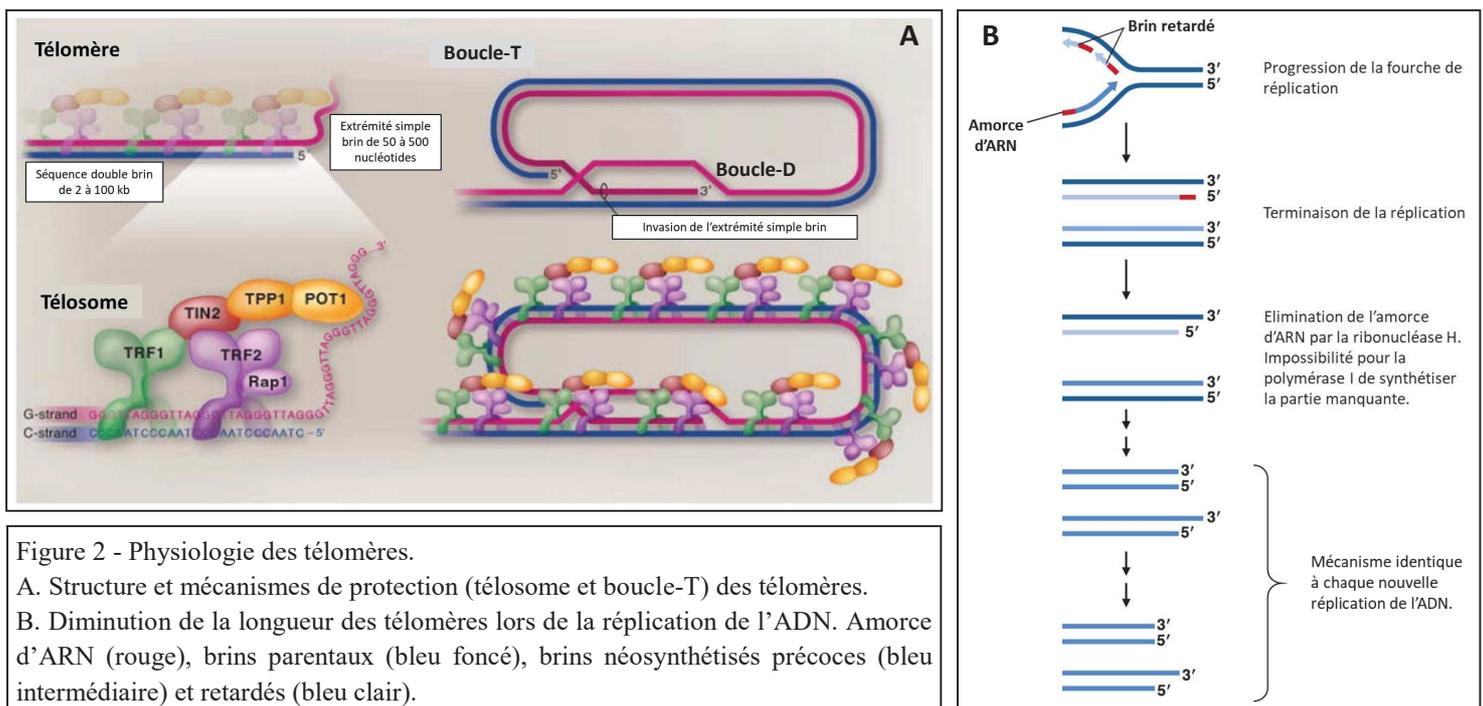


Figure 2 - Physiologie des télomères.

A. Structure et mécanismes de protection (télosome et boucle-T) des télomères.

B. Diminution de la longueur des télomères lors de la réplication de l'ADN. Amorce d'ARN (rouge), brins parentaux (bleu foncé), brins néosynthétisés précoces (bleu intermédiaire) et retardés (bleu clair).

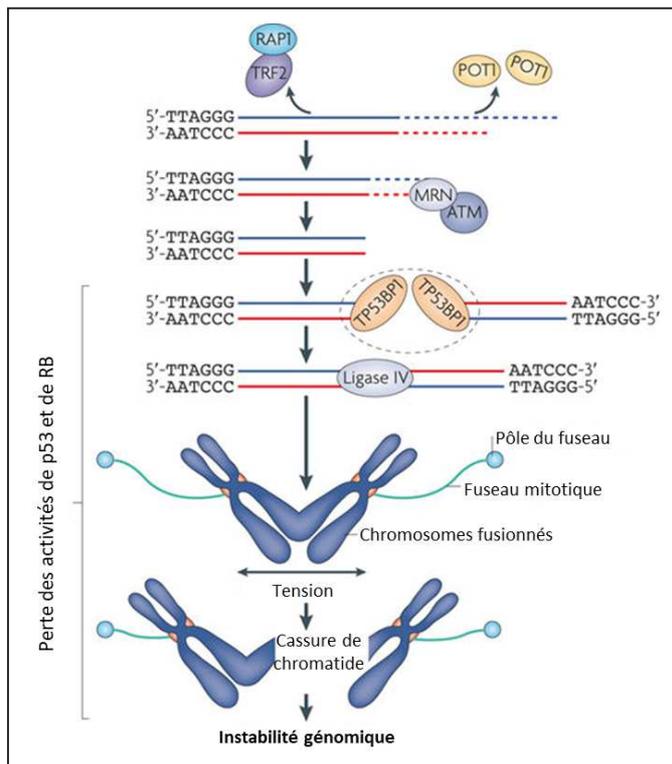


Figure 3 - Le raccourcissement des télomères participe à l'instabilité génomique.

Absence de protection des télomères par POT1 et TRF2. Reconnaissance par le complexe MRN et ATM favorisant le recrutement de TP53BP1 et un mécanisme de réparation de l'ADN de type NHEJ par action de la ligase IV. Fusion covalente de deux extrémités de chromosomes.

Absence d'activité de p53 et RB (effecteur des points de contrôle du cycle cellulaire) et poursuite du cycle.

Cassure aléatoire des chromatides fusionnées due aux tractions des fuseaux mitotiques. Formation d'anomalies déséquilibrées de la structure des chromosomes entraînant l'instabilité génomique.

Ainsi, au fil des divisions, la longueur des télomères diminue <sup>15</sup>. Une diminution extrême des télomères entraînerait des fusions bout à bout des chromosomes participant à l'instabilité génomique de la cellule et, finalement, à la mort cellulaire <sup>16</sup> (Figure 3, d'après O'Sullivan *et al.* <sup>17</sup>).

Dans les cellules somatiques, les télomères diminuent en taille jusqu'à atteindre une taille critique responsable de l'arrêt de la réplication. On parle alors de sénescence répliative. Il s'agit d'un arrêt du cycle dans des cellules restant métaboliquement actives, le plus souvent en phase G1. Cette sénescence programmée est un des moyens pour l'organisme de contrôler la prolifération des cellules et peut être considérée comme un mécanisme suppresseur de tumeur <sup>18</sup>.

Au contraire, les cellules cancéreuses doivent maintenir une taille suffisante des télomères pour assurer leur prolifération. Le plus souvent, cela est possible par la réactivation de la télomérase. Cette enzyme physiologiquement retrouvée dans les cellules souches et les cellules de la lignée germinale, est capable d'ajouter le motif hexanucléotidique à l'extrémité du télomère. Enfin, d'autres processus de maintien des télomères ont été identifiés utilisant des mécanismes de réplication de l'ADN médiée par des recombinaisons homologues <sup>19</sup>.

Enfin, les séquences télomériques étant riches en dinucléotides GC, elles peuvent être soumises à la formation de G-quadruplex. Ces structures secondaires des acides nucléiques sont impliquées dans la réplication et la transcription de l'ADN et dans la traduction des ARN messagers. Au niveau des télomères, on trouve également des structures G-quadruplex qui jouent le rôle de stabilisateur de la longueur télomérique (Figure 4 - d'après Rhodes D. *et*

al. <sup>20</sup>) empêchant une dégradation trop rapide par les nucléases et une synthèse excessive par la télomérase.

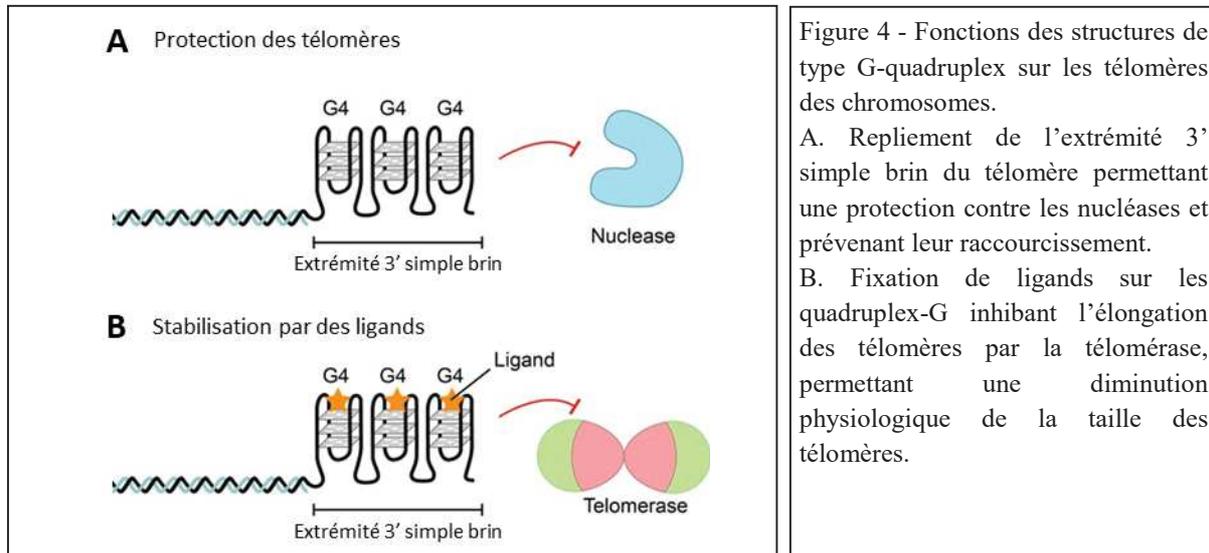


Figure 4 - Fonctions des structures de type G-quadruplex sur les télomères des chromosomes.

A. Repliement de l'extrémité 3' simple brin du télomère permettant une protection contre les nucléases et prévenant leur raccourcissement.

B. Fixation de ligands sur les quadruplex-G inhibant l'élongation des télomères par la télomérase, permettant une diminution physiologique de la taille des télomères.

### 1.3 Cycle cellulaire : notions fondamentales.

La croissance et le maintien d'un tissu nécessitent de multiples divisions cellulaires appelées mitoses. Ces divisions sont séparées par un temps sans modification morphologique apparente de la chromatine, appelée interphase. En réalité, l'interphase représente la période de vie de la cellule pendant laquelle elle peut assurer ses fonctions et préparer la prochaine division. Cette interphase est classiquement décomposée en 3 phases :

- Phase G1 : pendant cette phase, la cellule effectue son métabolisme normal et synthétise les protéines nécessaires à ses fonctions. Une étape de vérification appelée « point de contrôle » permet d'identifier les erreurs présentes sur le génome, ainsi que les structures anormales.
- Phase S : cette étape dure 4 heures en moyenne et permet de répliquer entièrement l'ADN du génome, selon le principe de la répllication semi-conservative. Physiquement, la phase S revient à dédoubler les chromosomes en deux molécules qui formeront les chromatides visibles pendant la mitose. Parallèlement à cette répllication, les centrioles présents dans le cytoplasme sont également répliqués. Ils participeront aux futurs pôles apicaux nécessaires à la polarité de la mitose.
- Phase G2 : il s'agit d'une phase de préparation à la division cellulaire qui va suivre. Là aussi, nombre de points de contrôle permettent d'assurer une entrée en mitose sécurisée.

Une quatrième phase, appelée G0, caractérise les cellules quiescentes aussi appelées « post-mitotiques ». Il s'agit de cellules le plus souvent totalement différenciées. Cet état concerne également les cellules sénescents.

C'est donc l'alternance d'interphase et de mitose qui délimite la durée de vie d'une cellule à l'échelle individuelle et qui est appelée cycle cellulaire. Chez l'humain, la durée du cycle est très variable d'un type cellulaire à un autre. Contrôler la durée du cycle cellulaire permet donc de contrôler la croissance cellulaire.

La progression à travers le cycle cellulaire nécessite l'activation de complexes enzymatiques comprenant des protéines kinases cycline-dépendante (CDK) et des sous-unités régulatrices des cyclines. Au décours des différentes phases du cycle cellulaire, des CDK spécifiques sont activées successivement grâce à une alternance de synthèse et de dégradation de leur cycline partenaire. L'activité des complexes CDK/cyclines est également régulée par des cycles de phosphorylation et de déphosphorylation et par la présence d'inhibiteurs : CKI, Cip/Kip et Ink4. Différents stimuli mitogènes et anti-mitogènes modifient la concentration de ces inhibiteurs. De plus, d'autres protéines régulatrices, comme p53, modulent l'expression des CKI pour assurer une évolution progressive de la cellule dans son cycle, garantissant ainsi que les prérequis nécessaires à l'étape suivante soient bien atteints. <sup>21,22</sup>

Egalement, la protéine Rb joue un rôle essentiel dans le cycle cellulaire (Figure 5 d'après Coller *et al.*<sup>22</sup>). Sous sa forme hypophosphorylée, Rb bloque le cycle en phase G1 en séquestrant le facteur de transcription E2F. Ainsi, dans les cellules quiescentes, le défaut

d'activité de CDK/cycline provoque l'accumulation de la protéine Rb hypophosphorylée. Au contraire, dans les cellules en prolifération, l'activation de CDK/cycline concentre la forme hyperphosphorylée de Rb à la fin de la phase G1, provoquant la libération d'E2F et la transactivation de divers gènes cibles nécessaires à la progression du cycle cellulaire.<sup>22</sup>

L'intégrité de l'ADN et donc de l'information génétique peuvent être affectées par nombres de mécanismes d'origine intracellulaire (stress répliatif) et extracellulaire (rayonnements ionisants, mutagènes, infections virales...) entraînant des mutations et des cassures simple-brin et double-brin. Bien qu'il existe une certaine tolérance de la cellule pour ces anomalies<sup>23</sup>, l'accumulation de mutations et d'aberrations chromosomiques peut perturber les fonctions vitales de la cellule et conduire à la sénescence ou à l'apoptose. De plus, les cellules en prolifération, les cellules souches et les cellules germinales doivent maintenir leur intégrité génomique afin de prévenir la transmission des anomalies aux cellules filles, ce qui pourrait engendrer l'apparition d'un cancer ou de maladie génétique chez la descendance. Pour corriger les dommages à l'ADN, les cellules des Mammifères ont développé plusieurs mécanismes de réparation dans lesquelles les hélicases répliatives ont un rôle majeur (Cf. chapitre 1.4.1 « Rôle des hélicases dans la réparation de l'ADN »). Les anomalies génétiques les plus difficiles à corriger sont les cassures chromosomiques. Pour éviter de transmettre ces anomalies à la chromatide sœur, la cellule peut initier des pauses lors du cycle cellulaire, appelées points de contrôle. Ces points de contrôle peuvent être déclenchés par d'autres agressions que subit la cellule, le stress oxydatif ou une activité oncogénique<sup>24</sup>. Les points de contrôle empêchent la transition vers la phase suivante du cycle cellulaire en inhibant le complexe CDK/cycline correspondant.

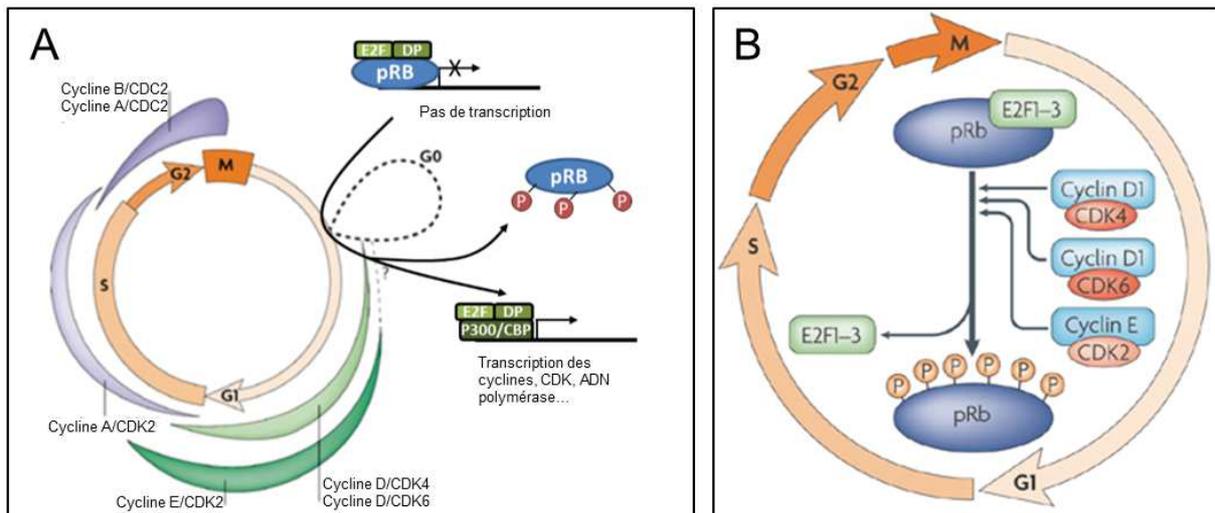


Figure 5 - Aspects fondamentaux du contrôle du cycle cellulaire

A. Cycle cellulaire et ses différentes phases. Phase G0 représentée en dehors du cycle normal (forme pointillée) avec présence de la protéine Rb hypophosphorylée empêchant l'expression des cyclines. Phases G1, S, G2 et mitose avec les complexes CDK/cycline correspondants.

B. Rôle de la protéine Rb dans la régulation du cycle cellulaire : entrée en phase S caractérisée par la phosphorylation de Rb par les complexes CDK/cycline et la libération du facteur de transcription E2F activant l'expression de gènes indispensables à la progression du cycle cellulaire

## 1.4 Les hélicases réplcatives et leurs fonctions physiologiques

On entend par hélicases des enzymes capables de dérouler les hélices d'ADN et d'ARN, participant ainsi à la séparation de l'ADN double-brin. Il s'agit d'enzymes ubiquitaires jouant un rôle indispensable dans le métabolisme de l'ADN. On retrouve une activité hélicase lors des phases physiologiques de réplication et de transcription de l'ADN mais également lors de la réparation de celui-ci et des recombinaisons du génome. Il existerait jusqu'à 95 gènes dans le génome humain codant une protéine à activité hélicase, classés en super-familles et familles<sup>25</sup>. Parmi celles-ci, un groupe se distingue par une intervention majeure lors de la réplication et le maintien des télomères : les RecQ hélicases. Chez les Mammifères, 5 gènes RecQL hélicases sont décrits : *RECQL1*, *BLM*, *WRN*, *RECQL4* et *RECQL5*.

A ce jour et pour 3 d'entre elles, des mutations ont été identifiées comme responsables de syndromes cliniquement identifiables : *WRN* pour le syndrome de Werner, *BLM* pour le syndrome de Bloom et *RECQL4* pour le syndrome de Rothmund-Thomson. Chacun de ces 3 syndromes associe un vieillissement pathologique accéléré à un risque accru de développement de cancer, notamment par une augmentation de l'instabilité génomique. Ainsi, les hélicases RecQL jouent un rôle critique dans le maintien de l'intégrité de l'information génétique et sont couramment appelées les « gardiennes du génome ».<sup>26,27</sup>

La plupart des protéines à activité hélicase nécessitent l'apport d'énergie par hydrolyse de l'ATP. Cette énergie leur permet de dérouler l'ADN double-brin mais également de résoudre

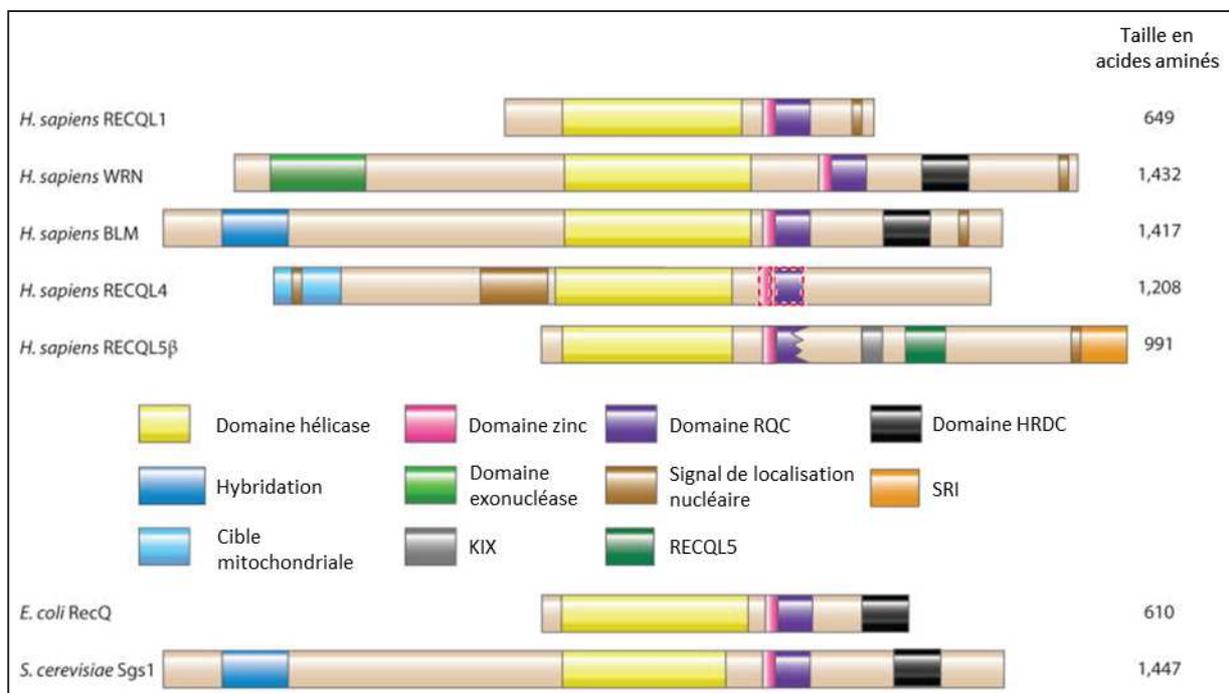


Figure 6 - Structures fonctionnelles des hélicases RecQL (Mammifères) et RecQ (procaryotes).

Partie supérieure : illustration des 5 hélicases RecQL humaines.

Partie inférieure : hélicase RecQ chez *Escherichia coli* et *Saccharomyces cerevisiae*.

Domaines protéiques fonctionnels homologues représentés par des rectangles de même couleur.

Pointillés rouges : domaines fonctionnels supputés pour RECQL4.

Tailles des protéines à droite, exprimées en nombre d'acides aminés.

D'après Croteau D. *et al.*<sup>26</sup>

les structures secondaires complexes et de rompre certaines interactions protéine-ADN. Les hélicases RecQ ont la particularité de se lier à l'ADN simple-brin et d'évoluer dans le sens 3'-5' permettant, par exemple, l'avancée des fourches de réplication et la résolution des jonctions de Holliday.

Les hélicases RecQ présentent 3 domaines protéiques (Figure 6) hautement conservés à travers les espèces :

- Le domaine principal (*core domain*) à activité hélicase, composé de deux sites HD1 et HD2 : c'est la partie effectrice de la protéine, capable de dérouler de nombreux types d'hélices d'ADN. Ce domaine fonctionnel est le plus conservé entre les protéines à activité hélicase humaine et non humaine.
- Le domaine RecQ C-terminal (RQC) : cet effecteur stabilise la liaison à l'ADN et permet également la reconnaissance des structures de type G-quadruplex<sup>28</sup>. Concernant les hélicases RecQL humaines, ce domaine n'est retrouvé que pour les protéines WRN et BLM.
- Le domaine C-terminal hélicase et RNase pseudo-D (DRHC) également identifié exclusivement sur WRN et BLM parmi les hélicases humaines. Ce domaine joue un rôle dans le recrutement des hélicases dans la réparation des lésions de l'ADN, notamment par la reconnaissance spécifique des cassures simple-brin.

Ainsi, se dégagent de la littérature certaines spécificités (Figure 7 d'après Croteau D. *et al.*<sup>26</sup>) de chacune des hélicases RecQL humaines :

- RECQL1 : Plusieurs études montrent que l'inactivation de cette enzyme engendre de l'instabilité génomique, des aberrations mitotiques et l'arrêt de la croissance cellulaire. RECQL1 aurait un rôle restreint lors de l'induction de la réplication et lors du redémarrage de la fourche de réplication après un stress répliatif<sup>29</sup>. Également cette hélicase interagit avec les télomères et participerait à leur maintien<sup>30</sup>. Pourtant, aucune pathologie humaine n'a été associée à des mutations du gène *RECQL1*.
- WRN : Majoritairement retrouvée dans le nucléole, la protéine WRN migre dans tout le noyau lorsqu'une lésion de l'ADN se produit et lors de la phase S du cycle cellulaire. Ces observations renforcent le rôle de WRN dans la réparation et la réplication de l'ADN. De plus, WRN est la seule des hélicases RecQL à posséder une activité exonucléase dans le sens 3'-5'. Il est probable que cette activité exonucléasique lui confère une fonction de réédition de l'ADN après réparation par les ADN polymérases.
- BLM : Cette hélicase est particulièrement exprimée lors des phases S et G2 du cycle cellulaire et elle est rapidement mobilisée en cas de lésions de l'ADN. L'altération de BLM chez l'homme provoque un phénotype particulier avec une fréquence très élevée de recombinaisons chromosomiques.
- RECQL4 : Elle est la seule des hélicases répliatives à être retrouvée dans les mitochondries. Ce gène a également la particularité d'être impliqué dans 3 syndromes

cliniques différents (Cf. chapitre 1.5.1.3 Syndrome de Rothmund-Thomson). Il semble que les mutations faux-sens affectant la structure globale de la protéine soient associées au syndrome de Rothmund-Thomson, alors que les mutations du domaine hélicase seraient associées au syndrome RAPADILINO <sup>31</sup>. Comme WRN et BLM, RECQL4 joue un rôle dans le maintien des télomères.

- RECQL5 : De répartition strictement nucléaire, cette hélicase est exprimée en permanence, quelle que soit la phase du cycle cellulaire et le type cellulaire. RECQL5 est capable de se fixer à l'ARN polymérase II et d'inhiber l'initiation et l'élongation de la transcription. Les modèles d'étude où RECQL5 est inactivée montrent qu'elle n'est pas indispensable au développement embryonnaire mais qu'elle joue un rôle suppresseur de tumeur important à l'instar des autres hélicases <sup>32</sup>.

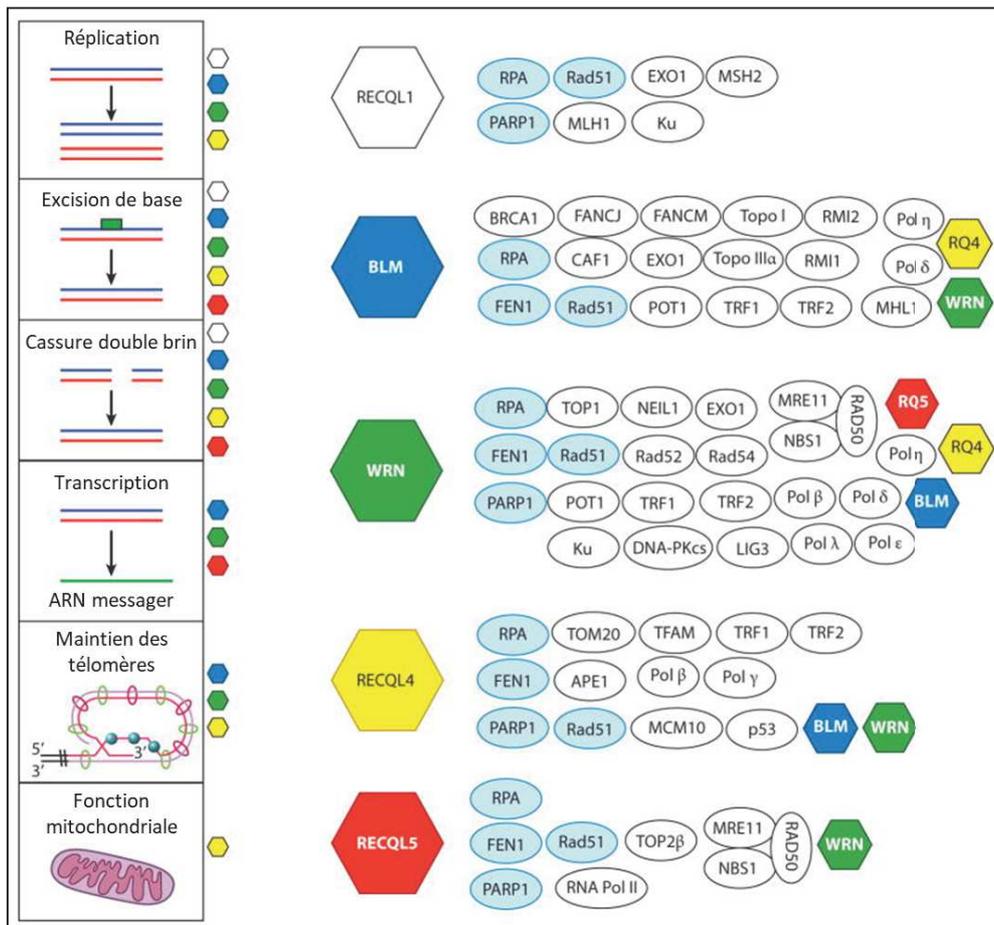


Figure 7 - Fonctions métaboliques et interactions protéines-protéines des hélicases RecQL. A gauche : voies métaboliques de l'ADN impliquant les hélicases RecQL. Les petits hexagones colorés à côté de chacune de ces voies représentent la(les)quelle(s) des hélicases est(sont) impliquée(s).

A droite : interactome de chacune des hélicases RecQL.

Bleu clair : protéines ayant des interactions avec au moins 4 des 5 hélicases décrites.

### 1.4.1 Rôle des hélicases dans la réparation de l'ADN

Les hélicases RecQL montrent une affinité particulièrement élevée et spécifique pour certaines structures de l'ADN qui ne sont présentes que lors de la réparation de celui-ci. C'est cette observation qui évoque l'implication des hélicases RecQL dans les mécanismes de réparation de l'ADN. Leurs rôles sont connus dans les réparations par excision de base et lors des réparations des cassures double-brin.

#### 1.4.1.1 Réparation par excision de base

Cette réparation élimine les nucléotides ayant subi des altérations chimiques telles que l'oxydation. Une glycosylase reconnaît la base nucléotidique lésée et l'élimine laissant le squelette sucre-phosphate intact. Puis l'endonucléase 1 spécifique vient cliver ce résidu créant une cassure simple-brin de l'ADN. Cette cassure est ensuite réparée par l'action de l'ADN polymérase  $\beta$  et d'une ligase. Lors de ces étapes, il est intéressant de noter que l'endonucléase 1 est inhibée par WRN mais est stimulée par RECQL4, alors que l'ADN polymérase est stimulée par WRN et RECQL4 (Figure 8A). De plus, cette polymérase n'a pas d'activité exonucléasique et fonctionne en coopération avec WRN. Ainsi, WRN assure une meilleure fidélité lors de la réparation par excision de base. Il existe également une voie de réparation par excision de bases faisant intervenir des ADN polymérase  $\delta$  et  $\epsilon$ , mais le rôle des hélicases répliquatives dans ce mécanisme est moins clair <sup>33</sup>.

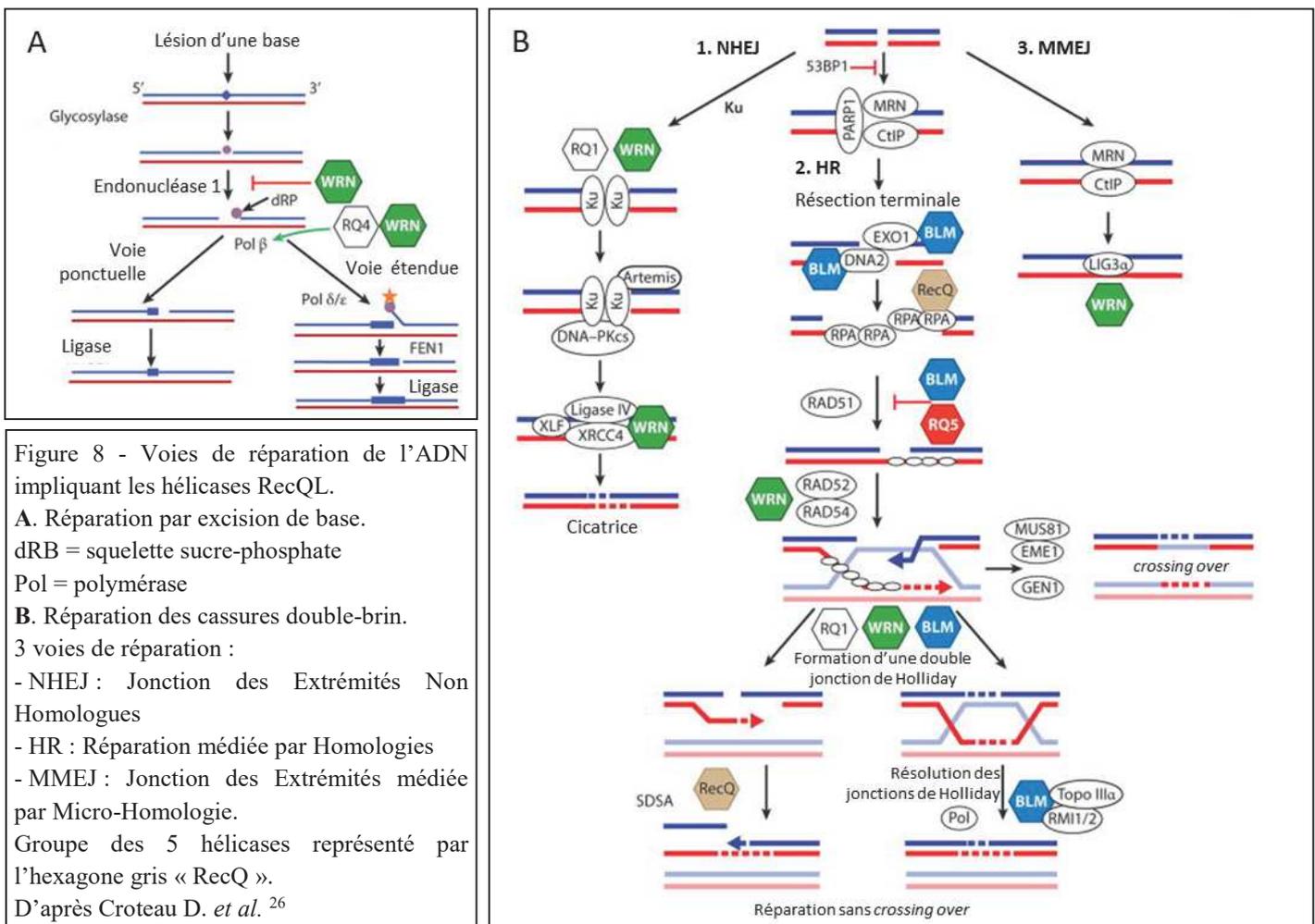


Figure 8 - Voies de réparation de l'ADN impliquant les hélicases RecQL.  
**A.** Réparation par excision de base.  
dRB = squelette sucre-phosphate  
Pol = polymérase  
**B.** Réparation des cassures double-brin.  
3 voies de réparation :  
- NHEJ : Jonction des Extrémités Non Homologues  
- HR : Réparation médiée par Homologies  
- MMEJ : Jonction des Extrémités médiée par Micro-Homologie.  
Groupe des 5 hélicases représenté par l'hexagone gris « RecQ ».  
D'après Croteau D. *et al.* <sup>26</sup>

### 1.4.1.2 Réparation des cassures double-brin de l'ADN

Les cassures double brin peuvent provoquer un arrêt du cycle cellulaire transitoire ou irréversible, occasionné notamment par la formation de réarrangements chromosomiques de grande taille. Les cellules peuvent réparer ces cassures par divers processus comme une Jonction des Extrémités Non Homologues (NHEJ), une Réparation médiée par Homologies, aussi appelée Recombinaison Homologue (HR), ou une Jonction des Extrémités médiée par Micro-Homologie (MMEJ). Le seul mécanisme ne générant pas d'erreurs de séquence lors de la réparation est la HR mais il nécessite la présence d'une chromatide sœur en tant que modèle, uniquement accessible en fin de phase S et en phase G2 du cycle cellulaire<sup>34</sup>. Les NHEJ et MMEJ sont réalisables tout au long du cycle cellulaire mais sont responsables d'erreurs dans la séquence nucléotidique, véritable cicatrice de la réparation (Figure 8B).

#### 1.4.1.2.1 Jonction des Extrémités Non Homologues (NHEJ)

Cette réparation, possible en l'absence de prolifération cellulaire, fait intervenir différents acteurs comme 53BP1, Ku70/Ku80 et le complexe XLF/XRCC4/Ligase IV. Les protéines Ku70/Ku80 et XRCC4/Ligase IV stimulent l'activité exonucléasique de WRN indispensable à ce mode de réparation. RECQL1 joue également un rôle dans la NHEJ en favorisant la reconnaissance de l'ADN par les protéines Ku.

#### 1.4.1.2.2 Jonction des Extrémités médiée par Micro-Homologie (MMEJ)

Le mécanisme précis de ce mode de réparation est encore mal connu. Il est observé lorsque des courtes séquences d'homologie existent entre la région à réparer et le modèle et fait intervenir notamment le complexe MRN (associant MRE11, RAD50 et NBS1) et la ligase III $\alpha$ . Il a été montré que WRN, BLM et RECQL1 interagissent avec le complexe MRN. Egalement, WRN interagit avec la ligase III $\alpha$ . Ces 3 hélicases joueraient ici un rôle dans l'équilibre entre NHEJ et MMEJ<sup>35</sup>.

#### 1.4.1.2.3 Réparation médiée par Homologies (HR)

Ce mécanisme est fréquemment observé lors d'un arrêt de la fourche de réplication (stress réplicatif), lors des réparations de l'ADN durant la mitose et il favorise les échanges inter-chromosomiques pendant la méiose.

La HR requiert les agents suivants : CtIP, le complexe MRN, RPA, DNA2, l'exonucléase 1 et RAD51. La protéine RPA, reconnaissant l'ADN simple brin, est essentielle pour la réplication et la réparation. Elle est capable d'interagir avec toutes les protéines RecQL humaines et stimule leur fonction hélicase.

Une étape de résection des extrémités est indispensable dans ce mécanisme, afin de générer des extrémités 3' simple-brin permettant la reconnaissance d'homologie. CtIP et le complexe MRN se fixent sur la zone de cassure double-brin. CtIP stimule l'activité exonucléasique du complexe MRN pour permettre la résection des extrémités et le recrutement de 2 nucléases supplémentaires : l'exonucléase 1 et DNA2. BLM joue un rôle essentiel dans cette étape en désenroulant l'ADN et en augmentant l'affinité de l'exonucléase I pour l'ADN. Bien que

WRN ait une activité exonucléasique intrinsèque, sa polarité 3'-5' l'empêche de participer à cette résection.

L'étape suivante est la reconnaissance d'une séquence d'homologie voisine de la cassure grâce à la formation d'un filament de la nucléoprotéine RAD51 et d'une boucle-D (c'est-à-dire d'un envahissement d'une région d'ADN double-brin par un ADN homologue simple-brin). Ici, BLM et RECQL5 ralentissent cette étape en inhibant la formation du filament et ont une action complémentaire. L'hélicase WRN aurait une action inhibitrice à cette étape en interagissant avec RAD52 et RAD54. Enfin RECQL4 interagit également avec RAD51 mais son rôle n'est pas parfaitement connu.

Une fois la reconnaissance de séquences homologues effectuée, une nouvelle synthèse d'ADN en suivant le brin modèle permet de générer un brin réparé. Il est alors possible que la néo-synthèse d'ADN mène à la formation de jonctions de Holliday simples ou doubles. RECQL1, BLM et WRN agissent à cette étape pour brancher les jonctions de Holliday ou permettre leur déplacement. Enfin, vient une phase de résolution des jonctions de Holliday selon deux voies possibles :

- Une voie médiée par les nucléases GEN1 et MUS81/EME1 qui peut engendrer un échange de matériel, appelé *crossing-over*, entre le brin réparé et le brin modèle.
- Une voie médiée par BLM ne générant pas de *crossing-over*.

Il existe également une autre voie alternative sans formation de jonctions de Holliday et sans *crossing-over* appelée SDSA (appariement à l'ADN simple brin). Toutes les hélicases RecQL possèdent cette activité SDSA <sup>36</sup>.

### 1.4.2 Rôle des hélicases dans la réplication de l'ADN

Les hélicases RecQL interviennent dans toutes les étapes de la réplication de l'ADN : initiation, traitement des fragments d'Okazaki, élongation des brins directs et retardés, résolution des fourches (Figure 9 d'après Croteau D. *et al.*<sup>26</sup>).

Lors de l'initiation, RECQL1 et RECQL4 entrent en jeu. Plus particulièrement RECQL4 qui interagit avec le complexe d'initiation de la réplication directement en lien avec des kinases cyclines-dépendantes.

BLM et WRN accélèrent la progression de la fourche de réplication. Ainsi dans les cellules sans activité de ces 2 hélicases, la phase S du cycle cellulaire dure souvent plus longtemps. Une des explications à cette action est que BLM et WRN sont capables d'éliminer les obstacles à la progression de la fourche de réplication, comme les structures G-quadruplex et autres structures en épingle à cheveux. On appelle « sites fragiles des chromosomes » certaines régions du génome propices au stress répliatif car de nombreuses structures secondaires bloquent l'évolution des fourches de réplication. WRN et BLM sont également capables de stabiliser ces sites fragiles en favorisant l'activité de l'ADN polymérase  $\delta$ . WRN et BLM sont capables de faire régresser une fourche de réplication arrêtée, puis de faire migrer ou d'éliminer les branches surnuméraires afin de rétablir une fourche de réplication normale.

Egalement, l'hélicase RECQL1 favorise l'échange de brin sur les fourches de réplication arrêtées.

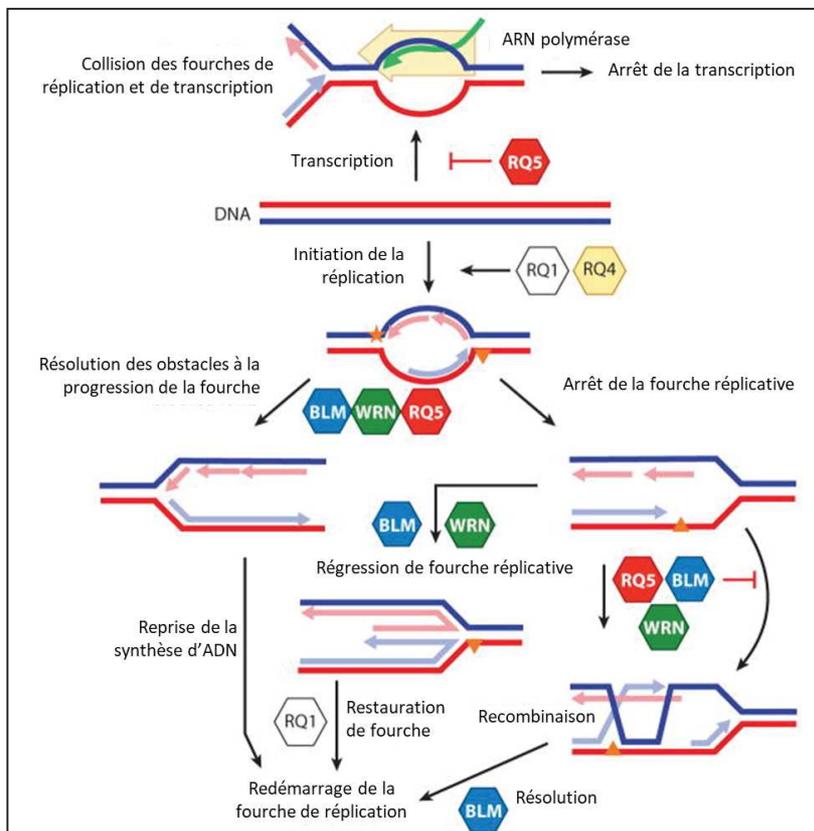


Figure 9 - Rôles des hélicases RecQL dans la réplication de l'ADN.

Sont représentés les rôles supposés des 5 hélicases répliatrices lors de l'initiation et de l'élongation de la réplication, le redémarrage et la régression des fourches arrêtées.

Egalement représenté le rôle préventif de RecQL5 dans la collision des fourches de réplication et de transcription.

Etoile et triangle oranges : lésions de l'ADN empêchant l'évolution de l'ADN polymérase.

Trait rouge : brin d'ADN direct.

Trait bleu : brin d'ADN retardé.

Trait vert : brin d'ARN.

De plus, WRN a aussi une fonction de relecture du génome après la synthèse par l'ADN polymérase, assurant ainsi une meilleure fidélité de la réplication.

RECQL1 a un rôle unique dans le redémarrage de la fourche de réplication après une lésion de l'ADN. Son action est synchronisée grâce à la poly(ADP-ribose) polymérase 1 (PARP1) empêchant un redémarrage trop précoce.

Enfin, BLM, WRN et RECQL4 ont également un rôle dans le traitement des fragments d'Okazaki mais celui-ci reste mal identifié.

### 1.4.3 Rôle des hélicases dans le maintien des télomères

La réplication du génome, à chaque cycle de division cellulaire provoque la perte progressive de séquences télomériques (Cf. paragraphe 1.2 Biologie des télomères) qui peut être compensée par l'activité télomérase. Les télomères sont plus sensibles au stress réplicatif que le reste du génome, ce qui peut expliquer en partie le rôle indispensable des hélicases RecQL dans la réplication des télomères. Même si les cellules sans activité hélicase WRN, BLM ou RECQL4 ont chacune des phénotypes distincts, elles ont cependant en commun des anomalies dans la réplication des télomères.

WRN, BLM et RECQL4 interagissent avec les protéines du télosome (TRF1, TRF2 et POT1) favorisant ainsi le désenroulement des boucles D et des fourches de réplication. Les rôles de RECQL1 et RECQL5 dans le maintien des télomères sont mal caractérisés. WRN et RECQL4 sont mobilisés sur les télomères pendant la phase S, stimulés par le stress de réplication. En revanche, BLM n'y est présent que lors des phases S tardives ou G2. Ces 3 hélicases ont donc des rôles différents dans le maintien des télomères. TRF2 et POT1 ont des activités opposées envers WRN : le premier augmente l'activité exonucléasique de WRN sur l'extrémité simple-brin des télomères alors que le second l'inhibe (Figure 10 d'après Croteau D. *et al.*<sup>26</sup>).

Lors du stress réplicatif, c'est-à-dire lors de l'arrêt d'une fourche de réplication, il est possible que la fourche régresse en formant spontanément une jonction à 4 branches. Si ces motifs permettent de dépasser le stress réplicatif, ils doivent cependant être éliminés le plus rapidement possible afin de ne pas générer d'instabilité télomérique. WRN et BLM aident à la formation et à l'élimination de ces jonctions particulières. De plus, la présence de structure G-quadruplex sur les télomères tend à les fragiliser. Il est à noter que les hélicases WRN et BLM peuvent résoudre ces motifs G-quadruplex mais pas RECQL4<sup>37</sup>.

Les boucles-T et boucles-D permettent la protection des télomères face aux protéines de la reconnaissance des cassures de l'ADN. Elles présentent toutefois un risque élevé de se cliver, ce qui engendrerait une perte massive du nombre de répétitions télomériques. Aussi, pour

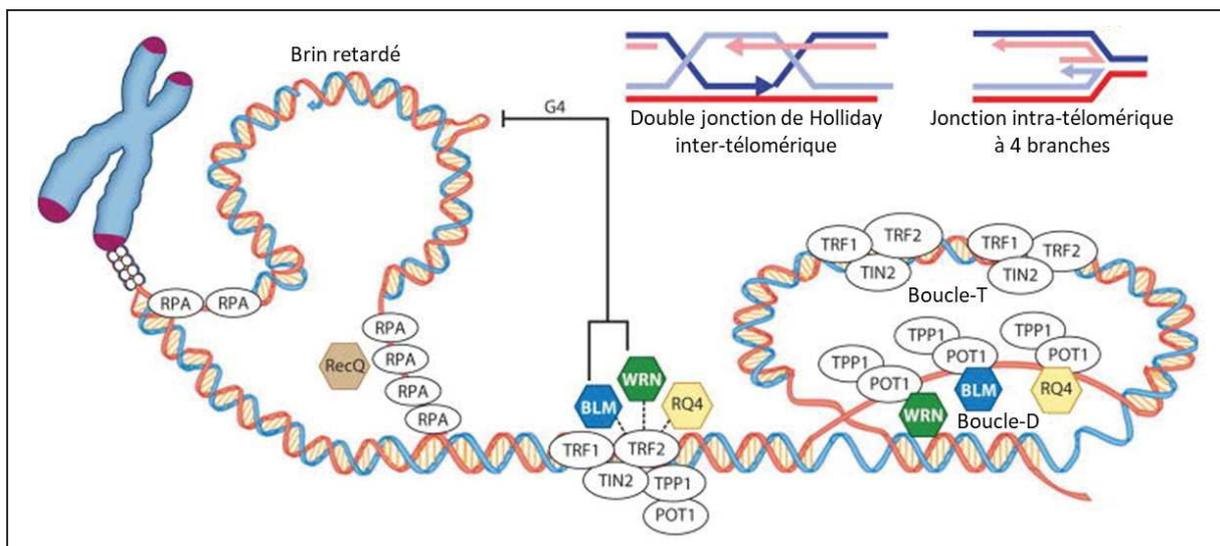


Figure 10 - Actions des hélicases réplicatives dans le maintien des télomères  
G4 : structure G-quadruplex. Groupe des 5 hélicases représenté par l'hexagone gris « RecQ ».

assurer leur stabilité, les boucles-D doivent régulièrement être régénérées. Lors de ce mécanisme, les 3 hélicases WRN, BLM et RECQL4 sont capables de résoudre ces boucles-D, dites intra-télomériques. Par accident, il arrive que l'extrémité simple-brin d'un télomère envahisse la séquence double-brin d'un autre télomère, généralement celui de la chromatide sœur, formant alors une boucle-D inter-télomérique. Cette nouvelle boucle engendre un potentiel de recombinaison entre les télomères qui serait délétère pour la stabilité de la cellule. Ici aussi, les 3 hélicases WRN, BLM et RECQL4 sont capables de résoudre ces boucles-D indésirables.

Enfin, dans les cellules cancéreuses, le maintien des télomères est assuré par différents mécanismes dépendant ou non de la télomérase. Une des voies emprunte le mécanisme de HR en recombinant les télomères entre eux. A ce niveau, il a été montré que les hélicases WRN et BLM sont impliquées<sup>38</sup> et représentent donc un potentiel pour la recherche de thérapies anti-cancéreuses.

## 1.5 Descriptions cliniques et génétiques des syndromes du vieillissement précoce

### 1.5.1 Syndromes de vieillissement précoce liés aux hélicases

#### 1.5.1.1 Syndrome de Werner

##### 1.5.1.1.1 Aspects cliniques

Décrit par Otto Werner en 1904, ce syndrome est caractérisé par l'apparition précoce de signes du vieillissement physiologique et une prédisposition au cancer. La Figure 11 (d'après Oshima *et al.*<sup>39</sup>) montre la progression de la maladie au cours des années chez une patiente atteinte du syndrome de Werner. La fréquence de ce syndrome dans la population générale est estimée entre 1/400 000 et 1/1 000 000.

Les signes cardinaux de ce syndrome, présents chez 91% des sujets atteints<sup>40</sup>, sont les suivants :

- Cataracte oculaire bilatérale.
- Grisonnement et/ou affinement prématuré des cheveux.
- Atteintes cutanées : atteintes de type sclérodermie, atrophies localisées des graisses sous-cutanées, ulcères profonds autour des tendons d'Achilles et des malléoles.
- Petite taille.

D'autres signes cliniques additionnels accompagnent souvent cette description :

- Maigreur des membres
- Traits tirés
- Ostéoporose
- Voix roque
- Hypogonadisme
- Diabète de type 2
- Calcification des tissus mous
- Néoplasies
- Athérosclérose



Figure 11 - Patiente atteinte du syndrome de Werner  
Apparence normale à l'âge de 8 ans. Chirurgie de la cataracte à 36 ans. Ulcérations sévères aux chevilles à 56 ans.

Le diagnostic clinique du syndrome de Werner est posé par l'observation des 4 signes cardinaux et de 2 des signes additionnels.

La chronologie de la maladie montre une apparition des premiers signes cliniques lors de la seconde décennie, notamment par le retard statural, le phénotype cutané et capillaire ainsi que la modification de la voix. Les autres atteintes apparaissent à partir de 30 ans. L'espérance de vie moyenne chez ces patients est de 54 ans et les principales causes de décès sont liées à des infarctus du myocarde et des cancers.

Il est intéressant de noter que ces patients sont beaucoup plus fréquemment touchés par certains type de cancers que la population générale, avec des risques relatifs supérieurs à 50 selon les atteintes : néoplasies de la thyroïdes, mélanomes malins, méningiomes, sarcomes des tissus mous, leucémies et néoplasies osseuses primaires <sup>41</sup>.

#### 1.5.1.1.2 Aspects moléculaires

Le syndrome de Werner est dû à des mutations du gène *WRN* et sa transmission est autosomique récessive. Ainsi, l'identification par séquençage de mutations sur les 2 allèles du gène *WRN* permet la confirmation moléculaire du syndrome.

Il existe un registre international des mutations pathologiques du gène *WRN* mettant en évidence la présence d'un effet fondateur au Japon et en Italie <sup>42</sup>. La majorité des mutations décrites sont tronquantes ou entraînant un décalage du cadre de lecture et sont disséminées sur tous les exons du gène (Figure 12, d'après Yokote *et al.*<sup>42</sup>). On note également quelques réarrangements de grandes tailles : délétions ou duplications partielles du gène, ayant un effet supposé inactivateur. Cette observation et le mode de transmission autosomique récessif du syndrome sont en faveur d'une nullosomie fonctionnelle pour la protéine WRN chez les patients atteints.

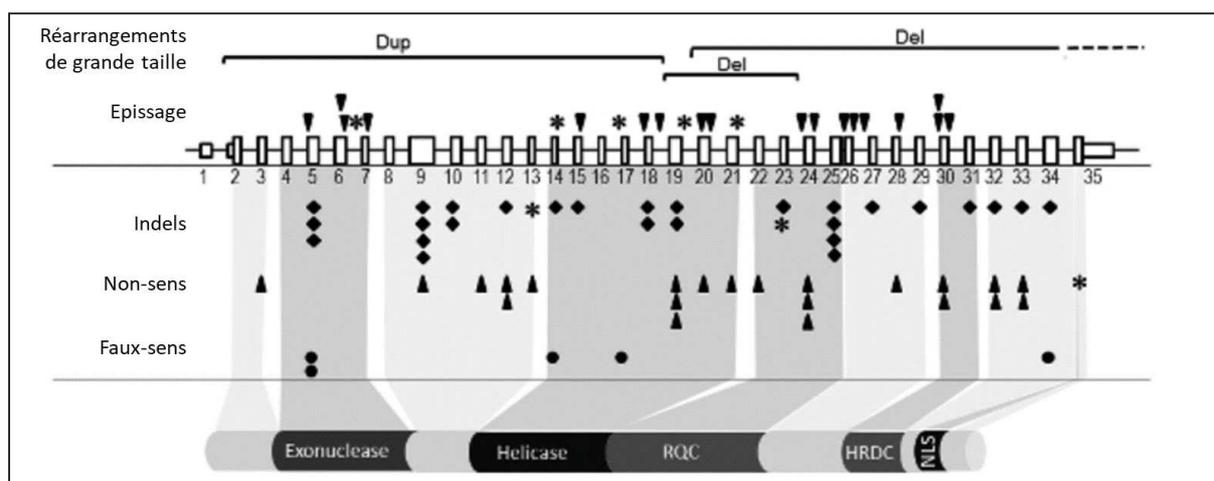


Figure 12 - Répartition des mutations responsables du syndrome de Werner.

A gauche : type de mutation/réarrangement.

Dup = duplication, Del = délétion

Gène *WRN* représenté en partie supérieure avec numérotation des exons du gène.

En bas : représentation des domaines fonctionnels codés par le gène *WRN*

#### *1.5.1.1.3 Aspects cytogénétiques*

Une instabilité à l'échelle chromosomique est le plus souvent détectable par l'établissement du caryotype sur les fibroblastes des patients. Il n'y a pas de point de cassure récurrent décrit concernant cette instabilité. Il est probable que cette instabilité soit à l'origine d'un temps de doublement de population allongé et expliquerait l'entrée en sénescence assez rapide des fibroblastes en culture <sup>43</sup>.

## 1.5.1.2 Syndrome de Bloom

### 1.5.1.2.1 Aspects cliniques

Le syndrome de Bloom est caractérisé par la présence de lésions érythémateuses de la face en forme de papillon après exposition au soleil, chez des patients présentant un retard statural dès la vie intra-utérine. <sup>44</sup> Décrit par le Dr Bloom dans les années 1950 <sup>45</sup>, seuls 300 cas ont été rapportés dans le registre international du *Weill Cornell Medical College* <sup>46</sup>.

Les principaux signes cliniques du syndrome de Bloom sont les suivants :

- Retard de croissance intra-utérin persistant en déficit staturo-pondéral harmonieux à l'âge adulte.
- Finesse du tissu adipeux sous-cutané.
- Variations morphologiques mineures de la face : microcéphalie, hypoplasie mandibulaire inférieure avec impression de nez et oreilles proéminentes.
- Voix haut perchée et rauque.
- Erythème de la face en forme de papillon sur le nez et les joues après exposition au soleil.
- Immunodéficience et infections répétées : otites et pneumonies.
- Stérilité masculine par azoospermie ou oligospermie sévère. Fertilité conservée chez les femmes malgré une ménopause précoce.

La Figure 13 illustre le phénotype facial caractéristique de ce syndrome. <sup>47,48</sup>

Les patients souffrant du syndrome de Bloom présentent également une forte prédisposition au développement de cancers. Il n'a pas été rapporté de localisation anatomique ou de type préférentiel

pour ces cancers mais leur fréquence est plus élevée que celle observée dans la population générale. <sup>46</sup> Les néoplasies sont les complications les plus fréquentes chez ces patients et représentent la principale cause de décès.



Figure 13 - Phénotype facial du syndrome de Bloom.

A. Erythème de la face et hypoplasie mandibulaire inférieure.

B. et C. Erythèmes caractéristiques déclenchés par l'exposition au soleil sur les joues et sur le nez.

### 1.5.1.2.2 Aspects moléculaires

Le mode de transmission décrit pour le syndrome de Bloom est de type autosomique récessif. La consanguinité est donc un des facteurs de risque d'apparition de la maladie dans une famille.

Le registre des patients tenu par le *Weill Cornell Medical College* montre une grande diversité des mutations retrouvées dans cette pathologie et la présence d'une mutation à effet fondateur décrite dans la population juive Ashkénaze<sup>49</sup>. Comme observé dans le syndrome de Werner, les mutations responsables du syndrome de Bloom sont essentiellement tronquantes ou entraînant un décalage du cadre de lecture et sont distribuées sur toutes les parties codantes du gène (Figure 14, d'après German *et al.*<sup>50</sup>). Là aussi, ces éléments sont en faveur d'une nullosomie fonctionnelle comme mécanisme pathologique chez les patients atteints.

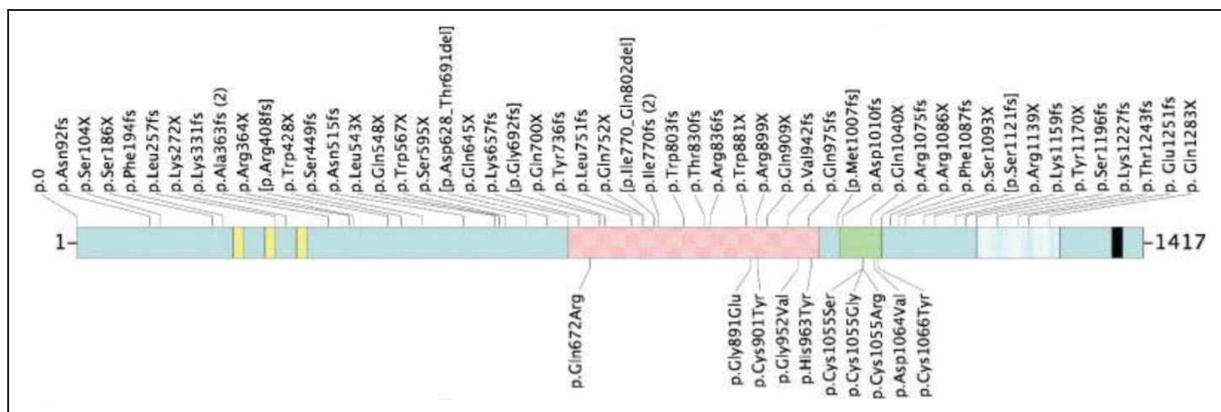


Figure 14 - Répartition des mutations responsables du syndrome de Bloom.

Les mutations sont indiquées à l'échelle de la protéine BLM (UniProtKB P54132). Les rectangles colorés représentent les domaines fonctionnels. L'unité de numérotation est l'acide aminé.

### 1.5.1.2.3 Aspects cytogénétiques

Le syndrome de Bloom présente également des particularités cytogénétiques remarquables<sup>51</sup> et on note chez les patients une augmentation significative du nombre d'échanges entre chromatides sœurs, de *crossing-over* mitotiques, de cassures chromosomiques, de structures tri- ou quadri-radiales et de chiasmas mitotiques. On observe également des images de condensation prématurée des chromosomes : suite à la fusion de deux cellules non synchronisées sur leur cycle cellulaire, le matériel chromosomique issu de la cellule en interphase se condense prématurément lorsque la cellule entre en métaphase (Figure 15 - d'après Kuhn *et al.*<sup>51</sup> et Ben Salah *et al.*<sup>52</sup>)

Ces particularités chromosomiques sont le témoin d'une instabilité génomique qui caractérise le syndrome de Bloom. Il est couramment convenu que le syndrome de Bloom est à ce point synonyme d'instabilité génomique que l'observation d'intenses échanges entre chromatides sœurs a longtemps servi de confirmation biologique au diagnostic clinique de ce syndrome<sup>53</sup>.

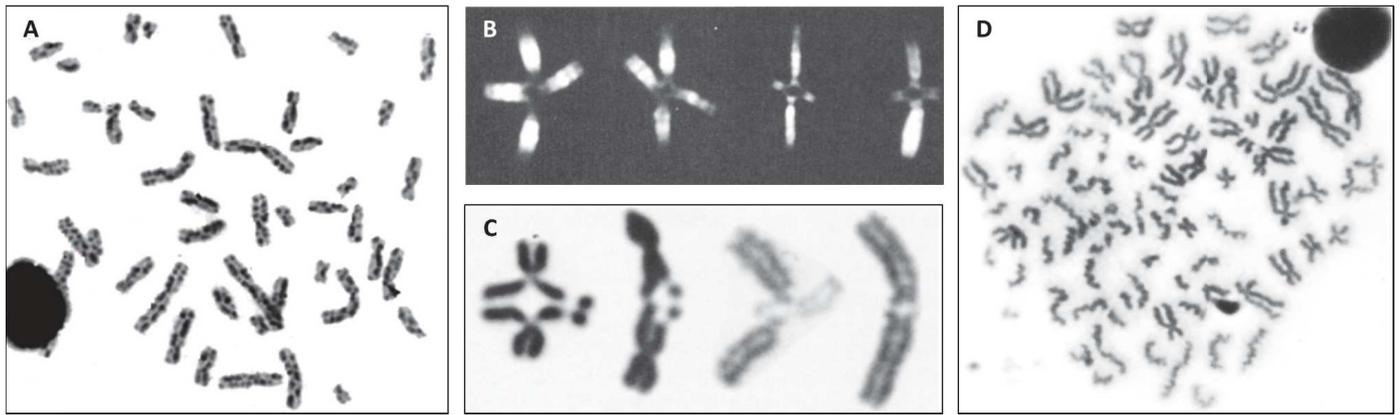


Figure 15 - Particularités cytogénétiques du syndrome de Bloom.

**A.** Grand nombre d'échanges entre chromatides sœurs.

**B et C.** Chiasmas mitotiques en bandes Q (B) et au Giemsa (C).

**D.** Chromosomes condensés prématurément suite à la fusion de deux cellules non synchronisées.

Même si l'observations de ces figures chromosomiques sont stabilisées *in vitro*, il est très fortement probable qu'un même type d'instabilité se forme *in vivo*, à l'origine de l'augmentation de l'incidence des cancers chez les patients souffrant du syndrome de Bloom. En effet, ces aberrations chromosomiques sont responsables de déséquilibres génomiques et il est tout à fait envisageable que ceux-ci entraînent l'inactivation d'anti-oncogènes ou modifient l'expression des oncogènes, notamment par effet de position.

Enfin, si les cellules de ces patients présentent un fort taux d'anomalies chromosomiques, elles montrent aussi une fréquence très élevée des mutations somatiques<sup>49</sup>. Ainsi cette instabilité présente aux deux échelles, cytogénétique et moléculaire, s'auto-entretient.

### 1.5.1.3 Syndrome de Rothmund-Thomson

#### 1.5.1.3.1 Aspects cliniques

Le signe clinique majeur du syndrome de Rothmund-Thomson est la poïkilodermie congénitale, décrite par Sidney Thomson en 1923 et en 1936<sup>54</sup>. Il s'agit d'une atteinte cutanée associant une atrophie épidermique, des télangiectasies (dilatations vasculaires dessinant des lignes rouges cutanées) et une dyschromie. Seuls 400 cas environ de syndrome de Rothmund-Thomson associés à des mutations du gène *RECQL4* ont été décrits dans la littérature.

Classiquement, ce syndrome est décomposé en deux phases évolutives :

- Une phase aigüe dans les premiers mois de la vie avec l'apparitions d'érythèmes.
- Une phase chronique laissant apparaître les autres signes cutanés persistante tout au long de la vie.



Figure 16 - Présentation clinique du syndrome de Rothmund-Thomson.

A. Hypoplasie des pouces, *genu valgum*, poïkilodermie distribuée et retard statural harmonieux, chez un garçon de 14 ans.

B. Poïkilodermie de la face chez un garçon de 21 ans avec alopecie (haut) et chez une fille de 14 ans (bas).

C. Anomalies squelettiques : aplasie du pouce (haut) et lésions de l'épiphyse distale de l'humérus (bas).

D'autres signes cliniques de sévérité variable<sup>55</sup> sont associés à ce syndrome :

- Déficit staturo-pondéral d'installation prénatale malgré un taux normal en hormone de croissance.

- Anomalies squelettiques majeures présentes chez 75% des patients : trabéculation des métaphyses, dysplasie ou aplasie de différents os (rotule, radius, cubitus, phalange et/ou pouce).
- Hypoplasie dentaire, microdontie, dent surnuméraire ou absente, sortie tardive ou ectopique, associées à une augmentation du risque de caries.
- Chevelure peu dense voire alopecie, cils et/ou sourcils épars.
- Atteintes hématologiques : anémie et neutropénie isolées, myélodysplasie, anémie arégénérative, leucémie.
- Cataracte bilatérale précoce, le plus souvent avant l'âge de 10 ans.
- Prédisposition au cancer : malgré une prévalence non évaluée chez l'adulte, le développement précoce d'ostéosarcomes demeure la néoplasie la plus souvent décrite, avec un âge médian de diagnostic à 11 ans. D'autres cancers cutanés sont décrits : carcinomes à cellules basales, carcinomes à cellules squameuses et mélanomes, notamment sur des zones non exposées au soleil. Les patients souffrant du syndrome de Rothmund-Thomson présentent également une sensibilité apparente aux cancers secondaires plus élevée que celle observée dans la population générale.

La Figure 16 (d'après Larizza *et al.*<sup>56</sup>) illustre les atteintes cutanées et squelettiques fréquemment retrouvées dans le syndrome de Rothmund-Thomson.

En l'absence de cancer, l'espérance de vie semble être normale bien que la littérature soit limitée sur ce point. De plus, les hélicases répliquatives comme RECQL4 étant impliqué dans les mécanismes de réparation de l'ADN, il pourrait paraître logique de voir un nombre de cancers secondaires post-chimiothérapies plus élevé que celui observé dans la population générale. Néanmoins, les revues sur ce sujet tendent à montrer qu'il n'y a pas d'excès de cancer secondaire chez ces patients<sup>57,58</sup>.

### 1.5.1.3.2 Aspects moléculaires

En faisant la revue de ce syndrome, Larizza *et al.*<sup>56</sup> font remarquer l'existence de 2 sous types du syndrome de Rothmund-Thomson. L'un retrouve des mutations homozygotes ou hétérozygotes composites du gène *RECQL4* et représente deux tiers des patients. L'autre demeure une maladie mendélienne de transmission apparemment autosomique récessive sans identification de gène impliqué dans la maladie à ce jour.

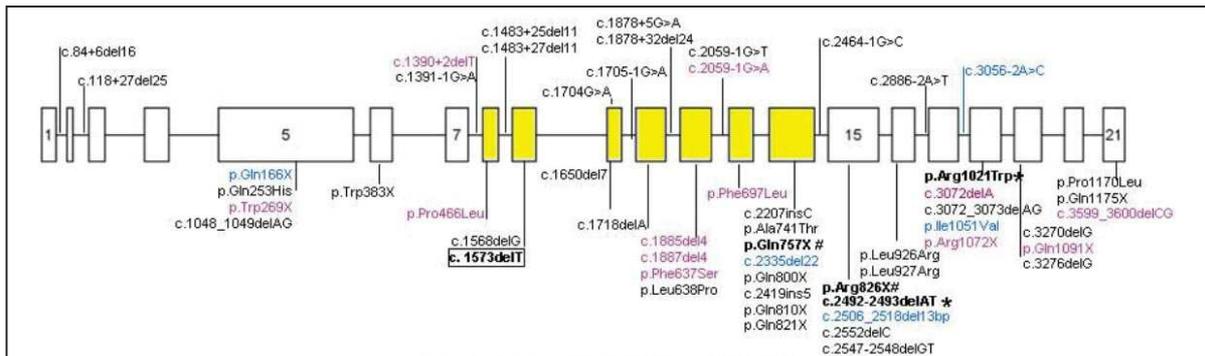


Figure 17 - Cartographie des mutations impliquées dans le syndrome de Rothmund-Thomson. Mutations indiquées selon leurs conséquences sur la protéine (p.) ou sur l'ADN complémentaire (c.).  
Partie haute : mutations responsables d'un défaut d'épissage.  
Partie basse : mutations non-sens ou engendrant un décalage du cadre de lecture ou faux-sens.  
Rectangles jaunes : exons codant le domaine protéique à activité hélicase.

Concernant les mutations pathologiques du gène *RECQL4* qui ont été mises en évidence, il s'agit pour la plupart de mutations non-sens ou entraînant un décalage du cadre de lecture, ou bien ayant un effet sur l'épissage de l'ARN immature. Là aussi, la cartographie de ces mutations (Figure 17, d'après Larizza *et al.*<sup>56</sup>) et le mode de transmission de la maladie laissent penser que le mécanisme est une nullosomie fonctionnelle.

Enfin, il est à noter que le gène *RECQL4* présente une hétérogénéité clinique puisqu'il est également impliqué dans deux autres syndromes :

- Le syndrome RAPADILINO (hypoplasie radiale, hypoplasie de la patella, fente palatine, diarrhée, luxation des articulations, petite taille, malformation des membres, nez étroit et intelligence conservée),
- Le syndrome Baller-Gerold caractérisé par une hypoplasie radiale, une craniosténose et un retard de croissance.<sup>59</sup>

Ces 3 syndromes ont en commun les anomalies radiales et un déficit statural. Cependant, les études cliniques publiées avec séquençage du gène *RECQL4* ne mettent pas en évidence de relation génotype-phénotype : il n'est donc pas possible d'affirmer quel mécanisme serait spécifique à chacun de ces syndromes.<sup>60,61</sup>

#### *1.5.1.3.3 Aspects cytogénétiques*

Bien que le syndrome de Rothmund-Thomson ne soit pas considéré comme un syndrome d'instabilité génomique en tant que tel, il est fréquent de rencontrer des anomalies caryotypiques sporadiques chez ces personnes. En effet, plusieurs publications rapportent des anomalies affectant le chromosome 8 dans les lymphocytes, sur culture de fibroblastes et sur prélèvements buccaux (trisomie en mosaïque, isochromosomes 8p ou 8q) <sup>62,63</sup>.

## 1.5.2 Syndrome de la progéria de Hutchinson-Gilford

### 1.5.2.1 Aspects cliniques

Décrit en 1886 par Jonathan Hutchinson, puis en 1897 par Hastings Gilford, ce syndrome est une entité rare mais bien caractérisée associant un déficit staturo-pondéral extrême à des signes d'un vieillissement accéléré.

La progéria de Hutchinson-Gilford (HGPS) est extrêmement rare et seul un enfant sur 4 000 000 souffre de cette pathologie <sup>64</sup>. Bien que les symptômes varient en âge d'apparition et en sévérité d'un patient à l'autre, la naissance de ces enfants est le plus souvent normale et les premiers signes se développent dans les premières années de vie (Figure 18, d'après Hennekam *et al.*<sup>64</sup>).

Classiquement, on retrouve les signes cliniques suivants :

- Croissance et développement :
  - Taille et poids inférieurs au 3<sup>ème</sup> percentile.
  - Périmètre crânien disproportionné.
  - Voix fluette et haut perchée.
- Atrophie des graisses sous-cutanées donnant l'impression de :
  - Veines superficielles du crâne proéminentes, cyanose des lèvres.
  - Yeux proéminent.
- Peau, phanères :
  - Lésions de type sclérodermie.
  - Alopécie avec rares cheveux sur l'occiput.
  - Perte des sourcils et parfois des cils.
  - Dystrophies des ongles.
  - Lagophthalmos (incapacité à fermer les yeux complètement) nocturne.
  - Lèvres fines.
- Sphère ORL :
  - Surdité des basses fréquences.
  - Sortie et chute des dents de lait retardées.
  - Sortie des dents définitives partielle.
  - Superposition des dents due à une petite bouche.
  - Palais creux ogival.
  - Frein de la langue court avec mobilité réduite de la langue.
- Squelette :
  - Base du nez étroite, pointe large.
  - Ostéolyse des phalanges distales et faible densité osseuse générale.
  - Fermeture retardée de la fontanelle antérieure.
  - Rétrognathie et micrognathie.
  - Clavicules courtes et dystrophiques, côtes étroites.

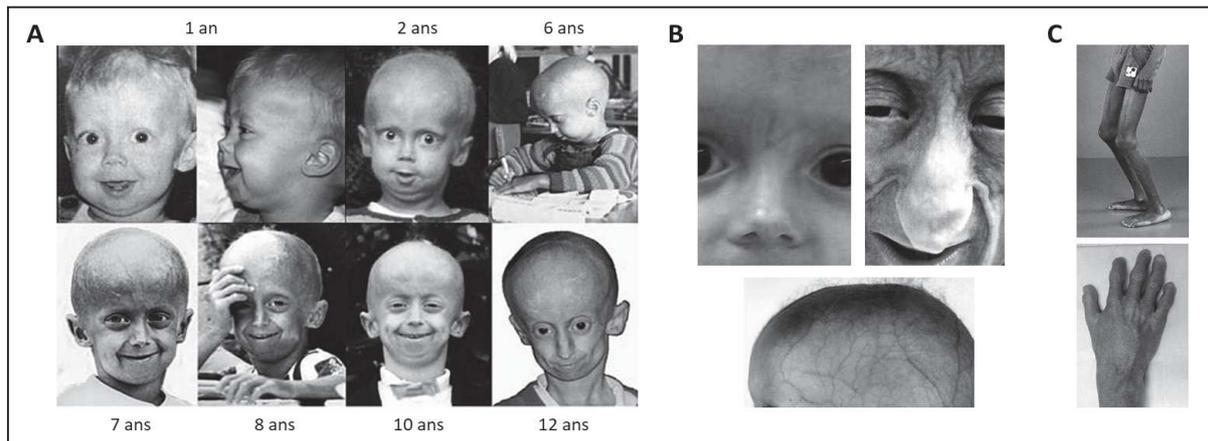


Figure 18 - Signes cliniques de la progéria de Hutchinson-Gilford

A. Evolution de l'apparence physique d'un patient entre 1 an et 12 ans.

B. Particularités de la face : Veine proéminente sur le pont nasal (haut à gauche). Finesse de la peau sur le front et les joues, pont nasal étroit, pointe du nez large et plate (haut à droite). Alopécie, finesse de la peau du crâne et veines visibles (bas).

C. Jambes d'un patient de 8 ans (haut). Camptodactylie chez un patient de 7 ans (bas).

- Cardiovasculaire et neurovasculaire :
  - Athérosclérose sévère et progressive entraînant des syndromes coronariens aigus et des infarctus du myocarde, accidents vasculaires cérébraux et accidents ischémiques transitoires.
  - Syndrome de Raynaud.
- Endocrinologie :
  - Absence de développement sexuel secondaire.
  - Faibles concentrations sériques en leptine.
  - Insulinorésistance.

Les complications habituellement retrouvées chez ces patients sont les conséquences de l'athérosclérose sévère. L'espérance de vie est d'environ 14 ans. Contrairement aux pathologies du vieillissement précoce liées aux hélicases, on ne retrouve pas d'incidence élevée de cancers chez les enfants atteints de HGPS.

### 1.5.2.2 Aspects moléculaires

*LMNA* est le seul gène dans lequel des mutations pathogènes ont été rapportées comme responsables du HGPS <sup>65</sup>. Le gène *LMNA* code physiologiquement deux protéines différentes par épissage alternatifs : la lamine A et la lamine C. Associées à la lamine B, ces 3 protéines forment la lamine. Elles sont des filaments intermédiaires retrouvées dans le nucléoplasme qui participent à la structure du noyau et aux interactions entre la chromatine et la membrane nucléaire.

Dans le cas du HGPS, la transmission génétique est autosomique dominante, avec une mutation synonyme dans l'exon c.1824C>T responsable de la forme classique du syndrome. Cette mutation apparemment silencieuse est en réalité responsable d'une modification de l'épissage de l'ARN messager en réactivant un site donneur cryptique. Il en résulte l'équivalent d'une délétion de 150 paires de bases dans la partie 3' de l'exon 11. La traduction puis les modifications post-

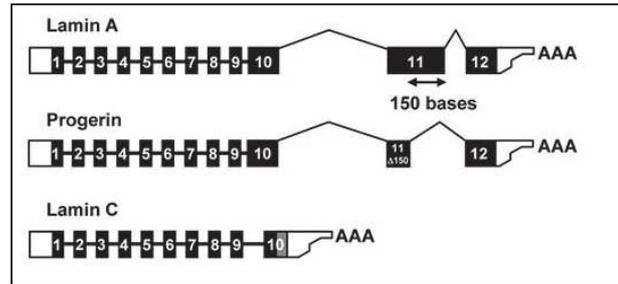


Figure 19 - Epissages alternatifs du gène *LMNA*. Rectangles noirs représentant les exons numérotés. Formes blanches représentant les parties non traduites en 3' et 5' du gène.

traductionnelles de ce gène donnent naissance à une protéine plus courte de 50 acides aminés que la lamine A normale, appelée progérine (Figure 19, d'après Lopez-Mejia *et al.*<sup>66</sup>). La progérine ne peut pas subir la maturation normale de lamine A, s'accumule dans le noyau et devient toxique. Par cet effet dominant négatif, la progérine impacte l'homéostasie du noyau et provoque de déformations de la membrane nucléaire<sup>67</sup>.

Pour cette mutation en particulier, sa présence sur un seul des deux allèles suffit pour engendrer la maladie. Il s'agit donc d'un syndrome de transmission autosomique dominant.

Certaines publications montrent que la progérine est également impliquée dans le vieillissement physiologique des cellules non mutées<sup>68</sup>. Ainsi, les cellules HGPS et les cellules non mutées sénescents partagent l'activation de nombreuses voies métaboliques<sup>69</sup> faisant des lignées HGPS un réel modèle de vieillissement prématuré.

Par ailleurs, le gène *LMNA* est caractérisé par sa grande hétérogénéité clinique. En effet, hormis le HGPS, ce gène est impliqué par différents mécanismes dans des pathologies variées comme les dystrophies musculaires d'Emery-Dreifuss et des ceintures, des cardiomyopathies dilatées, des lipodystrophies et la neuropathie axonale de Charcot-Marie-Tooth<sup>70</sup>.

## 1.6 Les cellules souches pluripotentes humaines

### 1.6.1 Les cellules souches embryonnaires humaines

Après fécondation de l'ovocyte humain par un spermatozoïde, le zygote obtenu est dit totipotent car il est capable de générer non seulement l'ensemble des différents types cellulaires que composent un individu, mais également de structurer cet être vivant.

Pendant les 7 jours qui suivent la fécondation, le zygote voyage à travers la trompe de l'utérus et en direction de la cavité utérine. Cette période précède l'implantation de l'embryon dans la muqueuse utérine.

Lors des premiers jours de son développement, l'embryon préimplantatoire réalise plusieurs divisions cellulaires jusqu'à la formation d'une sphère compacte de 16 à 64 blastomères, appelée morula. A la suite de ce stade, les cellules se lient étroitement par la mise en place de desmosomes.

Cinq jours après la fécondation, le blastocyste se forme. Les cellules se polarisent et se séparent en deux structures morphologiquement distinctes : une mince couche d'épithélium externe appelée trophoblaste et une masse cellulaire interne, aussi appelée bouton embryonnaire. Ces structures délimitent une cavité liquidienne nommée blastocèle (Figure 20).

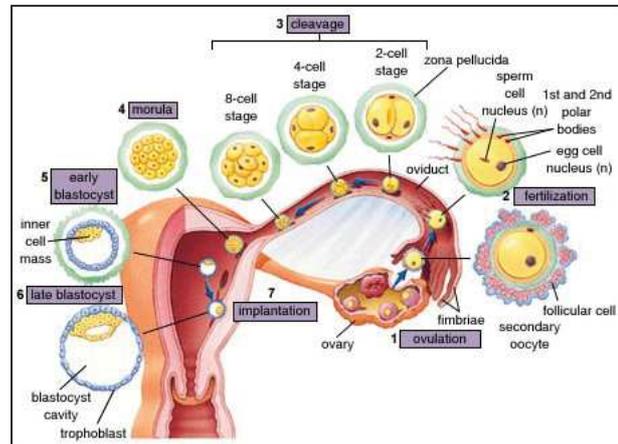


Figure 20 - Développement embryonnaire préimplantatoire du zygote au blastocyste.

Traduction :

1. Ovulation : ovaires, *fimbriae*, ovocyte secondaire, cellules folliculaires.
  2. Fécondation : *pronucléi* haploïdes maternel et paternel, globules polaires primaire et secondaire, oviducte.
  3. Premières divisions cellulaires : stades à 2 cellules, 4 cellules et 8 cellules.
  4. Morula.
  5. Blastocyste précoce : masse cellulaire interne.
  6. Blastocyste tardif : trophoblaste et blastocèle.
- Source : <http://ehumanbiofield.wikispaces.com/>

Les cellules du trophoblaste expriment des facteurs de croissance comme BMP4 et formeront plus tard la partie embryonnaire du placenta ainsi que d'autres tissus de soutien. Les cellules de la masse cellulaire interne expriment OCT4, SOX2 et NANOG et est dite pluripotente : c'est à partir de ces cellules que va se développer l'embryon.<sup>71</sup>

En 1998, Thomson *et al.*<sup>72</sup> ont réussi à extraire les premières cellules souches embryonnaires humaines pluripotentes (hESC pour *Human Embryonic Stem Cells*) de la masse cellulaire interne d'embryons excédentaires obtenus lors de fécondations *in vitro* (Figure 21). Dès lors qu'elles sont maintenues en culture sous leur forme indifférenciée, ces cellules ont la capacité de former des dérivés des trois feuillets embryonnaires, ce qui caractérise la pluripotence. Selon Thomson *et al.*, cette pluripotence peut être résumée *in vitro* et *in vivo* par :

- La présence de marqueurs de surface tels que SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81.
- La détection d'une activité enzymatique phosphatase alcaline.

- La formation de tératomes chez des souris immunodéficientes après injection de hESC.

En culture, les hESC forment des colonies denses, possèdent un haut niveau de rapport nucléocytoplasmique et montrent un niveau élevé d'activité télomérase. Cette capacité permet aux hESC d'échapper à la sénescence et de s'auto-renouveler. La culture *in vitro* des hESC a permis d'identifier que OCT4, SOX2 et NANOG sont les agents responsables des caractéristiques de pluripotence et d'auto-renouvellement <sup>73</sup>. Ces trois protéines agissent en coopération pour modifier l'expression de gènes et maintenir les voies de signalisation de la pluripotence. De plus, certains stimuli extracellulaires sont nécessaires au maintien du phénotype des hESC

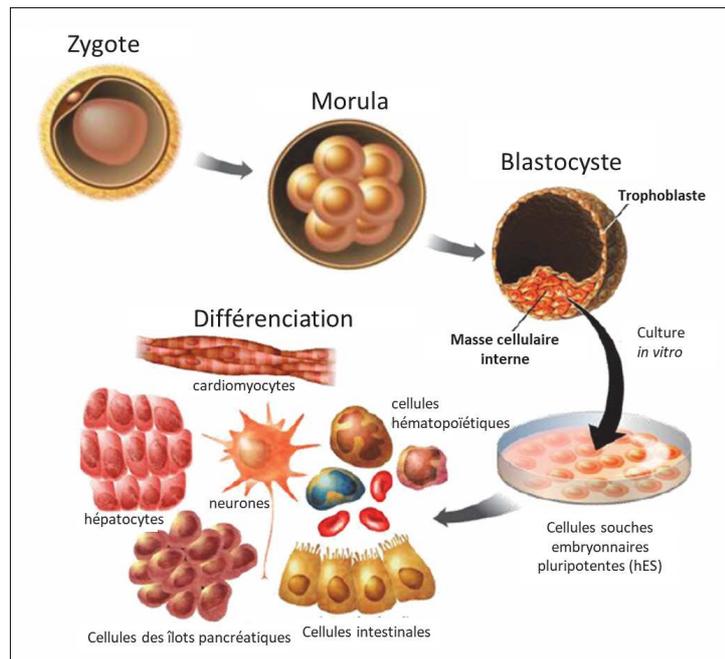


Figure 21 - Principe d'utilisation des cellules hESC. Extraction à partir de la masse cellulaire interne. Culture *in vitro* et différenciation dans la ou les cellules spécialisées d'intérêt. Courtoisie du Dr Romain Desprat.

indifférenciées, notamment la présence de  $\beta$ -FGF. <sup>74,75</sup> Cette dernière est une contrainte particulière au maintien en culture des cellules souches pluripotentes. Initialement, l'apport de ces compléments de culture a été réalisé par la mise en place d'une culture de cellules murines irradiées sécrétant un facteur de croissance similaire au  $\beta$ -FGF. Il existe désormais des compléments de milieu de culture permettant de mimer cette action et d'éviter la culture annexe de cellules murines.

### 1.6.2 Les cellules souches pluripotentes induites (iPS)

Les travaux de Takahashi et Yamanaka en 2006 (Figure 22) ont permis d'identifier un groupe de 24 gènes impliqués dans le maintien de capacités des cellules hESCs. Ils ont ainsi établi que l'expression artificielle d'un cocktail de 4 facteurs de transcription (Oct4, Klf4, Sox2 et c-Myc) est capable de « reprogrammer » des cellules somatiques de souris dans un état très proche des cellules souches embryonnaires de souris (mESC) <sup>76</sup>. Représentant une véritable révolution dans le domaine de la biologie des cellules souches, ces travaux ont été consacrés par un prix Nobel en 2012. Très peu de temps après, ces conclusions ont été confirmées sur des cellules humaines <sup>77</sup>.

Dans les années suivantes, de nombreuses études ont été réalisées pour identifier les étapes critiques dans le mécanisme de reprogrammation en cellules pluripotentes induites (iPS). L'une des étapes essentielles est le remodelage de la chromatine et la réactivation des

promoteurs des facteurs de transcription OCT4, SOX2, NANOG intrinsèques, afin d'assurer une boucle d'autorégulation positive <sup>78</sup>. Une autre étape critique dans le processus de reprogrammation cellulaire est de favoriser la transition mésenchymo-épithéliale, les cellules iPS ou hESC étant de nature épithéliale <sup>79,80</sup>.

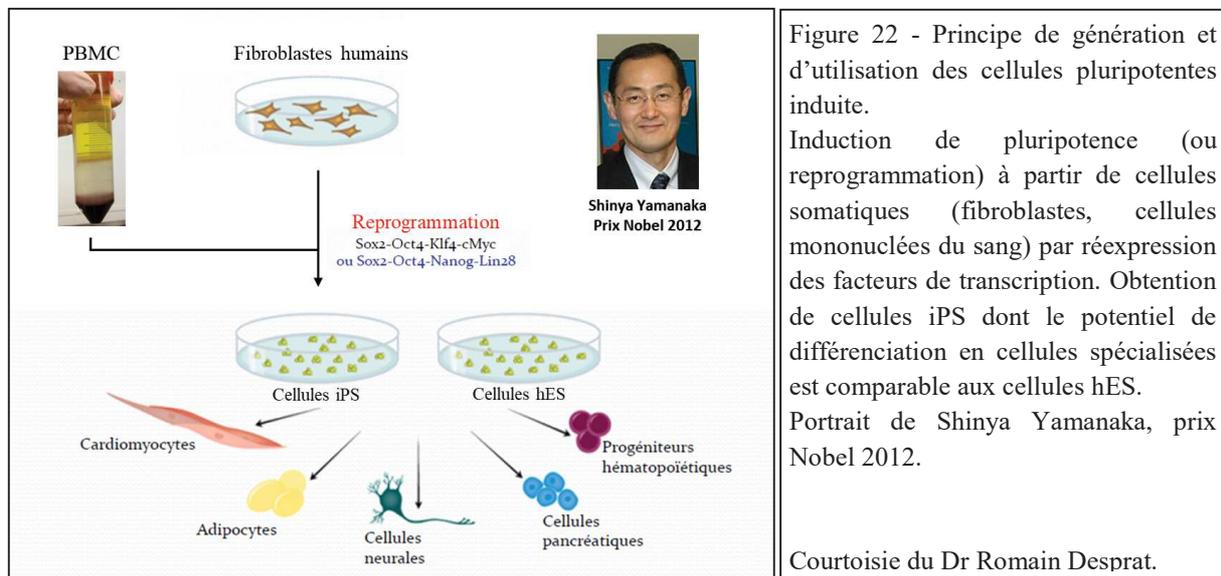


Figure 22 - Principe de génération et d'utilisation des cellules pluripotentes induite.

Induction de pluripotence (ou reprogrammation) à partir de cellules somatiques (fibroblastes, cellules mononuclées du sang) par réexpression des facteurs de transcription. Obtention de cellules iPS dont le potentiel de différenciation en cellules spécialisées est comparable aux cellules hES.

Portrait de Shinya Yamanaka, prix Nobel 2012.

Courtoisie du Dr Romain Desprat.

L'expression artificielle de ces 4 facteurs de transcription a été initialement induit par un vecteur lentiviral. L'infection des cellules humaines par les lentivirus engendre une augmentation significative du stress oxydant qui est responsable de cassures de l'ADN et de l'activation de p53. Cette activation de p53, couramment appelé « le gardien du génome », entraîne elle-même un arrêt du cycle cellulaire, induisant l'apoptose et la sénescence, ce qui diminue considérablement l'efficacité de reprogrammation <sup>81</sup>. Il est donc indispensable de pouvoir dépasser cet arrêt du cycle cellulaire médié par p53.

Les propriétés métaboliques des cellules sont également modifiées pendant la reprogrammation. Il est notamment observé une reconfiguration des mitochondries et du métabolisme bioénergétique <sup>82,83</sup>. La phosphorylation oxydante est diminuée dans les iPS, ce qui est obtenue par une glycolyse accrue et une activité mitochondriale plus faible. Ces modifications métaboliques semblent être elles-mêmes essentielles au processus de reprogrammation cellulaire <sup>84</sup>.

L'utilisation de rétrovirus pour apporter les facteurs de transcription indispensables à la reprogrammation est la source d'une instabilité génomique indésirable dans l'établissement de modèle cellulaire. Des procédés alternatifs ont été développés pour remplacer l'utilisation de lentivirus (Tableau 1) avec également leurs propres avantages et inconvénients. Le but ultime de ce développement est d'obtenir un processus sans produits xéno-génétiques pour rendre plus sûre l'utilisation des iPS, voire d'être utilisées en thérapie humaine.

| Type de vecteur  |                         | Facteurs de transcription                             | Efficacité (%) | Avantages  | Inconvénients   |
|------------------|-------------------------|---|----------------|--|---|
| Intégratif       | Rétrovirus              | OSKM<br>OSK<br>OSK + VPA<br>OS + VPA                  | 0,001 - 1      | Efficacité acceptable  | Intégration dans le génome, extinction provirale incomplète, cinétique lente                                      |
|                  | Lentivirus              | OSKM<br><i>miR302/367</i> + VPA                       | 0,1 - 1,1      | Efficacité acceptable et action sur les cellules en division ou non  | Intégration dans le génome, extinction provirale incomplète   |
|                  | Lentivirus inducibles   | OSKM<br>OSKMN   | 0,1 - 2        | Efficacité acceptable et contrôle de l'expression des facteurs   | Intégration dans le génome, nécessite une transactivation   |
| Éliminable       | Transposons             | OSKM  | 0,1            | Efficacité acceptable et pas d'intégration dans le génome  | Sélection difficile des lignées   |
|                  | <i>loxP</i> -lentivirus | OSK   | 0,1 - 1        | Efficacité acceptable et pas d'intégration dans le génome  | Sélection difficile des lignées, site <i>loxP</i> résiduels dans le génome  |
| Non intégratif   | Adénovirus              | OSKM  | 0,001          | Pas d'intégration dans le génome   | Faible efficacité   |
|                  | Plasmides               | OSNL  | 0,001          | Intégration rare dans le génome  | Faible efficacité, intégration accidentelle dans le génome  |
| Vecteurs non ADN | Virus Sendai            | OSKM  | 1              | Pas d'intégration dans le génome   | Difficultés d'élimination du vecteur répliquant   |
|                  | Protéines               | OS  | 0,001          | Pas d'intégration dans le génome, distribution directe des facteurs, pas de complications liées à l'utilisation d'ADN                            | Faible efficacité, demi-vie courte nécessitant de grandes quantités de protéines pures et de nombreux traitements |
|                  | ARN messagers modifiés  | OSKM<br>OSKML<br>+ VPA                                | 1 - 4,4        | Pas d'intégration dans le génome, pas de réponse antivirale innée, cinétique de reprogrammation plus rapide et contrôlable                       | Nécessite plusieurs cycles de transfection  |
|                  | MicroARN                | <i>miR-200c</i><br><i>miR-302s</i><br><i>miR-369s</i> | 0,1            | Bonne efficacité, pas d'intégration dans le génome, cinétique de reprogrammation rapide, pas d'utilisation de facteurs de transcription exogènes | Faible efficacité   |

Tableau 1 - Méthodes de reprogrammation des cellules somatiques en cellules iPS.

Abréviations des facteurs de transcription : K = KLF4, L = LIN28, M = c-MYC, N = NANOG, O = OCT4, S = SOX2, VPA = acide valproïque. Efficacité : pourcentage de cellules reprogrammées avec succès parmi l'ensemble des cellules ciblées.

### 1.6.3 Cellules souches mésenchymateuses

Les cellules souches mésenchymateuses (MSC) sont des cellules multipotentes du stroma qui peuvent se différencier en ostéoblastes, en chondrocytes, en myocytes et en adipocytes. De par ces propriétés de différenciation, les MSC représentent une source indispensable pour la recherche en médecine régénérative et un réel espoir dans la thérapie cellulaire <sup>85</sup>. Chez l'adulte, on peut isoler des MSC principalement à partir de la moelle osseuse, du sang périphérique et des tissus adipeux. On les trouve également dans la gelée de Wharton issue du cordon ombilical ainsi que dans le liquide amniotique <sup>86</sup>.

Morphologiquement, les MSC sont caractérisées par un petit corps cellulaire avec des extensions cytoplasmiques longues et minces. Le noyau est de grande taille et rond avec un nucléole proéminent. Le reste du corps cellulaire contient de petites quantités d'appareils de Golgi, de réticulum endoplasmique rugueux, de mitochondries et de polyribosomes. En culture, les MSC sont longues, minces et largement dispersées donnant un aspect fibroblastoïde.

Selon les recommandations de la Société Internationale de Thérapie Cellulaire (ISCT), trois critères permettent de définir ce qu'est une MSC <sup>87</sup>:

1. Les cellules doivent adhérer au plastique lors de la culture.
2. Des marqueurs de surface doivent être exprimés et d'autres sont exclus :
  - a. Phénotype positif (>95%) pour CD105, CD73 et CD90.
  - b. Phénotype négatif (<2%) pour CD45, CD34, CD14 (ou CD11b), CD79 $\alpha$  (ou CD19) et HLA-DR
3. Les cellules doivent présenter un potentiel de différenciation *in vitro* dans les 3 voies précitées.

Les syndromes du vieillissement précoce présentent des signes cliniques directement en lien avec des tissus dérivant des MSC comme la lipodystrophie, certaines anomalies osseuses, des malformations dentaires, ou encore, le retard staturo-pondéral. Même si certains de ces symptômes s'ils sont liés à une malformation et d'autres à une dégénérescence précoce, il est certain que le pool de cellules souches correspondant est impliqué dans l'apparition de ces signes. Il est donc intéressant, pour ces pathologies, d'étudier les lignées MSC et leurs voies de différenciation terminale.

Il est possible d'induire les cellules iPS dans la voie mésenchymateuse en deux étapes *in vitro*. Tout d'abord, l'inhibition de l'enzyme glycogène synthase kinase-3 (GSK-3) oriente les cellules iPS dans une voie similaire à celle retrouvée dans la ligne primitive embryonnaire. Puis l'apport de la protéine BMP4 permet une différenciation en cellules dont les capacités de différenciation sont semblables à celles de MSC <sup>88</sup>.

## 1.7 Instabilité génétique

L'instabilité génomique est définie par l'accumulation d'altérations du génome au fur et à mesure des divisions cellulaires. Les altérations sont classiquement distinguées selon leur taille : des anomalies de petites tailles, à l'échelle du nucléotide, sont représentées par les mutations ponctuelles jusqu'aux indels (remplacements de courtes séquences de nucléotides par d'autres) et les anomalies de grande taille concernant un ou plusieurs chromosomes <sup>89</sup>.

Ces anomalies s'accumulent avec le temps chez tous les organismes vivants, à une vitesse variable définissant le niveau d'instabilité. Les expositions aux radiations, les infections virales, le stress oxydant et le stress répliatif sont les sources les plus explorées d'instabilité génomique.

A l'échelle chromosomique, on distingue les anomalies du nombre des chromosomes dont l'origine est le plus souvent mitotique, des anomalies de la structure. Parmi elles, il est classiquement détaillées les anomalies simples, avec identification de deux points de cassure (délétion, inversion, translocation...), et des réarrangements complexes avec au moins trois points de cassures comme les insertions ou les translocations complexes <sup>90</sup>. Ce niveau de complexité atteint son paroxysme avec des mécanismes dits catastrophiques, comme le chromothripsis et le chromoanasythesis.

Dans le cas d'un chromothripsis (Figure 23 d'après Pellestor et *al.*<sup>91</sup>), un évènement localisé sur une ou plusieurs régions d'un chromosome entraîne une pulvérisation de la chromatine en petits fragments qui sont ensuite réparés au cours d'un seul cycle cellulaire. Les mécanismes de réparation sont alors saturés et de nombreuses erreurs dans le réagencement de ces segments apparaissent. Il en naît de nombreuses délétions, duplications et inversions dans la ou les régions chromosomiques concernées.

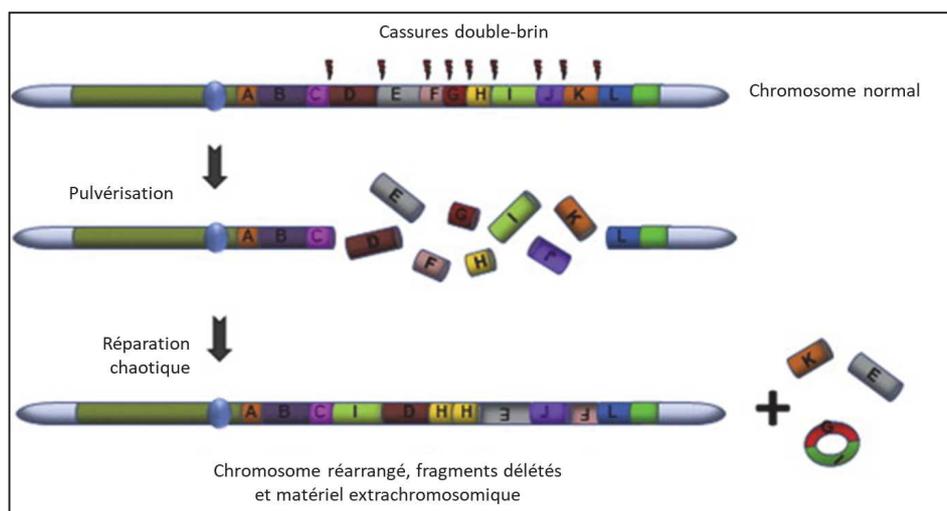


Figure 23 - principe mécanistique du chromothripsis.

Le mécanisme du chromoanasythesis est tout autant catastrophique mais ne prend pas naissance suite à une pulvérisation mais par un stress répliatif intense. La présence

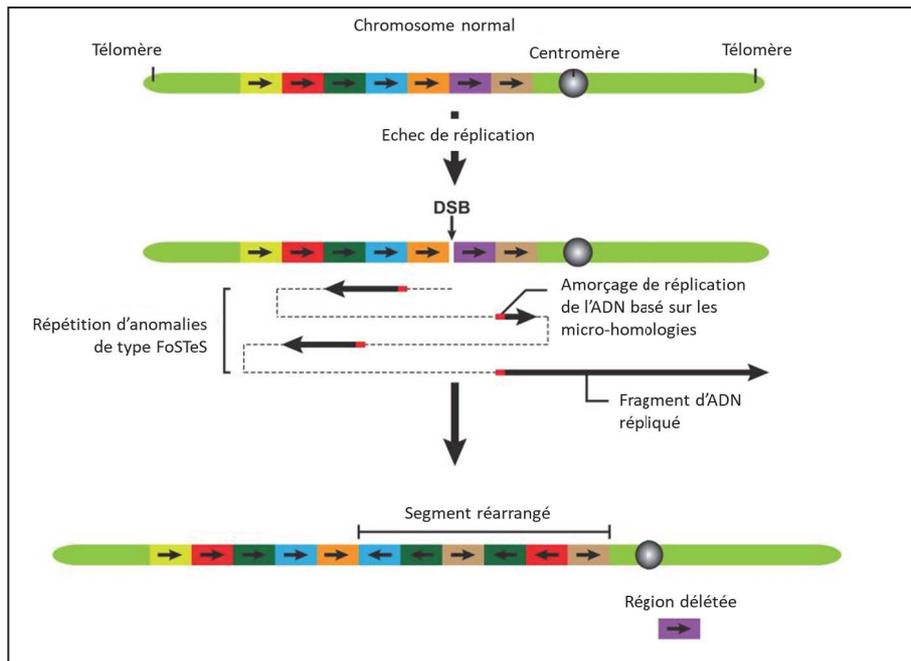


Figure 24 - Principe mécanistique du chromoanagenesis.  
DSB = cassure double-brin de l'ADN

d'obstacles sur les fourches de réplication oblige les complexes de réplication à changer plusieurs fois de brins modèles (mécanisme de type FoSTeS pour *Fork Stalling and Template Switching*) ou à produire des régressions de réplication (Figure 24 d'après Holland *et al.*<sup>92</sup>). Il en résulte de nombreux réarrangements chromosomiques dont les points de cassure sont localisés dans des régions de micro-homologies, signatures de ce mécanisme.

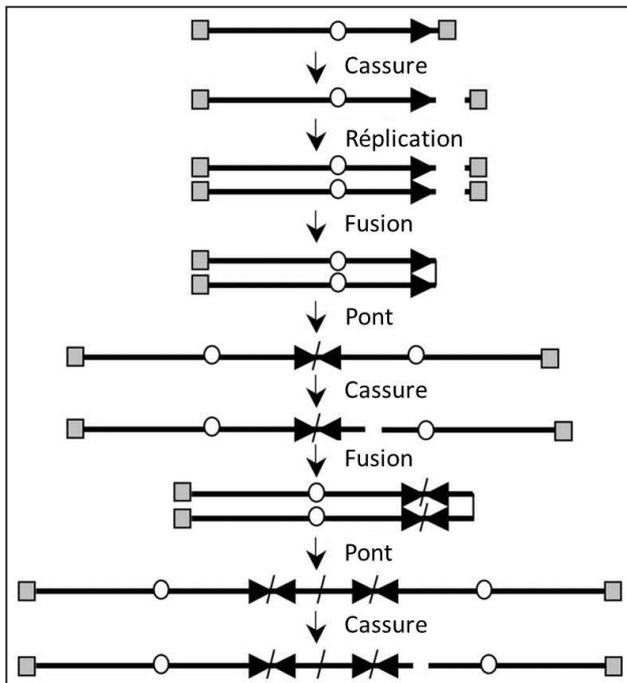


Figure 25 - Séquence cassure/fusion/pont amplifiant l'instabilité génomique

De plus, la présence même d'anomalies des chromosomes auto-entretient et amplifie l'instabilité génomique. En effet, les cassures double-brin à proximité des télomères peuvent provoquer une séquence appelée cassure/fusion/pont créant elle-même de nouvelles cassures chromosomiques et de nouveaux réarrangements (Figure 25 d'après Murnane *et al.*<sup>93</sup>). Egalement, l'hypothèse d'un effet interchromosomique entre anomalies de la structure et anomalies du nombre des chromosomes restent encore aujourd'hui débattue : la présence d'une translocation Robertsonienne augmenterait le risque d'anomalie du nombre des chromosomes en influençant leur ségrégation mitotique<sup>94,95</sup>.

Ces mécanismes ont notamment pu être compris en étudiant des syndromes dans lesquels l'instabilité génomique est particulièrement élevée, comme l'anémie de Fanconi (AF), l'ataxie télangiectasie (ATM), le *xeroderma pigmentosum* (XP) et le syndrome de Bloom<sup>96</sup>. Bien sûr, l'étude des tumeurs a également permis de mieux appréhender les mécanismes d'instabilité : ils sont à la fois le terrain et les acteurs du processus de cancérisation<sup>97</sup>.

L'établissement de nouveaux modèles cellulaires ou animaux à partir de ces pathologies permettra sans doute de mieux comprendre encore les voies de l'instabilité du génome.

## 2 Objectifs

Les syndromes de vieillissement précoce sont des maladies rares dont les mécanismes sont encore mal compris. La rareté des prélèvements biologiques oblige à trouver une source alternative pouvant présenter les caractéristiques cellulaires et tissulaires de la maladie et capable de générer autant de types cellulaires que ceux touchés par la pathologie. Les modèles d'étude animaux et les travaux sur cellules différenciées étant incomplets, l'étude des cellules souches de ces patients est une piste originale. Une solution s'offre à nous par la reprogrammation des cellules somatiques en cellules pluripotentes induites, évitant ainsi la manipulation d'embryons humains. Il s'agit donc d'une approche de choix pour étudier la physiopathologie d'un syndrome, que l'on souhaite récapituler en culture. Notre étude s'attache particulièrement aux syndromes du vieillissement précoce liés aux hélicases, c'est-à-dire les syndromes de Werner, Bloom et Rothmund-Thomson. Parallèlement à ces pathologies, nous nous intéressons également au syndrome de la Progéria de Hutchinson-Gilford, caractérisé par le début extrêmement précoce de la maladie, comme un « témoin positif » du vieillissement.

### 2.1 Génération de modèles d'étude des pathologies du vieillissement précoce

Pour cette étude, le premier objectif est d'établir des lignées de cellules iPS issues de patients atteints de syndromes du vieillissement précoce. Il est donc essentiel dans un premier temps de recruter les patients sur le territoire national, de réaliser des prélèvements biologiques et de sécuriser ces prélèvements. Vient ensuite l'induction de la pluripotence avec le choix d'une méthode efficace et non déstabilisante pour le génome des cellules à étudier. L'établissement de ces lignées passent aussi par la caractérisation des cellules iPS notamment en prouvant leur potentiel de pluripotence.

### 2.2 Récapitulation des pathologies du vieillissement précoce dans un modèle cellulaire

Etablir un modèle d'étude nécessite de prouver que les aspects de la maladie sont présents dans ce modèle à l'échelle de la cellule. Ainsi le deuxième objectif de ce travail est de retrouver les caractéristiques génomiques des patients dans les modèles iPS mais également de trouver un phénotype cellulaire distinctif pour chacun d'entre eux. A cette fin, nous souhaitons explorer différents paramètres des cellules en culture, comme leurs propriétés de recombinaisons chromosomiques, et aussi étudier leurs télomères et leurs membranes mitochondriales, à la recherche de différences significatives. Les pathologies du vieillissement précoces sont pour la plupart impliquées dans l'apparition d'une instabilité du génome. Certaines d'entre elles, comme les syndromes de Bloom et de Werner, sont même des

exemples souvent évoqués pour illustrer les états d'instabilité. Nous nous proposons donc d'étudier la stabilité de modèles générés, notamment par l'établissement des caryotypes et par analyses sur puce à ADN.

### **2.3 Evolution du modèle des pathologies du vieillissement précoce au travers des différenciations cellulaires**

La pluripotence des cellules iPS peut être mise en œuvre pour orienter leur différenciation vers un tissu d'intérêt. Ainsi, il est possible de générer des cellules souches mésenchymateuses (MCS) à partir des cellules iPS, elles-mêmes multipotentes et potentiellement inductibles en adipocytes, ostéocytes et chondrocytes, notamment. La symptomatologie des syndromes du vieillissement précoce est en lien avec ces types cellulaires puisqu'on rencontre fréquemment des signes cliniques comme la lipodystrophie, certaines anomalies osseuses, des malformations dentaires, ou encore, le retard staturo-pondéral. Notre dernier objectif est donc de mener les cellules iPS dans ces voies de différenciation et d'observer leur évolution sur les plans de la stabilité génomique et des phénotypes cellulaires identifiés lors de la récapitulation des pathologies.

## 3 Matériels et Méthodes

### 3.1 Recrutement des patients et prélèvements

#### 3.1.1 Recrutement national et recueil du consentement des patients

Dans le cadre d'un appel d'offre interne « Jeune Chercheur » du CHU de Montpellier, nous avons pu réaliser un recrutement national de patients souffrant de syndrome du vieillissement précoce et avec l'aide des réseaux nationaux de praticiens en génétique médicale. Les centres hospitalo-universitaires et les praticiens ayant participé au recrutement des patients sont les suivants :

- CHU de Montpellier, Pr Pujol
- CHU de Nantes, Dr Isidor
- CHU de Rouen, Dr Goldenberg

Au cours d'une consultation spécialisée en génétique, l'étude est proposée et expliquée au patient. S'il accepte, son consentement écrit est recueilli. Des prélèvements sont alors réalisés.

#### 3.1.2 Origines et caractéristiques des prélèvements et cellules

Pour l'ensemble des techniques réalisées, le Tableau 2 résume l'origine des cellules de patients et de témoins, ainsi que le(s) type(s) cellulaire(s) disponible(s).

| Lignée              | Patient/Donneur |     | Type cellulaire disponible |      |       |     | Inclusion      | Remarque/Origine  |
|---------------------|-----------------|-----|----------------------------|------|-------|-----|----------------|---|
|                     | Sexe            | Age | Lympho                     | PBMC | Fibro | MSC |                |   |
| Werner              | M               | 53  | x                          | x    | x     |     | AOI JC         |   |
| Bloom               | F               | 18  | x                          | x    | x     |     | AOI JC         |   |
| RT                  | F               | 40  | x                          | x    | x     |     | AOI JC         |   |
| Progéria            | M               | 2   |                            | x    |       |     | Collaboration  | Département de génétique du CHU de Nantes :<br>Dr Isidor, Dr David              |
| BJ                  | M               | NN  |                            |      | x     |     | Achat          |   |
| Témoin EFS          | M               | NR  |                            | x    |       |     | Patient EFS    | Recueil lors d'une saignée,<br>hémochromatose                                   |
| 25RUI               | M               | 58  |                            |      |       | x   | Protocole ISIS | Cellules données par l'équipe du<br>Dr Brondello de l'IRBM                      |
| Lymphocytes témoins | F               | 19  | x                          |      |       |     | Diagnostic     | Département de génétique du<br>CHU de Montpellier,<br>témoin pour technique SCE |
| hESC                | NR              | NA  |                            |      |       |     |                | Utilisation de l'ARN extrait<br>d'hESC pour témoin du<br>transcriptome          |

Tableau 2 - Origines et caractéristiques des cellules disponibles.

RT = Rothmund-Thomson, Lympho = lymphocytes, PBMC = cellules mononuclées du sang, Fibro = fibroblastes, MSC = cellules souches mésenchymateuses, M = masculin, F = féminin, Age exprimé en années, AOI JC = Appel d'offre interne jeune chercheur, NN = nouveau-né, NR = non renseigné, NA = non applicable.

### 3.1.3 Prélèvements biologiques et cultures primaires

Suite au recueil du consentement, des prélèvements de sang sur tubes EDTA et tubes héparinés sont réalisés, ainsi qu'une biopsie cutanée. Ces prélèvements sont envoyés le plus rapidement possible à l'unité de génétique chromosomique du CHU de Montpellier pour leur prise en charge.

Le sang sur EDTA sert à l'extraction d'acides nucléiques. Le sang sur héparine est utilisé pour isoler les PBMC et pour réaliser le caryotype lymphocytaire. La biopsie cutanée est dilacérée et ensemencée pour une culture des fibroblastes.

Les techniques de mises en culture sont celles habituellement utilisées dans les laboratoires de cytogénétique et selon les recommandations de l'Association des Cytogénéticiens de Langue Française.

L'isolement des PBMC est fait par une technique de centrifugation sur un gradient de Ficoll (Annexe 1).

### 3.1.4 Extraction d'acides nucléiques

Les extractions d'ADN à partir du sang sur EDTA et à partir des cultures cellulaires ont été réalisées avec les kit QIAamp DNA Blood Midi et QIAamp DNA Mini de Qiagen® respectivement, et selon les recommandations du fournisseur.

Les extractions d'ARN à partir des cultures cellulaires ont été réalisées avec le kit RNeasy Mini Qiagen®, et selon les recommandations du fournisseur.

## 3.2 **Identification génétique des lignées**

### 3.2.1 Séquençage Sanger des mutations pathologiques

Les informations concernant les mutations pathologiques portées par les patients Werner, Bloom, RT et HGPS sont renseignées par les médecins généticiens les ayant inclus dans l'étude.

Des amorces de séquençage sont dessinées avec le logiciel libre de droit et en ligne Primer-BLAST hébergé sur le site du NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). La spécificité de ces amorces est testée sur le logiciel libre de droit et en ligne In-Silico PCR hébergé sur le site UCSC (<https://genome.ucsc.edu>). Les amorces sont commandées, fabriquées et livrées par IDT®.

Les réactions d'amplification et de séquençage sont celles habituellement réalisées dans les laboratoires de génétique moléculaire, avec les kits Master Mix® (Promega) et BigDye™ Terminator v3.1 (Applied Biosystems) respectivement. Les produits des réactions de séquençage sont purifiés sur plaque de silice G50 Sephadex®.

L'électrophorèse capillaire est réalisée sur l'automate 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems®). Les fichiers de séquençage sont alignés sur la séquence de référence et les variants sont identifiés sur le logiciel SeqScape (Applied Biosystems®).

La nomenclature des variants identifiés est vérifiée sur le logiciel libre de droit et en ligne Mutalyzer hébergé sur le site <https://mutalyzer.nl/>.

La fréquence des variants dans la population générale est interrogé sur la base de données ExAC hébergé sur le site <http://exac.broadinstitute.org/>.

### 3.2.2 Polymorphisme de répétition des régions micro-satellites

L'étude des polymorphismes de répétition des régions micro-satellites est réalisée avec le kit PowerPlex® 16 System (Promega) sur les ADN extraits précédemment. Le protocole du fournisseur est respecté. L'analyse des fragments est réalisée par électrophorèse capillaire sur l'automate 3130xl Genetic Analyzer® (Applied Biosystems). Les résultats sont interprétés sur le logiciel GeneMapper® ID Software v3.2 (Promega) et selon les recommandations du fournisseur.

## 3.3 Génération et culture des cellules souches pluripotentes induites (iPS)

### 3.3.1 Induction de pluripotence

La reprogrammation de cellules somatiques en cellules iPS est réalisée par infection avec un vecteur de type virus Sendai. Il s'agit d'un virus à ARN monocaténaire qui se réplique dans le cytoplasme des cellules infectées. L'ARN ainsi produit est traduit sans intégration dans le génome hôte, ce qui évite l'instabilité qui est habituellement rencontrée avec les vecteurs de type lentivirus. Le vecteur utilisé est dépourvu du gène de fusion rendant impossible la formation de nouvelles particules infectantes. Ainsi le virus va être « dilué » au cours des divisions cellulaires successives : il est couramment admis que le virus Sendai est entièrement éliminé après le 10<sup>ème</sup> passage des cultures après reprogrammation.

L'infection utilise le kit de reprogrammation CytoTune™-iPS 2.0 Sendai (Invitrogen) qui combine plusieurs vecteur Sendai permettant l'expression des facteurs de transcription OKSM (Oct3/4, Klf4, Sox2 et c-Myc).

La concentration de vecteur délivré s'exprime en MOI (*Multiple Of Infection*). Une MOI égale à 1, correspond à la quantité de virus nécessaire pour infecter une cellule. Initialement utilisée pour les infections par lentivirus, les constructeurs des kits Sendai continuent d'utiliser cette unité de concentration. Le kit utilisé permet une délivrance équivalente aux MOI suivantes :

- Oct3/4 : MOI = 5
- Klf4 : MOI = 8
- Sox2 : MOI = 5
- c-Myc : MOI = 5

Le titre de chacun des vecteurs est disponible sur le site internet du fabricant et le volume de virus à ajouter au milieu de culture est calculé ainsi :

$$\text{Volume de virus (mL)} = \frac{\text{MOI} \times \text{nombre de cellules}}{\text{Titre du virus}}$$

### 3.3.1.1 Induction sur cellules fibroblastiques

L'induction est réalisée à partir de fibroblastes pour les lignées RT et le témoin BJ.

Les cellules sont cultivées comme habituellement avec un milieu adapté (DMEM + 10% de sérum de veau fœtal) et passées 2 jours avant l'infection, puis le calendrier suivant est respecté :

- J0 : l'infection est réalisée en ajoutant le volume de virus calculé selon la formule précitée.
- J1 : le milieu contenant le virus est éliminé et remplacé par du milieu pour fibroblastes.
- J7 : les cellules sont passées sur des boîtes tapissées de MatriGel® selon les recommandations du fournisseur et avec du milieu pour fibroblastes.
- J8 : changement de milieu de culture pour du E8 (Cf. 3.3.2 « Culture des colonies iPS »).

### 3.3.1.2 Induction sur PBMC

L'induction est réalisée à partir des PBMC pour les lignées Werner, Bloom, Progéria et Témoin EFS.

Le principe de cette reprogrammation est de stimuler les progéniteurs indifférenciés CD34+ du sang dans la voie érythroïde pendant une semaine puis de réaliser l'infection par le virus Sendai avec des MOI doublés par rapport aux recommandations du kit. De plus l'inoculation du virus se fait par une centrifugation à grande vitesse, appelée « spinoculation ». Cette optimisation a été faite selon les travaux de Churko *et al.*<sup>98</sup>

La stimulation dans la voie érythroïde est réalisée avec le milieu Stem Span SFEM II (Stemcell®) et selon les recommandations du fournisseur. L'annexe 2 détaille le protocole technique de la reprogrammation sur PBMC.

### 3.3.2 Culture des colonies iPS

L'apparition des colonies est surveillée au microscope optique quotidiennement. Dès que les colonies sont de taille suffisante, un *picking* est réalisé, c'est-à-dire un passage mécanique manuel. Les colonies ainsi développées sont mélangées sans suivi de clonalité. L'annexe 3 en détaille les aspects techniques. Une partie des colonies est laissée dans la boîte d'induction pour réaliser le dépistage de l'activité phosphatase alcaline (Cf. 3.4.1 « Détection de l'activité

phosphatase alcaline »). Le milieu de culture utilisé est du Essential 8™ (Gibco), couramment appelé E8, selon la description de Thomson *et al.*<sup>99</sup>

Une fois les colonies en culture, des passages non enzymatiques sont réalisés toutes les semaines ou dès que la confluence est atteinte. Les détails techniques sont indiqués en annexe 3.

## 3.4 Caractérisation de la pluripotence

### 3.4.1 Détection de l'activité phosphatase alcaline

Considérée comme un dépistage des colonies à potentiel de pluripotence, la mise en évidence de l'activité phosphatase alcaline est réalisable dès l'émergence des premières colonies. Le kit Vector® Red Alkaline Phosphatase Substrate a été utilisé selon les recommandations du fournisseur (Annexe 4).

### 3.4.2 Marqueurs de surface et marqueurs nucléaires

#### 3.4.2.1 Immunofluorescence

Les cellules iPS sont cultivées sur lamelles de verre tapissées de MatriGel® et disposées dans des plaques 6-puits, dans les conditions décrites au paragraphe 3.3.2 « Culture des colonies iPS ».

Les anticorps utilisés, conjugués à des fluorochromes (Stem Light® Pluripotency cell signaling kit Cat 9656) sont les suivants :

- Oct-4A (C30A3) Rabbit IgG - AlexaFluor® (vert)
- Sox2 (D6D9) XP Rabbit IgG - AlexaFluor® (vert)
- Nanog (D73G4) XP Rabbit IgG - AlexaFluor® (vert)
- SSEA4 (MC813) Mouse IgG3 - PE (rouge)
- TRA-1-60 Mouse IgM - PE (rouge)
- TRA-1-81 Mouse IgM - PE (rouge)

Les étapes de préparation sont les suivantes :

- Lavage rapide au PBS préchauffé.
- Fixation 15 minutes dans du paraformaldéhyde 4% à température ambiante.
- 3 lavages au PBS de 5 minutes.
- Solution de blocage (saponine 1% + sérum de veau fœtal 5% dans PBS) pendant 60 minutes à température ambiante.
- Dilution des anticorps au 1/200 dans la solution de blocage et incubation des cellules une nuit à 4°C.
- 3 lavages au PBS de Dulbecco de 5 minutes.
- Montage et fixation sur une lame de verre avec une goutte de Vectashield® contenant le contre-colorant au DAPI.

La lecture est réalisée au microscope à fluorescence aux longueurs d'onde adéquates.

### 3.4.2.2 Cytométrie en flux

Les cellules iPS sont cultivées comme habituellement, mises en suspension par l'action non enzymatique du Versene® et incubées 20 minutes à température ambiante avec les anticorps suivants, conjugués à des fluorochromes (Stem Light® Pluripotency cell signaling kit Cat 9656) :

- Oct-4A (C30A3) Rabbit IgG - AlexaFluor® (vert)
- Sox2 (D6D9) XP Rabbit IgG - AlexaFluor® (vert)
- Nanog (D73G4) XP Rabbit IgG - AlexaFluor® (vert)
- SSEA4 (MC813) Mouse IgG3 - PE (rouge)
- TRA-1-60 Mouse IgM - PE (rouge)
- TRA-1-81 Mouse IgM - PE (rouge)

L'analyse par cytométrie en flux est réalisée sur un automate FACS CANTO II Becton Dickinson® sur le plateau de cytométrie MRI à l'IRBM, aux longueurs d'onde indiquées. Le logiciel de pilotage et d'enregistrement utilisé est Diva® et les données visualisées sur FlowJo®.

### 3.4.3 Tératomes sur souris

La confirmation formelle du caractère de pluripotence des colonies est obtenue par la démonstration de leur capacité à redonner des tissus dérivants des 3 feuillets embryonnaires (endoderme, mésoderme, ectoderme). Ceci est observable lors de la formation de tératomes *in vivo* chez la souris immunodéficiente après greffe intradermique de ces colonies.

Les souris retenues pour cette expérience sont des NOD Scid Gamma de 4 semaines (Laboratoires Charles Rivier) hébergées à l'animalerie de l'INM (Institut de Neurosciences de Montpellier).

Les colonies à tester sont amplifiées en boîtes de 60mm et traitées avec un inhibiteur de Rho-Kinase. Elles sont ensuite incluses dans 200 µL de Matrigel® froid et disposées dans une seringue sur glace. Les injections, le suivi des souris et les sacrifices sont réalisés par un expérimentateur agréé.

L'autopsie permet de récupérer les pièces anatomiques d'intérêt qui sont lavées au PBS puis fixées au paraformaldéhyde 4% sur une nuit. Après un nouveau lavage à l'éthanol 70%, ces pièces sont incluses dans des cassettes dédiées et identifiées. L'inclusion en paraffine, la coupe, le montage sur lame, les colorations et l'expertise histologique sont confiés au RHEM (Réseau d'Histologie Expérimentale de Montpellier) sur le site de l'IRCM (Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier).

Sur le plateau technique du RHEM, l'analyse histologique est réalisée sur les nodules tumoraux prélevés, fixés puis inclus en paraffine. Une coupe de chaque bloc est colorée à

l'HES (Hémalun Eosine Safran) pour observer les structures histologiques présentes sur la lame. Une autre coupe est colorée par le PAS (*Periodic Acid Schiff*) pour mettre en évidence en rose fuchsia les glycosaminoglycanes et les glucides complexes typiques des cellules mucipares, caractéristiques de l'épithélium respiratoire et digestif, deux épithéliums dérivés de l'endoderme. Les structures histologiques observées sont répertoriées, photographiées et classées dans un tableau en fonction de l'origine de leur feuillet embryonnaire : ectoderme, mésoderme et endoderme.

Le protocole expérimental sur animaux vivants est validé par la direction générale pour la recherche et l'innovation du ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche.

### 3.5 Transcriptome

L'étude du transcriptome est réalisée par hybridation sur une puce GeneChip™ Human Genome U133 Plus 2.0 Array. Avec 10 000 sondes, ce format de puce d'expression permet d'étudier 6 500 gènes et 47 000 transcrits.

La vérification de la qualité des ARN ainsi que les réalisations techniques d'hybridation et de lecture des puces d'expression sont faites par la plateforme hospitalière « Transcriptome » de l'IRMB du CHU de Montpellier. Une étape de normalisation des résultats bruts est faite avec le logiciel du fournisseur Expression Console (Affymetrix®). Le mode de normalisation *3' expression array RMA* utilisé est celui recommandé par la fabricant.

Les résultats normalisés sont ensuite analysés sur le logiciel *Transcriptome Analysis Console v3.0* (Affymetrix®) fourni par le fabricant. Ce logiciel permet notamment d'évaluer la corrélation de rang de Spearman sous forme de diagrammes et également de réaliser des analyses non supervisées sur le transcriptome ou sur des gènes d'intérêt. Lorsque plusieurs transcrits sont disponibles, la valeur d'expression retenue est la médiane de ces expressions.

### 3.6 Etude du cycle cellulaire

Il est possible d'évaluer les proportions de cellules en culture dans chacune des 3 phases du cycle cellulaire (G0/G1, S et G2/mitose) par l'incorporation de BrdU et d'iodure de propidium au cours du cycle, puis par une analyse par cytométrie en flux.

Le BrdU est un analogue de la thymine et s'incorpore dans l'ADN uniquement au moment de la phase de réplication. L'iodure de propidium est un intercalant de l'ADN et s'insère dans toutes les molécules d'ADN néosynthétisées ou ancestrales. Le temps d'incorporation du BrdU est inférieur à celui de la phase S afin de ne pas confondre les cellules en phase S et les cellules en phase G2.

La présence de BrdU est révélée par un anticorps anti-BrdU lui-même détecté par un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome émettant à 519 nm. L'iodure de propidium est naturellement fluorescent et émet à 617 nm. L'analyse par cytométrie en flux permet de déterminer des nuages de points correspondant à chacune des phases du cycle cellulaire et d'en déterminer les proportions (Figure 26, d'après Ceccini *et al.* <sup>100</sup>)

L'Annexe 5 décrit le protocole technique en détail.

Les anticorps utilisés sont les suivants :

- Anticorps anti-BrdU (BD® 347580, n°408)
- Anticorps secondaire anti-murine Alexa® 488 nm

L'analyse par cytométrie en flux est réalisée sur un automate FACS CANTO II Becton Dickinson® sur le plateau de cytométrie MRI à l'IRBM, aux longueurs d'onde indiquées. Le logiciel de pilotage et d'enregistrement utilisé est Diva® et les données visualisées sur FlowJo®.

### 3.7 Etude de la stabilité génomique

#### 3.7.1 Caryotype

Les caryotypes ont été établis avec les techniques habituelles de l'unité de génétique chromosomique du CHU de Montpellier. L'examen est réalisé sur 10 à 15 métaphases lorsque cela est possible et sur 50 métaphases en cas de suspicion de mosaïque. La résolution est évaluée avec les modèles habituellement utilisés dans les laboratoires de cytogénétique et selon les recommandations de l'Association des Cytogénéticiens de Langue Française (ACLF).

Pour les cellules en culture adhérentes lâches comme les fibroblastes et les MSC, les caryotypes ont été réalisés *in situ*, après culture en chambre de type Labtek®.

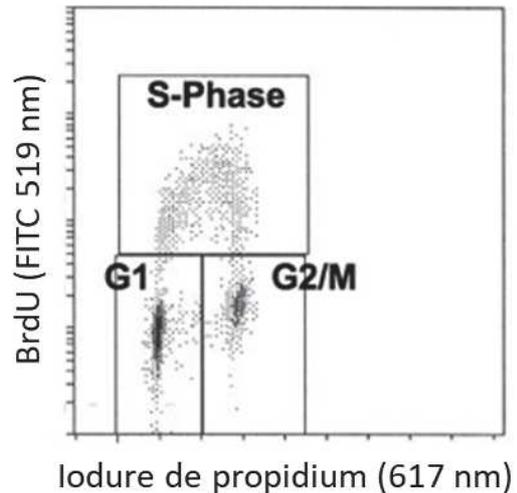


Figure 26 - Principe de l'étude du cycle cellulaire par marquage au BrdU et à l'iodure de propidium. Graphique bidimensionnel présentant l'émission de fluorescence à 617 nm en abscisse (fluorescence de l'iodure de propidium) et à 519 nm en ordonnée (BrdU marqué par des anticorps primaire et secondaire couplé au FITC). Identification de 3 nuages de points correspondant aux cellules en phase G1, S ou G2/mitose.

Pour les cellules en culture adhérentes en colonies serrées comme les cellules iPS, ainsi que pour les cellules en culture non adhérentes comme les lymphocytes et les PBMC, les caryotypes ont été réalisés après étalement d'un culot cytogénétique établi préalablement.

L'Annexe 6 décrit les détails techniques de ces méthodes.

### 3.7.2 FISH

Lorsqu'une anomalie cytogénétique a été décelée par l'analyse du caryotype ou par l'ACPA, un examen par hybridation fluorescente *in situ* (FISH) a été réalisé pour confirmer cette anomalie et apporter plus d'information sur sa structure et évaluer une éventuelle mosaïque. L'examen est réalisé sur 100 noyaux et 30 métaphases lorsque cela est possible.

Les sondes utilisées et leur fabricant sont les suivantes :

- Kit multi-FISH 24 couleurs *24XCyte Human Multicolor FISH Probe* (MetaSystem)
- Sondes centromériques *Satellite Enumeration Probes* (CytoCell)
- Sondes subtélomériques (Aquarius - CytoCell)

La méthode utilisée est celle du fournisseur et selon les recommandations de l'Association des Cytogénéticiens de Langue Française (ACLF). La plaque chauffante utilisée pour la co-dénaturation des sondes et de la chromatine cible est un HyBrite®

### 3.7.3 Analyse Chromosomique par Puce à ADN (ACPA)

L'ACPA permet de mettre en évidence les CNV (*copy number variation*) c'est-à-dire les anomalies quantitatives du génome, comparativement à un témoin réputé sain. L'ACPA ne montre pas les anomalies de la ploïdie, les mosaïques chromosomiques, les réarrangements de moins de 300 kilobases.

Ces analyses ont été réalisées sur la plateforme régionale des « puces à ADN » de l'unité de génétique chromosomique du CHU de Montpellier. Les puces à hybrider sont des SurePrint G3 Human 8x 60k (Agilent).

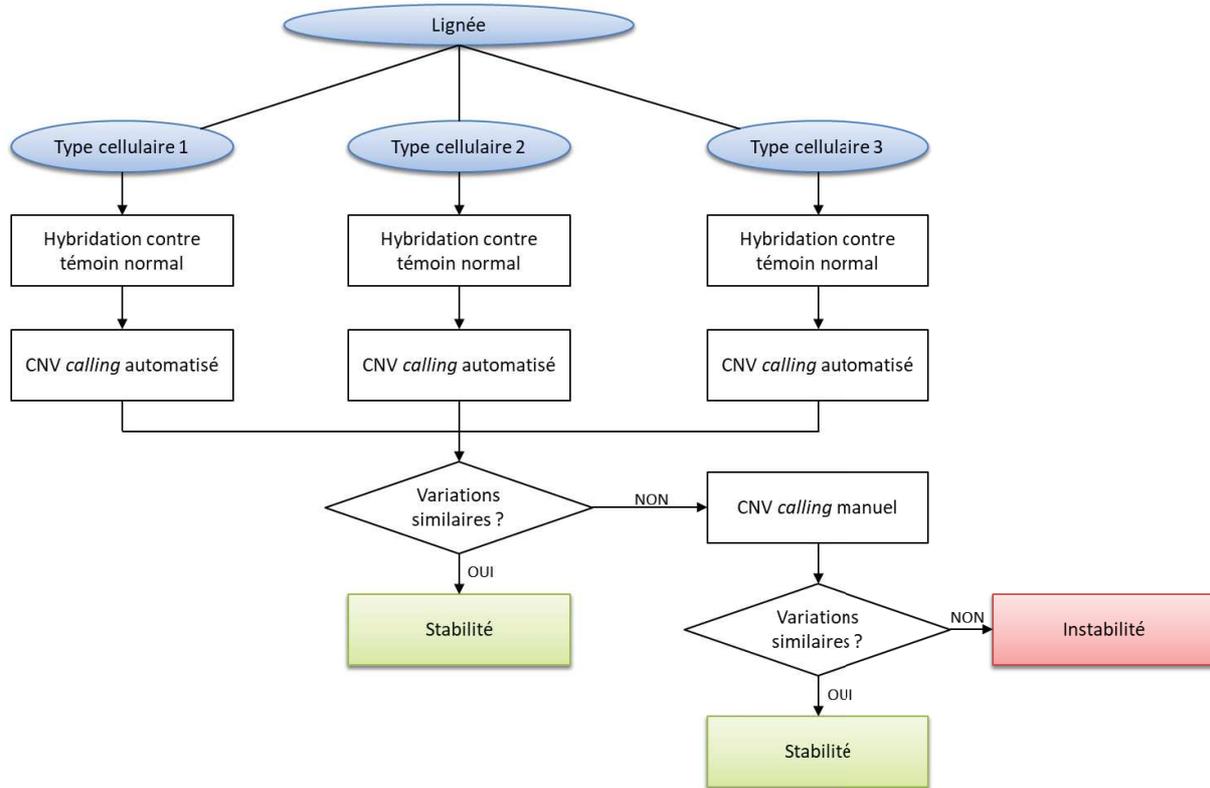
La méthode utilisée est celle du fournisseur et selon les recommandations de l'Association des Cytogénéticiens de Langue Française (ACLF). Il s'agit d'une hybridation comparative cellules d'intérêt contre témoin apparié sur le sexe (fournisseur Agilent).

La lecture des lames est faite par un scanner automatisé *SureScan Microarray Scanner* (Agilent) et l'analyse est réalisée sur le logiciel du fournisseur CytoGenomics v4.0.3 (Agilent) avec les paramètres personnalisés suivants :

- Algorithme : ADM-2, threshold 6
- CNV *Calling* : Sondes consécutives : 6  
Log2R mini délétion : -0.80  
Log2R mini duplication : +0.50

L'identification des CNV est fait par une méthode automatisée avec les paramètres précités et, si nécessaire, par une méthode manuelle visuelle par observation des déviations sonde à sonde dans une région d'intérêt.

La comparaison des résultats est faite selon l'algorithme suivant :



Les résultats sont ensuite résumés dans un tableau.

### 3.8 Phénotypes cellulaires spécifiques des pathologies du vieillissement précoce

#### 3.8.1 Etude des télomères par Q-FISH

La quantification des télomères par FISH a été démontrée par Lansdorp *et al.*<sup>101</sup> dès 1996 puis par Hultdin *et al.*<sup>102</sup> en 1998 avec une bonne corrélation entre la longueur des télomères estimée par Southern blot et l'intensité du signal obtenu suite à l'hybridation de sondes PNA fluorescentes spécifiques des régions télomériques.

Les PNA (*Peptide Nucleic Acid*) sont des molécules artificielles mimant la structure des acides nucléiques naturels (ADN et ARN) dont le squelette n'est pas phosphaté. Cette propriété chimique permet une interaction PNA-ADN plus forte que l'interaction ADN-ADN<sup>103</sup>. Ici, ces molécules miment l'hexanucléotide des télomères et sont couplées à un fluorochrome FITC pour former une sonde utilisable pour l'hybridation *in situ*.

Les cellules sont cultivées selon le protocole habituel, puis un culot cytogénétique est réalisé, identique à celui préparé pour l'étude du caryotype (Annexe 3). Les cellules sont ensuite étalées sur une lame de verre. Les étapes successives de prétraitement, hybridation et lavage sont décrites en Annexe 7 avec l'utilisation du kit PNA FISH FITC DAKO®.

La capture et l'analyse des images ont été réalisées avec l'aide de la plate-forme MRI (Montpellier Ressources Imagerie) sur le site de l'IGH (Institut de Génétique Humaine). Le microscope à épifluorescence utilisé est un AxioImager Zeiss® piloté par le logiciel fournisseur Zen. L'analyse des images, réalisée sur le logiciel libre de droit CellProfiler, a permis d'isoler les signaux de fluorescence pour s'affranchir du bruit de fond et d'en mesurer l'intensité. Ce logiciel est capable d'identifier les signaux provenant d'un même noyau, permettant ainsi de mesurer la fluorescence globale par noyau. L'unité de mesure est une unité arbitraire de fluorescence. L'optimisation des paramètres d'analyse du logiciel CellProfiler a été réalisée en collaboration avec Mme Amélie Sarrazin et M. Julio Mateos Langerak, ingénieurs de la plate-forme MRI.

#### 3.8.2 Echange entre chromatides sœurs

L'instabilité génomique engendrée par le déficit en hélicase augmente le taux de recombinaisons, ce qui est particulièrement vrai pour l'hélicase BLM. Il est possible de visualiser ces recombinaisons par des échanges entre chromatides sœurs (ou SCE pour *Sister Chromatid Exchange*) sur les chromosomes mitotiques en métaphase.

La technique consiste à incorporer du BrdU dans l'ADN en réplication pendant deux cycles cellulaires consécutifs. De par le

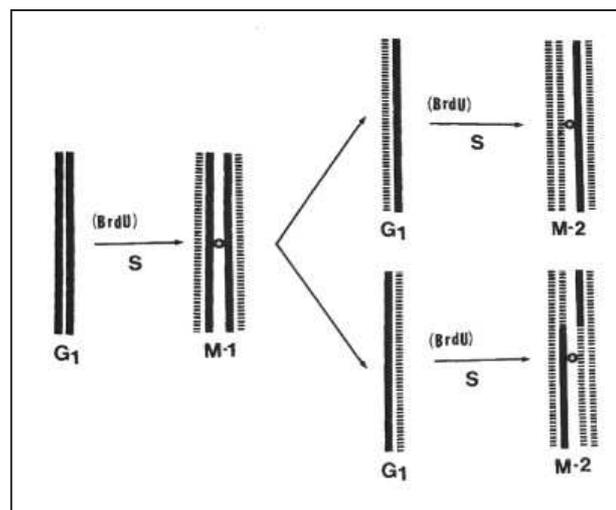


Figure 27 - principe d'incorporation du BrdU dans l'ADN en réplication pour la technique SCE (*Sister Chromatid Exchange*).

principe de réplication semi-conservative de l'ADN, seule une chromatide sur les deux chromatides sœurs aura ses deux brins d'ADN incorporé au BrdU ; l'autre chromatide n'ayant qu'un seul des deux brins incorporé (Figure 27). Cette différence de teneur en BrdU confère à la chromatide la plus incorporée une meilleure affinité pour le colorant de Hoechst et une augmente ainsi sa sensibilité aux UV.

Après une photodégradation contrôlée et marquage au Giemsa, on peut voir une coloration plus claire pour la chromatide ayant la plus forte teneur en BrdU et donc la plus photodégradée. Ainsi, il est possible de visualiser les échanges de matériel entre deux chromatides qui ont eu lieu au cours de ces deux cycles cellulaires.

Le nombre d'échange observé pour chaque mitose est répertorié, ainsi que le nombre de chromosomes présents dans ces mitoses. Le nombre d'échanges interchromatidiens est normalisé par le nombre de chromosome et multiplié par 100 pour former un score. Puis sont calculés les médianes et les écarts-types de chacun des scores établis.

L'annexe 8 détaille le protocole de la technique.

### 3.8.3 Perméabilité membranaire des mitochondries

Le potentiel de membrane des mitochondries est indispensable pour la production d'ATP. Ce potentiel, noté  $\Delta\Psi$ , est un gradient électrique d'environ 180 à 200 mV. Il est possible d'évaluer ce gradient grâce au cation lipophile JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide). Ce marqueur fluorescent présente une longueur d'onde d'émission vers 590 nm (couleur verte) lorsqu'il est présent en monomère mais cette émission est modifiée à 488 nm (couleur rouge) sous sa forme agrégée. On sait également que la concentration de JC-1 à l'intérieur de la mitochondrie est dépendante du potentiel  $\Delta\Psi$ .

Ainsi une mitochondrie à potentiel de membrane conservé présente une fluorescence rouge après incorporation de JC-1. Au contraire, la dépolarisation de la membrane mitochondriale fait apparaître une émission de fluorescente verte. La formation des agrégats de JC-1 débute à un potentiel d'environ 80 à 100 mV et atteint son maximum aux alentours de 200 mV. <sup>104</sup>

L'étude du potentiel de membrane est réalisée avec le kit MitoProbe™ JC-1 Assay (ThermoFischer, catalogue n°M34152). Les cellules sont remises en suspension avec le procédé habituellement utilisé pour les passages puis laissées en incubation à 37°C et à l'abri de la lumière avec du JC-1 à une concentration finale de 2  $\mu$ M pendant 30 minutes. Un témoin négatif est réalisé de la même manière en ajoutant du CCCP (carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone) à une concentration finale de 50  $\mu$ M.

L'analyse par cytométrie en flux est réalisée sur un automate FACS CANTO II Becton Dickinson® sur le plateau de cytométrie MRI à l'IRBM, aux longueurs d'onde indiquées. Le logiciel de pilotage et d'enregistrement utilisé est Diva® et les données visualisées sur FlowJo®.

### 3.9 Dérivation des cellules iPS en cellules souches mésenchymateuses

L'induction de différenciation des cellules iPS en cellules MSC est réalisée en utilisant le kit Mesoderm Induction Medium (StemCell®) et en suivant les recommandations du fournisseur. Au 5<sup>ème</sup> jour d'induction, les cellules sont passées sur des boîtes sans Matrigel®. A partir de ce jour, le milieu de culture est progressivement remplacé par le milieu spécifique des MSC :

- 1<sup>er</sup> changement : 75% Mesoderm Induction Medium + 25% milieu pour MSC.
- 2<sup>ème</sup> changement : 50% Mesoderm Induction Medium + 50% milieu pour MSC.
- 3<sup>ème</sup> changement : 25% Mesoderm Induction Medium + 75% milieu pour MSC.
- 4<sup>ème</sup> changement et suivants : 100% milieu pour MSC.

Composition du milieu pour MSC, stable 2 semaines au réfrigérateur :

- $\alpha$ MEM QSP 200 mL
- FBS qualifié pour MSC 20 mL
- Pénicilline/Streptomycine 2 mL
- $\beta$ FGF à 10 ng/ $\mu$ L 20  $\mu$ L

Le passage de ces cellules est fait à une confluence de 80% environ par action de la trypsine-EDTA. Le réensemencement se fait sur des boîtes en plastique sans gélatine ni autre support de culture, à une densité de 1000 à 2000 cellules / cm<sup>2</sup>.

En parallèle des cellules MSC obtenues par induction sur cellules iPS, une lignée MSC « native » nommée 25RUI est cultivée en tant que témoin phénotypique. Il est à noter que cette lignée a été obtenue par ponction de moelle osseuse chez un adulte sain : les caractéristiques d'une cellule MSC adulte peuvent être différentes des cellules MSC obtenues par induction. En effet, les MSC dérivées des cellules iPS ont un phénotype plutôt embryonnaire.

### 3.10 Caractérisation des cellules MSC

#### 3.10.1 Etude des marqueurs de surface

Pour mettre en évidence la présence des marqueurs de surface précités, le kit Human MSC Analysis BD StemFlow® pour analyse par cytométrie en flux est utilisé. Deux cocktails d'anticorps sont proposés dans ce kit :

- Un cocktail associant anti-CD105, anti-CD73 et anti-CD90 chacun étant couplé avec un fluorochrome différent et le mélange anti-CD45, anti-CD34, anti-CD11b, anti-CD19 et anti-HLA-DR avec un quatrième fluorochrome utilisé comme dépistage d'un contaminant.
- Un cocktail de témoins négatifs avec les isotypes de chacun des anticorps du précédent cocktail.

Les marqueurs de surface sont testés ici par cytométrie en flux selon le protocole suivant :

- Décoller les cellules adhérentes par action de la trypsine.

- Laver au PBS et remettre en suspension dans du PBS pour une concentration entre  $5 \cdot 10^6$  et  $10^7$  cellules par mL.
- Préparer des tubes pour cytométrie en flux avec 5 à 50  $\mu\text{L}$  d'anticorps.
- Ajouter 100  $\mu\text{L}$  de suspension de cellules à tester.
- Incuber 30 minutes à l'abri de la lumière, à température ambiante ou à  $+4^\circ\text{C}$ .
- Laver les cellules au PBS et remettre en suspension dans 300 à 500  $\mu\text{L}$  d'une solution PBS + 1% FBS + 0.09% azide de sodium.

L'analyse par cytométrie en flux est réalisée sur un automate FACS CANTO II Becton Dickinson® sur le plateau de cytométrie MRI à l'IRBM, aux longueurs d'onde indiquées. Le logiciel de pilotage et d'enregistrement utilisé est Diva® et les données visualisées sur FlowJo®.

### 3.10.2 Etude de la différenciation terminale des cellules souches mésenchymateuses

Par définition, les cellules MSC sont capables de se différencier dans les trois voies adipogénique, ostéogénique et chondrogénique. Cette capacité fait partie de la qualification des lignées MSC.

Afin d'induire les cellules MSC dans ces trois voies de différenciation, les kits suivants sont utilisés selon les recommandations du fournisseur :

- MesenCult™ Adipogenic Differentiation Medium Human (Stemcell technologies)  
Cat n° 05412
- MesenCult™ Osteogenic Stimulatory Kit (Stemcell technologies)  
Cat n° 05434
- MesenCult™-ACF Chondrogenic Differentiation Medium (Stemcell technologies)  
Cat n° 05455

Concernant les voies adipogénique et ostéogénique, l'induction de différenciation est réalisée dans des puits de plaques de 12 puits, ce qui nécessite peu de cellules.

Concernant la voie chondrogénique, l'induction de différenciation est faite sur quatre culots de 500 000 cellules chacun, ce qui représente beaucoup de cellules en considérant le cycle cellulaire relativement lent des MSC.

Dans tous les cas, l'induction dure 21 jours avec des changements de milieu tous les 3 jours.

A la fin de l'induction, des colorations spéciales sont réalisées pour montrer le potentiel d'engagement dans la voie étudiée.

La coloration à l'*Oil Red O* permet de mettre en évidence les vacuoles lipidiques en rouge présentes dans les cellules de la voie adipogénique. Généralement, ces vésicules sont visibles à l'état frais des cultures monocouches et la coloration permet d'en confirmer la nature lipidique.

La coloration à l'*Alirazine Red S* montre les dépôts calciques normalement visibles lors de la différenciation ostéogénique.

Les culots cellulaires de la différenciation chondrogénique sont fixés au paraformaldéhyde à 4% pendant une nuit, puis lavés dans de l'éthanol à 70% avant d'être pré-inclus dans un gel dédié d'HistoGel®. Les étapes d'inclusion en paraffine, de coupe au microtome, d'apposition sur lame et de coloration sont réalisées par le plateau technique RHEM de l'IRCM. La coloration spéciale au Bleu Alcian avec contre coloration nucléaire au *Nuclear Fast Red* met en évidence les mucopolysaccharides sulfatés habituellement présents dans les cartilages.

### 3.11 Activité $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence

Les cellules étudiées sont cultivées comme habituellement selon leur type, pour une durée permettant d'établir un niveau de confluence entre 50% et 80%.

Le kit  $\beta$ -Gal Staining Kit (Invitrogen) est utilisé pour réaliser le marquage coloré de l'activité  $\beta$ -galactosidase cytoplasmique, selon le protocole suivant, pour des proportions de 1 mL par puits de 35 mm :

- Lavage rapide au PBS 1x (fourni).
- Fixation avec la solution fournie diluée à 1x pendant 10 minutes à température ambiante.
- Pendant ce temps, préparer la solution de marquage :
  - o 10  $\mu$ L de solution A.
  - o 10  $\mu$ L de solution B.
  - o 10  $\mu$ L de solution C.
  - o 50  $\mu$ L de solution X-Gal à 20 mg/mL dans du N-N-diméthylformamide.
  - o 920  $\mu$ L de PBS 1x.
- 2 lavages rapides au PBS 1x.
- Incuber avec la solution de marquage toute une nuit à 37°C à l'abri de la lumière.

La lecture se fait au microscope optique avec détermination du pourcentage de cellules présentant une coloration bleutée du cytoplasme.

### 3.12 Outils statistiques

Pour comparer deux médianes observées, le test non paramétrique de Wilcoxon - Mann Whitney est utilisé sur le site internet BiostaTGV<sup>105</sup> et exécuté sous le logiciel R.

Pour comparer plus de deux médianes observées avec moins de 75 mesures, le test non paramétrique de Kruskal-Wallis permettant de s'affranchir de l'hypothèse d'une distribution de loi Normale est utilisé sur le site BiostaTGV et exécuté sous le logiciel R. Si ce test est positif, le test *post-hoc* Tukey HSD est alors utilisé pour identifier quel groupe est significativement différent, sur le site internet Astata.<sup>106</sup> Si le nombre de mesures est supérieur à 75, un test de comparaison de variance ANOVA puis un test *post-hoc* Tukey HSD sont réalisés, sur le site internet Astata.

Pour comparer des proportions entre 2 ou plus conditions, un test de  $\chi^2$  est fait sur le site internet BiostaTGV<sup>105</sup> et exécuté sous le logiciel R.

Pour l'ensemble des tests statistiques réalisés, le risque de première espèce  $\alpha$  est fixé conventionnellement à 0,05. Si le test est positif, une estimation de la probabilité p est donnée.

## 4 Résultats

### 4.1 Génération des cellules iPS

#### 4.1.1 Morphologies des colonies iPS et dépistage de l'activité phosphatase alcaline

Les colonies naissantes après reprogrammation montrent une morphologie caractéristique des cellules iPS : développement de colonies très serrées, monocouches, aux bords bien délimités avec de petites cellules à fort rapport nucléo-cytoplasmique.

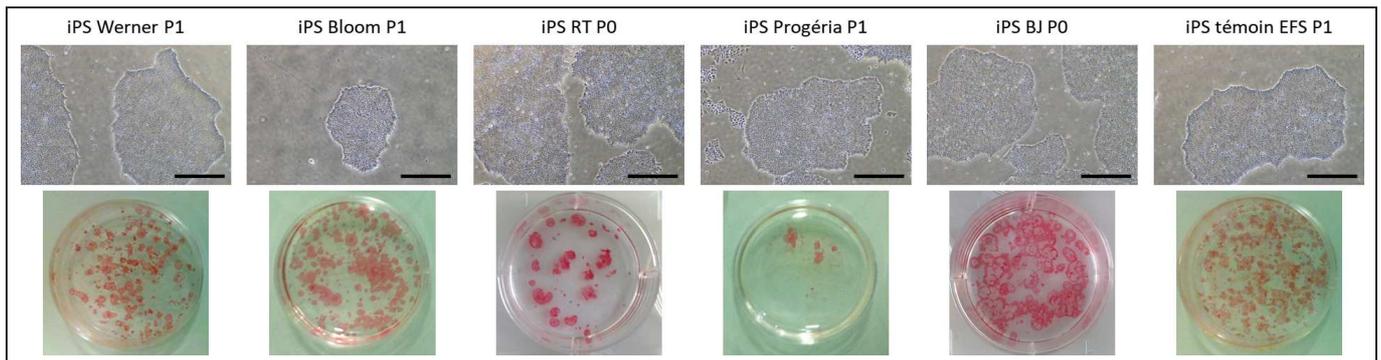


Figure 28 - Morphologie et détection de l'activité phosphatase alcaline des colonies iPS.

Partie supérieure : morphologie des colonies iPS au microscope optique (objectif x10). La barre noire représente 20 µm.

Partie inférieure : développement d'une coloration rose ou rouge pour les colonies présentant une activité phosphatase alcaline.

P0 = colonies naissantes obtenues après reprogrammation.

P1 = 1er *picking*, c'est-à-dire après sélection manuelle et repiquage des colonies à P0.

Sur ces colonies naissantes ou lors des premiers passages en culture, la coloration au Vector Red substrate® a permis de montrer la présence de colonies positives pour l'activité phosphatase alcaline (Figure 28).

Les observations conjointes de la morphologie des colonies et de la présence d'une activité phosphatase alcalines représentent un dépistage de la génération de colonies iPS. Ce dépistage doit être confirmé par d'autres examens prouvant le caractère de pluripotente.

Les réactions colorées d'activité phosphatase alcaline n'ayant pas été réalisées au même moment, ni dans des conditions strictement identiques de culture et nombre de cellules transfectées, il n'est pas possible de comparer les résultats entre eux. Nous ne pouvons donc pas comparer les efficacités de reprogrammation. Ici, l'élément de réponse est donc simplement qualitatif : il y a bien présence de colonies à activité phosphatase alcaline qui sont donc potentiellement pluripotentes.

#### 4.1.2 Marqueurs de surface et nucléaires associés à la pluripotence

L'étude de l'expression des marqueurs de la pluripotence des lignées de cellules iPS a montré des résultats positifs pour toutes les lignées et tous les anticorps, par immunofluorescence (Figure 29) et par cytométrie en flux (Annexe 9).

Ces résultats sont ceux attendus et participent au faisceau d'arguments pour la caractérisation de la pluripotence des lignées de cellules iPS.

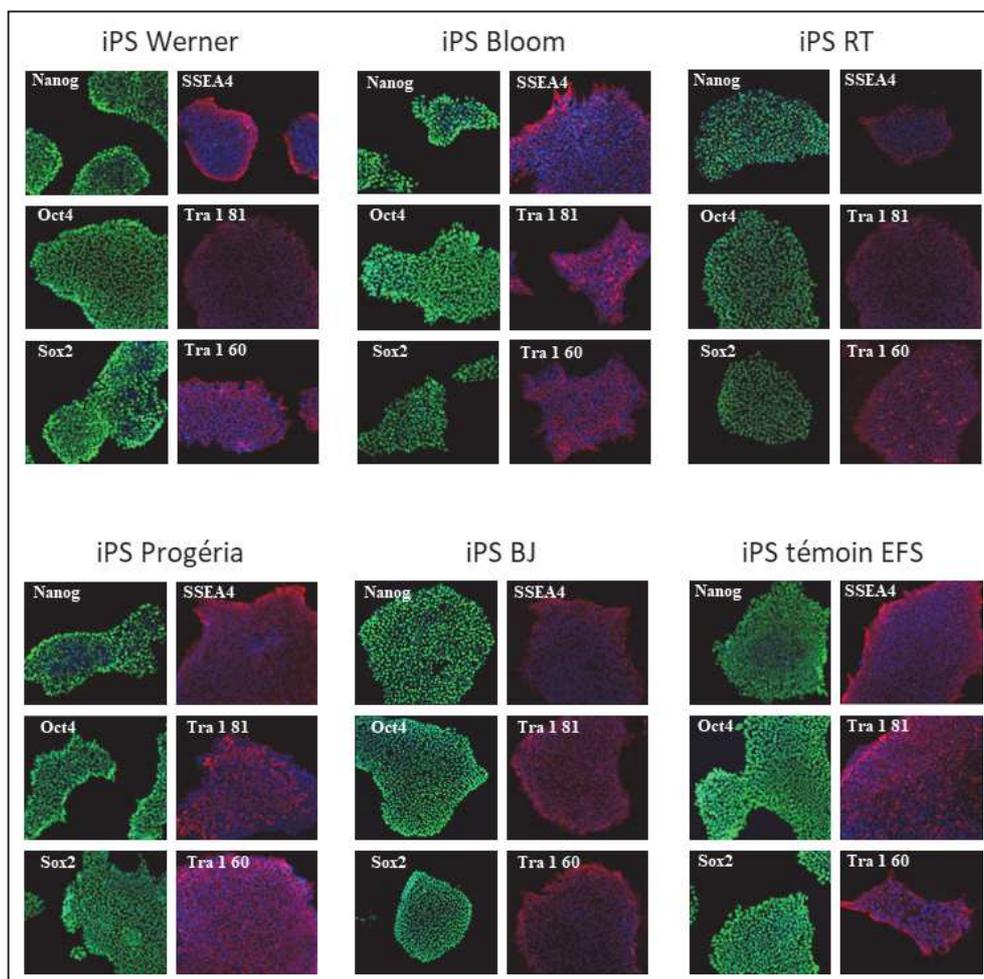


Figure 29 - Détection par immunofluorescence des marqueurs de la pluripotence des cellules iPS.

Marquages nucléaires couplés à l'AlexaFluor® (vert) pour les anticorps Anti-Nanog, Anti-Oct4 et Anti-Sox2.

Marquages de surface couplés au PE (rouge) pour les anticorps anti-SSEA4, anti-Tra-1-81 et anti-Tra-1-60.

Contre coloration de la chromatide au DAPI (bleu).

### 4.1.3 Profil d'expression des gènes de pluripotence

Les données de transcriptome des cellules iPS, des fibroblastes des lignées RT et BJ ainsi qu'un échantillon de cellules souches embryonnaires humaines ont été analysés selon une méthode non supervisée. Celle-ci permet de hiérarchiser des groupes de lignées présentant des

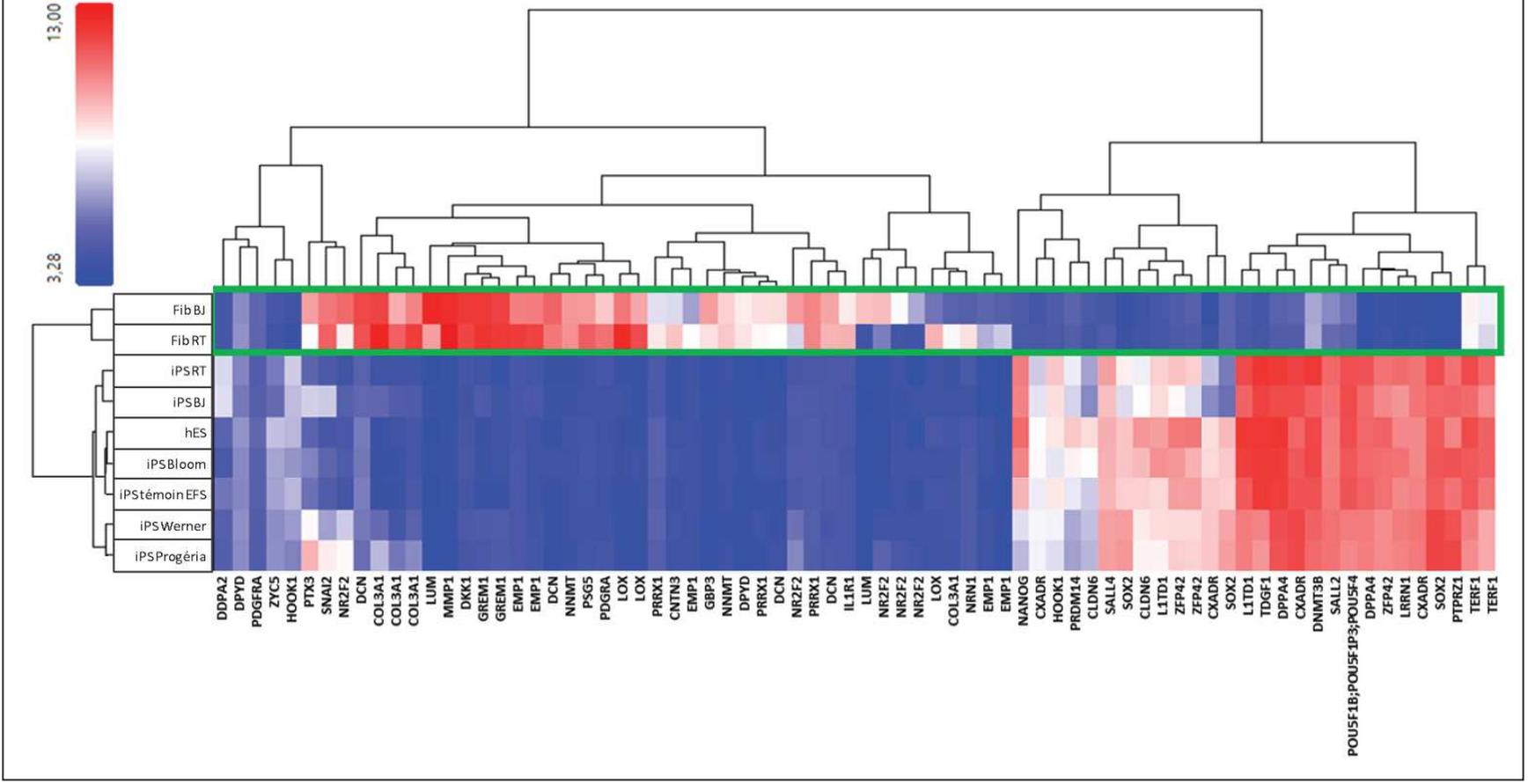


Figure 30 - Analyse non supervisée de l'expression des gènes impliqués dans la pluripotence ou dans la spécialisation des fibroblastes.

A gauche : liste des gènes dont l'expression est analysée.

En haut : lignées testées. Fib = fibroblastes. hESC = cellules souches embryonnaires humaines.

Echelle colorée représentant le niveau d'expression des gènes, du bleu (faible) au rouge (fort). Valeurs chiffrées représentant une l'intensité du signal.

Dendrogrammes pour hiérarchiser les groupes et sous-groupes présentant des profils d'expression similaires.

Cadre vert : échantillons issus de culture de fibroblastes.

profils d'expression similaires. Cette hiérarchie de similarité est représentée par des dendrogrammes : plus les profils de deux types cellulaires sont proches, plus le trait les reliant est à leur proximité. Au contraire, ce trait s'éloigne lorsque les profils sont différents. Pour cette analyse, un panel de transcrits impliqués dans la pluripotence et d'autres transcrits impliqués dans la spécialisation des fibroblastes ont été sélectionnés. Cette liste est spécifiquement adaptée aux conditions de cultures de cellules iPS dans le milieu E8 (Cf. paragraphe 3.3.2 « Culture des colonies iPS ») comme cela a été établi par Chen *et al.*<sup>99</sup>

Les résultats de cette analyse non supervisée (Figure 30) ont permis d'identifier clairement deux groupes de types cellulaires : les cellules iPS et hES (partie gauche du tableau) d'une part et les fibroblastes (partie droite) d'autre part. On distingue également deux groupes de gènes : les 28 transcrits impliqués dans la pluripotence (partie basse du tableau) d'une part et les 46 transcrits de la spécialisation fibroblastique (partie haute du tableau).

Ces résultats ont également été confirmés par une analyse de corrélation d'expression sur la totalité du transcriptome. La corrélation de rang de Spearman (Figure 31) montre un grand score de corrélation entre les cellules iPS et hES et un faible score entre ces lignées et les cellules fibroblastiques testées.

La

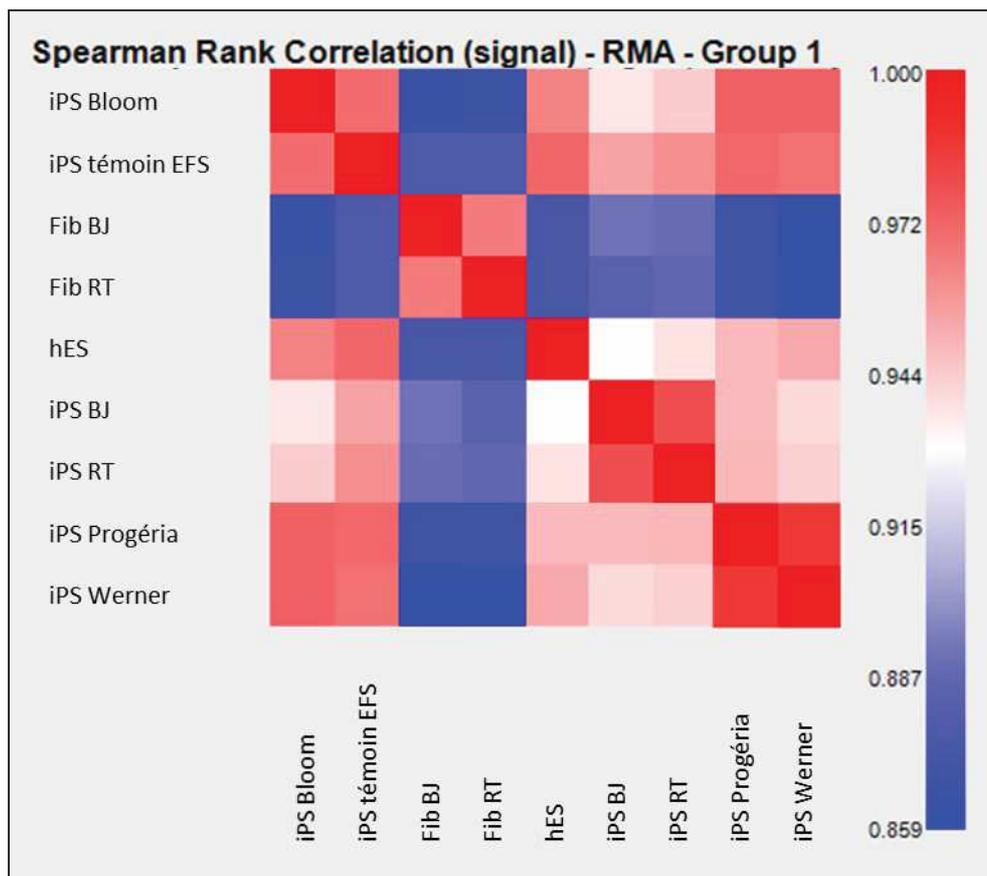


Figure 31 - Analyse des profils d'expression par la corrélation de Spearman. Les profils sont comparés deux à deux. Un gradient de couleur du bleu au rouge indique la force de la corrélation.

grande similarité d'expression entre les cellules iPS et les cellules hES sont un argument supplémentaire de la pluripotence des cellules iPS. Egalement, la non ressemblance avec les profils d'expression de spécialisation dans la lignée fibroblastique indique que les cellules iPS ne sont pas engagées dans cette voie de différenciation.

#### 4.1.4 Formation de tératomes humains chez la souris

Le protocole d'injection des cellules iPS dans des souris immunodéficientes a permis le développement de tumeurs visibles en quelques semaines. Les tumeurs extraites (Annexe 10) après sacrifice des souris ont été fixées et envoyées au plateau d'histologie de RHEM pour inclusion en paraffine, coupe au microtome, apposition sur lame, coloration et expertise.

L'expertise histologique réalisée par le Dr Florence Bernex a montré que les tumeurs analysées issues de chacune des lignées iPS de l'étude présentent des tissus dérivant de chacun des trois feuilletts embryonnaires (Annexe 11 et Tableau 3). La présence d'au moins une structure dérivant de chacun de ces feuilletts permet d'affirmer le caractère pluripotent des cellules injectées (Tableau 4).

|            | ECTODERME                                      | NEURO-ECTODERME            |                   |   | MESODERME    |              |               |           |    |                           | ENDODERME              |  |  |
|------------|--|----------------------------|-------------------|---|--------------|--------------|---------------|-----------|----|---------------------------|------------------------|--|--|
|            | formation d'annexes pilosébacées et d'épiderme | formation type tube neural | neurones type DRG | cellules de la crête neurale :<br>mélanocytes | muscle lisse | muscle strié | tissu adipeux | cartilage | os | cellules mésenchymateuses | structures vasculaires | cellules mucipares caliciformes "Goblet cells" caractéristiques de l'épithélium de type respiratoire ou de type digestif | cellules mucipares visibles sur l'épithélium de type respiratoire à E 16.5 |
| Werner     |  | x                          |                   | x   |              |              | x             |           |    | x                         |                        | x  | x  |
| Bloom      | x  | x                          |                   | x   |              | x            |               | x         |    | x                         |                        | x  | x  |
| RT         |  | x                          |                   | x   |              |              |               | x         | x  | x                         |                        | x  | x  |
| Progéria   |  | x                          | x                 | x   |              |              | x             |           |    | x                         |                        | x  | x  |
| BJ         |  | x                          |                   | x   |              | x            |               | x         | x  | x                         |                        | x  | x  |
| Témoin EFS |  | x                          |                   | x   | x            |              |               |           |    | x                         |                        | x  | x  |

Tableau 3 - Identification des structures histologiques dérivant des trois feuilletts embryonnaires sur les tumeurs murines. La croix indique une structure identifiée lors de l'expertise

|            | ECTODERME | MESODERME | ENDODERME | Pluripotence | Remarque             |
|------------|-----------|-----------|-----------|--------------|----------------------|
| Werner     | x         | x         | x         | x            | densément cellulaire |
| Bloom      | x         | x         | x         | x            | densément cellulaire |
| RT         | x         | x         | x         | x            | densément cellulaire |
| Progéria   | x         | x         | x         | x            | densément cellulaire |
| BJ         | x         | x         | x         | x            | densément cellulaire |
| Témoin EFS | x         | x         | x         | x            | densément cellulaire |

Tableau 4 - Conclusions de l'expertise histologique

Les tumeurs extraites étant de grande taille, il n'est pas possible d'analyser l'ensemble de leur volume. Les coupes histologiques ont donc été réalisées arbitrairement dans l'axe le plus grand des pièces. Ainsi, l'observation des structures reste aléatoire et il est très probable que certaines structures existantes n'aient pas été décelées lors de cette analyse. Il n'est donc pas possible de comparer la présence ou l'absence des structures présentées dans le Tableau 3 pour chacune des lignées iPS testées. L'information essentielle de cet examen reste que les cellules iPS générées présentent un réel potentiel de pluripotence.

## 4.2 Identification des mutations causales par séquençage.

Des amorces spécifiques des exons contenant les mutations causales précédemment identifiées chez les patients Werner, Bloom, RT et HGPS ont été mises au point (Annexe 12). Une amplification par PCR et un séquençage de type Sanger a permis de retrouver ces mutations sur les ADN extraits des cellules natives et des cellules iPS.

Concernant la lignée Werner : le séquençage met en évidence une mutation non-sens du gène *WRN* apparemment homozygote, de nomenclature c.3789C>G et p.(Tyr1263\*). Ce variant n'est pas référencé dans la base de données ExAC. La mutation a déjà été publiée dans la littérature<sup>107</sup> ; il s'agit du patient inclus dans l'étude. Cette mutation est donc privée. Dans ce cas, le rôle de la consanguinité est donc important dans l'apparition du génotype homozygote chez ce patient (Figure 32A).

La mutation est située dans une partie traduite entre les domaines fonctionnels HRDC et le signal NLS (Figure 32B). Dans l'hypothèse de la synthèse d'une protéine tronquée, l'absence de ce signal NLS ne permettrait pas l'adressage post-traductionnel vers le noyau, rendant la protéine non effective. L'hypothèse d'une dégradation de l'ARN messager de type NMD est aussi envisageable.

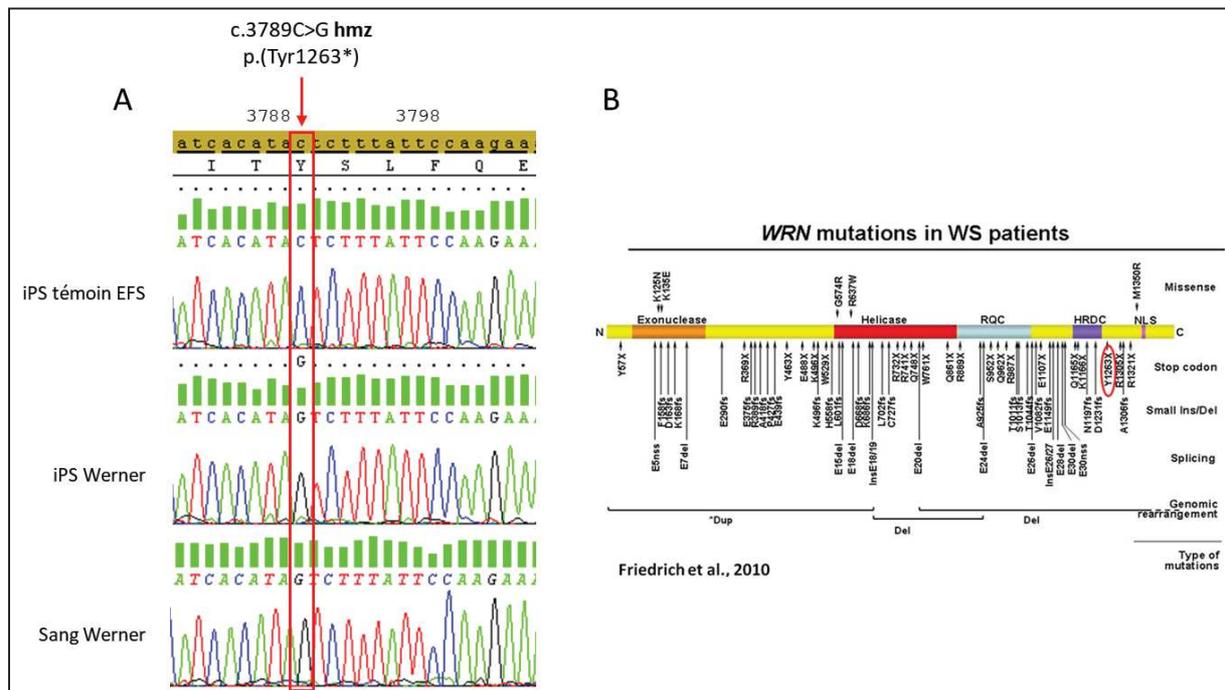


Figure 32 - Mutation causale chez le patient Werner

A. Séquençage Sanger montrant la mutation c.3789C>G apparemment homozygote sur le sang du patient et sur les cellules iPS correspondantes mais pas sur les iPS du témoin EFS. Position c.3789 dans le cadre rouge.

B. Positionnement théorique de la mutation sur la protéine, entourée en rouge.

Pour la lignée Bloom, la mutation c.2116del du gène *BLM* apparemment homozygote a été mise en évidence (Figure 33A). Cette mutation entraîne théoriquement un décalage du cadre de lecture lors de la traduction avec naissance d'une protéine tronquée, notée p.(Ser706Leufs\*11). La position de la mutation fait suggérer que le domaine hélicase ne peut pas être synthétisé entièrement (Figure 33B, d'après Monnat *et al.*<sup>108</sup>) engendrant une protéine non fonctionnelle. Là aussi, l'hypothèse d'une dégradation des ARN messager de type NMD est possible.

Cette mutation n'est présente dans aucune base de données de la population générale et n'a jamais été publiée. Pour ce variant également, on peut considérer que la consanguinité de la patiente a eu un rôle important dans l'apparition de la maladie.

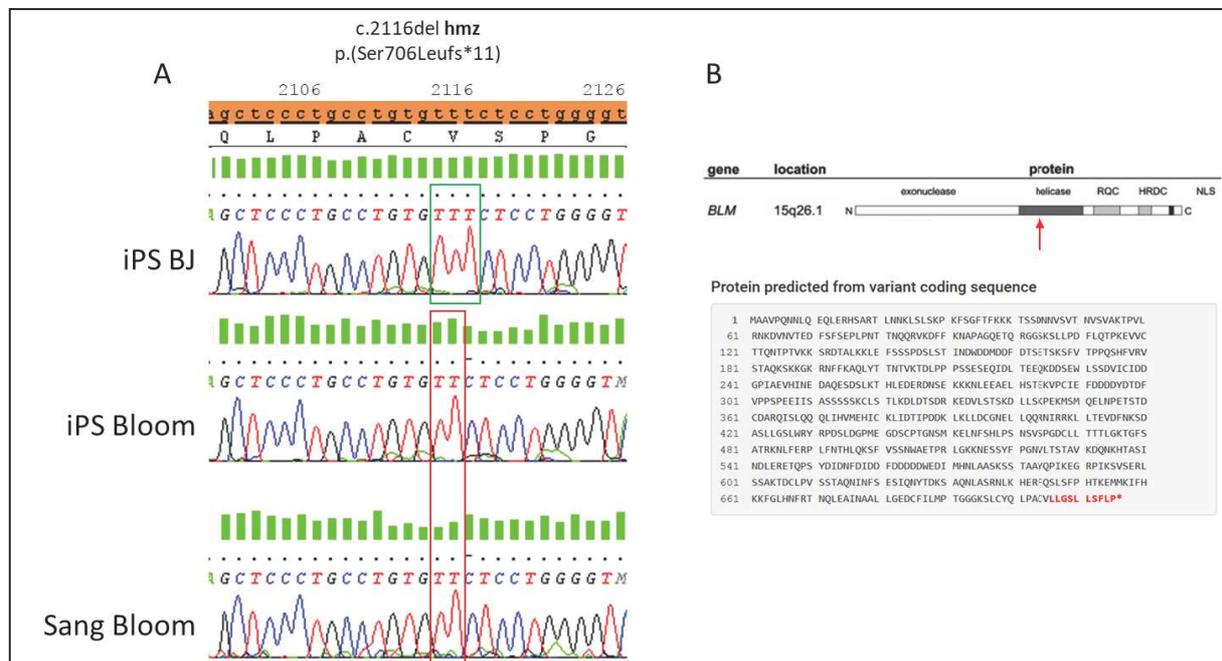


Figure 33 - Mutation causale chez le patient Bloom

**A.** Séquençage Sanger montrant la mutation c.2116del apparemment homozygote sur le sang du patient et sur les cellules iPS correspondantes (cadre rouge) mais pas sur les iPS du témoin BJ (cadre vert).

**B.** Positionnement théorique de la mutation sur la protéine (flèche rouge) et conséquences prédites sur sa composition en acide aminé (séquence rouge).

Concernant la lignée RT, le séquençage Sanger du gène *RECQL4* a montré la mutation c.2269c>T apparemment homozygote. Ce variant est répertorié dans la base de données ExAC à une fréquence inférieure à 1/1000. Cette fréquence allélique est très faible et, si la loi de Hardy-Weinberg est applicable, correspond à un porteur homozygote sur 1 000 000 personnes dans la population générale. Cette valeur est comparable à la fréquence de la maladie (Figure 34A).

Cette mutation p.(Glu757\*) entrainerait l'apparition d'un codon stop (non-sens) dans la partie codant le domaine fonctionnel hélicase de la protéine (Figure 34B, d'après Croteau *et al.*<sup>109</sup>). Comme pour les deux autres hélicases, il est possible que le mécanisme pathologique soit une

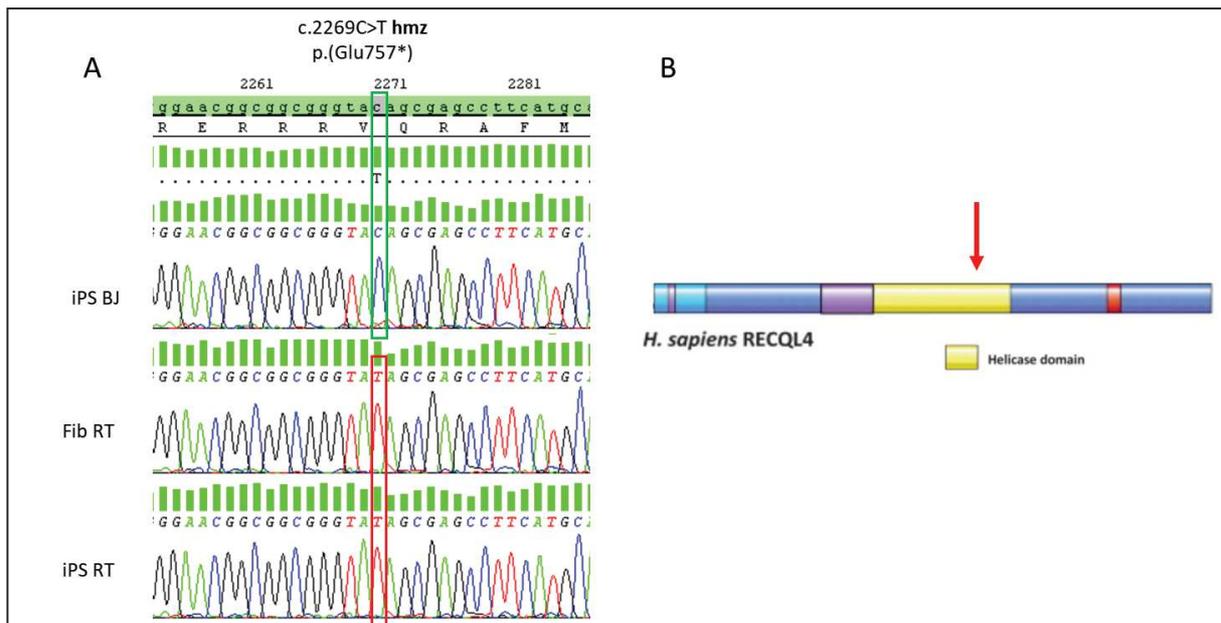


Figure 34 - Mutation causale chez le patient RT.  
**A.** Séquençage Sanger montrant la mutation c.2269C>T apparemment homozygote sur les fibroblastes du patient et sur les cellules iPS correspondantes (cadre rouge) mais pas sur les iPS du témoin BJ (cadre vert).  
**B.** Positionnement théorique de la mutation sur la protéine (flèche rouge) dans la partie codant le domaine fonctionnel hélicase.

protéine non fonctionnelle par défaut du domaine hélicase, ou bien que les ARN messages soient dégradés avant même leur traduction.

Enfin, concernant la lignée Progéria, le séquençage met en évidence la présence de la mutation c.1824C>T du gène *LMNA* sur un seul des deux allèles dans les cellules sanguines du patient dans les cellules iPS (Figure 35). Cette mutation apparemment silencieuse est en réalité responsable d'une anomalie de l'épissage par réactivation d'un site donneur. Il en résulte de la synthèse d'une protéine anormale. Il s'agit de la mutation causale classique de ce syndrome à effet dominant négatif (Cf. paragraphe 1.5.2) déjà décrite dans la littérature par De Sandre-Giovannoli *et al.*<sup>110</sup>

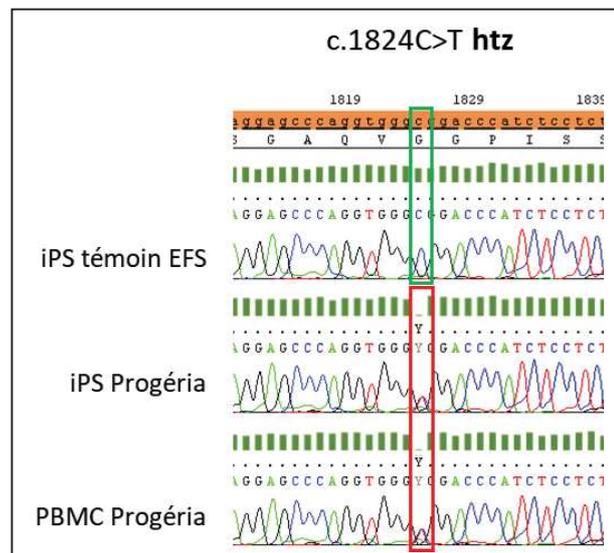


Figure 35 - Mutation causale chez le patient HGPS. Séquençage Sanger montrant la mutation c.1824C>T hétérozygote sur les PBMC du patient et sur les cellules iPS correspondantes (cadre rouge) mais pas sur les iPS du témoin EFS (cadre vert).

### 4.3 Identification du profil génétique des lignées étudiées.

Le profil génétique par étude du polymorphisme de répétition des microsatellites a été établi pour sécuriser l'identité des différentes lignées cellulaires utilisées au cours de ce travail.

| Chromosome | Loci       | Werner<br>PBMC | Werner<br>iPS | Bloom<br>Fibroblastes | Bloom<br>iPS | RT<br>Fibroblastes | RT<br>iPS | Progéria<br>PBMC | Progéria<br>iPS | BJ<br>Fibroblastes | BJ<br>iPS | témoin EFS<br>PBMC | témoin EFS<br>iPS |
|------------|------------|----------------|---------------|-----------------------|--------------|--------------------|-----------|------------------|-----------------|--------------------|-----------|--------------------|-------------------|
| 3p21.31    | D3S1358    | 16 18          | 16 18         | 15 17                 | 15 17        | 15 18              | 15 18     | 15 18            | 15 18           | 14 16              | 14 16     | 14 17              | 14 17             |
| 11p15.5    | TH01       | 7 hmz          | 7 hmz         | 9 9,3                 | 9 9,3        | 8 9                | 8 9       | 7 8              | 7 8             | 7 8                | 7 8       | 7 9                | 7 9               |
| 21q21.1    | D21S11     | 30 31          | 30 31         | 28 32                 | 28 32        | 30 hmz             | 30 hmz    | 29 hmz           | 29 hmz          | 29 hmz             | 29 hmz    | 30 31              | 30 31             |
| 18q21.33   | D18S51     | 16 17          | 16 17         | 14 hmz                | 14 hmz       | 12 14              | 12 14     | 12 17            | 12 17           | 17 19              | 17 19     | 12 15              | 12 15             |
| 15q26.2    | Penta_E    | 5 13           | 5 13          | 7 hmz                 | 7 hmz        | 11 14              | 11 14     | 11 12            | 11 12           | 7 17               | 7 17      | 13 15              | 13 15             |
| 5q23.2     | D5S818     | 10 12          | 10 12         | 12 13                 | 12 13        | 12 13              | 12 13     | 12 hmz           | 12 hmz          | 12 hmz             | 12 hmz    | 11 hmz             | 11 hmz            |
| 13q31.1    | D13S317    | 11 14          | 11 14         | 8 12                  | 8 12         | 11 hmz             | 11 hmz    | 10 11            | 10 11           | 8 9                | 8 9       | 12 13              | 12 13             |
| 7q21.11    | D7S820     | 9 hmz          | 9 hmz         | 10 11                 | 10 11        | 10 hmz             | 10 hmz    | 8 11             | 8 11            | 11 12              | 11 12     | 10 11              | 10 11             |
| 16q24.1    | D16S539    | 12 13          | 12 13         | 13 hmz                | 13 hmz       | 12 13              | 12 13     | 11 12            | 11 12           | 9 13               | 9 13      | 12 13              | 12 13             |
| 5q33.1     | CSF1PO     | 12 hmz         | 12 hmz        | 11 hmz                | 11 hmz       | 11 13              | 11 13     | 11 12            | 11 12           | 10 12              | 10 12     | 11 13              | 11 13             |
| 21q22.3    | Penta_D    | 11 14          | 11 14         | 9 11                  | 9 11         | 11 12              | 11 12     | 9 10             | 9 10            | 12 13              | 12 13     | 12 14              | 12 14             |
| 12p22.3    | Amelogenin | X Y            | X Y           | X hmz                 | X hmz        | X hmz              | X hmz     | X Y              | X Y             | X Y                | X Y       | X Y                | X Y               |
| 12p13.31   | vWA        | 14 18          | 14 18         | 16 hmz                | 16 hmz       | 16 19              | 16 19     | 14 19            | 14 19           | 16 18              | 16 18     | 16 19              | 16 19             |
| 8q24.13    | D8S1179    | 10 15          | 10 15         | 12 13                 | 12 13        | 10 13              | 10 13     | 12 13            | 12 13           | 9 11               | 9 11      | 14 hmz             | 14 hmz            |
| 2p25.3     | TPOX       | 8 9            | 8 9           | 8 9                   | 8 9          | 8 11               | 8 11      | 8 9              | 8 9             | 10 11              | 10 11     | 8 11               | 8 11              |
| 4q28       | FGA        | 21 23          | 21 23         | 20 25                 | 20 25        | 21 23              | 21 23     | 23 25            | 23 25           | 22 23              | 22 23     | 22 23              | 22 23             |

Tableau 5 - Identification des allèles des polymorphismes microsatellitaires des 6 lignées étudiées.

16 loci chromosomiques sont analysés. Les couples de valeurs indiquées représentent chacun des allèles identifiés pour chaque microsatellite dans chaque lignée. Hmz = homozygote pour l'allèle concerné.

Bandeau supérieur : identification de la lignée (1<sup>ère</sup> ligne) et du type cellulaire (2<sup>nd</sup>e ligne).

Pour chaque lignée étudiée, le profil génétique retrouvé sur cellules initiales et sur cellules iPS est le même (Tableau 5). De plus, les sexes chromosomiques déterminés par les allèles de l'amélogénine sont concordants avec les sexes des patients. Ces résultats garantissent qu'il n'y a pas eu d'inversion de boîtes de culture ou de contamination massive entre deux lignées.

#### 4.4 Expression des hélicases dans les cellules iPS.

L'analyse des transcriptomes a permis d'évaluer l'expression des hélicases répliquatives *WRN*, *BLM* et *RECQL4* dans les cellules iPS, les cellules embryonnaires humaines et dans les fibroblastes des lignées BJ et RT (Figure 36).

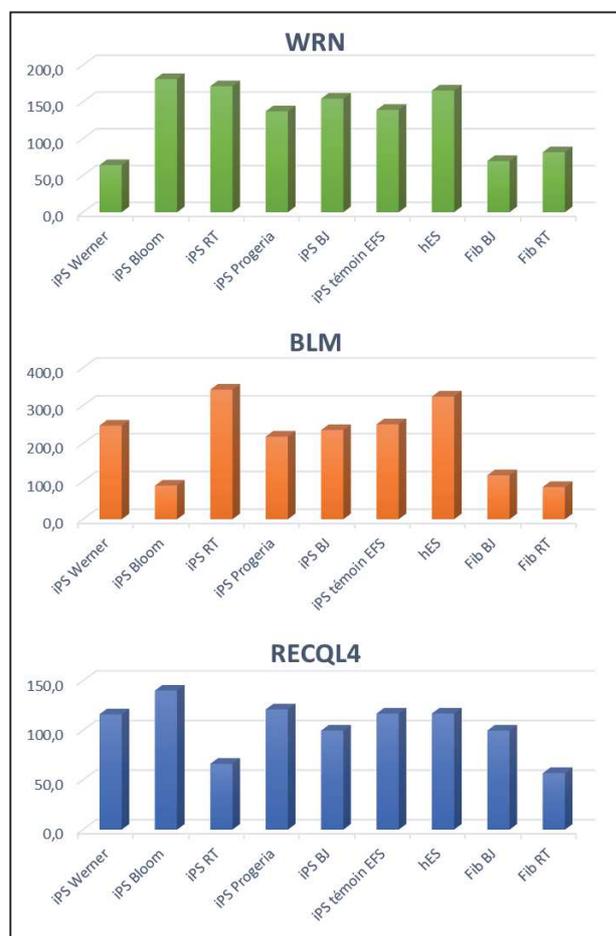


Figure 36 - Expression des hélicases répliquatives WRN, BLM et RecQL4  
Expression dans les cellules iPS, hESC et les fibroblastes. En ordonnée : valeur linéaire du signal d'expression après normalisation.

Concernant les cellules iPS, on note une plus faible expression de l'hélicase répliquative déficiente dans chacune des lignées pathologiques par rapport aux autres lignées étudiées : *WRN* est moins exprimé dans les cellules iPS Werner que dans les cellules iPS Bloom, iPS RT et iPS Progeria. Il en est de même pour l'expression de *BLM* et de *RECQL4* dans les cellules iPS Bloom et iPS RT respectivement. Le fait que le niveau d'expression d'une hélicase semble être diminué dans la lignée pathologique correspondante peut nous faire suspecter une dégradation des ARN messagers par un mécanisme de type NMD (*Nonsense-Mediated Decay*). En effet, pour les trois pathologies étudiées, les mutations causales mises en évidence sont de type tronquantes (codon stop prématuré ou décalage du cadre de lecture). Or, ce type de mutation est particulièrement impliqué dans le mécanisme NMD.

De plus, il semblerait que l'expression de *BLM* soit augmentée dans les cellules iPS RT et que l'hélicase *RECQL4* soit légèrement plus exprimée dans les cellules iPS Bloom. Cette observation peut nous orienter vers un hypothétique mécanisme de compensation entre les hélicases BLM et RECQL4 lorsque l'une d'entre elle est déficiente.

Concernant les fibroblastes analysés, on note que les valeurs d'expression obtenues sont globalement plus faibles que pour les cellules pluripotentes, notamment pour les hélicases WRN et BLM. Il semblerait que ces deux hélicases soient particulièrement exprimées dans les cellules pluripotentes. Concernant l'hélicase RECQL4, les valeurs montrent une diminution d'expression dans la lignée RT par rapport à la lignée BJ. Là aussi, un mécanisme de dégradation des ARN messagers de type NMD peut être évoqué.

Ces résultats préliminaires doivent être confirmés nécessitant une analyse quantitative de type RT-Q-PCR avec des couples d'oligonucléotides ciblant les différentes portions des ARN messagers afin de valider nos hypothèses. De plus, les valeurs indiquées ne sont pas assorties d'un écart type et il n'est donc pas possible d'affirmer si ces différences sont significatives par un test statistique.

#### 4.5 Expression de la lamine A dans les cellules iPS.

Selon la même méthode que précédemment, l'étude du transcriptome a permis de montrer une quasi absence d'expression de la lamine A (LMNA) dans les cellules pluripotentes : cellules iPS et cellules hESC par rapport au cellules différenciées fibroblastiques (Figure 37).

Ces résultats sont cohérents avec ceux déjà publiés par Liu *et al.*<sup>111</sup> : la lamine A ne s'exprime pas dans les cellules iPS reprogrammées des lignées BJ et progéria. Nous pouvons donc ici étendre cette observation aux trois pathologies des hélicases et également aux cellules embryonnaires humaines hESC.

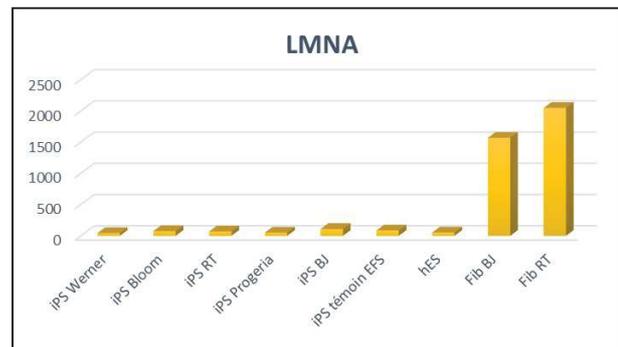


Figure 37 - Expression de la lamine A  
Expression dans les cellules iPS, hESC et les fibroblastes. En ordonnée : valeur linéaire du signal d'expression après normalisation.

## 4.6 Etude du cycle cellulaire des cellules iPS

Le cycle cellulaire des lignées iPS a été analysé et a permis de quantifier les proportions de cellules dans chacune des phases G0/G1, S et G2/mitose (Figure 38). L'annexe 13 présente l'ensemble des résultats pour chacune des lignées iPS testées (graphiques bidimensionnels, proportions de chaque population). Aucune différence significative de répartition de ces proportions n'a été mise en évidence par un test de  $\chi^2$  ( $p = 0.89$ ).

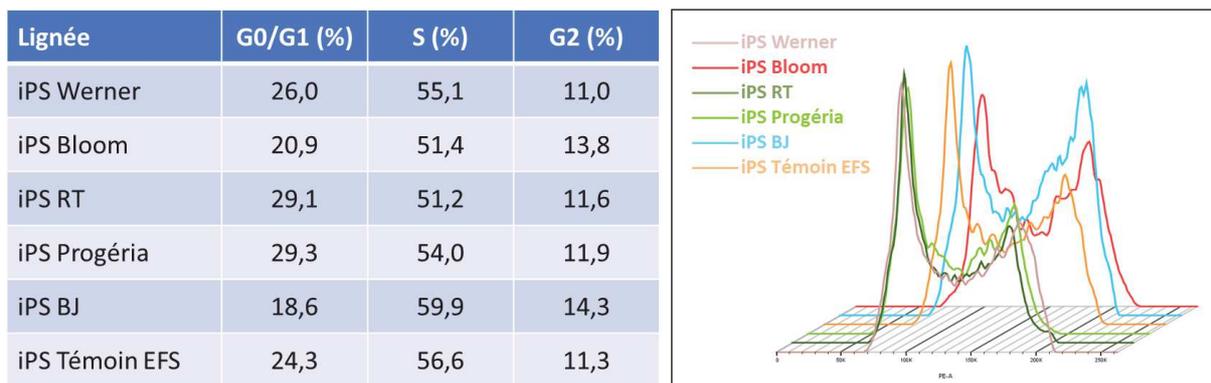


Figure 38 - Etude du cycle cellulaire des lignées iPS

A gauche : pourcentage de cellules dans chacune des phases du cycle G0/G1, S et G2/mitose pour chaque lignée iPS testées.

A droite : superposition des représentations graphiques monoparamétriques du cycle cellulaire des lignées iPS testées. En abscisse : intensité de fluorescence de l'iodure de propidium.

Ces résultats sont ceux attendus pour des lignées iPS sans anomalie <sup>112</sup>. Il est possible d'en conclure que les altérations des gènes des hélicases répliquatives et de la lamine A n'ont pas d'influence sur le cycle cellulaire des cellules iPS. Bien sûr cette conclusion est à remettre dans le contexte particulier des cellules iPS.

#### 4.7 Estimation de la longueur des télomères des cellules iPS

Après étalement des culots cytogénétiques sur des lames de verre, les noyaux des cellules iPS ont été hybridés avec des sondes PNA spécifiques des régions télomériques. Des clichés ont été pris par microscopie à fluorescence puis les intensités des signaux fluorescents vert (FITC) ont été estimés informatiquement. Les moyennes des fluorescences mesurées pour chacune des lignées iPS sont représentées en histogrammes (Figure 39). Les tests statistiques montrent une différence significative entre la lignée iPS Werner et les autres lignées iPS ( $p < 0,01$ ). L'annexe 14 montre des exemples de capture d'image en microscopie à fluorescence avec analyse automatisée par CellProfiler® ainsi que le détail des tests statistiques effectués.

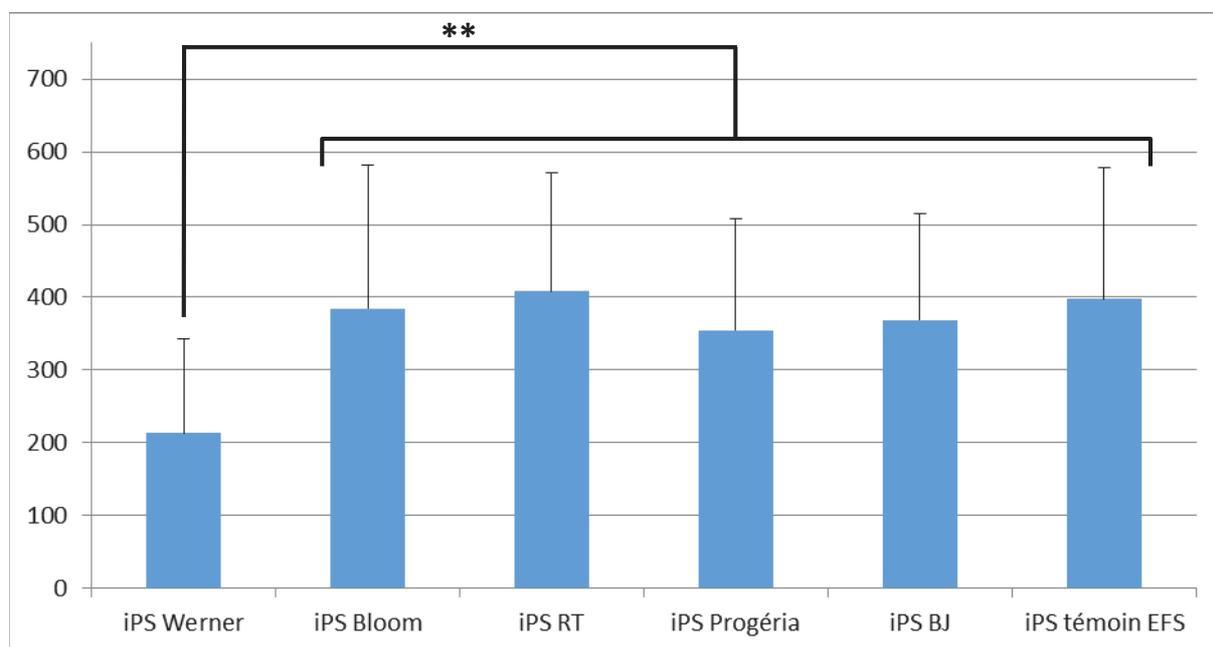


Figure 39 - Estimation des longueurs télomériques des lignées iPS  
Histogrammes représentant les moyennes des fluorescences mesurées en émission FITC pour chacune des lignées iPS testées. Barres verticales fines : écarts-types. Unité de mesure arbitraire. Tests ANOVA et *post hoc* de Tuckey : différences statistiques significatives (\*\*  $p < 0,01$ ).

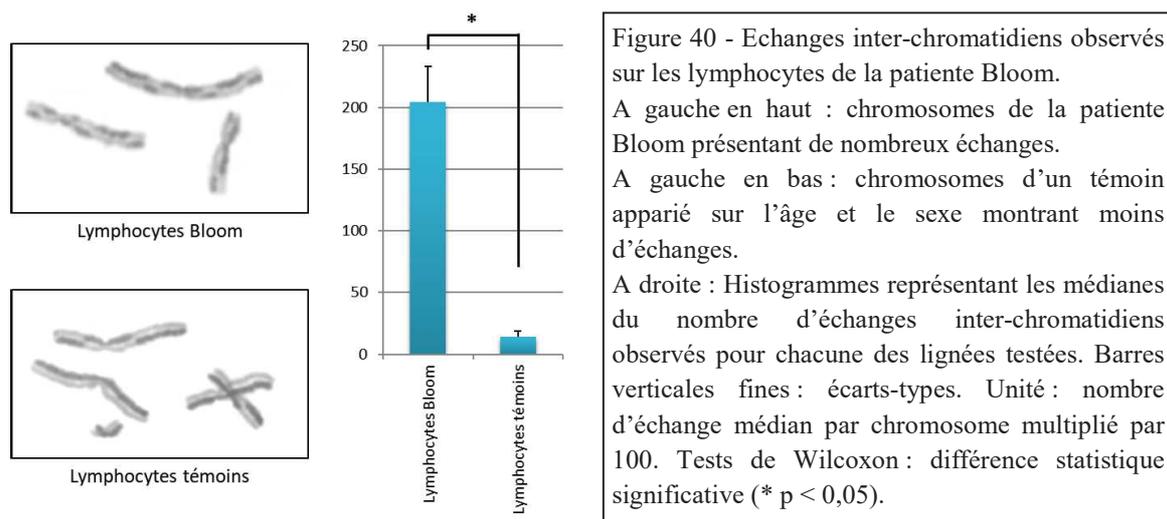
Contrairement à la technique de référence par *Southern blot*, les résultats obtenus par Q-FISH ne peuvent pas être directement transcrits en une longueur de télomère, habituellement exprimée en kilobases. Ici, c'est la comparaison entre les résultats d'un même type cellulaire, au décours de la même expérience, qui est informatif.

## 4.8 Etude des échanges entre chromatides sœurs

La coloration différentielle des chromatides sœurs d'un même chromosome permet de montrer les échanges produits entre elles au cours des deux derniers cycles cellulaires. Le dénombrement de ces échanges représente donc le taux de recombinaisons homologues qui ont lieu dans une lignée cellulaire.

Concernant les cellules natives de la patiente Bloom, le nombre d'échanges observés sur lymphocytes est très largement supérieur à celui des lymphocytes d'un témoin apparié sur l'âge et le sexe (Figure 40,  $p < 0.05$ ). Ce résultat était attendu puisque les échanges interchromatidiens du syndrome de Bloom sont un des éléments qui concourt au diagnostic biologique de ce syndrome <sup>44</sup>.

Malheureusement, ce test n'a pas pu être réalisé sur les cellules natives des autres pathologies car la technique s'est révélée en échec (PBMC du témoin EFS), il n'y avait pas suffisamment de matériel (PBMC Progéria) ou le type cellulaire était différent (fibroblastes pour BJ et RT) empêchant donc la comparaison.



Concernant les cellules iPS, ce test a été réalisé sur les six lignées en culture. Le nombre d'échanges interchromatidiens est là aussi augmenté de manière très significative pour la lignée Bloom par rapport aux autres lignées pathologiques ou témoins étudiées (Figure 41,  $p < 0.01$ ). Les images de chacune des lignées étudiées ainsi que le détail des tests statistiques réalisés sont présentés en annexe 15.

En raison des résolutions obtenues très différentes entre les cellules iPS et les lymphocytes, il n'est pas possible de comparer directement les résultats entre ces deux types cellulaires. Cependant, on peut noter que le rapport d'augmentation entre la lignée pathologique Bloom et son témoin semble être sensiblement identique pour les deux types cellulaires, avec un coefficient compris entre 15 et 20.

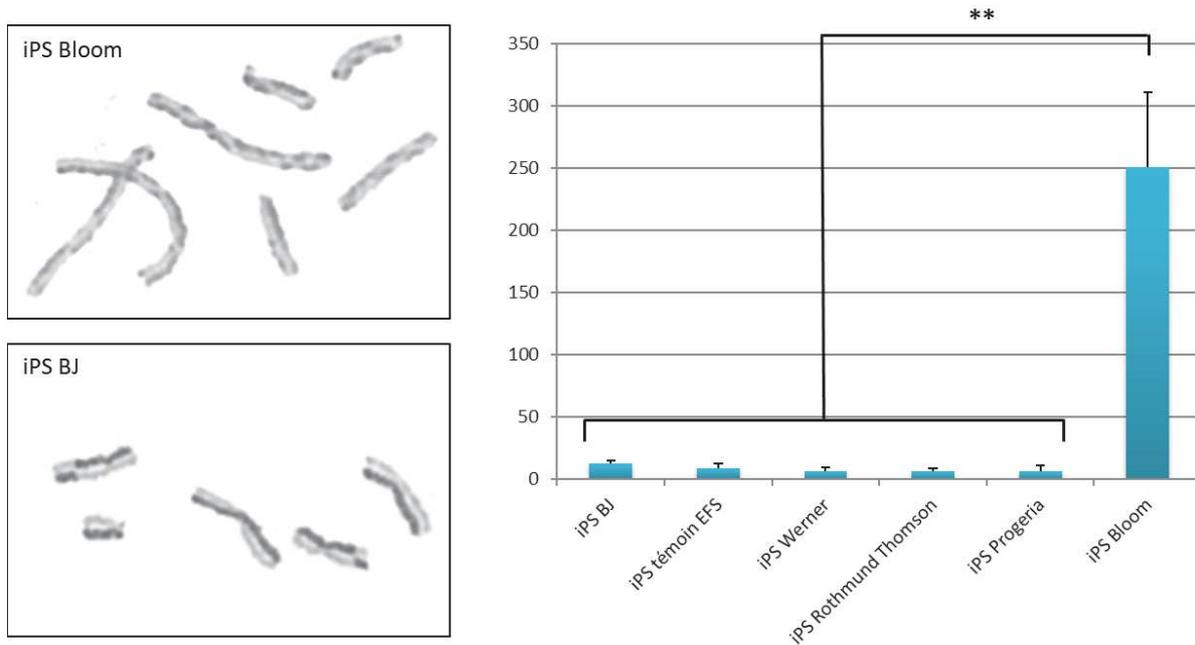


Figure 41 - Echanges inter-chromatidiens observés sur les lignées iPS.  
 A gauche en haut : chromosomes de la lignée iPS Bloom présentant de nombreux échanges.  
 A gauche en bas : chromosomes de la lignée iPS BJ présentant des échanges moins fréquents.  
 A droite : Histogrammes représentant les médianes du nombre d'échanges inter-chromatidiens observés pour chacune des lignées iPS testées. Barres verticales fines : écarts-types. Unité : nombre d'échange médian par chromosome multiplié par 100. Tests de Kruskal-Wallis et *post hoc* de Tuckey : différences statistiques significatives (\*\*  $p < 0,01$ ).

Ces résultats montrent que la lignée Bloom conserve son phénotype de recombinaison entre chromatides sœurs dans les cellules iPS, malgré les effets de la reprogrammation.

## 4.9 Etude de la fonction de membranaire des mitochondries

Le potentiel de membrane des mitochondries peut être estimé par leur capacité à agréger le marqueur JC-1. Fluorescent dans le vert sous forme libre et dans le rouge sous sa forme agrégée, la cation JC-1 traverse la membrane de la mitochondrie par un processus actif où il y est accumulé. Ainsi le rapport des fluorescences rouge sur verte permet d'évaluer ce potentiel de membrane des mitochondries. La mesure des fluorescences est faite par cytométrie en flux, à l'échelle de la cellule. Un témoin négatif est réalisé par la supplémentation de CCCP qui supprime le potentiel de membrane mitochondriale.

L'analyse des cellules iPS par cytométrie en flux après incubation en présence du marqueur JC-1 montre un potentiel de membrane plus faible pour les cellules iPS issues des lignées pathologiques Werner, Bloom, RT et Progéria par rapport aux lignées non pathologiques BJ et témoin EFS (Figure 42 et annexe 16).

Pour cette expérience, aucun test statistique n'est réalisable pour prouver le caractère significatif des différences observées.

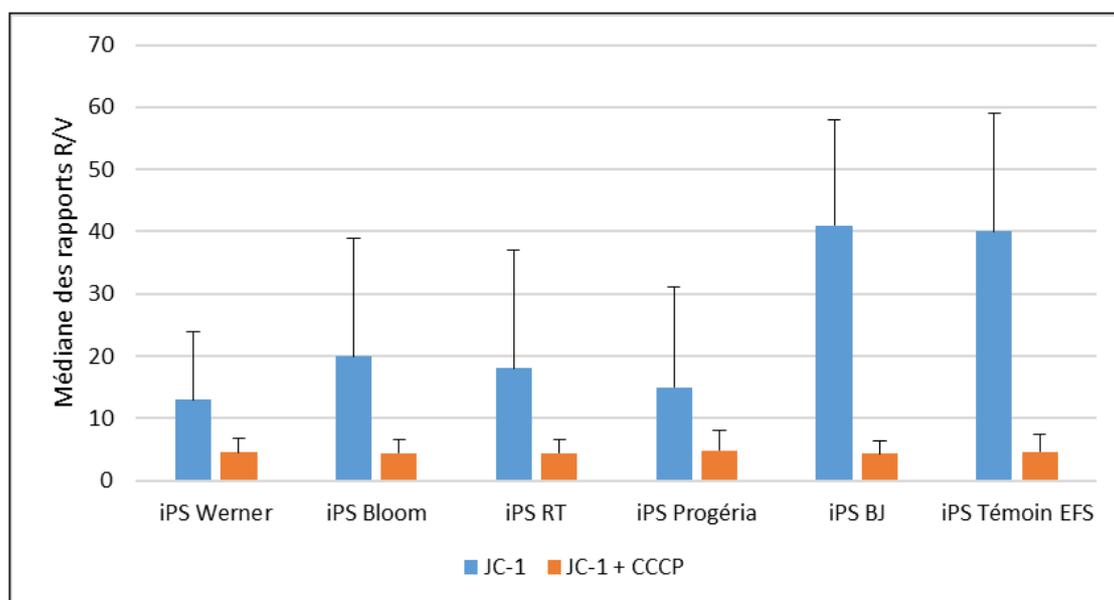


Figure 42 - Etude du potentiel de membrane des mitochondries des cellules iPS  
Incorporation du marqueur JC-1 et analyse par cytométrie en flux des émissions de fluorescence à 590 nm (rouge) et à 529 nm (vert) pour 10 000 cellules. En ordonnée : rapport de fluorescence rouge/vert, unité arbitraire. Lectures après incubation du JC-1 seul (histogrammes bleus) et accompagné de CCCP (histogrammes oranges).

Il a déjà été démontré que la reprogrammation des cellules somatiques en cellules iPS favorise une restructuration des mitochondries dans un état embryonnaire, notamment par un potentiel de membrane restauré<sup>113,114</sup>. Les résultats obtenus ici permettent de poser l'hypothèse d'une restauration incomplète du potentiel de membrane des mitochondries lors de la reprogrammation des lignées pathologiques Werner, Bloom, RT et Progéria, dans les conditions de reprogrammation que nous avons utilisées.

## 4.10 Induction des cellules iPS en cellules souches mésenchymateuses

Les cellules iPS ont été induites dans la voie mésenchymateuse puis cultivées sur plusieurs passages comme décrit dans le paragraphe 3.9 « Dérivation des cellules iPS en cellules souches mésenchymateuses ». Parallèlement, une lignée de cellules MSC isolées à partir d'une ponction de moelle osseuse chez un adulte sain a permis d'établir un « témoin » positif de différenciation. Cette lignée est notée 25RUI.

### 4.10.1 Morphologie des cellules induites

L'observation au microscope optique des cellules induites dans la voie mésenchymateuse montre des cellules adhérentes d'aspect fusiforme, au corps cellulaire plus ou moins étroit, avec d'éventuelles émissions de pseudopodes (Figure 43). Cette description faisant évoquer un aspect fibroblastique est en accord avec la morphologie habituellement rencontrée des MSC en culture.

Toutefois, concernant les lignées Bloom et 25 RUI, on note la présence d'une proportion variable de cellule au corps cellulaire élargi. Cet aspect peut évoquer des cellules en voie de sénescence.

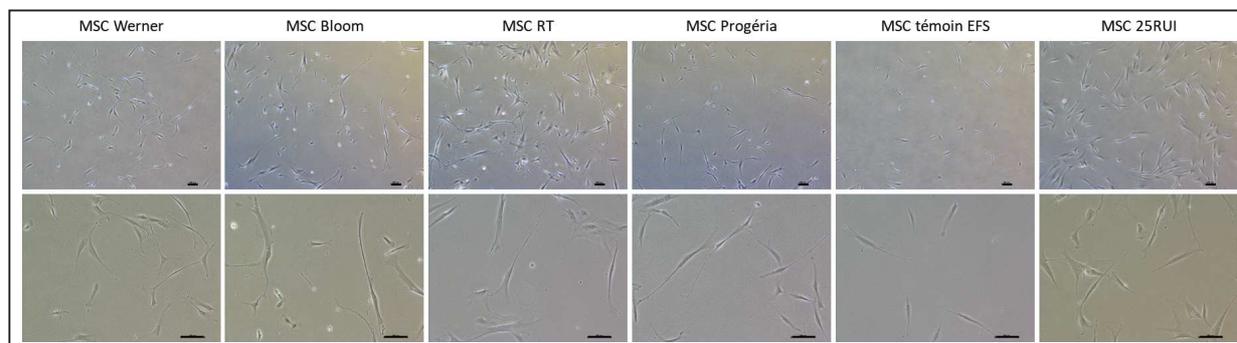


Figure 43 - Morphologie des cellules obtenues après induction dans la voie mésenchymateuse  
Observation au microscope optique aux objectifs x4 et x10. Le trait noir représente 10 µm.

### 4.10.2 Marqueurs de surface

L'un des critères permettant de définir une cellule MSC est la présence des marqueurs de surface CD90, CD105 et CD73, ainsi que l'absence des marqueurs CD34, CD11b CD19, CD45 et HLA-DR.

Après hybridation d'anticorps spécifiques de ces marqueurs, une analyse par cytométrie en flux a été réalisée (Annexe 17). Un marquage par un isotope contrôle a permis de montrer la

spécificité des anticorps utilisés. Pour les lignées Werner, RT, Progéria, témoins EFS et 25RUI, les résultats sont ceux attendus.

Concernant la lignée Bloom, le marqueur de surface CD90 fait défaut. Les résultats de l'analyse par cytométrie en flux montrent deux populations : une positive pour CD90 et l'autre négative. Ce test a été réalisé une seconde fois sur un passage plus tardif de la lignée MSC Bloom et on distingue que la population qui n'exprime pas le marqueur de surface CD90 s'accroît et devient majoritaire avec 55% des cellules analysées.

En conclusion, le test est positif pour l'ensemble des lignées examinées à l'exception des cellules de la lignée Bloom. Cette observation sera prise en compte pour les résultats obtenus à partir de ces cellules.

#### 4.10.3 Dépistage de la sénescence dans les cellules MSC

Il est possible d'évaluer la sénescence d'une lignée en culture par l'estimation de son activité  $\beta$ -galactosidase. La réaction colorée est réalisée *in situ* puis le pourcentage de cellules positives est déterminé visuellement.

Pour les 6 lignées MSC testées, il apparaît que la répartition du nombre de cellules positives n'est pas homogène (test du  $\chi^2$  positif,  $p < 0.001$ ). Pour cette expérience, la lignée MSC Bloom présente plus de cellules sénescents que les autres lignées (Figure 44).

De plus, la morphologie des cellules observées fait effectivement penser que la lignée Bloom présente plus de sénescence, avec de nombreuses cellules gonflées au cytoplasme très large.

Cependant, il est à noter que cette coloration a été réalisée une seule fois et doit être confirmée par une répétition de ce test, avant de pouvoir conclure quant à la sénescence de ces lignées. De plus, les passages auxquels le test a été fait ne sont pas exactement équivalents entre les 6 lignées, ce qui devra être corrigé avant de répéter le test.

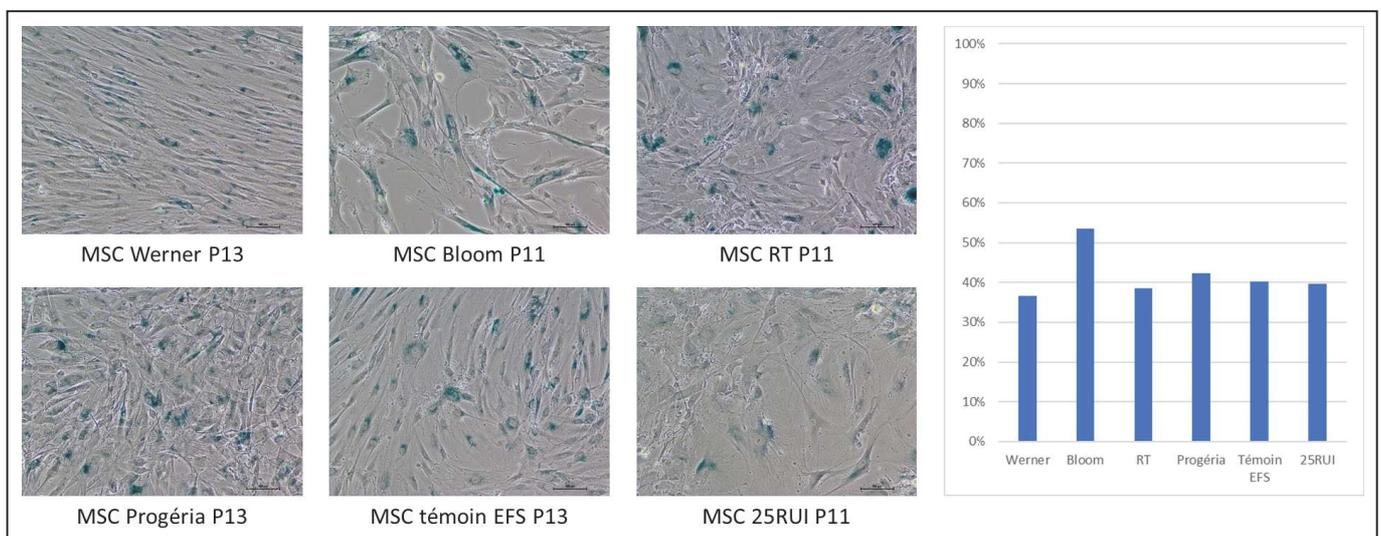


Figure 44 - Dépistage de l'activité  $\beta$ -galactosidase liée à la sénescence dans les cellules MSC

A gauche : prise de vue de chacune des lignées au microscope optique, grossissement x10. Coloration bleue des cytoplasmes des cellules présentant une activité enzymatique  $\beta$ -galactosidase. P : indique le nombre de passage à l'examen.

A droite : pourcentage de cellules positives par lignée.

#### 4.11 Différenciation terminale des MSC dans les voies adipogénique, ostéogénique et chondrogénique.

Chacune des lignées MSC a été cultivées dans des conditions induisant la différenciation dans les voies adipogéniques et ostéogénique. A la fin de la période de 21 jours d'induction, des colorations spéciales au *Oil Red O* et à l'*Alirazine Red S* montrant la présence de précurseurs des voies adipogénique et ostéogénique respectivement ont été faites (Figure 45).

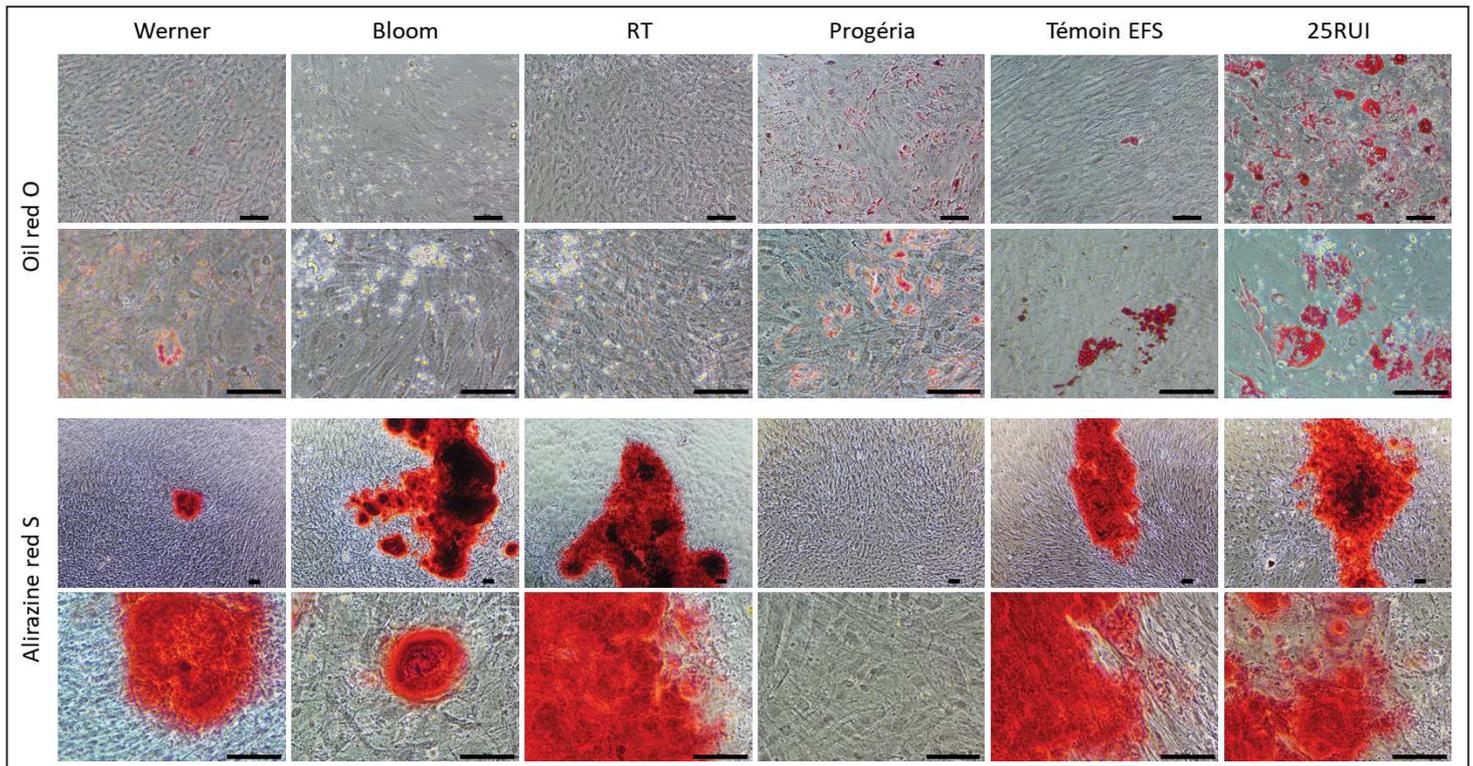


Figure 45 - Etude de la différenciation des cellules MSC dans les voies adipogéniques et ostéogéniques.

Panel supérieur : coloration au Oil Red O des cellules induites dans la voie adipogénique.

Panel inférieur : coloration à l'Alirazine Red S des cellules induites dans la voie ostéogénique.

Le trait noir représente 10  $\mu\text{m}$ .

Une évaluation visuelle et semi-quantitative a été faite au microscope optique (Tableau 6).

Concernant la voie adipogénique, toutes les lignées MSC issues de la différenciation de cellules iPS ont donné des signaux plus faibles ou absents par rapport à la lignée native MSC 25RUI. Au sein des lignées issues de la différenciation des cellules iPS, on note que les lignées Bloom et RT n'ont donné aucun précurseur de cette voie adipogénique, avec la coloration utilisée. De manière isolée, seule la lignée Progéria a montré une coloration positive franche, restant néanmoins très inférieure aux signaux perçus pour la lignée 25RUI.

| Voie         | Werner | Bloom | RT | Progéria | Témoïn EFS | 25RUI |
|--------------|--------|-------|----|----------|------------|-------|
| Adipogénique | +/-    | -     | -  | +        | +/-        | +++   |
| Ostéogénique | +      | +     | +  | -        | +          | +     |

Tableau 6 - Evaluation semi-quantitative de la différenciation des cellules MSC dans les voies adipogéniques et ostéogéniques.

|             |   |
|-------------|---|
| Symbole -   | Absence de colonie ou de cellule positive à la coloration spéciale.       |
| Symbole +/- | Présence de rares cellules faiblement positives à la coloration spéciale. |
| Symbole +   | Présence d'assez nombreuses cellules positives à la coloration spéciale.  |
| Symbole +++ | Présence de très nombreuses cellules positives à la coloration spéciale.  |

Pour la voie ostéogénique, mise à part la lignée Progéria, l'ensemble des lignées MSC ont présenté des colonies positives à la coloration spéciale, avec des intensités relativement semblables entre elles.

De ces premiers résultats de différenciation des voies terminales des MSC, on peut formuler plusieurs hypothèses. Dans les conditions expérimentales *in vitro* :

1. Les cellules MSC issues de cellules iPS s'engagent moins intensément ou moins vite dans la voie adipogénique que les cellules MSC natives.
2. La lignée MSC Progéria ne forme pas de précurseurs ostéogéniques.

La littérature indique que les MSC de la lignée Progéria montrent habituellement une différenciation précoce dans la voie ostéogénique <sup>115</sup>. Ici, il est peut-être possible d'envisager une différenciation très précoce, consommant rapidement l'ensemble des progéniteurs ostéogéniques et ne permettant pas le développement d'amas de cellules différenciées avec dépôts calciques visibles à la résolution du microscope optique.

Cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois et doit être répétée avant de pouvoir en tirer les conclusions. De plus, les colorations à l'*Oil Red O* et à l'*Alirazine Red S* mettent en évidence des éléments des voies adipogénique et ostéogénique mais ne prouvent pas la présence de cellules de ces voies. Un marquage par des anticorps spécifiques ou un dosage par q-PCR de transcrits des voies de différenciation permettraient de confirmer ces résultats <sup>116</sup>.

De plus, l'étude des différenciations terminales des cellules MSC concerne également la voie chondrogénique qui n'a pas pu être explorée dans ce travail pour cause de manque de matériel biologique. En effet, cette expérience nécessite un grand nombre de cellule et, malheureusement, les lignées BLM, RT et 25RUI n'ont pas pu proliférer suffisamment.

## 4.12 Etude de la stabilité génomique des lignées en culture

### 4.12.1 Stabilité génomique des cellules natives

Le Tableau 7 récapitule les résultats des examens des caryotypes réalisés sur les différents types de cellules natives disponibles pour les patients et les témoins de l'étude. L'annexe 18 montre un exemple de caryotype pour chacune des lignées sans anomalie décelée.

| Lignée     | Type cellulaire    | Passage | Formule  | Résolution | Nombre de cellules analysées |
|------------|--------------------|---------|--|------------|------------------------------|
| Werner     | Fibroblastes       | P4      | 3 clones anormaux *                                | 400 bandes | 29                           |
|            | Sang (lymphocytes) | -       | 46,XY  | 550 bandes | 15                           |
| Bloom      | Fibroblastes       | P3      | 46,XX  | 400 bandes | 11                           |
|            | Sang (lymphocytes) | -       | 46,XX,chr <sub>b</sub> ,cht <sub>b</sub> ,qr,del,i | 550 bandes | 15                           |
| RT         | Fibroblastes       | P3      | 46,XX  | 400 bandes | 15                           |
|            | Sang (lymphocytes) | -       | 46,XX  | 550 bandes | 15                           |
| Progéria   | PBMC               | -       | Echec  | -          | -                            |
| BJ         | Fibroblastes       | P11     | 46,XY  | 400 bandes | 15                           |
| Témoin EFS | PBMC               | -       | Echec  | -          | -                            |

Tableau 7 - Caryotypes sur cellules natives des patients.

Passage : pour les cellules en culture adhérente, le nombre de passage avant examen est indiqué.

\* Cf. figure dédiée aux fibroblastes de la lignée Werner.

chr<sub>b</sub> = *chromosome break*, cht<sub>b</sub> = *chromatid break*, qr = *quadriradial pattern*, del = *délétion*, i : *isochromosome*.

Malgré deux tentatives distinctes, les caryotypes sur cellules mononuclées du sang (PBMC) isolées des patients et des témoins se sont retrouvés en échec. Cependant, pour ces prélèvements, de l'ADN a pu être extrait et des analyses chromosomiques par puce à ADN (ACPA) ont permis d'apporter en partie une réponse pour l'étude de la stabilité génomique (Cf. paragraphe suivant).

Concernant la lignée Werner, on note une discordance entre les résultats obtenus sur les deux types cellulaires. Malgré un caryotype sur lymphocytes normal de formule 46,XY, l'étude des fibroblastes met en évidence 3 clones anormaux. Une étude par hybridation multi-FISH a permis de confirmer les anomalies décelées (Figure 46). Au total, on retrouve :

- Un clone minoritaire A (17% des cellules) avec une translocation complexe impliquant les chromosomes 3, 5 et 6 associée à une délétion interstitielle d'un chromosome 4.

Formule ISCN : **46,XY,t(3;6;5)(q27;q26;q22),del(4)(p14p16)**

- Un clone minoritaire B (11% des cellules) avec une délétion interstitielle d'un chromosome 2 et une inversion péricentrique d'un chromosome 3.

Formule ISCN : **46,XY,del(2)(q24q32),inv(3)(p22q27)**

- Un clone majoritaire C (72% des cellules) avec les mêmes anomalies que celles du clone B, associées à une inversion péricentrique d'un chromosome 9.  
 Formule ISCN : 46,XY,del(2)(q24q32),inv(3)(p22q27),inv(9)(p21q31)

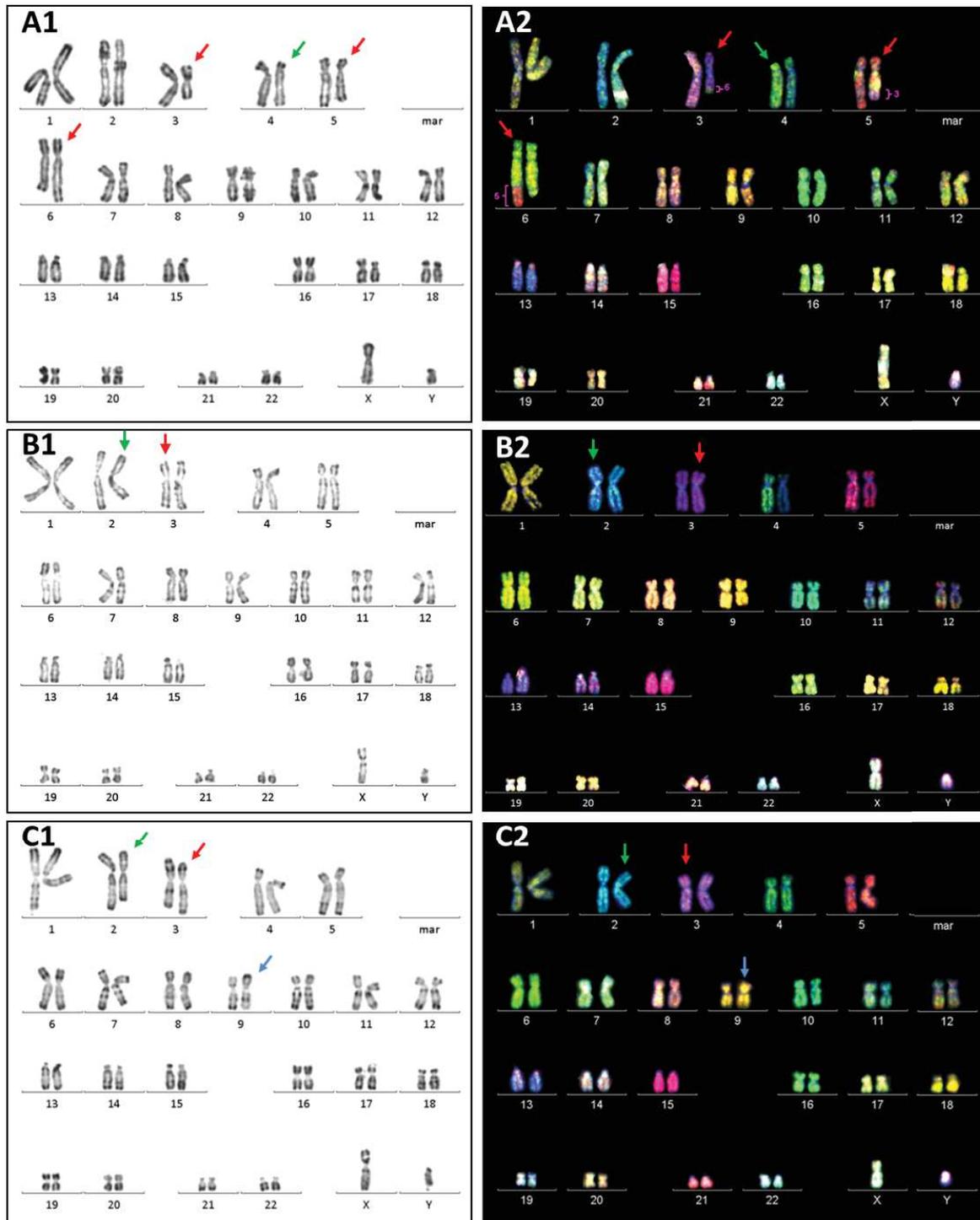


Figure 46 - Caractérisation des anomalies chromosomiques des fibroblastes de la lignée Werner.  
 Panel 1 à gauche : caryotype standard. Panel 2 à droite : analyse par hybridation multi-FISH.  
 A : Clone A. Translocation complexe (flèches rouges) et délétion interstitielle (flèches vertes).  
 B : Clone B. Délétion interstitielle (flèches vertes) et inversion péricentrique (flèches rouges).  
 C : Clone C. Délétion interstitielle (flèches vertes) et inversions péricentriques (flèches rouges et bleues).

Il est probable que le clone C dérive du clone B car on considère généralement que les anomalies chromosomiques s'accumulent au cours de l'évolution clonale. Le clone A semble indépendant puisque aucune anomalie n'est commune entre ce clone et les deux autres : on peut supposer qu'ils sont complètement indépendants et que leur ancêtre commun a disparu (Figure 47). Ces observations ont été faites au passage n°5 de la culture de fibroblastes. Avec ces éléments, il n'est pas possible de déterminer s'il s'agit d'une réelle mosaïque confinée au tissu cutané chez le patient ou d'anomalies des chromosomes acquises lors de la culture *in vitro*. Il serait certainement possible de répondre à cette question en étudiant un nouveau prélèvement cutané ou en réalisant une FISH sur noyaux d'un prélèvement jugal. Les anomalies chromosomiques retrouvées après plusieurs passages de culture cellulaire sont souvent dites « adaptatives » et seraient dues au changement d'environnement de « l'*in vivo* » vers « l'*in vitro* ». Ici, toutes les cellules fibroblastiques analysées sont anormales et présentent des anomalies complexes (c'est-à-dire avec plus de deux points de cassure par caryotype). En effet, les fibroblastes des patients Werner montrent une plus grande variété et une fréquence plus élevée d'anomalies des chromosomes par rapport à des fibroblastes non mutés soumis aux mêmes conditions de culture <sup>117</sup>. Ces remaniements non spécifiques reflètent donc un type d'instabilité génomique, par sensibilité accrue à l'environnement *in vitro*.

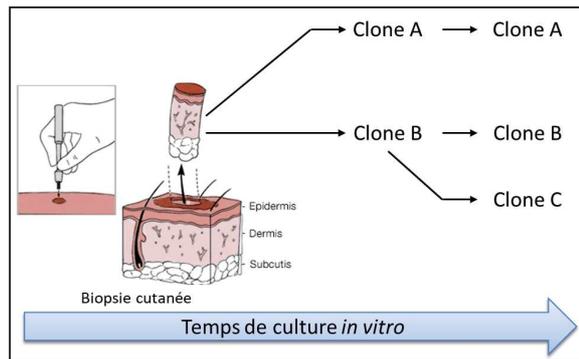


Figure 47 - Clonalité probable des fibroblastes de la lignée Werner.

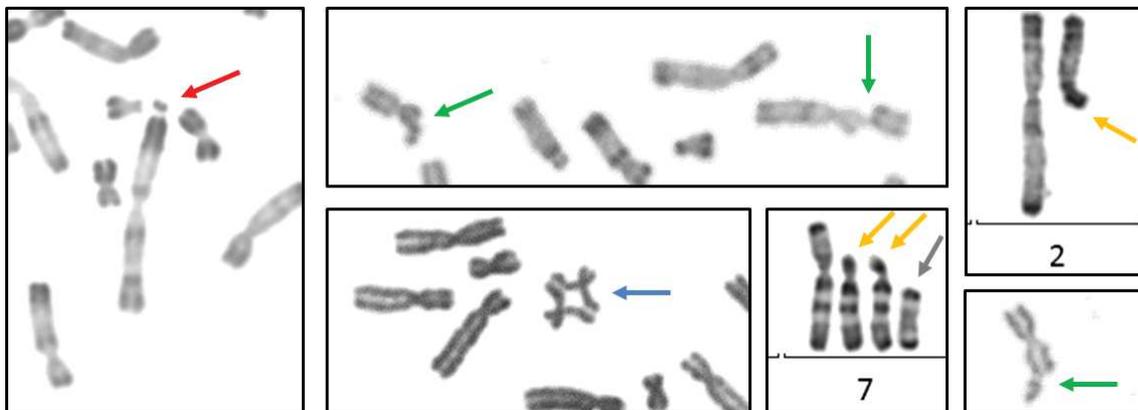


Figure 48 - Figures chromosomiques des lymphocytes de la lignée Bloom. Cassures chromosomiques (flèche rouge), cassures de chromatides (flèches vertes), figures quadriradiales (flèche bleue), délétions (flèches oranges) et isochromosomes (flèche grise)

Concernant la lignée Bloom, le caryotype présente une formule globalement normale 46,XX. Cependant, il a été observé la présence de figures chromosomiques telles que des cassures chromosomiques, des cassures de chromatides, des figures quadriradiales, des délétions et des isochromosomes sur 33 métaphases parmi les 230 observées, soit 14% des images (Figure 48). Ces anomalies « accidentelles » peuvent être rencontrées dans des cellules normales mais

le taux de celles-ci est très significativement plus élevé dans les lignées Bloom <sup>51</sup>. Il s'agit donc d'un résultat attendu pour cette lignée.

#### 4.12.2 Stabilité génomique des cellules iPS

Les caryotypes sur cellules iPS ont également été réalisés (Tableau 8 & annexe 19) et n'ont pas permis de déceler d'anomalie. Les sexes chromosomiques obtenus sont ceux attendus.

| Lignée     | Passage | Formule | Résolution | Nombre de cellules analysées |
|------------|---------|---------|------------|------------------------------|
| Werner     | P17     | 46,XY   | 300 bandes | 10                           |
| Bloom      | P31     | 46,XX   | 300 bandes | 10                           |
| RT         | P22     | 46,XX   | 300 bandes | 10                           |
| Progéria   | P17     | 46,XY   | 300 bandes | 10                           |
| BJ         | P43     | 46,XY   | 300 bandes | 10                           |
| Témoin EFS | P17     | 46,XY   | 300 bandes | 10                           |

Tableau 8 - Caryotypes sur cellules iPS des différentes lignées étudiées.  
Passage : le nombre de passage avant examen est indiqué.

Egalement des ACPA ont été réalisées sur les ADN extraits des cellules iPS et comparées aux résultats des mêmes analyses réalisées sur les cellules natives (Tableau 9 & annexe 20). Lorsque le *calling* automatique n'a pas permis d'identifier des CNV strictement identiques, un *calling* manuel a été réalisé (Cf. 3.7.3 « Analyse Chromosomique par Puce à ADN »).

Pour les lignées Werner, RT, Progéria, BJ et témoin EFS, aucune discordance n'a été mise en évidence dans la comparaison des CNV.

Concernant la lignée Bloom, 3 déséquilibres supplémentaires sur les cellules iPS (Figure 49) ont été mis en évidence :

- La présence de trois copies du matériel chromosomique de l'extrémité du bras long d'un chromosome 13, soit une trisomie partielle de 14,3 Mb du chromosome 13.
- La présence d'une seule copie du matériel chromosomique de l'extrémité du bras long d'un chromosome 18, soit une monosomie partielle de 22,2 Mb du chromosome 18.
- La présence d'un seul gonosome, c'est-à-dire une monosomie du chromosome X.

L'association d'une délétion probablement terminale et d'une duplication probablement terminale sur deux chromosomes différents fait suspecter une translocation déséquilibrée due à la présence seule d'un des deux dérivés de la translocation. A la vue de ces déséquilibres, il s'agirait d'un dérivé du chromosome 18 issu d'une translocation t(13;18)(q32.3;q21.31).

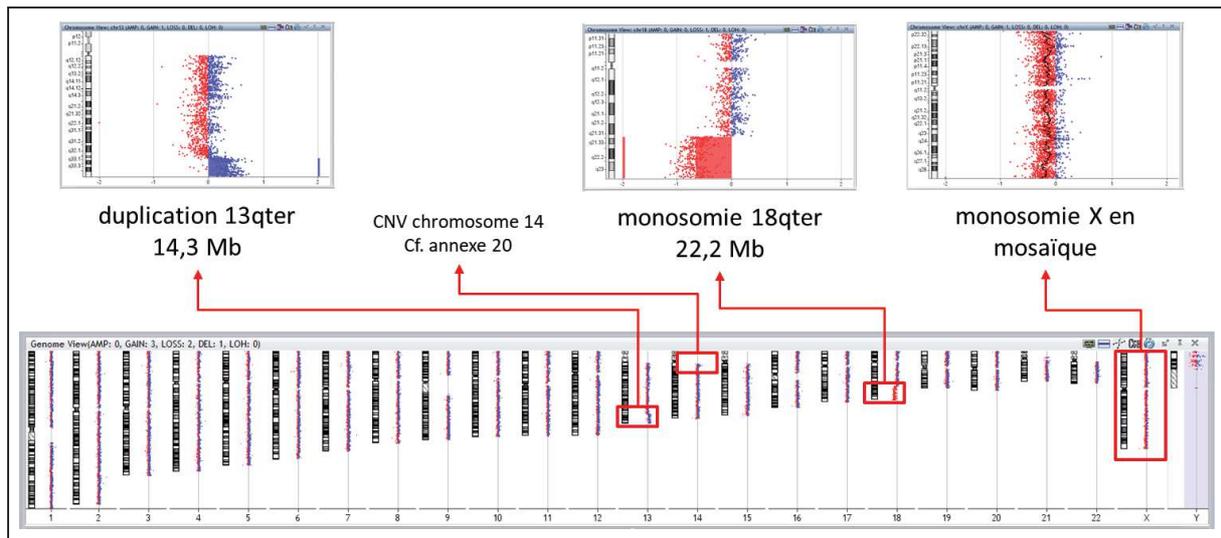


Figure 49 - Identification des CNV des cellules iPS de la lignée Bloom  
 Partie basse : vue pangénomique des résultats. Les cadres rouges indiquent la présence d'un CNV.  
 Partie haute : grossissement sur les chromosomes impliqués dans les déséquilibres, taille du CNV indiquée en mégabases (Mb).  
 Points rouges : sondes déviantes dans le sens de la délétion.  
 Points bleus : sondes déviantes dans le sens de la duplication.

De plus, ces anomalies ne semblent pas être homogènes en tenant compte du Log2 ratio des CNV décrits. En effet, la cible théorique du Log2R est de - 1 pour une perte de copie et de + 0,58 en cas de duplication. A partir des valeurs mesurées du Log2R il est possible de faire une estimation des proportions cellulaires. Même si ces estimations restent très approximatives et nécessitent d'être confirmées par une seconde technique, il semble que les proportions des mosaïques soient les suivantes :

- Cellules avec trisomie partielle du chromosome 13 : 53%
- Cellules avec monosomie partielle du chromosome 18 : 73%
- Cellules avec monosomie X : 21%

Une analyse complémentaire par FISH sur un culot cytogénétique de la lignée Bloom iPS P39 a permis de confirmer ces résultats. Deux panels d'hybridation ont été réalisés associant :

- 1 sonde (rouge) subtélomérique du bras long du chromosome 13 et 1 sonde (vert) centromérique du chromosome X, d'une part.
- 1 sonde (rouge) subtélomérique du bras long du chromosome 18 et 1 sonde (vert) centromérique du chromosome X, d'autre part.

Ces hybridations, dont les résultats sont cohérents avec ceux observés par ACPA, ont permis de déterminer que le clone monosomique X dérive du clone porteur de la translocation déséquilibrée dans les proportions suivantes :

- Clone apparemment normal : 25%
- Clone avec dérivé du chromosome 18 seul : 55%
- Clone avec dérivé du chromosome 18 et monosomie X : 20%

| Lignée, type cellulaire, passage | Chr  | Bande                | Début                     | Fin                      | Taille           | Log2R          | Nombre de sondes | Type        | Calling              | Conclusion |
|----------------------------------|--|----------------------|---------------------------|--------------------------|------------------|----------------|------------------|-------------|----------------------|------------|
| Werner Sang total                | 2  | q37.3                | 242 886 386               | 243 041 364              | 154 979          | -0.802         | 6                | Délétion    | Automatique          | STABLE     |
| Werner iPS P8                    | 2  | q37.3                | 242 886 386               | 243 041 364              | 154 979          | ND             | 6                | Délétion    | Automatique + manuel |            |
| Comparaison                      | PROFILS SIMILAIRES   |                      |                           |                          |                  |                |                  |             |                      |            |
| Bloom Fibroblastes P4            | 14   | q11.2                | 22 441 989                | 22 964 922               | 522 934          | 0.529          | 11               | Duplication | Automatique + manuel | INSTABLE   |
| Bloom iPS P36                    | 14   | q11.2                | 22 321 455                | 22 964 922               | 643 468          | 0.407          | 15               | Duplication | Automatique + manuel |            |
|                                  | 13   | q32.3q34             | 100 764 109               | 115 059 020              | 14 294 912       | 0.339          | 276              | Duplication |                      |            |
|                                  | 18   | q21.31q23            | 55 708 888                | 77 982 126               | 22 273 239       | -0.652         | 366              | Délétion    |                      |            |
| X                                | p22.33p11.21<br>q11.1q28   | 61 091<br>62 063 537 | 58 051 765<br>155 232 907 | 57 990 675<br>93 169 371 | -0.157<br>-0.163 | 1 084<br>1 597 | Délétions        |             |                      |            |
| Comparaison                      | Acquisition d'une duplication et d'une délétion probablement terminales sur des autosomes et d'une monosomie X en mosaïque |                      |                           |                          |                  |                |                  |             |                      |            |
| RT Fibroblastes P4               | 14   | q11.2                | 22 387 418                | 22 964 922               | 577 505          | 0.546          | 12               | Duplication | Automatique          | STABLE     |
| RT iPS P27                       | 14   | q11.2                | 22 387 418                | 22 964 922               | 577 505          | ND             | 12               | Duplication | Automatique + manuel |            |
| Comparaison                      | PROFILS SIMILAIRES   |                      |                           |                          |                  |                |                  |             |                      |            |
| Progéria PBMC                    | 22   | q11.23               | 25 664 618                | 26 030 280               | 365 663          | 0.558          | 8                | Duplication | Automatique + manuel | STABLE     |
| Progéria iPS P10                 | 22   | q11.23               | 25 621 922                | 25 892 253               | 270 332          | 0.553          | 7                | Duplication | Automatique + manuel |            |
| Comparaison                      | PROFILS SIMILAIRES   |                      |                           |                          |                  |                |                  |             |                      |            |
| BJ Fibroblastes P11              | 15   | q11.1q11.2           | 20 481 702                | 22 509 254               | 2 027 553        | ND             | 14               | Délétion    | Automatique + manuel | STABLE     |
| BJ iPS P10                       | 15   | q11.1q11.2           | 20 481 702                | 22 509 254               | 2 027 553        | -0.85          | 14               | Délétion    | Automatique          |            |
| Comparaison                      | PROFILS SIMILAIRES   |                      |                           |                          |                  |                |                  |             |                      |            |
| témoin EFS PBMC                  | Pas de CNV détecté   |                      |                           |                          |                  |                |                  |             | Automatique          | STABLE     |
| témoin EFS iPS P10               | Pas de CNV détecté   |                      |                           |                          |                  |                |                  |             | Automatique          |            |
| Comparaison                      | PROFILS SIMILAIRES   |                      |                           |                          |                  |                |                  |             |                      |            |

Tableau 9 - Comparaison des CNV détectés sur cellules natives et sur cellules iPS.

Description des CNV détectés : chromosomes et bandes chromosomiques concernés, positions génomiques de début et de fin (référence hg19), taille en paires de bases, Log2R : transformations logarithmiques des rapports des émissions de fluorescence normalisées « cellules d'intérêt / cellules témoins », type de CNV, *calling* : utilisation de la méthode automatisée du fournisseur du kit ACPA et éventuellement méthode manuelle par comparaison visuelle des profils d'hybridation, conclusion.

Ces résultats sont donc en faveur d'une instabilité génomique dans la lignée iPS Bloom qui n'avait pas été observée sur le caryotype. Plusieurs éléments sont à considérer pour comprendre cette discordance :

- La résolution du caryotype standard sur les cellules iPS est assez faible, environ 300 bandes. A cette résolution, seules les anomalies chromosomiques de grandes tailles sont visibles. Il n'est pas impossible que le remplacement de 14,3 Mb en position terminale du chromosome 18 par 22,2 Mb de matériel issu du chromosome 13 soit passé inaperçu.

- La monosomie X est estimée à environ 20% or seules 10 métaphases ont pu être analysées sur le caryotype. Avec ce nombre peu élevé de mitoses, la probabilité de ne pas observer la mosaïque est de 10% <sup>118,119</sup>.
- L'établissement du caryotype nécessite l'entrée en mitose de la cellule analysée. Il a été décrit que la présence d'anomalies chromosomiques peut entraîner une difficulté pour cette entrée en division cellulaire, diminuant donc la sensibilité de l'examen <sup>120-122</sup>.
- Les 3 analyses (caryotype, ACPA et FISH) ont été réalisées à des temps différents de la culture des cellules iPS. Il est probable que les anomalies retrouvées « se fixent » au fur et à mesure des cycles cellulaires, en conférant par exemple un avantage prolifératif aux cellules porteuses. Dans cette hypothèse, il est probable que la proportion de cellules anormales augmente au fil du temps, ce qui pourrait expliquer l'absence d'anomalie au passage P31, retrouvée en grandes proportions au passage P39.

#### 4.12.3 Stabilité génomique des cellules MSC

Concernant les cellules souches mésenchymateuses, le caryotype a pu être établi par analyse *in situ*, dont les résultats sont résumés sur le Tableau 10. Des images sont présentées en annexe 21.

| Lignée     | Passage | Formule  | Résolution | Nombre de cellules analysées |
|------------|---------|----------|------------|------------------------------|
| Werner     | P13     | 46,XY    | 300 bandes | 11                           |
| Bloom      | P11     | 46,XX    | 300 bandes | 20                           |
| RT         | P11     | 46,XX    | 300 bandes | 8                            |
| Progéria   | P13     | 46,XY    | 300 bandes | 8                            |
| Témoin EFS | P13     | 46,XY    | 300 bandes | 10                           |
| 25RUI      | P11     | 47,XY,+7 | 300 bandes | 3                            |

Tableau 10 - Caryotypes sur cellules MSC des différentes lignées étudiées.  
Passage : le nombre de passage avant examen est indiqué.

Il est à noter que les anomalies identifiées sur les cellules iPS de la lignée Bloom ne sont pas retrouvées sur les cellules MSC. Là aussi, les mêmes arguments que ceux détaillés dans le paragraphe précédent peuvent expliquer l'absence de mise en évidence d'anomalie. De plus, il n'est pas impossible que l'étape de différenciation des cellules iPS en cellules MSC ait été responsable d'une sélection de clones sans anomalie chromosomique. En retenant cette

hypothèse, la Figure 50 montre les différentes évolutions clonales observées pour la lignée Bloom, des cellules natives jusqu'aux cellules MSC.

Concernant la lignée 25RUI, on note la présence d'une trisomie 7 apparemment homogène. Seules 3 métaphases ont pu être analysées et le caractère homogène reste donc à confirmer, par exemple par une analyse par FISH. Ces cellules témoins sont isolées à partir d'une moelle osseuse d'un donneur adulte, ce qui les distingue des autres lignées dont les caractéristiques sont de type embryonnaire. Il a été démontré que ces cellules adultes sont fréquemment le siège d'anomalies chromosomiques clonales<sup>123</sup> qui peuvent spontanément régresser au cours de la culture.

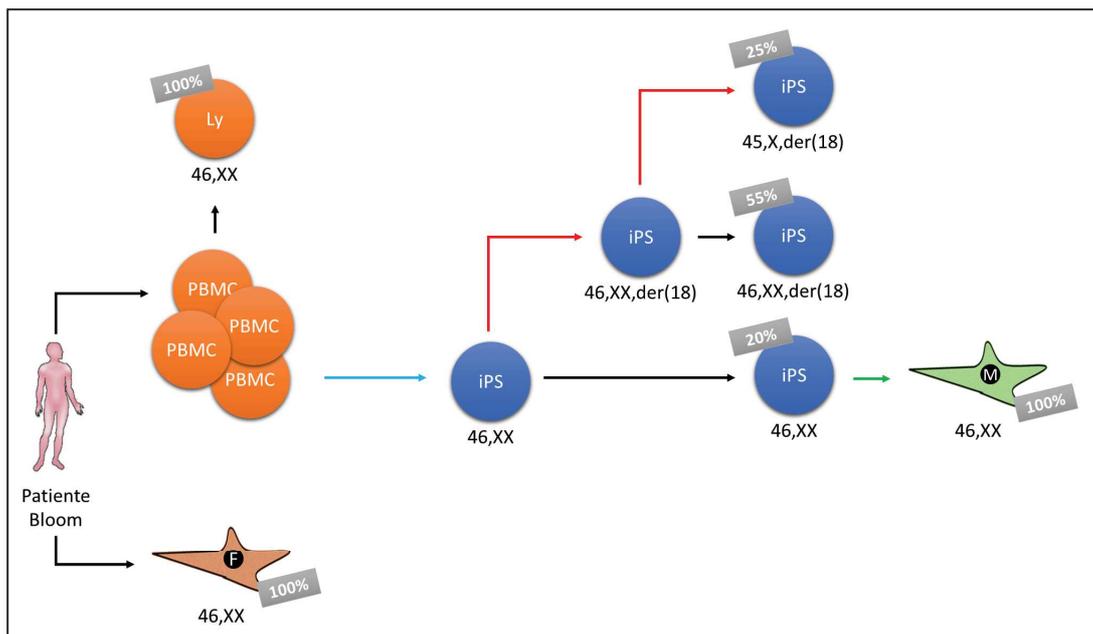


Figure 50 - Evolution clonale des cellules de la lignée Bloom.

F : fibroblastes, PBMC : cellules mononucléées du sang périphérique, Ly : lymphocytes, M : cellules MSC.

Étiquette grise : estimation du mosaïcisme cellulaire en pourcentage, avec formule chromosomique établie ou la plus probable pour chaque clone.

Flèche bleue : reprogrammation en cellule iPS.

Flèche verte : différenciation en cellules MSC.

Flèches rouges : dérivation clonale et accumulation d'anomalies chromosomiques.

Cette étude de stabilité des cellules MSC en culture doit être complétée par des ACPA. Malheureusement, les quantités de cellules obtenues n'ont pas permis de réaliser une extraction d'ADN correcte pour l'ensemble des 6 lignées.

## 5 Discussion

### 5.1 L'induction de pluripotence par le vecteur virus Sendai est efficace.

Le protocole de reprogrammation à partir de cellules somatiques a montré son efficacité concernant les pathologies du vieillissement précoce. Les différentes explorations réalisées ont permis de prouver la pluripotence et l'identité de cellules reprogrammées : activité enzymatique phosphatase alcaline, expression des marqueurs de surface et nucléaires de pluripotence, profils transcriptomiques, formation de tératomes chez la souris avec structures histologiques dérivant des trois feuilletts embryonnaires. Que les cellules ciblées soient des fibroblastes (lignées RT et BJ) ou des progéniteurs de la voie érythroïde (lignées Werner, Bloom, Progeria, Témoin EFS), aucune différence notable n'a été mise en évidence. L'infection par le virus Sendai et la réexpression des 4 facteurs de transcription OKSM semblent donc avoir été efficaces. On peut noter que pour la plupart des lignées de cette étude, la reprogrammation a été faite à partir de cellules PBMC. Contrairement aux fibroblastes, ces cellules ne montrent que peu de signes de sénescence *in vitro*. Cette propriété nous a permis d'envisager une stratégie à 4 facteurs de transcription. En effet, les fibroblastes de ces pathologies entrant rapidement en sénescence, une stratégie à 6 facteurs aurait pu être appliquée <sup>124</sup>.

Si les premiers travaux de Yamanaka utilisant les fibroblastes et les lentivirus montraient une faible efficacité, il semble que l'utilisation du virus Sendai en tant que vecteur n'ai pas de limite quant aux cibles cellulaires. Il existe des protocoles d'induction de pluripotence à partir de progéniteurs CD34+, de cellules de la pulpe dentaire et une équipe sud-coréenne a même récemment été capable de reprogrammer avec succès les cellules obtenues sur recueil urinaire <sup>125</sup>.

Cependant, le métabolisme des cellules ciblées sont prépondérants dans les chances de succès de la reprogrammation. Lapasset *et al.* <sup>124</sup> ont montré en 2011 que des cellules sénescents en culture étaient plus difficiles à reprogrammer et nécessitent la réexpression de 6 facteurs de transcription : Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc, Nanog et Lin28 avec un vecteur lentivirus. Le cycle cellulaire ralenti des cellules sénescents est un frein à la reprogrammation qui peut ainsi être dépassé. D'autres travaux sur le vecteur Sendai ont montré une corrélation négative entre l'efficacité de reprogrammation et l'âge du patient ou le temps de culture avant infection <sup>126</sup>.

Le contexte génétique des cellules cibles est également primordial : les travaux sur les syndromes d'instabilité génétique comme l'anémie de Fanconi montrent que les voies de signalisation défaillante dans cette pathologie sont en réalité indispensables à la reprogrammation. Il est donc proposé pour ce modèle, de réactiver les fonctions physiologiques de la famille de gènes *FANC* avant l'induction <sup>127,128</sup>. Le syndrome d'Ataxie Téléangiectasie dû à des anomalies du gène suppresseur de tumeur *ATM* représente également un autre modèle d'instabilité : pour cette lignée, la désactivation de p53 induite par la reprogrammation par lentivirus conjointe au défaut constitutionnel d'*ATM* engendre une

grande instabilité sous la forme de nombreux réarrangements chromosomiques <sup>129</sup>. Des cellules issues du même syndrome, reprogrammées avec un vecteur non intégratif, ne montrent pas d'instabilité dans les premiers passages en culture <sup>130</sup>.

Le choix d'une stratégie de reprogrammation à 4 facteurs de transcription portés par le vecteur de type virus Sendai semble donc être une approche acceptable pour ces pathologies liées à l'instabilité génomique ou à cycle cellulaire ralenti, notamment pour les syndromes de Werner et de Bloom. Il est envisageable qu'une stratégie similaire à 6 facteurs de transcription aurait amélioré l'efficacité du processus et aurait augmenté les quantités de cellules reprogrammées. Malheureusement, il n'existe pas de solution commerciale efficace à 6 facteurs de transcription et avec vecteur non intégratif. Dans ce travail, il n'est pas possible d'évaluer quantitativement les efficacités de reprogrammation car les inductions de pluripotence ont été réalisées sur différents temps et sur des cellules cibles différentes en nombre et en type. Ces différences sont dues au fait que nous n'avons que très peu de matériel biologique à notre disposition pour certaines lignées et parfois qu'un seul type cellulaire. Pour tenter de normaliser ces différences, un témoin sans pathologie du vieillissement précoce a été reprogrammé en parallèle pour chacun des types cellulaires. L'information obtenue est néanmoins qualitative puisque des colonies iPS ont pu être générées pour les 6 lignées testées.

## 5.2 Le modèle Werner généré se distingue des autres modèles existants

Des modèles de souris déficientes pour le gène *WRN* ont précédemment été générés mais ceux-ci ne sont pas parvenus à récapituler le phénotype de la maladie. En effet, l'apparence de ces souris reste normal pendant leur première année de vie et aucune susceptibilité particulière aux agents déstabilisants du génome n'a pu être démontrée <sup>131</sup>. Egalement, ce modèle ne parvient pas à mettre en évidence de raccourcissement significatif des télomères. Ceci peut s'expliquer par des télomères particulièrement longs chez les souris qui compenseraient le phénotype de vieillissement précoce observé chez l'Humain <sup>132</sup>. Cependant, les fibroblastes issus de ces souris ont montré une sénescence accrue lors de la culture.

Les travaux sur les cellules de patients souffrant du syndrome de Werner ont démontré que l'absence de l'hélicase WRN entraîne une réduction des longueurs télomériques, certainement due à la non résolution des structures G-quadruplex <sup>133</sup>. D'autre part, la réactivation de la télomérase permet le maintien des longueurs télomériques dans ces cellules déficientes en hélicase WRN <sup>134</sup>. Ces modèles de fibroblastes directement issus de la culture de biopsies de peau de patient Werner entrent malheureusement très rapidement en sénescence empêchant ainsi de multiplier les explorations génétiques ou fonctionnelles.

Un modèle de cellules iPS à partir de fibroblastes humains a été créé par Shimamoto *et al.* <sup>135</sup> en 2014. Ce modèle a montré que les longueurs télomériques sont restaurées après reprogrammation en cellules iPS, par un mécanisme de réactivation de la télomérase et des composants associés. Les auteurs notent toutefois une grande hétérogénéité de ces longueurs télomériques en fonction des clones analysés et de leur temps de culture. Ceci peut être

expliqué par une hétérogénéité de la réactivation de la télomérase en fonction des clones, ce qui a été démontré dans les colonies iPS issues de lignées non pathologiques<sup>136</sup>.

Dans notre étude, malgré une reprogrammation en cellules iPS et un état pluripotent prouvé par la formation des tératomes chez la souris, les cellules iPS de la lignée Werner montrent des télomères significativement plus petits que les autres lignées iPS en culture. Il serait intéressant ici d'étudier l'activité de la télomérase pour comprendre cette discordance avec le modèle humain précité.

Egalement, notre reprogrammation en cellules iPS a été réalisée avec un vecteur virus Sendai sur des cellules PBMC stimulées dans la voie érythroïde, contrairement au modèle de Shimamoto *et al.* pour lequel des fibroblastes avaient été reprogrammés par un lentivirus. Ces différences expérimentales pourraient expliquer une restauration incomplète des télomères dans notre modèle. De plus, la méthode d'évaluation des longueurs des télomères diffère dans les deux études : nous avons utilisé une méthode Q-FISH exclusivement spécifique de régions télomériques alors que la méthode TRF utilisée par Shimamoto *et al.* surestime la mesure en englobant une partie des régions subtélomériques<sup>137</sup>.

Il semble que la restauration complète des longueurs télomériques nécessite un temps de culture assez long sur des lignées saines<sup>138</sup>. Ainsi il serait intéressant de reproduire la mesure des télomères par Q-FISH sur différents passages des cellules iPS en culture afin d'explorer un éventuel retard dans la restauration de ces télomères concernant la lignée Werner.

Enfin, Lapasset *et al.*<sup>124</sup> ont montré que la reprogrammation avec 6 facteurs de transcription génère des télomères avec une taille optimisée et même plus importante que celles de cellules hESC H1 et H9 utilisées comme cellules de référence. Dans le cas de la lignée Werner, il semble que cette stratégie à 6 facteurs de transcription aurait pu être bénéfique.

### 5.3 Le syndrome de Bloom est caractérisé par son instabilité

Au cours des différentes phases de ce projet, nous avons mis en évidence que les cellules de la lignée Bloom conservent leur phénotype d'instabilité génomique.

En premier lieu, les échanges inter-chromatidiens dans les deux types cellulaires (fibroblastes et cellules iPS) de la lignée Bloom sont beaucoup plus fréquents que dans les autres lignées étudiées. Cette observation peut se comprendre par le rôle de l'hélicase BLM dans la résolution des jonctions de Holliday : son absence conduit à l'utilisation d'autres systèmes de réparation favorisant les *crossing-over* (Cf. paragraphe 1.4.1 « Rôle des hélicases dans la réparation de l'ADN »). On peut donc supposer que les autres hélicases ne peuvent pas se substituer à cette absence et BLM jouerait donc un rôle unique à cette étape de la réparation de l'ADN. Ceci serait vrai dans les cellules somatiques différenciées et également dans les cellules pluripotentes.

De plus, dans les lymphocytes de cette lignée, l'établissement du caryotype a permis de montrer des figures chromosomiques d'instabilité comme des cassures de chromatide et des

structures quadriradiales. La présence de ces formations peut être observée de manière anecdotique dans des lignées non pathologiques, et est souvent associée aux conditions de culture <sup>139</sup>. Ici, ces anomalies sont présentes à une fréquence élevée (14% des images analysées) ce qui démontre une sensibilité accrue à ces conditions de culture *in vitro*.

Concernant les cellules iPS de la lignée Bloom, les aberrations chromosomiques retrouvées sont également un signe d'instabilité génomique. Ces anomalies sont présentes à des passages tardifs des cellules iPS, ce qui suggère qu'elles sont « tolérées » par ces cellules indifférenciées. Nous avons également mis en lumière la possibilité d'une évolution clonale concernant cette lignée Bloom (Cf. Figure 50). Plusieurs facteurs sont à prendre en considération pour bien comprendre l'instabilité des cellules iPS :

- Le processus de reprogrammation est lui-même une source d'instabilité car il nécessite d'éteindre temporairement certains gènes suppresseurs de tumeurs. Ceci augmente le risque que des cassures double-brin de l'ADN soient mal réparées et est donc un potentiel d'instabilité génomique <sup>140,141</sup>. Il est probable que les anomalies chromosomiques générées à cette occasion soient responsables d'un désavantage prolifératif les faisant progressivement disparaître <sup>142</sup>.
- D'autre part, des anomalies génomiques tendent à s'accumuler dans les cultures au long cours des cellules iPS. Certaines aneuploïdies et anomalies de la structure des chromosomes sont retrouvées de manières récurrentes <sup>143</sup> laissant penser qu'il s'agit d'un mécanisme d'adaptation aux conditions de culture.

Il est intéressant de noter que ces mêmes anomalies chromosomiques ont disparu lors de la différenciation en cellules MSC. Il est probable que cette étape de différenciation ait sélectionné les clones sans anomalie, ou bien que ces anomalies ne soient pas tolérées par les cellules MSC entraînant la disparition des cellules porteuses <sup>123</sup>.

Concernant la différenciation des cellules MSC dans les voies terminales, on observe que la lignée Bloom ne montre pas de formation de cellules de type adipogénique à la coloration *Oil Red O*. Même si cette coloration peut être considérée comme un simple dépistage d'un engagement vers la voie adipogénique, l'absence de cellules à vacuoles lipidiques montre un défaut ou, tout au moins, un retard dans cette différenciation.

Egalement, la détection des marqueurs de surface caractérisant les MSC n'est pas totale pour la lignée Bloom puisque l'antigène CD90 n'est que partiellement mis en évidence.

L'association de ces deux observations sur les cellules MSC de la lignée Bloom peut nous faire suspecter une différenciation incomplète ou un biais de celle-ci des cellules iPS vers les cellules MSC.

Enfin l'étude de la sénescence de ces cellules par le dépistage de l'activité SA- $\beta$ -galactosidase montre aussi un signal plus fort concernant la lignée Bloom. Même si ce test doit être réitéré pour être considéré comme définitif, on peut supposer que l'instabilité intrinsèque à la lignée Bloom est en partie responsable de cette sénescence prématurée *in vitro*.

Au total, l'évolution des cellules de la lignée Bloom au travers des différentes étapes d'inductions de pluripotence et de différenciation semble être marquée par son instabilité génomique perpétuelle.

#### **5.4 La fonction mitochondriale des pathologies du vieillissement précoce serait altérée**

L'implication de la fonction mitochondriale dans le vieillissement physiologique et dans les syndromes du vieillissement précoce a été démontrée<sup>144</sup>. Les dysfonctions de cette membrane sont liées à l'accumulation de mutation de l'ADN mitochondrial et des anomalies de sa réplication. Ainsi le rôle de l'hélicase RECQL4 adressée vers la mitochondrie semble essentiel dans le phénotype des syndromes du vieillissement précoce. Cette hypothèse a été testée par Kumari *et al.*<sup>145</sup> sur les fibroblastes d'un patient atteint du syndrome de Rothmund-Thomson montrant une altération des fonctions mitochondriales : l'inactivation de la voie SOD2 dans les mitochondries défectueuses favoriserait la voie de la glycolyse aérobie impliquée dans le processus de transformation tumoral. Cette observation ferait ainsi le lien entre les anomalies des fonctions mitochondriales et la prédisposition aux cancers très élevée retrouvée dans les syndromes du vieillissement précoce.

Par l'étude de l'agrégation du cation JC-1 nous avons montré une différence sur les cellules iPS issues des pathologies du vieillissement précoce par rapport aux témoins sains. Cette exploration avec le cation JC-1 met en évidence un nombre absolu de mitochondries dont la membrane est fonctionnelle, par cellule. Ainsi une diminution du rapport de fluorescence peut être dû à une diminution du nombre de mitochondrie présente dans la cellule et /ou de mitochondrie dont la fonction membranaire est diminuée.

Il serait pertinent de poursuivre ces explorations fonctionnelles et quantitatives des mitochondries dans les modèles de cellules iPS, notamment par une analyse par MitoSOX permettant de détecter la génération d'ion superoxyde lors de l'activité mitochondriale. Egalement, une exploration du stress mitochondrial avec l'équipement Seahorse® nous permettra de mieux comprendre l'origine des différences mises en évidence.

#### **5.5 Sénescence et cycle cellulaire**

Les pathologies du vieillissement précoce montrent *in vitro* l'apparition prématurée d'une sénescence cellulaire. Ceci a été démontré notamment sur les fibroblastes de la lignée Werner par la présence d'une activité SA- $\beta$ -galactosidase<sup>146</sup>. Par définition, cette sénescence cellulaire représente un arrêt, ou tout au moins un frein, du cycle cellulaire.

Il est ici intéressant de voir que la reprogrammation en cellule iPS restaure le cycle cellulaire dans les cellules du vieillissement précoce comme pour les témoins sains. Ainsi, malgré une instabilité génomique encore présente, des télomères partiellement rallongés et des fonctions

mitochondriales perfectibles, les cellules iPS des pathologies du vieillissement précoce prolifèrent comme les autres cellules pluripotentes. Cette donnée nous fait supposer que les signes de sénescence *in vitro* ont été effacés par la reprogrammation. Ceci pourrait être confirmé par les résultats de l'activité SA- $\beta$ -galactosidase sur les cellules iPS.

Concernant les cellules MSC générées, nous avons mis en évidence une croissance très ralenties pour les lignées Bloom et RT, ainsi que pour la lignée MSC témoin adulte. Cette entrée en sénescence est appuyée par l'augmentation de l'activité SA-  $\beta$ -galactosidase pour la lignée Bloom. Même si cette dernière donnée doit être confirmée par un répliquât de l'expérience, nous pouvons formuler l'hypothèse que l'instabilité intrinsèque de la lignée Bloom se retrouve ici sous la forme d'une entrée en sénescence plus précoce que les autres lignées. Ceci pourrait également être en lien avec le défaut d'expression du marqueur de surface CD90 dans ces cellules MSC. L'étude de la prolifération de ces lignées pourrait être poursuivie par une analyse de leur cycle cellulaire.

Enfin, nous avons observé que la différenciation de ces lignées dans les voies terminales adipogéniques et ostéogéniques ne semblaient pas être complète par rapport à celle observée chez un témoin MSC adulte. Il est probable que les cellules MSC dérivant de cellules iPS aient un phénotype plus immature de par leurs similitudes avec des cellules embryonnaires. C'est peut-être cette différence avec les cellules MSC adultes qui expliquerait les difficultés pour ces cellules à entrer dans la voie adipogénique.

## 5.6 Qu'en est-il des hélicases RECQL1 et RECQL5 ?

Les rôles précis de ces deux hélicases ne sont pas encore bien déterminés. Malgré leur implication dans les mécanismes de réplication et de réparation des cassures de l'ADN, aucune pathologie humaine n'a été rapportée suite à des altérations des gènes *RECQL1* et *RECQL5*. Deux hypothèses sont évoquées pour expliquer ce fait :

- Leur présence serait facultative dans les cellules et le défaut des hélicases RecQL1 et RecQL5 pourrait être substitué par les fonctions des autres hélicases présentes.
- Ou bien, au contraire, leurs fonctions seraient indispensables et les anomalies liées à ces gènes seraient létales.

Concernant ces deux gènes, plus de 300 variations alléliques potentiellement pathologiques ont été retrouvées dans les bases de données de type ExAC (exomes de 50000 personnes sans anomalies du développement) et DGV (CNV considérés comme polymorphiques). Cependant, aucun individu dans ces bases de données de population saine ne présente ce type d'anomalie en portage homozygote ou hétérozygote composite. Cette observation peut nous faire supposer des maladies autosomiques récessives liées à ces deux gènes ne seraient pas compatibles avec la vie <sup>147</sup>.

En considérant cette hypothèse de leur caractère indispensable au bon fonctionnement cellulaire, il serait intéressant de produire des modèles d'altération de ces gènes. On peut

imaginer en éteindre l'expression par des inhibiteurs de type shRNA (*short hairpin RNA*) ou par des outils d'édition du génome comme CRISP/Cas9.

La modélisation de ces deux altérations génétiques viendrait compléter le panel de modèles des 3 hélicases générés lors de ce travail. Cela permettrait sans doute de mieux comprendre les interactions existantes entre les 5 hélicases répliquatives humaines.

## 6 Conclusion et perspectives

Ainsi cette étude a permis de recruter des patients atteints de pathologies rares du vieillissement précoce et de générer à partir de leurs prélèvements des modèles de cellules pluripotentes induites. L'identitovigilance des lignées a été assurée et les mutations responsables des pathologies étudiées ont été mises en évidence dans ces modèles.

La reprogrammation en cellules iPS régénère les caractéristiques épigénétiques et fonctionnelles proches de celle d'un embryon humain. Cependant, l'origine des cellules reprogrammées et leur patrimoine génétique semble maintenir une influence sur les cellules iPS en culture : la restauration des télomères apparaît incomplète pour la lignée Werner et la fonction mitochondriale des lignées des syndromes du vieillissement précoce semble ne pas être identique à celles des témoins sains.

Le rôle des hélicases dans la réparation des altérations du génome a été montré au travers de l'instabilité génomique observée lorsqu'elles sont défailtantes. Ceci est particulièrement vrai pour l'hélicase BLM dont l'instabilité paraît être une signature moléculaire. Ce projet pourra être poursuivi par l'étude de l'implication de l'hélicase BLM dans l'instabilité mitotique. En effet, les défauts de BLM sont à l'origine de la persistance de ponts observés entre chromatides sœurs lors de l'anaphase, augmentant ainsi l'instabilité mitotique, la formation de micronucléi pathologiques et le risque de perte chromosomique <sup>148</sup>. Également, une équipe Australienne a récemment identifié le gène *RMI2* comme étant responsable d'un syndrome pseudo-Bloom avec un phénotype *in vitro* similaire <sup>149</sup>. Il serait particulièrement intéressant de montrer les interactions existantes entre les protéines RMI2 et BLM.

Ces pathologies étant particulièrement sensibles aux altérations du génome, il serait intéressant d'en observer les conséquences par la formation des foyers  $\gamma$ -H2AX. Cette histone spécialisée dans la prise en charge des cassures double-brin de l'ADN est recrutée dans les régions génomiques fragilisées. Ces foyers peuvent être mis en évidence par un anticorps spécifique. La maîtrise technique d'hybridation et de quantification par microscopie à fluorescence est en cours de développement pour cette étude.

L'instabilité génomique de ces lignées peut amener à la formation de micronucléi. Ces structures peuvent avoir un cycle de réplication désynchronisé par rapport au noyau principal, engendrant encore plus d'instabilité. Observer et analyser le contenu des micronucléi amènerait sans doute à découvrir des événements d'instabilité extrême de la chromatine comme le mécanisme de chromothripsis ou autres réarrangements stochastiques du génome.

Également, les pathologies du vieillissement précoce montrent une entrée en sénescence particulièrement prématurée par rapport aux autres lignées saines. Pour ces pathologies, l'étude de la réplication de l'ADN et des structures secondaires la ralentissant nous apporterait sans doute des éléments de compréhension. Ainsi, nous pouvons détecter les origines de réplication de ces cellules par une technique de peignage moléculaire et dépister la présence

de structures G-quadruplex, sources de stress réplicatif, par des anticorps spécifiques commerciaux existant sur le marché. Il serait particulièrement intéressant d'analyser les conséquences de l'instabilité génomique liée au stress réplicatif, notamment par l'apparition de phénomènes de chromoanasythesis dus à des arrêts des fourches de réplication suivis de changements itératifs de matrice.

D'autres facteurs ayant un rôle majeur dans le développement de la sénescence cellulaire, comme p53, pourront également être recherchés dans les modèles que nous avons générés. Ces cellules entrant rapidement en sénescence pourront aussi apporter de nombreuses informations par l'intermédiaire de leur phénotype sécrétoire, aussi appelé « sécrétome ». En effet, l'ensemble des protéines et autres signaux moléculaires sécrétés durant l'entrée en sénescence joue un rôle majeur dans le renouvellement tissulaire et dans les processus tumoraux. Les pathologies du vieillissement précoce montrant une très grande susceptibilité aux cancers, il est certain que les informations données par ces protéines sécrétées nous aideront à mieux en comprendre le mécanisme.

L'étude de la différenciation des cellules iPS vers les tissus cibles des pathologies doit être poursuivie, notamment dans les lignées adipogéniques et ostéogéniques, qui présentent le plus de liens avec les signes cliniques observés chez les patients. L'identification de biais de différenciation pourrait nous orienter dans les voies métaboliques à explorer pour mieux comprendre la genèse de ces signes cliniques.

Enfin, ces modèles iPS désormais générés pourraient servir au criblage de molécules d'intérêt thérapeutique dans la lutte contre le cancer ou la recherche de traitements antivieillessement, notamment en lien avec la télomérase et les mécanismes alternatifs de rallongement de télomères.

L'utilisation de ces technologies pour modéliser des maladies génétiques de vieillissement précoce nécessite d'en définir les limites. Notre étude participe à l'exploration de ces limites en apportant des éléments de réponse quant aux stratégies employées puisqu'ici nous avons utilisé des cellules de patientes adultes. Une autre possibilité intéressante aurait été pu être de modifier des cellules souches embryonnaires saines par une mutation caractéristique d'une pathologie introduite par la technique CRISP/Cas9 par exemple. Cette stratégie pourrait compléter avantageusement nos modèles établis dans l'optique de récapituler ces pathologies *in vitro*.

## 7 Références bibliographiques

1. Hayflick, L. THE LIMITED IN VITRO LIFETIME OF HUMAN DIPLOID CELL STRAINS. *Exp. Cell Res.* **37**, 614–636 (1965).
2. Shay, J. W. & Wright, W. E. Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 72–76 (2000).
3. Rodier, F. & Campisi, J. Four faces of cellular senescence. *J. Cell Biol.* **192**, 547 (2011).
4. d’Adda di Fagagna, F. Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 512–522 (2008).
5. Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D. & Lowe, S. W. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* **88**, 593–602 (1997).
6. Bakkenist, C. J. & Kastan, M. B. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* **421**, 499–506 (2003).
7. Ramirez, R. D. *et al.* Putative telomere-independent mechanisms of replicative aging reflect inadequate growth conditions. *Genes Dev.* **15**, 398–403 (2001).
8. Maier, B. *et al.* Modulation of mammalian life span by the short isoform of p53. *Genes Dev.* **18**, 306–319 (2004).
9. Nicolai, S. *et al.* DNA repair and aging: the impact of the p53 family. *Aging* **7**, 1050 (2015).
10. Varela, I. *et al.* Combined treatment with statins and aminobisphosphonates extends longevity in a mouse model of human premature aging. *Nat. Med.* **14**, 767–772 (2008).
11. Wang, G., Chan, C.-H., Gao, Y. & Lin, H.-K. Novel roles of Skp2 E3 ligase in cellular senescence, cancer progression, and metastasis. *Chin. J. Cancer* **31**, 169–177 (2012).
12. Liu, H. *et al.* Augmented Wnt signaling in a mammalian model of accelerated aging. *Science* **317**, 803–806 (2007).
13. Lange, T. de. How Telomeres Solve the End-Protection Problem. *Science* **326**, 948 (2009).
14. Hardin, J. & Bertoni, G. *Becker’s World of the cell.* (Pearson, 2016).
15. Harley, C. B., Futcher, A. B. & Greider, C. W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**, 458–460 (1990).
16. Counter, C. M. *et al.* Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J.* **11**, 1921 (1992).

17. O'Sullivan, R. J. & Karlseder, J. Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 171–181 (2010).
18. Cesare, A. J. & Reddel, R. R. *Alternative Lengthening of Telomeres in Mammalian Cells*. (Landes Bioscience, 2013).
19. Henson, J. D., Neumann, A. A., Yeager, T. R. & Reddel, R. R. Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells. *Oncogene* **21**, 598–610 (2002).
20. Rhodes, D. & Lipps, H. J. G-quadruplexes and their regulatory roles in biology. *Nucleic Acids Res.* **43**, 8627–8637 (2015).
21. Fuster, J. J. *et al.* Control of cell proliferation in atherosclerosis: insights from animal models and human studies. *Cardiovasc. Res.* **86**, 254–264 (2010).
22. Coller, H. A. What's taking so long? S-phase entry from quiescence versus proliferation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 667–670 (2007).
23. Saugar, I., Ortiz-Bazán, M. Á. & Tercero, J. A. Tolerating DNA damage during eukaryotic chromosome replication. *Exp. Cell Res.* **329**, 170–177 (2014).
24. Campisi, J. & d'Adda di Fagagna, F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 729–740 (2007).
25. Umate, P., Tuteja, N. & Tuteja, R. Genome-wide comprehensive analysis of human helicases. *Commun. Integr. Biol.* **4**, 118 (2011).
26. Croteau, D. L., Popuri, V., Opresko, P. L. & Bohr, V. A. Human RecQ Helicases in DNA Repair, Recombination, and Replication. *Annu. Rev. Biochem.* **83**, 519 (2014).
27. Larsen, N. B. & Hickson, I. D. RecQ Helicases: Conserved Guardians of Genomic Integrity. *Adv. Exp. Med. Biol.* **767**, 161–184 (2013).
28. Huber, M. D., Duquette, M. L., Shiels, J. C. & Maizels, N. A conserved G4 DNA binding domain in RecQ family helicases. *J. Mol. Biol.* **358**, 1071–1080 (2006).
29. Sharma, S. & Brosh, R. M. Unique and important consequences of RECQ1 deficiency in mammalian cells. *Cell Cycle Georget. Tex* **7**, 989–1000 (2008).
30. Popuri, V. *et al.* Human RECQL1 participates in telomere maintenance. *Nucleic Acids Res.* **42**, 5671–5688 (2014).
31. Jensen, M. B. *et al.* The helicase and ATPase activities of RECQL4 are compromised by mutations reported in three human patients. *Aging* **4**, 790–802 (2012).
32. Garcia, P. L., Liu, Y., Jiricny, J., West, S. C. & Janscak, P. Human RECQ5beta, a protein with DNA helicase and strand-annealing activities in a single polypeptide. *EMBO J.* **23**, 2882–2891 (2004).
33. Harrigan, J. A. *et al.* The Werner syndrome protein operates in base excision repair and cooperates with DNA polymerase beta. *Nucleic Acids Res.* **34**, 745–754 (2006).

34. Boboila, C., Alt, F. W. & Schwer, B. Classical and alternative end-joining pathways for repair of lymphocyte-specific and general DNA double-strand breaks. *Adv. Immunol.* **116**, 1–49 (2012).
35. Bothmer, A. *et al.* Mechanism of DNA resection during intrachromosomal recombination and immunoglobulin class switching. *J. Exp. Med.* **210**, 115–123 (2013).
36. Wu, Y. Unwinding and rewinding: double faces of helicase? *J. Nucleic Acids* **2012**, 140601 (2012).
37. Rossi, M. L., Ghosh, A. K., Kulikowicz, T., Croteau, D. L. & Bohr, V. A. Conserved helicase domain of human RecQ4 is required for strand annealing-independent DNA unwinding. *DNA Repair* **9**, 796–804 (2010).
38. Mendez-Bermudez, A. *et al.* The roles of WRN and BLM RecQ helicases in the Alternative Lengthening of Telomeres. *Nucleic Acids Res.* **40**, 10809–10820 (2012).
39. Oshima, J., Sidorova, J. M. & Monnat, R. J. Werner syndrome: Clinical features, pathogenesis and potential therapeutic interventions. *Ageing Res. Rev.* **33**, 105–114 (2017).
40. Oshima, J., Martin, G. M. & Hisama, F. M. Werner Syndrome. in *GeneReviews*® (eds. Pagon, R. A. *et al.*) (University of Washington, Seattle, 2016).
41. Lauper, J. M., Krause, A., Vaughan, T. L. & Monnat, R. J. Spectrum and risk of neoplasia in Werner syndrome: a systematic review. *PloS One* **8**, e59709 (2013).
42. Yokote, K. *et al.* WRN Mutation Update: Mutation Spectrum, Patient Registries, and Translational Prospects. *Hum. Mutat.* **38**, 7–15 (2017).
43. Morita, K. *et al.* Werner's syndrome--chromosome analyses of cultured fibroblasts and mitogen-stimulated lymphocytes. *Br. J. Dermatol.* **136**, 620–623 (1997).
44. Sanz, M. M., German, J. & Cunniff, C. Bloom's Syndrome. in *GeneReviews*® (eds. Pagon, R. A. *et al.*) (University of Washington, Seattle, 2016).
45. Bloom, D. Congenital telangiectatic erythema resembling lupus erythematosus in dwarfs; probably a syndrome entity. *AMA Am. J. Dis. Child.* **88**, 754–758 (1954).
46. Weill Cornell Medical Center | Bloom's Syndrome Registry. Available at: [http://weill.cornell.edu/bsr/data\\_from\\_registry/](http://weill.cornell.edu/bsr/data_from_registry/).
47. Cunniff, C., Bassetti, J. A. & Ellis, N. A. Bloom's Syndrome: Clinical Spectrum, Molecular Pathogenesis, and Cancer Predisposition. *Mol. Syndromol.* **8**, 4–23 (2017).
48. Arora, H. *et al.* Bloom syndrome. *Int. J. Dermatol.* **53**, 798–802 (2014).
49. German, J. Bloom syndrome: a mendelian prototype of somatic mutational disease. *Medicine (Baltimore)* **72**, 393–406 (1993).

50. German, J., Sanz, M. M., Ciocci, S., Ye, T. Z. & Ellis, N. A. Syndrome-causing mutations of the BLM gene in persons in the Bloom's Syndrome Registry. *Hum. Mutat.* **28**, 743–753 (2007).
51. Kuhn, E. M. & Therman, E. Cytogenetics of Bloom's syndrome. *Cancer Genet. Cytogenet.* **22**, 1–18 (1986).
52. Ben Salah, G. *et al.* A novel frameshift mutation in BLM gene associated with high sister chromatid exchanges (SCE) in heterozygous family members. *Mol. Biol. Rep.* **41**, 7373–7380 (2014).
53. Bartram, C. R., Koske-Westphal, T. & Passarge, E. Chromatid exchanges in ataxia telangiectasia, Bloom syndrome, Werner syndrome, and xeroderma pigmentosum. *Ann. Hum. Genet.* **40**, 79–86 (1976).
54. Thomson, M. S. Poikiloderma Congenitale: Two Cases for Diagnosis. *Proc. R. Soc. Med.* **29**, 453–455 (1936).
55. Wang, L. L. & Plon, S. E. Rothmund-Thomson Syndrome. in *GeneReviews*(®) (eds. Pagon, R. A. et al.) (University of Washington, Seattle, 1999).
56. Larizza, L., Roversi, G. & Volpi, L. Rothmund-Thomson syndrome. *Orphanet J. Rare Dis.* **5**, 2 (2010).
57. Hicks, M. J., Roth, J. R., Kozinetz, C. A. & Wang, L. L. Clinicopathologic features of osteosarcoma in patients with Rothmund-Thomson syndrome. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **25**, 370–375 (2007).
58. Simon, T. *et al.* Multiple malignant diseases in a patient with Rothmund-Thomson syndrome with RECQL4 mutations: Case report and literature review. *Am. J. Med. Genet. A.* **152A**, 1575–1579 (2010).
59. Van Maldergem, L. Baller-Gerold Syndrome. in *GeneReviews*(®) (eds. Pagon, R. A. et al.) (University of Washington, Seattle, 2011).
60. Piard, J. *et al.* Search for ReCQL4 mutations in 39 patients genotyped for suspected Rothmund–Thomson/Baller-Gerold syndromes. *Clin. Genet.* **87**, 244–251 (2015).
61. Siitonen, H. A. *et al.* The mutation spectrum in RECQL4 diseases. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* **17**, 151–158 (2009).
62. Ying, K. L., Oizumi, J. & Curry, C. J. Rothmund-Thomson syndrome associated with trisomy 8 mosaicism. *J. Med. Genet.* **27**, 258–260 (1990).
63. Anbari, K. K. *et al.* Two primary osteosarcomas in a patient with Rothmund-Thomson syndrome. *Clin. Orthop.* 213–223 (2000).
64. Hennekam, R. C. M. Hutchinson-Gilford progeria syndrome: review of the phenotype. *Am. J. Med. Genet. A.* **140**, 2603–2624 (2006).
65. Gordon, L. B., Brown, W. T. & Collins, F. S. Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome. in *GeneReviews*(®) (eds. Pagon, R. A. et al.) (University of Washington, Seattle, 2015).

66. Lopez-Mejia, I. C. *et al.* A conserved splicing mechanism of the LMNA gene controls premature aging. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 4540–4555 (2011).
67. De Sandre-Giovannoli, A. & Lévy, N. Altered splicing in prelamin A-associated premature aging phenotypes. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* **44**, 199–232 (2006).
68. Reddy, S. & Comai, L. Lamin A, farnesylation and aging. *Exp. Cell Res.* **318**, 1–7 (2012).
69. Aliper, A. M. *et al.* Signaling pathway activation drift during aging: Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome fibroblasts are comparable to normal middle-age and old-age cells. *Aging* **7**, 26–37 (2015).
70. Kozlov, S. *et al.* Mutations in the mouse *Lmna* gene causing progeria, muscular dystrophy and cardiomyopathy. *Novartis Found. Symp.* **264**, 246–258; discussion 258–263 (2005).
71. Cockburn, K. & Rossant, J. Making the blastocyst: lessons from the mouse. *J. Clin. Invest.* **120**, 995–1003 (2010).
72. Thomson, J. A. *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**, 1145–1147 (1998).
73. Boyer, L. A. *et al.* Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* **122**, 947–956 (2005).
74. Amit, M. *et al.* Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev. Biol.* **227**, 271–278 (2000).
75. Greber, B., Lehrach, H. & Adjaye, J. Silencing of core transcription factors in human EC cells highlights the importance of autocrine FGF signaling for self-renewal. *BMC Dev. Biol.* **7**, 46 (2007).
76. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663–676 (2006).
77. Takahashi, K. *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**, 861–872 (2007).
78. Do, J. T. & Schöler, H. R. Regulatory circuits underlying pluripotency and reprogramming. *Trends Pharmacol. Sci.* **30**, 296–302 (2009).
79. Samavarchi-Tehrani, P. *et al.* Functional genomics reveals a BMP-driven mesenchymal-to-epithelial transition in the initiation of somatic cell reprogramming. *Cell Stem Cell* **7**, 64–77 (2010).
80. Li, R. *et al.* A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* **7**, 51–63 (2010).
81. Mah, N. *et al.* Molecular insights into reprogramming-initiation events mediated by the OSKM gene regulatory network. *PloS One* **6**, e24351 (2011).

82. Armstrong, L. *et al.* Human induced pluripotent stem cell lines show stress defense mechanisms and mitochondrial regulation similar to those of human embryonic stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* **28**, 661–673 (2010).
83. Suhr, S. T. *et al.* Mitochondrial rejuvenation after induced pluripotency. *PLoS One* **5**, e14095 (2010).
84. Folmes, C. D. L. *et al.* Somatic oxidative bioenergetics transitions into pluripotency-dependent glycolysis to facilitate nuclear reprogramming. *Cell Metab.* **14**, 264–271 (2011).
85. Boregowda, S. V., Booker, C. N. & Phinney, D. G. Mesenchymal Stem Cells: The Moniker Fits the Science. *Stem Cells Dayt. Ohio* (2017). doi:10.1002/stem.2713
86. Can, A., Celikkan, F. T. & Cinar, O. Umbilical cord mesenchymal stromal cell transplantations: A systemic analysis of clinical trials. *Cytotherapy* (2017). doi:10.1016/j.jcyt.2017.08.004
87. Dominici, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315–317 (2006).
88. Tan, J. Y., Sriram, G., Rufaihah, A. J., Neoh, K. G. & Cao, T. Efficient derivation of lateral plate and paraxial mesoderm subtypes from human embryonic stem cells through GSKi-mediated differentiation. *Stem Cells Dev.* **22**, 1893–1906 (2013).
89. Lengauer, C., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* **396**, 643–649 (1998).
90. Gatinois, V., Puechberty, J., Lefort, G., Geneviève, D. & Pellestor, F. [Complex chromosomal rearrangements: a paradigm for the study of chromosomal instability]. *Med. Sci. MS* **30**, 55–63 (2014).
91. Pellestor, F., Gatinois, V., Puechberty, J., Geneviève, D. & Lefort, G. Chromothripsis: potential origin in gametogenesis and preimplantation cell divisions. A review. *Fertil. Steril.* **102**, 1785–1796 (2014).
92. Masset, H. *et al.* A Distinct Class of Chromoanagenesis Events Characterized by Focal Copy Number Gains. *Hum. Mutat.* **37**, 661–668 (2016).
93. Murnane, J. P. Telomere dysfunction and chromosome instability. *Mutat. Res.* **730**, 28–36 (2012).
94. Wang, B. *et al.* Analysis of Meiotic Segregation Patterns and Interchromosomal Effects in Sperm from 13 Robertsonian Translocations. *Balk. J. Med. Genet. BJMG* **20**, 43–50 (2017).
95. Anton, E., Vidal, F. & Blanco, J. Interchromosomal effect analyses by sperm FISH: incidence and distribution among reorganization carriers. *Syst. Biol. Reprod. Med.* **57**, 268–278 (2011).

96. Therman, E. & Susman, M. *Human chromosomes: structure, behavior, and effects*. (Springer-Verlag, 1993).
97. Przybytkowski, E. *et al.* Chromosome-breakage genomic instability and chromothripsis in breast cancer. *BMC Genomics* **15**, (2014).
98. Churko, J. M., Burridge, P. W. & Wu, J. C. Generation of human iPSCs from human peripheral blood mononuclear cells using non-integrative Sendai virus in chemically defined conditions. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **1036**, 81–88 (2013).
99. Chen, G. *et al.* Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture. *Nat. Methods* **8**, 424–429 (2011).
100. Cecchini, M. J., Amiri, M. & Dick, F. A. Analysis of cell cycle position in mammalian cells. *J. Vis. Exp. JoVE* (2012). doi:10.3791/3491
101. Lansdorp, P. M. *et al.* Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Hum. Mol. Genet.* **5**, 685–691 (1996).
102. Hultdin, M. *et al.* Telomere analysis by fluorescence in situ hybridization and flow cytometry. *Nucleic Acids Res.* **26**, 3651–3656 (1998).
103. Veselkov, A. G., Demidov, V. V., Nielson, P. E. & Frank-Kamenetskii, M. D. A new class of genome rare cutters. *Nucleic Acids Res.* **24**, 2483–2487 (1996).
104. Cossarizza, A. & Salvio, S. Flow cytometric analysis of mitochondrial membrane potential using JC-1. *Curr. Protoc. Cytom.* **Chapter 9**, Unit 9.14 (2001).
105. BiostaTGV - Statistiques en ligne. Available at: <https://marne.u707.jussieu.fr/biostatgv/>.
106. Complex online web statistical calculators. Available at: <http://astatsa.com/>.
107. Friedrich, K. *et al.* WRN mutations in Werner syndrome patients: genomic rearrangements, unusual intronic mutations and ethnic-specific alterations. *Hum. Genet.* **128**, 103–111 (2010).
108. Monnat, R. J. Human RECQ helicases: roles in DNA metabolism, mutagenesis and cancer biology. *Semin. Cancer Biol.* **20**, 329–339 (2010).
109. Croteau, D. L., Singh, D. K., Hoh Ferrarelli, L., Lu, H. & Bohr, V. A. RECQL4 in genomic instability and aging. *Trends Genet. TIG* **28**, 624–631 (2012).
110. De Sandre-Giovannoli, A. *et al.* Lamin a truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science* **300**, 2055 (2003).
111. Liu, G.-H. *et al.* Recapitulation of premature ageing with iPSCs from Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* **472**, 221–225 (2011).
112. Ghule, P. N. *et al.* Reprogramming the pluripotent cell cycle: restoration of an abbreviated G1 phase in human induced pluripotent stem (iPS) cells. *J. Cell. Physiol.* **226**, 1149 (2011).

113. Lapasset, L. *et al.* Rejuvenating senescent and centenarian human cells by reprogramming through the pluripotent state. *Genes Dev.* **25**, 2248–2253 (2011).
114. Rohani, L., Johnson, A. A., Arnold, A. & Stolzing, A. The aging signature: a hallmark of induced pluripotent stem cells? *Aging Cell* **13**, 2–7 (2014).
115. Lo Cicero, A. *et al.* A High Throughput Phenotypic Screening reveals compounds that counteract premature osteogenic differentiation of HGPS iPS-derived mesenchymal stem cells. *Sci. Rep.* **6**, 34798 (2016).
116. Ragni, E., Viganò, M., Rebullà, P., Giordano, R. & Lazzari, L. What is beyond a qRT-PCR study on mesenchymal stem cell differentiation properties: how to choose the most reliable housekeeping genes. *J. Cell. Mol. Med.* **17**, 168–180 (2013).
117. Grigorova, M., Balajee, A. S. & Natarajan, A. T. Spontaneous and X-ray-induced chromosomal aberrations in Werner syndrome cells detected by FISH using chromosome-specific painting probes. *Mutagenesis* **15**, 303–310 (2000).
118. Hook, E. B. Exclusion of chromosomal mosaicism: tables of 90%, 95% and 99% confidence limits and comments on use. *Am. J. Hum. Genet.* **29**, 94–97 (1977).
119. Guide de bonnes pratiques en cytogénétique - V3 2014 - ACLF - Version électronique disponible à l'adresse <http://www.eaclf.org/bulletin.php>.
120. Schubert, R., Viersbach, R., Eggermann, T., Hansmann, M. & Schwanitz, G. Report of two new cases of Pallister-Killian syndrome confirmed by FISH: tissue-specific mosaicism and loss of i(12p) by in vitro selection. *Am. J. Med. Genet.* **72**, 106–110 (1997).
121. Reeser, S. L. & Wenger, S. L. Failure of PHA-stimulated i(12p) lymphocytes to divide in Pallister-Killian syndrome. *Am. J. Med. Genet.* **42**, 815–819 (1992).
122. Persutte, W. H. & Lenke, R. R. Failure of amniotic-fluid-cell growth: is it related to fetal aneuploidy? *Lancet* **345**, 96–97 (1995).
123. Stultz, B. G. *et al.* Chromosomal Stability of Mesenchymal Stromal Cells During In Vitro Culture. *Cytotherapy* **18**, 336–343 (2016).
124. Lapasset, L. *et al.* Rejuvenating senescent and centenarian human cells by reprogramming through the pluripotent state. *Genes Dev.* **25**, 2248–2253 (2011).
125. Uhm, K.-O. *et al.* Generation of human induced pluripotent stem cells from urinary cells of a healthy donor using a non-integration system. *Stem Cell Res.* **21**, 44–46 (2017).
126. Trokovic, R., Weltner, J., Noisa, P., Raivio, T. & Otonkoski, T. Combined negative effect of donor age and time in culture on the reprogramming efficiency into induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res.* **15**, 254–262 (2015).
127. Müller, L. U. W. *et al.* Overcoming reprogramming resistance of Fanconi anemia cells. *Blood* **119**, 5449–5457 (2012).

128. Liu, G.-H. *et al.* Modeling Fanconi Anemia pathogenesis and therapeutics using integration-free patient-derived iPSCs. *Nat. Commun.* **5**, 4330 (2014).
129. Nayler, S. *et al.* Induced pluripotent stem cells from ataxia-telangiectasia recapitulate the cellular phenotype. *Stem Cells Transl. Med.* **1**, 523–535 (2012).
130. Bhatt, N. *et al.* Integration-free erythroblast-derived human induced pluripotent stem cells (iPSCs) from an individual with Ataxia-Telangiectasia (A-T). *Stem Cell Res.* **17**, 205–207 (2016).
131. Lombard, D. B. *et al.* Mutations in the WRN gene in mice accelerate mortality in a p53-null background. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 3286–3291 (2000).
132. Chang, S. *et al.* Essential role of limiting telomeres in the pathogenesis of Werner syndrome. *Nat. Genet.* **36**, 877–882 (2004).
133. Crabbe, L., Verdun, R. E., Haggblom, C. I. & Karlseder, J. Defective telomere lagging strand synthesis in cells lacking WRN helicase activity. *Science* **306**, 1951–1953 (2004).
134. Sugimoto, M. A cascade leading to premature aging phenotypes including abnormal tumor profiles in Werner syndrome (review). *Int. J. Mol. Med.* **33**, 247–253 (2014).
135. Shimamoto, A. *et al.* Reprogramming Suppresses Premature Senescence Phenotypes of Werner Syndrome Cells and Maintains Chromosomal Stability over Long-Term Culture. *PLoS ONE* **9**, (2014).
136. Mathew, R. *et al.* Robust activation of the human but not mouse telomerase gene during the induction of pluripotency. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **24**, 2702–2715 (2010).
137. Aubert, G., Hills, M. & Lansdorp, P. M. Telomere Length Measurement - caveats and a critical assessment of the available technologies and tools. *Mutat. Res.* **730**, 59 (2012).
138. Marion, R. M. *et al.* Telomeres acquire embryonic stem cell characteristics in induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **4**, 141–154 (2009).
139. Chaganti, R. S., Schonberg, S. & German, J. A manyfold increase in sister chromatid exchanges in Bloom's syndrome lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **71**, 4508–4512 (1974).
140. González, F. *et al.* Homologous recombination DNA repair genes play a critical role in reprogramming to a pluripotent state. *Cell Rep.* **3**, 651–660 (2013).
141. Lee, J.-Y., Kim, D.-K., Ko, J.-J., Kim, K. P. & Park, K.-S. Rad51 Regulates Reprogramming Efficiency through DNA Repair Pathway. *Dev. Reprod.* **20**, 163–169 (2016).
142. Mayshar, Y. *et al.* Identification and classification of chromosomal aberrations in human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **7**, 521–531 (2010).

143. Turinetto, V., Orlando, L. & Giachino, C. Induced Pluripotent Stem Cells: Advances in the Quest for Genetic Stability during Reprogramming Process. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 1952 (2017).
144. Bratic, A. & Larsson, N.-G. The role of mitochondria in aging. *J. Clin. Invest.* **123**, 951–957 (2013).
145. Kumari, J. *et al.* Mitochondrial functions of RECQL4 are required for the prevention of aerobic glycolysis-dependent cell invasion. *J Cell Sci* **129**, 1312–1318 (2016).
146. Shamanna, R. A. *et al.* Camptothecin targets WRN protein: mechanism and relevance in clinical breast cancer. *Oncotarget* **7**, 13269–13284 (2016).
147. Fu, W., Ligabue, A., Rogers, K. J., Akey, J. M. & Monnat, R. J. Human RECQ Helicase Pathogenic Variants, Population Variation and “Missing” Diseases. *Hum. Mutat.* **38**, 193–203 (2017).
148. Liu, Y., Nielsen, C. F., Yao, Q. & Hickson, I. D. The origins and processing of ultra fine anaphase DNA bridges. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **26**, 1–5 (2014).
149. Hudson, D. F. *et al.* Loss of RMI2 Increases Genome Instability and Causes a Bloom-Like Syndrome. *PLoS Genet.* **12**, e1006483 (2016).
150. Moralli, D. *et al.* An improved technique for chromosomal analysis of human ES and iPS cells. *Stem Cell Rev.* **7**, 471–477 (2011).
151. Perner, S. *et al.* Quantifying telomere lengths of human individual chromosome arms by centromere-calibrated fluorescence in situ hybridization and digital imaging. *Am. J. Pathol.* **163**, 1751–1756 (2003).
152. O’Sullivan, J. N. *et al.* Telomere length assessment in tissue sections by quantitative FISH: Image analysis algorithms. *Cytometry A* **58A**, 120–131 (2004).
153. *Human chromosomes: principles and techniques.* (McGraw-Hill, 1995).
154. *Molecular toxicology protocols.* (Humana Press, 2014).
155. Momcilovic, O. *et al.* DNA damage responses in human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. *PloS One* **5**, e13410 (2010).

## 8 Figures et Tables

|  |    |
|--|----|
| Figure 1 - Notion de sénescence cellulaire.....  | 14 |
| Figure 2 - Physiologie des télomères. ....   | 17 |
| Figure 3 - Le raccourcissement des télomères participe à l'instabilité génomique.....                    | 18 |
| Figure 4 - Fonctions des structures de type G-quadruplex sur les télomères des chromosomes.....          | 19 |
| Figure 5 - Aspects fondamentaux du contrôle du cycle cellulaire .....                                    | 21 |
| Figure 6 - Structures fonctionnelles des hélicases RecQL (Mammifères) et RecQ (procaryotes).....         | 22 |
| Figure 7 - Fonctions métaboliques et interactions protéines-protéines des hélicases RecQL.....           | 24 |
| Figure 8 - Voies de réparation de l'ADN impliquant les hélicases RecQL. ....                             | 25 |
| Figure 9 - Rôles des hélicases RecQL dans la réplication de l'ADN.....                                   | 28 |
| Figure 10 - Actions des hélicases réplicatives dans le maintien des télomères.....                       | 30 |
| Figure 11 - Patient atteinte du syndrome de Werner .....   | 32 |
| Figure 12 - Répartition des mutations responsables du syndrome de Werner. ....                           | 33 |
| Figure 13 - Phénotype facial du syndrome de Bloom. ....  | 35 |
| Figure 14 - Répartition des mutations responsables du syndrome de Bloom.....                             | 36 |
| Figure 15 - Particularités cytogénétiques du syndrome de Bloom.....                                      | 37 |
| Figure 16 - Présentation clinique du syndrome de Rothmund-Thomson.....                                   | 38 |
| Figure 17 - Cartographie des mutations impliquées dans le syndrome de Rothmund-Thomson. ....             | 40 |
| Figure 18 - Signes cliniques de la progéria de Hutchinson-Gilford.....                                   | 43 |
| Figure 19 - Epissages alternatifs du gène LMNA. ....   | 44 |
| Figure 20 - Développement embryonnaire pré-implantatoire du zygote au blastocyste.....                   | 45 |
| Figure 21 - Principe d'utilisation des cellules hESC.....  | 46 |
| Figure 22 - Principe de génération et d'utilisation des cellules pluripotentes induite.....              | 47 |
| Figure 23 - principe mécanistique du chromothripsis. ....  | 50 |
| Figure 24 - Principe mécanistique du chromoanasythesis.....  | 51 |
| Figure 25 - Séquence cassure/fusion/pont amplifiant l'instabilité génomique.....                         | 51 |
| Figure 26 - Principe de l'étude du cycle cellulaire par marquage au BrdU et à l'iodure de propidium..... | 62 |

|  |     |
|--|-----|
| Figure 27 - principe d'incorporation du BrdU dans l'ADN en répllication pour la technique SCE .....  | 65  |
| Figure 28 - Morphologie et détection de l'activité phosphatase alcaline des colonies iPS.....  | 71  |
| Figure 29 - Détection par immunofluorescence des marqueurs de la pluripotence des cellules iPS. ...  | 72  |
| Figure 30 - Analyse non supervisée de l'expression des gènes impliqués dans la pluripotence ou dans la spécialisation des fibroblastes. .... | 73  |
| Figure 31 - Analyse des profils d'expression par la corrélation de Spearman.....   | 74  |
| Figure 32 - Mutation causale chez le patient Werner.....   | 78  |
| Figure 33 - Mutation causale chez le patient Bloom.....  | 79  |
| Figure 34 - Mutation causale chez le patient RT.....   | 80  |
| Figure 35 - Mutation causale chez le patient HGPS.....   | 80  |
| Figure 36 - Expression des hélicases réplcatives WRN, BLM et RecQL4.....   | 82  |
| Figure 37 - Expression de la lamine A.....   | 83  |
| Figure 38 - Etude du cycle cellulaire des lignées iPS .....  | 84  |
| Figure 39 - Estimation des longueurs télomériques des lignées iPS .....  | 85  |
| Figure 40 - Echanges inter-chromatidiens observés sur les lymphocytes de la patiente Bloom.....  | 86  |
| Figure 41 - Echanges inter-chromatidiens observés sur les lignée iPS. ....   | 87  |
| Figure 42 - Etude du potentiel de membrane des mitochondries des cellules iPS .....  | 88  |
| Figure 43 - Morphologie des cellules obtenues après induction dans la voie mésenchymateuse .....   | 89  |
| Figure 44 - Dépistage de l'activité $\beta$ -galactosidase liée à la sénescence dans les cellules MSC .....                                  | 90  |
| Figure 45 - Etude de la différenciation des cellules MSC dans les voies adipogéniques et ostéogéniques. ....                                 | 91  |
| Figure 46 - Caractérisation des anomalies chromosomiques des fibroblastes de la lignée Werner. ....  | 94  |
| Figure 47 - Clonalité probable des fibroblastes de la lignée Werner. ....  | 95  |
| Figure 48 - Figures chromosomiques des lymphocytes de la lignée Bloom. ....  | 95  |
| Figure 49 - Identification des CNV des cellules iPS de la lignée Bloom.....  | 97  |
| Figure 50 - Evolution clonale des cellules de la lignée Bloom. ....  | 100 |

|   |    |
|---|----|
| Tableau 1 - Méthodes de reprogrammation des cellules somatiques en cellules iPS.....  | 48 |
| Tableau 2 - Origines et caractéristiques des cellules disponibles.....  | 55 |
| Tableau 3 - Identification des structures histologiques dérivant des trois feuillets embryonnaires sur les tumeurs murines. ....    | 76 |
| Tableau 4 - Conclusions de l'expertise histologique.....  | 76 |
| Tableau 5 - Identification des allèles des polymorphismes microsatellitaires des 6 lignées étudiées...                              | 81 |
| Tableau 6 - Evaluation semi-quantitative de la différenciation des cellules MSC dans les voies adipogéniques et ostéogéniques. .... | 92 |
| Tableau 7 - Caryotypes sur cellules natives des patients. ....  | 93 |
| Tableau 8 - Caryotypes sur cellules iPS des différentes lignées étudiées. ....  | 96 |
| Tableau 9 - Comparaison des CNV détectés sur cellules natives et sur cellules iPS. ....   | 98 |
| Tableau 10 - Caryotypes sur cellules MSC des différentes lignées étudiées. ....   | 99 |

## 9 Annexes

Annexe 1 : Isolement des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC)

Annexe 2 : Protocole d'induction de pluripotence sur cellules PBMC

Annexe 3 : Protocole de culture des cellules iPS

Annexe 4 : Protocole de détection de l'activité phosphatase alcaline

Annexe 5 : Etude du cycle cellulaire par cytométrie en flux

Annexe 6 : Etablissement du caryotype standard sur cellules iPS

Annexe 7 : Protocole Q-FISH pantélomérique sur noyaux

Annexe 8 : Protocole SCE (Sister Chromatid Exchange) pour cellules iPS

Annexe 9 : Expression des marqueurs de la pluripotence des cellules iPS par cytométrie en flux

Annexe 10 : Sacrifice des souris et exérèse des tumeurs formées après injection des cellules iPS

Annexe 11 : Analyse histologique des tumeurs murines

Annexe 12 : Amorces utilisées pour le séquençage Sanger des mutations causales

Annexe 13 : Analyse du cycle cellulaire des lignées iPS

Annexe 14 : Estimation de la longueur des télomères des cellules iPS

Annexe 15 : *Sister Chromatid Exchanges* observés sur métaphases de cellules iPS

Annexe 16 : Etude de la perméabilité membranaire des mitochondries

Annexe 17 : Caractérisation des MSC par les marqueurs de surface spécifiques par cytométrie en flux

Annexe 18 : Caryotypes des cellules natives sans anomalie décelée

Annexe 19 : Caryotypes des cellules iPS

Annexe 20 : Détails des CNV retenus par *calling* manuel lors des ACPA

Annexe 21 : Caryotypes des cellules MSC

## Annexe 1

### Isolement des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC)

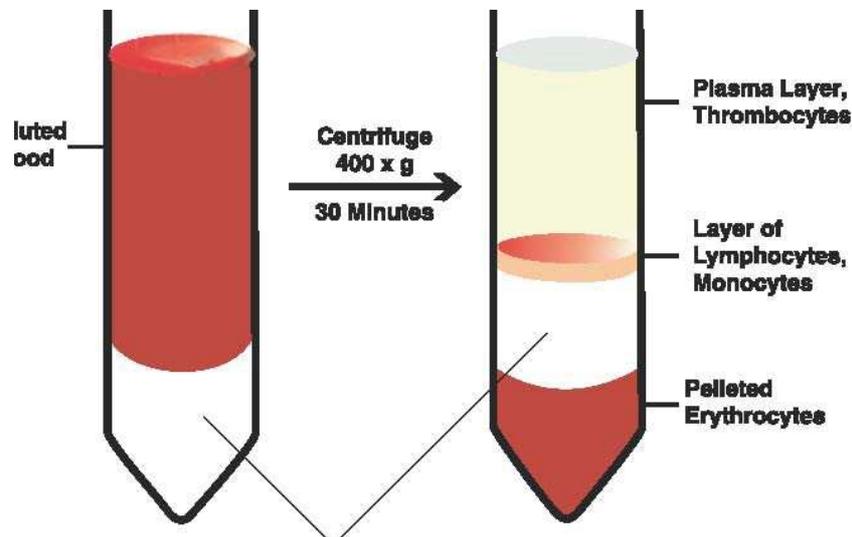
Les PBMC contiennent notamment les cellules CD34+ et les progéniteurs érythroïdes qui serviront de cibles à la reprogrammation. Le sang doit être prélevé sur héparinate de lithium et pris en charge le plus rapidement possible pour maintenir la viabilité des cellules.

#### Matériel nécessaire :

- Solution Ficoll : *Lymphocytes Separation Medium* d=1,077 +/- 0,001
- Solution de PBS 1x stérile.
- Cellules de Malassez.
- Bleu de trypan.
- DMSO.
- Sérum de Veau Fœtal (FBS).
- Tamis cellulaire « *Cell Strainer 40µm* ».

Travail sous hotte à flux laminaire dans des conditions stériles :

1. Remettre les tubes de sang en suspension par plusieurs retournements lents et successifs.
2. Identifier des tubes de 50 mL et répartir équitablement le sang du patient dans ces tubes, sans dépasser 25 mL par tube. Attention à ne pas laisser passer les caillots dans les tubes. Eliminer ces éventuels caillots à l'aide d'une pipette stérile. Si malgré cela des caillots sont toujours visibles, il est possible de filtrer le sang avec un tamis de type « *Cell Strainer 40µm* ».
3. Diluer au demi avec du PBS stérile.
4. Préparer un nombre suffisant de tubes de 50 mL avec 17,5 mL de Ficoll.
5. Remettre en suspension le sang dilué à l'aide d'une pipette de 10 mL. Avec cette pipette réglée sur le débit le plus lent, en deux fois, ajouter 15 mL de sang à la surface du Ficoll de la manière suivante : incliner au maximum le tube de Ficoll et positionner la pipette contenant le sang le long de la paroi, proche de la surface du Ficoll. Lentement et avec un débit continu, faire couler le sang le long de la paroi. L'ensemble doit former 2 phases bien distinctes et le sang ne doit pas se mélanger au Ficoll. Après quelques minutes de contact, il est possible que des globules rouges tombent au fond du Ficoll : cela ne dérange pas la suite de la technique.
6. Avec précaution, mettre les tubes dans la centrifugeuse : veiller à ne pas perturber les phases des liquides. Centrifuger 30 min à 2000 tr/min sans accélérateur ni frein.



7. A la fin du cycle de centrifugation, vérifier la formation des différentes couches schématisées ci-dessus, notamment le disque des cellules mononuclées. Retourner sous la hotte à flux d'air laminaire en veillant à ne pas perturber les phases.

8. Eliminer la phase supérieure de plasma par aspiration à l'aide d'une pipette jusqu'à environ 1 cm du disque des cellules mononuclées.

9. Identifier autant de nouveaux tubes de 50 mL que besoin. A l'aide d'une pipette de 10 mL et avec précautions, recueillir le disque des cellules mononuclées à travers le reste de plasma. Il faut récupérer tout le disque, quitte à prélever aussi un peu de plasma ou de Ficoll. Disposer ces cellules dans un des nouveaux tubes collecteurs.

10. Ajouter du PBS stérile dans chacun de tubes collecteurs jusqu'à un volume de 50 mL, de telle sorte que le volume prélevé du Ficoll soit au moins dilué au 1/4. Si ce n'est pas le cas, avant de faire la dilution, subdiviser chaque tube collecteur en 2 ou 3 autres tubes de 50 mL puis compléter avec le PBS stérile.

11. Centrifuger les tubes 8 min à 500 G avec accélérateur et frein. Observer la présence d'un fin culot. La présence de globules rouges dans ce culot, en faible quantité, n'influence pas la qualité de la technique.

12. Eliminer le surnageant par retournement, en une fois, d'un geste franc. Remettre le tube en position verticale et remettre en suspension ce culot dans le liquide résiduel, par exemple en frottant le fond du tube sur la grille de la hotte.

13. Réunir le contenu des différents tubes collecteurs en un seul. Rincer 2 fois les autres tubes avec 3 mL de PBS stérile et transférer ces rinçages dans le tube collecteur unique. Ajouter du PBS stérile dans ce tube collecteur jusqu'à un volume de 50 mL.

14. Centrifuger les tubes 8 min à 500 G avec accélérateur et frein. Observer la présence d'un culot.

15. Eliminer le surnageant par retournement, en une fois, d'un geste franc. Remettre ce culot en suspension dans le liquide résiduel. Mesurer le volume de liquide à l'aide d'un P1000. Ajouter du PBS pour obtenir un volume de 1000  $\mu$ L.

16. Colorer un aliquot de cellules au bleu de trypan et les compter en cellules de Malassez. Congeler dans du DMSO ou autre liquide de conservation approprié.

## Annexe 2

### Protocole d'induction de pluripotence sur cellules PBMC

#### Réactifs nécessaires :

- Milieu de culture Stem Span SFEM II (Stemcell®)
- Complément de culture StemSpan Erythroid Expansion 100x (Stemcell®)
- Milieu de culture non onéreux (DMEM par exemple) froid
- Kit Sendai Cytotune® v2.0
- Sodium butyrate
- Rock Inhibitor Y27632 Sigma®
- Milieu E8 et Matrigel

#### **J-6 : Ensemencement des PBMC totaux en plaque 12-puits (volume : 1 mL/puits)**

1. Préchauffer la quantité nécessaire de milieu SFEM II à 37°C. Ajouter 10 µL de complément Erythroid Expansion pour 1 mL de milieu.
2. Sortir les PBMC de l'azote et les faire décongeler rapidement.
3. Reprendre les cellules dans 10 mL de milieu de culture non onéreux et froid. Réservez un aliquot de quelques µL pour compter les cellules. Centrifuger 10 min à 200G. Pendant ce temps, compter les cellules vivantes avec une Malassez.
4. Aspirer le surnageant et remettre en suspension dans le liquide restant.
5. Ajouter du milieu SFEM II + complément préchauffé afin d'obtenir une concentration de  $5.10^5$  cellules par mL de suspension. Déposer 1 mL de suspension par puits de la plaque 12-puits et incuber 48h à 37°C en hypoxie.

#### **J-5 à J-1 : Changement de milieu (500 µL/puits)**

1. Préchauffer un volume de 500 µL/puits de milieu SFEM II + complément à 37°C (Cf. J-6)
2. Sous la hotte, incliner les plaques 12 puits et attendre quelques minutes que les cellules décantent.
3. Aspirer 500 µL de surnageant de chaque puits et ajouter 500 µL de milieu préchauffé.
4. Incuber 24h à 37°C en hypoxie.

## J0 : Transduction

1. Retrouver les titres des virus Sendai sur le site du distributeur grâce au numéro de lot :

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A16517>

2. Transférer les cellules dans un tube conique de 15 mL et les compter.

3. Appliquer la formule suivante pour déterminer le volume de virus par puits et par vecteur :

$$\text{Volume of virus } (\mu\text{L}) = \frac{\text{MOI (CIU/cell)} \times \text{number of cells}}{\text{titer of virus (CIU/mL)} \times 10^{-3} (\mu\text{L/mL})}$$

Les MOI à appliquer sont les suivantes :

- KOS            MOI = 10
- hc-Myc        MOI = 10
- hKlf4           MOI = 6

NE PAS AJOUTER DE POLYBRENE !

Si le kit utilisé a déjà été décongelé-recongelé :

- Appliquer un coefficient multiplicateur de 2 à la précédente formule.
- Eliminer le surplus de virus non utilisé (ne pas recongeler).

Si le kit est utilisé pour la 1<sup>ère</sup> fois :

- Aliquoter les virus non utilisés pour des quantités correspondant :
  - « Mix » des 3 virus MOI = 5/5/3 pour 10<sup>5</sup> cellules (soit 2 repro de 50 000).
  - Virus excédentaires non mixés avec leur MOI respective et pour 10<sup>5</sup> cellules.

Dans tous les cas, mettre à jour le fichier stock de l'équipe.

4. Ajouter directement les volumes de virus dans le tube.

5. Spinocultation : centrifuger 60 min à 2250 rpm à température ambiante.

6. Pendant ce temps :

- Aliquoter les virus si besoin comme indiqué en 3.
- Préchauffer un volume de 1 mL/puits de milieu SFEM II + complément à 37°C (Cf. J-6) sachant que la cible de réensemencement est de 2,5.10<sup>5</sup> à 5,0.10<sup>5</sup> cellules par puits.

7. A la fin de la spinocultation, remettre en suspension les culots dans leur surnageant.

8. Réensemencement en plaque 12 puits. Si le nombre de cellules est supérieur à 5,0.10<sup>5</sup> cellules, démultiplier les puits pour obtenir la concentration cible et diluer la suspension avec du milieu SFEM II + complément (Cf. J-6) pour un volume final de 1 mL par puits.

9. Ajouter 1 mL de milieu SFEM II + complément par puits (volume final  $\approx$  2 mL)

10. Incuber 24h à 37°C en hypoxie.

### **J1 : Elimination des virus Sendai**

1. Préchauffer à 37°C un volume de 1 mL/puits de milieu SFEM II + complément + butyrate sodium (NaB) à 0,5 mM + rock inhibitor (RI) à 10 µM. Soit, pour 1 mL de SFEM II, ajouter :

- Complément érythroïde 100x : 10 µL
- Sodium butyrate (100 Mm) : 5 µL
- Rock inhibitor (5 Mm) : 2 µL

2. Collecter les cellules en suspension dans des tubes coniques de 15 mL

3. Centrifuger 10 min à 400G à température ambiante.

4. Aspirer le surnageant, remettre en suspension dans 1 mL de milieu SFEM II + complément + NaB + RI et réensemencer les cellules dans leur puits d'origine.

5. Incuber 48h à 37°C en hypoxie.

### **J3 : Passage sur Matrigel**

1. Comptez les cellules vivantes en suspension dans chacun des puits de la plaque 12 puits.

2. Préparer des boites 35 mm avec Matrigel selon le protocole habituel (milieu E8). Prévoir 1 boite par condition et pour  $5 \cdot 10^4$  cellules vivantes.

3. Préchauffer un volume de 1 mL/puits et 2 mL/boite de milieu SFEM II sans complément + NaB + RI. Soit, pour 1 mL de SFEM II, ajouter :

- Sodium butyrate (100 Mm) : 5 µL
- Rock inhibitor (5 Mm) : 2 µL

4. Eliminer le surnageant des boites 35 mm avec Matrigel.

5. A partir des puits de la plaque 12 puits remis en suspension, transférer un volume correspondant à  $5 \cdot 10^4$  cellules dans chaque boite 35 mm.

6. Ajouter le milieu SFEM II + NaB + RI : 1 mL par puits et 2 mL par boite 35 mm.

7. Incuber 24h à 37°C en hypoxie.

#### **J4 à J6 : Changement de milieu**

1. Préchauffer un volume de 1 mL/puits et 2 mL/boite de milieu SFEM II + NaB + RI (Cf. J3)
2. Eliminer le surnageant des boites et des puits.
3. Ajouter le milieu SFEM II + NaB + RI : 1 mL par puits et 2 mL par boite 35 mm.
4. Incuber 24h à 37°C en hypoxie.

#### **J7 : Transition en milieu E8**

1. Préchauffer du milieu E8 : 1 mL par boite 35 mm et 250 µL par puits.
2. Eliminer la moitié de tous les volumes de culture.
3. Ajouter le milieu E8 : 1 mL par boite 35 mm et 250 µL par puits.
4. Incuber 24h à 37°C en hypoxie.

#### **J8 et suivants...**

1. Préchauffer du milieu E8 : 2 mL par boite 35 mm et 500 µL par puits.
2. Eliminer tous les volumes de culture.
3. Ajouter le milieu E8 et incuber 24h à 37°C en hypoxie.

Poursuivre ainsi la culture de ces boites et surveiller l'apparition de colonies iPS. Dès que les colonies sont suffisamment développées, procéder au « picking » comme habituellement.

### Annexe 3

#### Protocole de culture des cellules iPS – *Colony Picking*

Après reprogrammation et apparition des 1ers clones, il est nécessaire d'isoler les colonies d'intérêt et de les cultiver dans une nouvelle boîte. Ceci permet d'éliminer les cellules non ou mal reprogrammées et donc de ne cultiver que des colonies potentiellement iPS.

Ce « picking » peut être réalisé de manière polyclonale (mélange de différentes colonies dans une seule boîte) ou monoclonale (une boîte par colonie).

#### Matériel nécessaire :

- Pompe d'aspiration, paille et cônes de P200 sans filtre.
- Cônes de pipettes P1000 et P10.
- Milieu de culture préchauffé E8
- Rock Inhibitor Y27632 Sigma®.
- Microscope sous la hotte à flux d'air laminaire.

**1.** Changement de milieu des puits à passer : ajouter du Rock Inhibitor en concentration finale 10  $\mu$ M (soit 4  $\mu$ L pour 2 mL de milieu de culture à partir des aliquots congelés à 5 mM). Laisser incuber 1h à 37°C en hypoxie.

**2.** Préparer les nouveaux puits ou boîtes de culture, avec ou sans matrigel selon le protocole dédié. Eliminer le surnageant de ces nouveaux puits ou boîtes et ajouter du milieu frais additionné de Rock Inhibitor dans la même concentration qu'en **1**.

**3.** Après l'incubation du Rock Inhibitor, observer et repérer les colonies à sélectionner. Sous contrôle microscopique, avec la pipette P10 munie d'un cône stérile, gratter la colonie d'intérêt, puis la décoller en faisant des mouvements circulaires.

**4.** Avec la même pipette P10 et son cône, aspirer la colonie et la transférer dans sa nouvelle boîte de culture. Réaliser une aspiration/refoulement.

**5.** Refaire les étapes **3.** et **4.** autant de fois qu'il y a de colonies à sélectionner.

**6.** Laisser incuber à 37°C en hypoxie jusqu'au prochain changement de milieu de culture.

## Annexe 3 bis

### Protocole de culture des cellules iPS : passage non enzymatique

Lorsque les colonies sont à confluence ou lorsque des zones de différenciation trop importantes sont visibles, un passage est indiqué. Le passage non enzymatique ou « Versene » est surtout utilisé dans les phases d'amplification d'une lignée iPS précoce ou non. Attention, il ne peut être réalisé que sur Matrigel et sur une culture ne présentant pas beaucoup de différenciation.

#### Matériel nécessaire :

- Pompe d'aspiration, paille et cônes de P200 sans filtre.
- Tips de pipettes P1000 et P10.
- Milieu de culture préchauffé E8.
- Versene (PBS-EDAT) Gibco® à TA.
- Tubes Falcon de 15 mL.
- Microscope sous la hotte à flux d'air laminaire.

1. Préparer les nouveaux puits ou boîtes de culture sur Matrigel selon le protocole dédié.
2. Aspirer et éliminer le surnageant de culture.
3. Rinçages : ajouter 1 mL de Versene et l'éliminer aussitôt par aspiration. Recommencer une fois.
4. Dissociation : ajouter 1 mL de Versene et laisser agir à TA pendant 2 minutes précisément. Pendant ce temps, observer au microscope les bords des colonies qui se rétractent.
5. Éliminer délicatement le surnageant par aspiration. Veiller à ce que les colonies ne se décollent pas à cette étape.
6. Sans attendre, ajouter 2 mL de milieu de culture pour stopper la réaction de dissociation. Aspirer/refouler plusieurs fois jusqu'à ce que les colonies se décollent visuellement (en général, 2 allers-retours suffisent).
7. Transférer dans un tube de 15 mL et compléter avec du milieu de culture pour obtenir le volume à ensemer. Homogénéiser avec une aspiration/refoulement douce.
8. Éliminer le surnageant des boîtes secondaires et transférer la suspension cellulaire. Il est possible de poursuivre la culture de la boîte initiale en ajoutant 2 mL de milieu : les colonies non décollées par la dissociation continueront leur croissance.

## Annexe 4

### Protocole de détection de l'activité phosphatase alcaline

#### Matériel nécessaire :

- Kit Vector® Red Alkaline Phosphatase Substrate (réactifs 1, 2 et 3).
- Tampon Tris-HCl 100 mM - 200 mM à pH = 8,2 à 8,5 (conservé au réfrigérateur)

**1.** Préparation de la solution de travail. Prévoir 2 mL par puits 35 mm. Pour 10 mL de tampon Tris-HCl à température ambiante, ajouter :

- 4 gouttes de réactif 1.
- 4 gouttes de réactif 2.
- 4 gouttes de réactif 3.

Réserver à température ambiante et à l'abri de la lumière.

**2.** Eliminer le milieu de culture par aspiration.

**3.** Rincer chaque puits au PBS. Eliminer le PBS sans attendre.

**4.** Ajouter 2 mL de solution de travail. Laisser incuber 30 min à température ambiante si possible à l'abri de la lumière.

**5.** Eliminer les surnageants par aspiration.

**6.** Rincer chaque puits au PBS. Eliminer le PBS sans attendre.

**7.** Rincer chaque puits au PBS. Laisser incuber 5 min à température ambiante si possible à l'abri de la lumière.

**8.** Eliminer le PBS par aspiration. Prendre des photos des puits.

L'observation du résultat peut se faire à l'œil nu. Les puits ainsi marqués peuvent être conservés tel quels dans de l'aluminium au réfrigérateur pendant plusieurs jours.

La réaction est colorimétrique mais aussi fluorescente et peut être observée au microscope à fluorescence avec le filtre « Texas Red ».

## Annexe 5

### Etude du cycle cellulaire par cytométrie en flux

#### Matériel nécessaire :

- BrdU
- Iodure de propidium (1 mg/mL Invitrogen®)
- Anticorps anti-BrdU (BD® 347580, n°408)
- Anticorps secondaire anti-murin Alexa® 488 nm
- RNase A à 20 mg/mL (Invitrogen® n°12091-021)
- Solution boratée :
  - o 9,53 g de Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>, 10H<sub>2</sub>O
  - o 250 mL d'eau stérile
  - o Mélanger et ajuster le pH à 8,5.

Les cellules étudiées sont cultivées comme habituellement selon leur type, pour une durée permettant d'établir un niveau de confluence aux environs de 50%.

#### Protocole :

- Ajouter du BrdU au milieu de culture pour une concentration finale de 100 µM.
- Laisser incuber 2 heures à 37°C.
- Eliminer le milieu de culture et laver 2 fois au PBS froid.
- Ajouter de la trypsine pour détacher les cellules de leur support de culture pendant quelques minutes.
- Neutraliser l'action de la trypsine avec du milieu de culture contenant 10% de FBS.
- Récupérer la suspension cellulaire et centrifuger 5 minutes à 1000 tour/minute.
- Eliminer le surnageant et ajouter 2,5 mL de PBS froid supplémenté à 1% de FBS. Veiller à bien remettre en suspension toutes les cellules.
- Ajouter 7,5 mL d'alcool absolu froid, goutte à goutte, sous agitation au vortex.
- Laisser reposer 2 heures au congélateur ou toute une nuit.
- Faire un lavage au PBS, centrifuger 5 minutes à 1000 tour/minute et éliminer le surnageant.
- Ajouter goutte à goutte sous agitation au vortex 1 mL de HCl 2N additionné de 0,5% de Triton X-100.
- Incuber 30 minutes à température ambiante et, si possible, mélanger toutes les 5 minutes.
- Ajouter 5 mL de PBS, centrifuger 5 minutes à 1000 tour/minute et éliminer le surnageant.
- Remettre en suspension dans la solution boratée à pH 8,5.
- Centrifuger 5 minutes à 1000 tour/minute et éliminer le surnageant.
- Remettre en suspension dans 200 µL de l'anticorps anti-BrdU dilué à 1/30 dans du PBS additionné de 0,5% de Tween 20 et de 1% de FBS.
- Laisser incuber 30 minutes à température ambiante ou toute une nuit à 4°C.
- Ajouter entre 1 et 5 mL de PBS, centrifuger 5 minutes à 1000 tour/minute et éliminer le surnageant.
- Remettre en suspension dans 200 µL d'anticorps secondaire anti-murin Alexa® 488 nm dilué à 1/200 dans du PBS additionné de 0,5% de Tween 20 et de 1% de FBS.
- Laisser incuber 30 minutes à température ambiante.

- Ajouter entre 1 et 2,5 mL de PBS, centrifuger 5 minutes à 1000 tour/minute et éliminer le surnageant.
- Remettre en suspension dans 500  $\mu$ L de PBS contenant 50  $\mu$ g/mL d'iodure de propidium et 200  $\mu$ L/mL de RNase A.
- Laisser incuber 30 minutes à 37°C, ou 2 à 3 heures à température ambiante ou toute une nuit à 4°C.
- Filtrer avec un filtre à 70  $\mu$ m et transférer la suspension dans des tubes en polypropylène pour analyse par cytométrie en flux.

## Annexe 6

### Etablissement du caryotype standard sur cellules iPS

#### Sources :

- Moralli, D. *et al.* (2010) *Stem Cell Rev.* <sup>150</sup>
- Optimisation « maison » des différents paramètres expérimentaux

#### Equipement :

Hôte stérile  
Etuve à 37°C et 5% d'O<sub>2</sub>.  
Centrifugeuse  
Congélateur à -20°C  
Bain marie  
Chambre d'étalement de type Thermotron®

#### Solutions :

Colcemid 10µg/ml tamponné au PBS  
Trypsine/EDTA 0.25% ou TrypLE®  
Solution hypotonique KCl 0.75 M  
Fixateur : ¼ acide acétique glacial + ¾ méthanol  
Tampon phosphate 1x (PBS)  
Milieu de culture spécifique aux cellules iPS : E8™

#### Protocole :

1. Faire un ensemencement habituel des cellules iPS : prévoir entre 3 et 6 boîtes 35 mm de concentration moyenne. Incuber à 37°C en hypoxie.
2. Suivre la pousse : dès que la prolifération est exponentielle (normalement pas plus de 48h de pousse) procéder à la sortie de culture.
3. Arrêt des métaphases : changer le milieu de culture. Ajouter 4 µL de Colcemid à 10 µg/mL par boîte. Laisser incuber 4h à 37°C en hypoxie.
4. Sortie de culture :
  - Laver les cellules avec du PBS préchauffé.
  - Ajouter 1 mL de trypsine EDTA préchauffée par boîte et incuber 3 min à 37°C.
  - Tapoter les boîtes pour favoriser le décollement des cellules.
  - Contrôler l'action de la trypsine au microscope.
  - Ajouter quelques gouttes de milieu de culture pour stopper l'action de la trypsine.
  - Collecter la suspension dans un tube 15 mL, laver les boîtes avec du PBS pour récupérer le maximum de matériel et aspirer/refouler plusieurs fois à la pipette pour dissocier toutes les cellules.
  - centrifuger 10 min à 1500 rpm.
  - éliminer le surnageant.

5. Choc hypotonique : ajouter 8 mL de solution de choc préchauffée, goutte à goutte, sous agitation au vortex. Laisser incubé 20 min à 37°C.
6. Préfixation : stopper le choc hypotonique par l'ajout de 1 mL de fixateur froid. Homogénéiser par retournements successifs. Centrifuger 10 min à 1500 rpm à 4°C.
7. 1<sup>ère</sup> fixation : Eliminer le surnageant par aspiration. Remettre le culot en suspension en tapotant le tube. Ajouter 10 mL de fixateur froid, goutte à goutte, sous agitation au vortex. Laisser incubé 10 min au congélateur. Centrifuger 10 min à 1500 rpm à 4°C.
8. Fixations suivantes : Réaliser 2 autres étapes de fixation de la même manière, sans incubation au congélateur. Laisser reposer une nuit.
9. Etalement : à réaliser dans une enceinte à atmosphère contrôlée de type Thermotron® à une température de 20°C et une hygrométrie à 60%. En fonction de la concentration de la suspension, étaler entre 10 et 20µL sur une lame de verre préalablement dégraissée à l'alcool. Laisser sécher 10 min. Contrôler la qualité de l'étalement et l'index mitotique au microscope.

10. Dénaturation en bandes R :

Préparer une solution d'Earle :

- 10 mL de solution mère EBSS 10x.
- Eau stérile QSP 100 mL.
- Ajuster le pH à 5,46 ou 5,47 avec une solution de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> saturée.
- Laisser stabiliser sous agitation magnétique pendant 30 min.

Mettre la solution dans des bacs en porcelaine dans un bain-marie à 87°C

Laisser équilibrer pendant 30 minutes.

Réhydrater quelques instants les lames à traiter dans de l'eau stérile.

Dénaturer une lame test pendant 60 min.

Après 30 min, mettre à dénaturer les autres lames.

A la fin de la dénaturation de la lame test, la plonger dans l'eau froide et la rincer sous l'eau du robinet.

Colorer cette lame 3 minutes au Giemsa 3%

Rincer la lame 3 à 4 fois à l'eau froide et laisser sécher.

Evaluer la qualité de la dénaturation au microscope optique à l'objectif x100.

En fonction des résultats de cette lame test, ajuster le temps de dénaturation, le temps de coloration et le nombre de rinçage des lames restantes.

## Annexe 7

### Protocole Q-FISH pantéomérique sur noyaux

#### Sources :

- Protocole du kit PNA FISH FITC DAKO®
- Perner, S. *et al.* (2003) *Am. J. Pathol.* <sup>151</sup>
- O'Sullivan, J. N. *et al.* (2004) *Cytometry* <sup>152</sup>

#### Equipements :

HyBrite® ou plaque chauffante équivalente

Microscope à fluorescence avec filtres : FITC (émission 490 nm, lecture 525 nm)  
DAPI (émission 360 nm, lecture 460 nm)

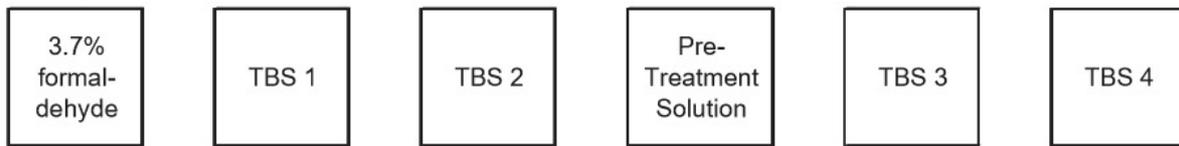
#### Préparation des solutions de travail :

- Tampon TBS :  
Dissoudre 1 paquet dans 1 litre d'eau stérile.  
Stabilité : 6 mois à 4°C. 500 mL par technique.
- Solution de formaldéhyde à 3,7% :  
Diluer 8 mL de formaldéhyde 37% avec 72 mL de TBS (dilution au 1/10) à température ambiante.  
Utiliser cette solution 10 fois maximum et pas plus de 4 semaines.
- Solution de prétraitement :  
Diluer 40 µL de solution mère (flacon 1) dans 80 mL de TBS (dilution au 1:2000) à température ambiante.  
A préparer extemporanément.
- Solution de rinçage :  
Diluer 20 mL de solution mère (flacon 3) dans 980 mL d'eau stérile (dilution au 1:50) à température ambiante.  
Stabilité : 1 an et 1/2 à 4 °C. 80 mL par technique.
- Solution de lavage :  
Diluer 20 mL de solution mère (flacon 4) dans 980 mL d'eau stérile (dilution au 1:50).  
Préchauffer à 65°C pendant 90 min env. avant utilisation. Un aspect laiteux de la solution peut apparaître sans modifier la qualité de la technique.  
Stabilité : 1 an et 1/2 à 4 °C.
- Solution de montage :  
Vectashield® *antifading* + DAPI à 0,1 µg/mL ou autre contre-colorant de la chromatine.

- Solutions alcooliques :  
Préparer des solutions d'alcool à 70%, à 85% et absolu et les refroidir au congélateur.

Protocole d'hybridation :

1. Préparer des jarres d'alcool à 70%, 85% et absolu froid. Ne les sortir du congélateur ou du réfrigérateur qu'au dernier moment.
2. Préparer les solutions dans des jarres comme suit :



3. Etaler la préparation chromosomique comme habituellement.
4. Repérer au microscope à lumière blanche, avec un crayon diamanté la zone la plus riche en métaphase.
5. Immerger les lames 2 min environ dans la jarre de TBS1.
6. Immerger les lames 2 min exactement dans la jarre de formaldéhyde.
7. Immerger les lames 5 min dans la jarre de TBS1.
8. Immerger les lames 5 min dans la jarre de TBS2.
9. Immerger les lames 10 min dans la jarre de prétraitement.
10. Immerger les lames 5 min dans la jarre de TBS3.
11. Immerger les lames 5 min dans la jarre de TBS4.
12. Immerger les lames 2 min dans la jarre d'éthanol 70%.
13. Immerger les lames 2 min dans la jarre d'éthanol 85%.
14. Immerger les lames 2 min dans la jarre d'éthanol absolu.
15. Laisser sécher les lames pendant 5 min à l'air libre. Remettre les jarres d'alcool au congélateur.
16. A partir de ce point, travailler dans la pénombre. Déposer 10  $\mu$ L de sonde PNA Télomères FITC sur la lame, la recouvrir d'une lamelle 18 mm x 18 mm et sceller le montage avec du *rubber cement*.
17. Dénaturer 5 min à 80°C à l'HyBrite® ou sur une plaque chauffante.
18. Placer la lame dans une chambre humide à l'abri de la lumière et laisser incubé entre 30 min et 4h à température ambiante.

Lavages :

19. Préchauffer une jarre de solution de lavage dans un bain marie à 65°C.
20. Préparer une jarre de solution de rinçage à température ambiante.
21. Retirer le *rubber cement*. Immerger et remuer la lame dans la solution de rinçage quelques instants pour faire tomber la lamelle.
22. Immerger les lames dans la solution de lavage à 65°C pendant 5 min exactement.
23. Immerger les lames 2 min dans la jarre d'éthanol 70%.
24. Immerger les lames 2 min dans la jarre d'éthanol 85%.
25. Immerger les lames 2 min dans la jarre d'éthanol absolu.

26. Laisser sécher les lames pendant 5 min.
27. Luter les lames avec la solution de montage et une grande lamelle.
28. Laisser reposer 15 min avant lecture au microscope à fluorescence.

## Annexe 8

### Protocole SCE (*Sister Chromatid Exchange*) pour cellules iPS

Sources :

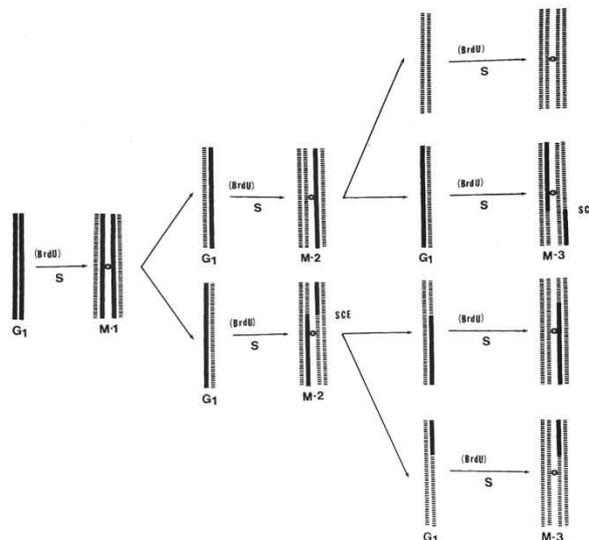
- Human Chromosomes (2nd edition) <sup>153</sup>
- Molecular Toxicology Protocols (2nd edition) <sup>154</sup>
- Momcilovic, O. *et al.* (2010) *PloS One* <sup>155</sup>
- Optimisation « maison » des différents paramètres expérimentaux

Les SCE (*sister chromatid exchanges*) peuvent être démontrés par une coloration différentielle de chacune des chromatides sœurs des chromosomes en métaphase. Cela est possible par l'incorporation d'un analogue de la thymidine, le BrdU, dans l'ADN suivi de 2 cycles cellulaires et d'une photodégradation. Il en résulte d'une coloration plus claire de la chromatide dont l'ADN a incorporé le BrdU et d'une coloration plus sombre pour la chromatide sans BrdU.

Il y a donc 2 étapes successives :

- incorporation du BrdU dans l'ADN en réplication pour 2 cycles cellulaires.
- coloration différentielle des chromatides par un fluorochrome ou par le Giemsa.

Sachant que le cycle cellulaire d'une cellule iPS est d'environ 18h. Le temps d'incubation du BrdU doit être d'environ 36h.



#### A. Incorporation du BrdU :

##### Solution de BrdU :

|               |       |
|---------------|-------|
| BrdU          | 10 mg |
| Eau distillée | 10 mL |

La solution de BrdU peut être utilisée telle quelle ou après filtration stérilisante. Elle doit être stockée au froid et à l'abri de la lumière et utilisée dans les 2 à 3 semaines.

## Protocole :

1. Faire un passage habituel des cellules iPS : prévoir entre 3 et 6 boites 35 mm de concentration moyenne. Incuber à 37°C en hypoxie.
2. Suivre la pousse : dès que la prolifération est exponentielle (normalement pas plus de 48h de pousse) ajouter 35 µL de BrdU par boite.
3. Incuber 32h à 37°C en hypoxie.
4. Ajouter 4 µL de Colcemid à 10 µg/mL (flacon du secteur DPN) par boite.
5. Incuber 4h à 37°C en hypoxie.
6. Sortie de culture :
  - laver 1 fois au PBS préchauffé.
  - 3 minutes de trypsine EDTA préchauffée à l'étuve à 37°C.
  - tapoter les boites + contrôle au microscope.
  - ajouter un peu de milieu de culture pour stopper l'action de la trypsine.
  - collecter la suspension dans un tube 15 mL, laver les boites avec du PBS pour récupérer le maximum de matériel et aspirer/refouler plusieurs fois à la pipette pour dissocier toutes les cellules.
  - centrifuger 10 min à 1500 rpm.
  - éliminer le surnageant.
7. Choc, préfixation, fixations et étalement : Cf.
- 8.
- 9.

10. « Etablissement du caryotype standard sur cellules iPS ».

11. Laisser vieillir une nuit les lames à l'abris de la lumière.

## **B. Coloration différentielle au Giemsa :**

### Solution Hoechst 33258 (10 µg/mL) :

|                |        |
|----------------|--------|
| Hoeschst 33258 | 1 mg   |
| Eau distillée  | 100 mL |

### Solution SSC 2x : secteur FISH

|   |        |
|---|--------|
| NaCl  | 17,5 g |
| Sodium citrate dihydraté (Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> , 2H <sub>2</sub> O) | 8,8 g  |
| Eau distillée   | 1 L    |

Ajuster cette solution à pH = 7 avec de la soude.

### Solution de Giemsa :

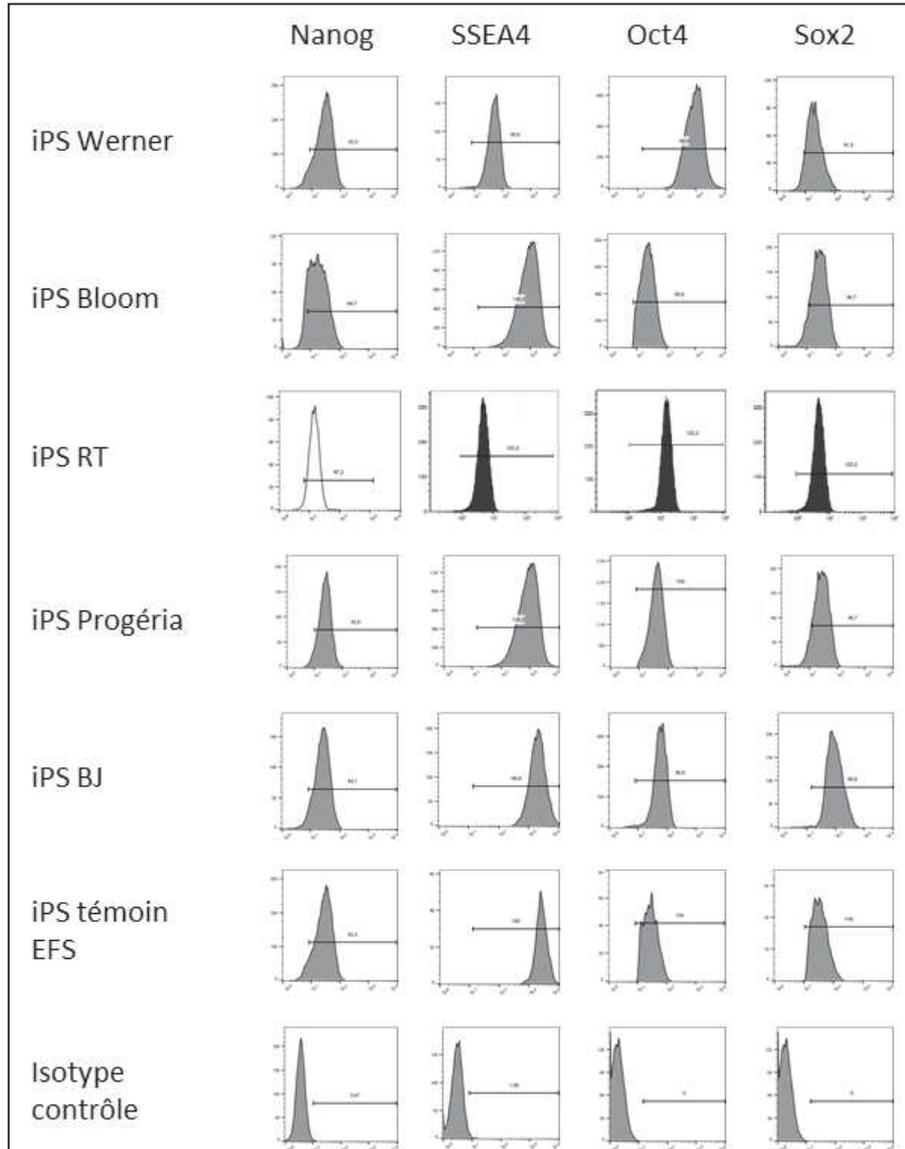
|                             |                                     |
|-----------------------------|-------------------------------------|
| Giemsa filtré (secteur DPN) | 10 mL                               |
| PBS                         | QSP bac en porcelaine (env. 100 mL) |

### Protocole :

1. Transférer la solution de Hoechst dans une jarre en porcelaine. Immerger les lames dans la solution de Hoechst pendant 20 minutes à l'abris de la lumière.
2. Rincer les lames au PBS.
3. Disposer les lames sur une plaque chauffante à 55°C, les recouvrir par quelques gouttes de PBS et d'une lamelle de verre pour éviter la dessiccation. Disposer la lampe à UV juste au-dessus des lames, à une distance de 5 à 10 cm. Allumer la lampe à UV et laisser les lames dans ce montage pendant 20 à 30 minutes.
4. Rincer les lames à l'eau distillée laisser sécher à l'air.
5. Colorer avec la solution extemporanée de Giemsa pendant 30 minutes. Laver à l'eau une ou deux fois. Pour obtenir une différenciation optimale, contrôler la coloration au microscope.
6. Optionnel : rechercher la localisation des métaphases à l'aide de l'automate Metafer® et avec les paramètres suivants :
  - *Classifier* : Sang LCL-trained
  - *Sensitivity* : 13.0
  - *Search window* : predefined
  - *Size* : SANG
7. Analyser les images au microscope et photographier.

## Annexe 9

Expression des marqueurs de la pluripotence des cellules iPS par cytométrie en flux

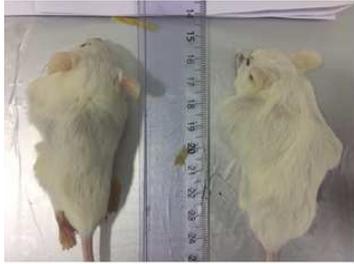


|                  | Nanog  | SSEA4   | Oct4    | Sox2    |
|------------------|--------|---------|---------|---------|
| iPS Werner       | 92,0%  | 98,9 %  | 99,9 %  | 91,5 %  |
| iPS Bloom        | 84,7 % | 100,0 % | 99,6 %  | 86,7 %  |
| iPS RT           | 97,2 % | 100,0 % | 100,0 % | 100,0 % |
| iPS Progéria     | 93,9 % | 100,0 % | 100,0 % | 86,7 %  |
| iPS BJ           | 94,1 % | 99,8 %  | 98,6 %  | 98,8 %  |
| iPS témoin EFS   | 92,0 % | 100,0 % | 100,0 % | 100,0 % |
| Isotype contrôle | 0,47 % | 1,06 %  | 0,0 %   | 0,0 %   |

Partie haute : distributions des intensités de fluorescence selon les lignées iPS étudiées et les anticorps testés.  
Partie basse : pourcentages de positivité des populations cellulaires selon les seuils fixés avec l'isotype contrôle

## Annexe 10

Sacrifice des souris et exérèse des tumeurs formées après injection des cellules iPS



Werner



Bloom



RT



Progéria



BJ

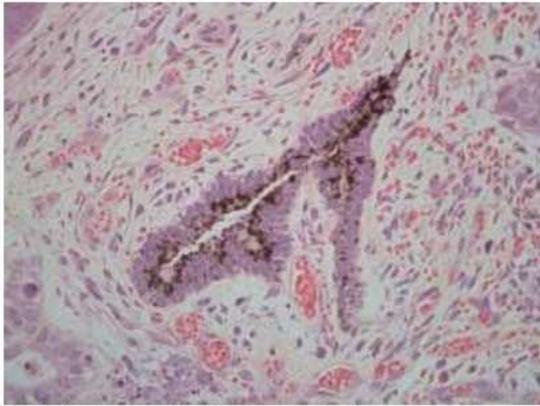


Témoin EFS

## Annexe 11

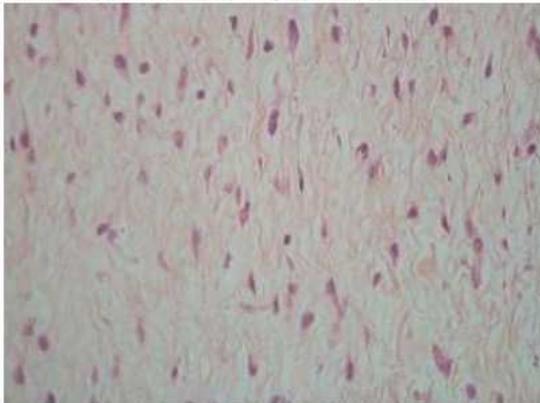
### Analyse histologique des tumeurs murines

#### Tératome issu d'iPS de la lignée Werner

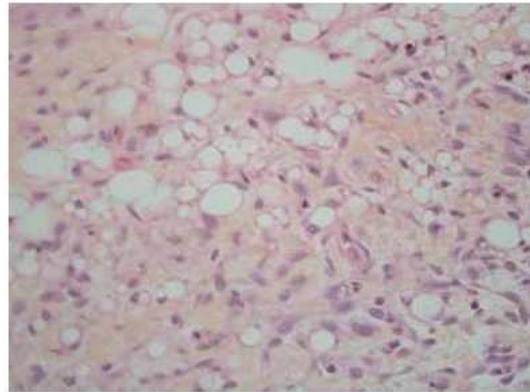


... et cellules pigmentées, les mélanocytes

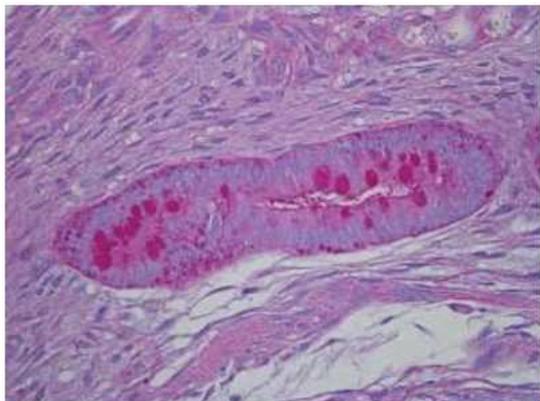
**Dérivés neuro-ectodermiques** : tube neural



**Dérivé mésodermique** : mésenchyme embryonnaire



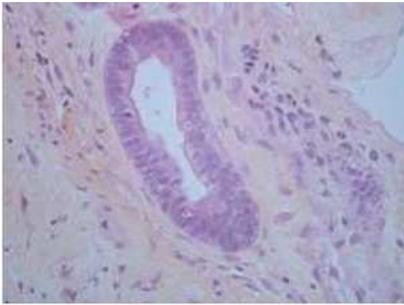
Et adipocytes du tissu adipeux blanc



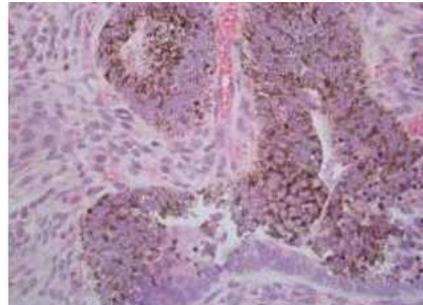
**Dérivé endodermique** : épithélium intestinal

Coloration PAS pour visualiser les Goblet cells

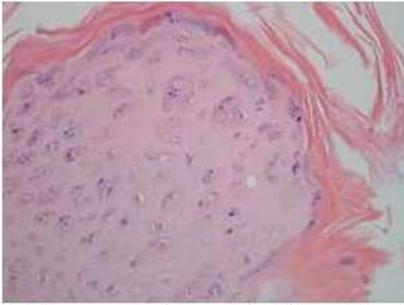
Tératome issu d'iPS de la lignée Bloom



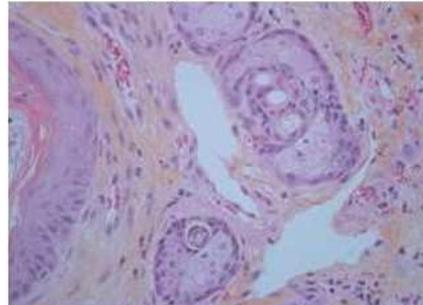
Dérivés neuro-ectodermiques : tube neural



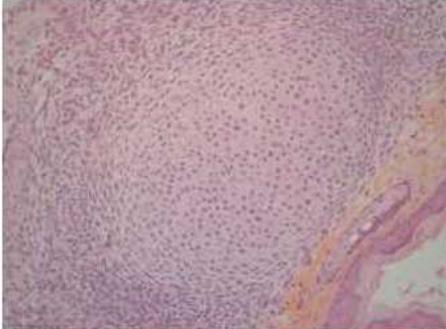
... avec cellules pigmentées, les mélanocytes



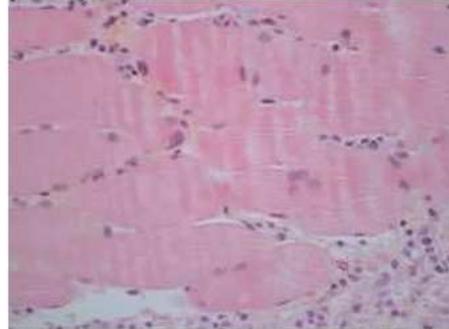
Dérivé ectodermique, formation d'un épithélium pavimenteux stratifié kératinisé comme l'épiderme



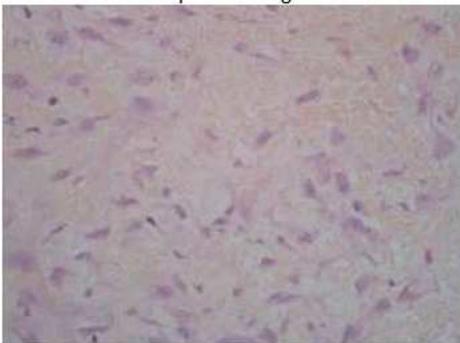
Dérivé ectodermique formation de structures type annexes pilosébacées



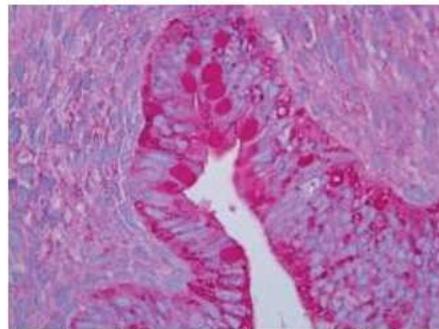
Dérivé mésodermique : cartilage



... et cellules musculaires striées

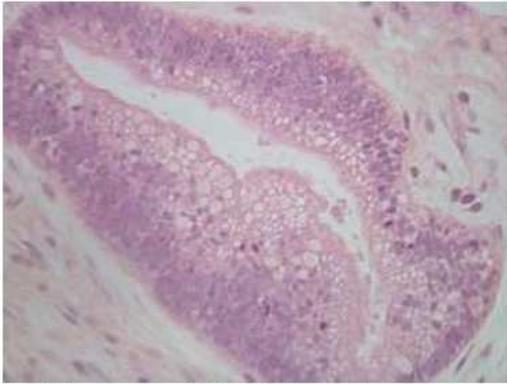


Dérivé mésodermique : mésenchyme embryonnaire

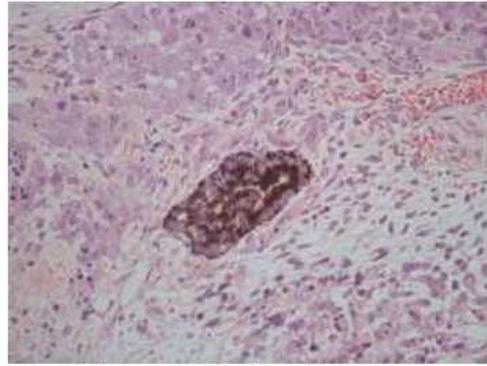


Dérivé endodermique : le PAS révèle le mucus des cellules mucipares de l'épithélium intestinal

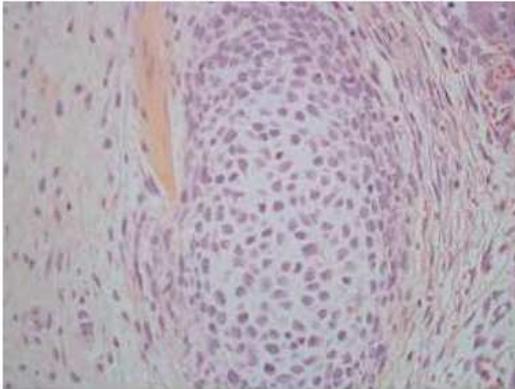
Tératome issu d'iPS de la lignée Rothmund-Thomson



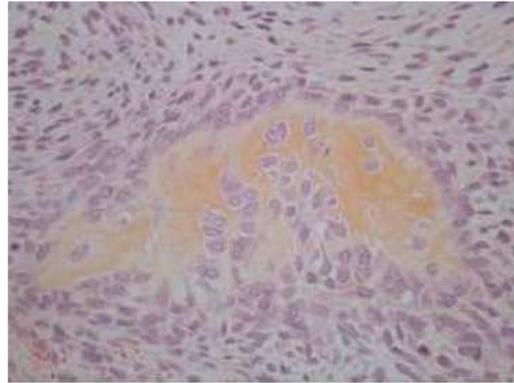
**Dérivés neuro-ectodermiques** : tube neural



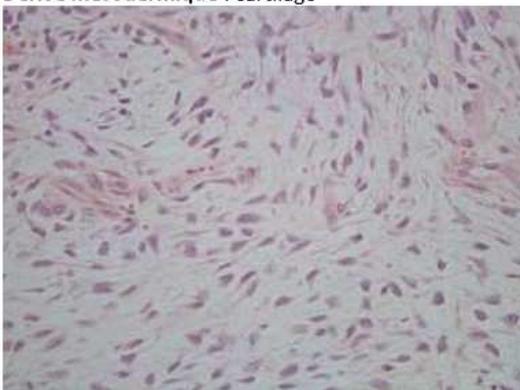
... et cellules pigmentées, les mélanocytes



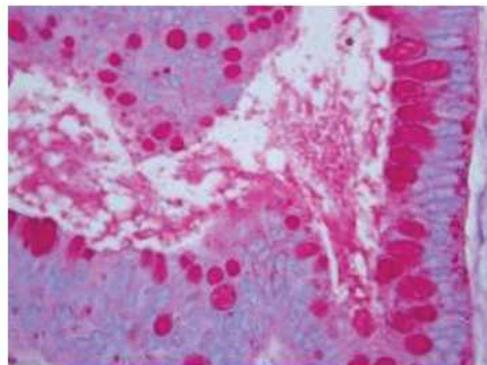
**Dérivé mésodermique** : cartilage



... et os

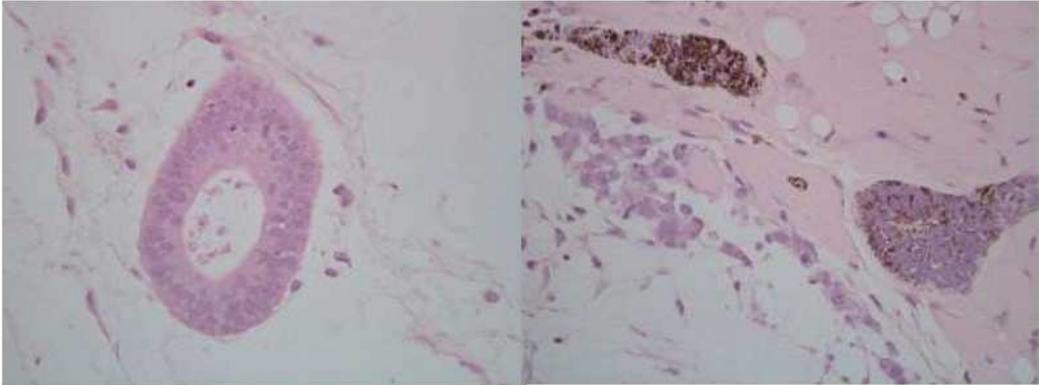


Dérivé mésodermique : mésenchyme embryonnaire



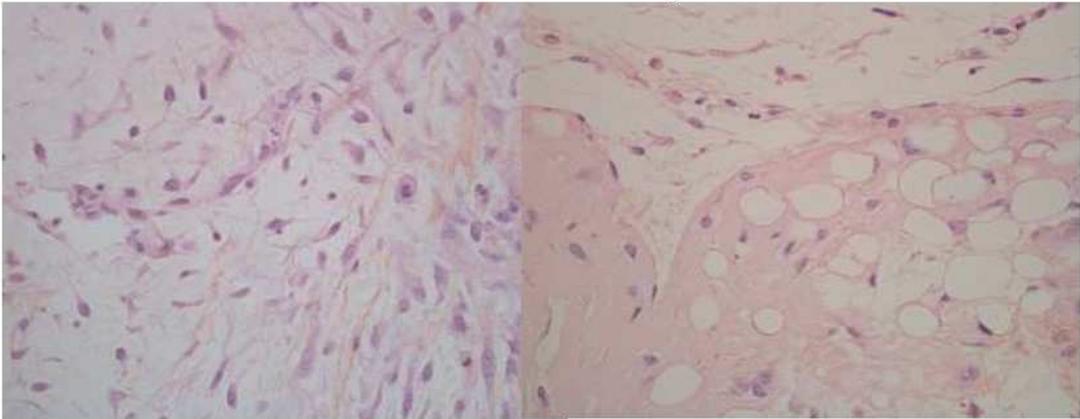
**Dérivé endodermique** : Coloration PAS pour visualiser les Goblet de l'épithélium intestinal

Tératome issu d'iPS de la lignée Progéria



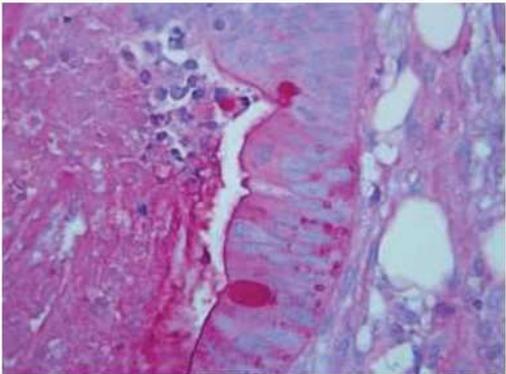
**Dérivés neuro-ectodermiques** : tube neural

Aspect compatible : mélanocytes et Neurones de Dorsal Root Ganglia



**Dérivé mésodermique** : mésenchyme embryonnaire

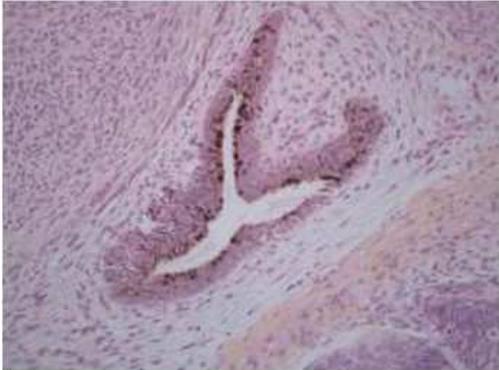
... et adipocytes du tissu adipeux blanc



coloration PAS pour visualiser les Goblet cells

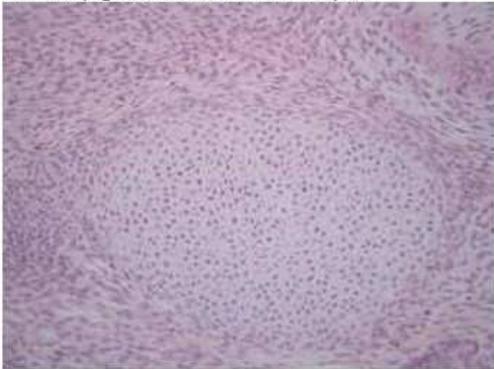
**Dérivé endodermique** : épithélium intestinal

Tératome issu d'iPS de la lignée BJ

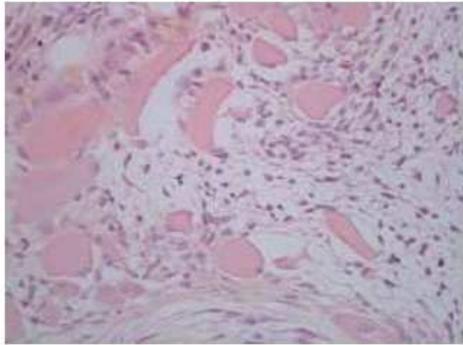


**Dérivés neuro-ectodermiques** : tube neural et cellules pigmentées, les mélanocytes

...



**Dérivés mésodermiques** : cartilage



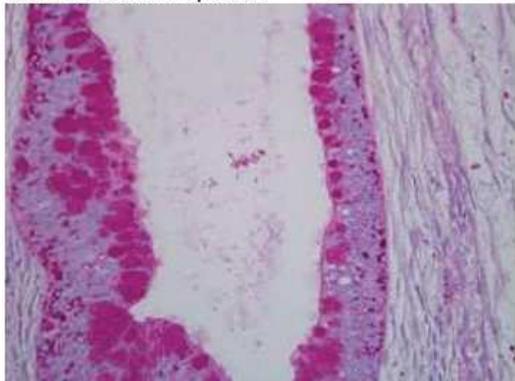
... Et cellules musculaires striées



Dérivé mésodermique : os



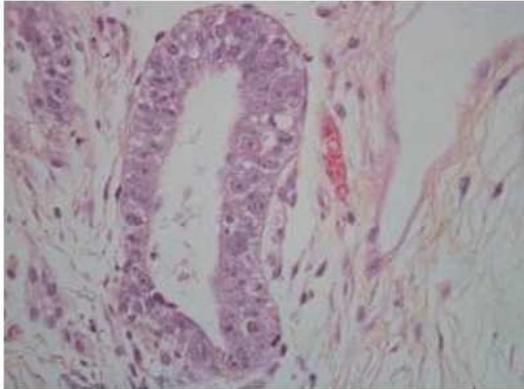
mésenchyme embryonnaire



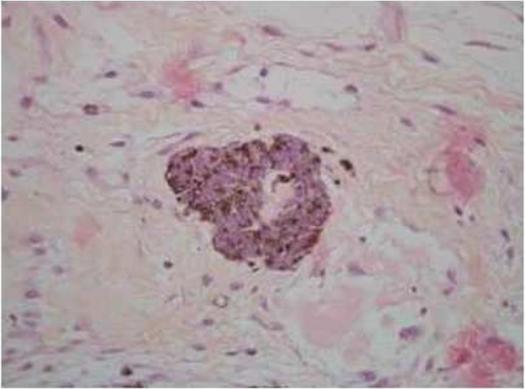
**Dérivé endodermique** : épithélium intestinal

Coloration PAS pour les cellules mucipares

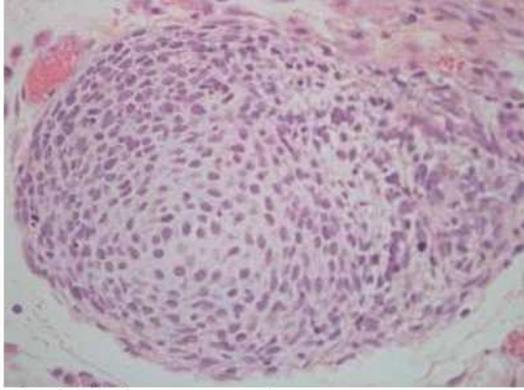
Tératome issu d'iPS de la lignée « témoin EFS »



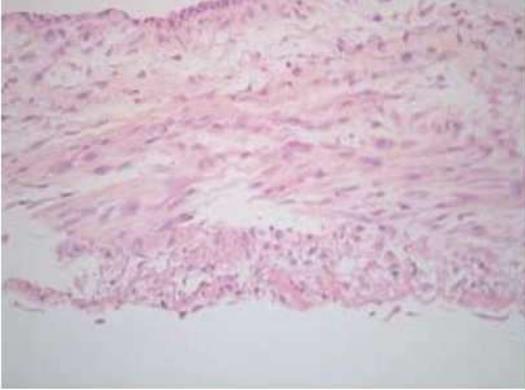
**Dérivés neuro-ectodermiques** : tube neural



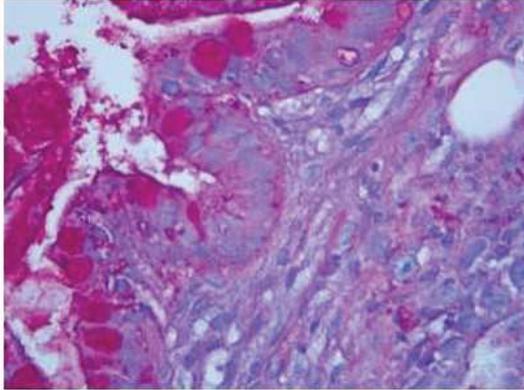
... et cellules pigmentées, les mélanocytes



**Dérivé mésodermique** : cartilage



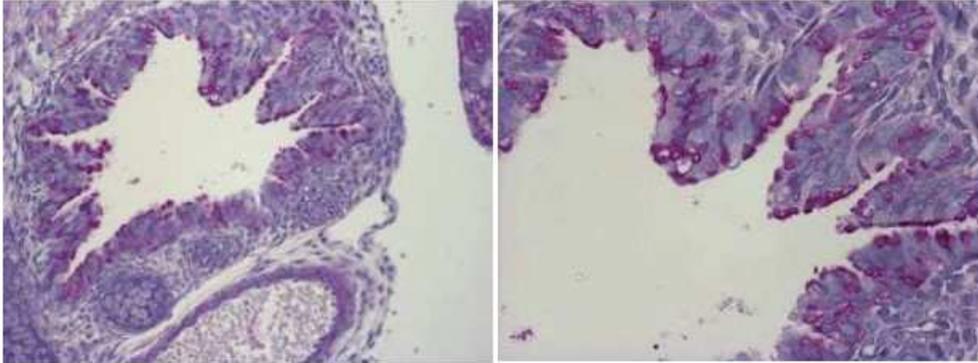
... et cellules musculaires lisses



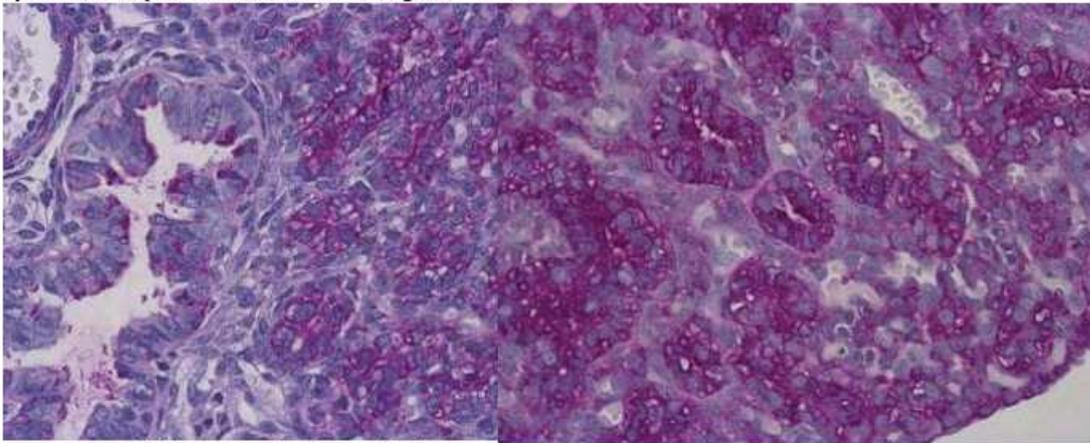
**Dérivé endodermique** : épithélium intestinal

coloration PAS pour visualiser les Goblet cells

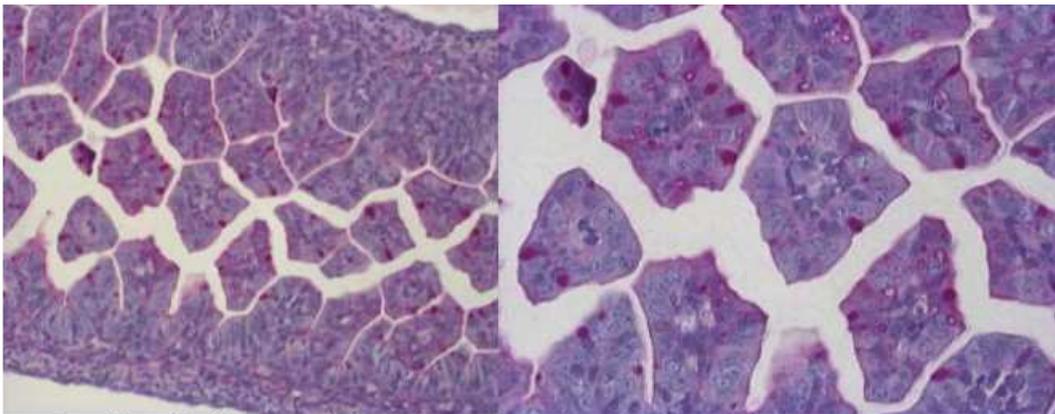
Coloration PAS témoin sur embryon E16.6



Epithélium respiratoire coloré PAS E16.6 g=20 G=40



Poumon, Epithélium respiratoire coloré PAS E16.6 g=20 G=40



Intestin grêle, Epithélium intestinal coloré PAS E16.6 g=20 G=40, visualiser les cellules mucipares

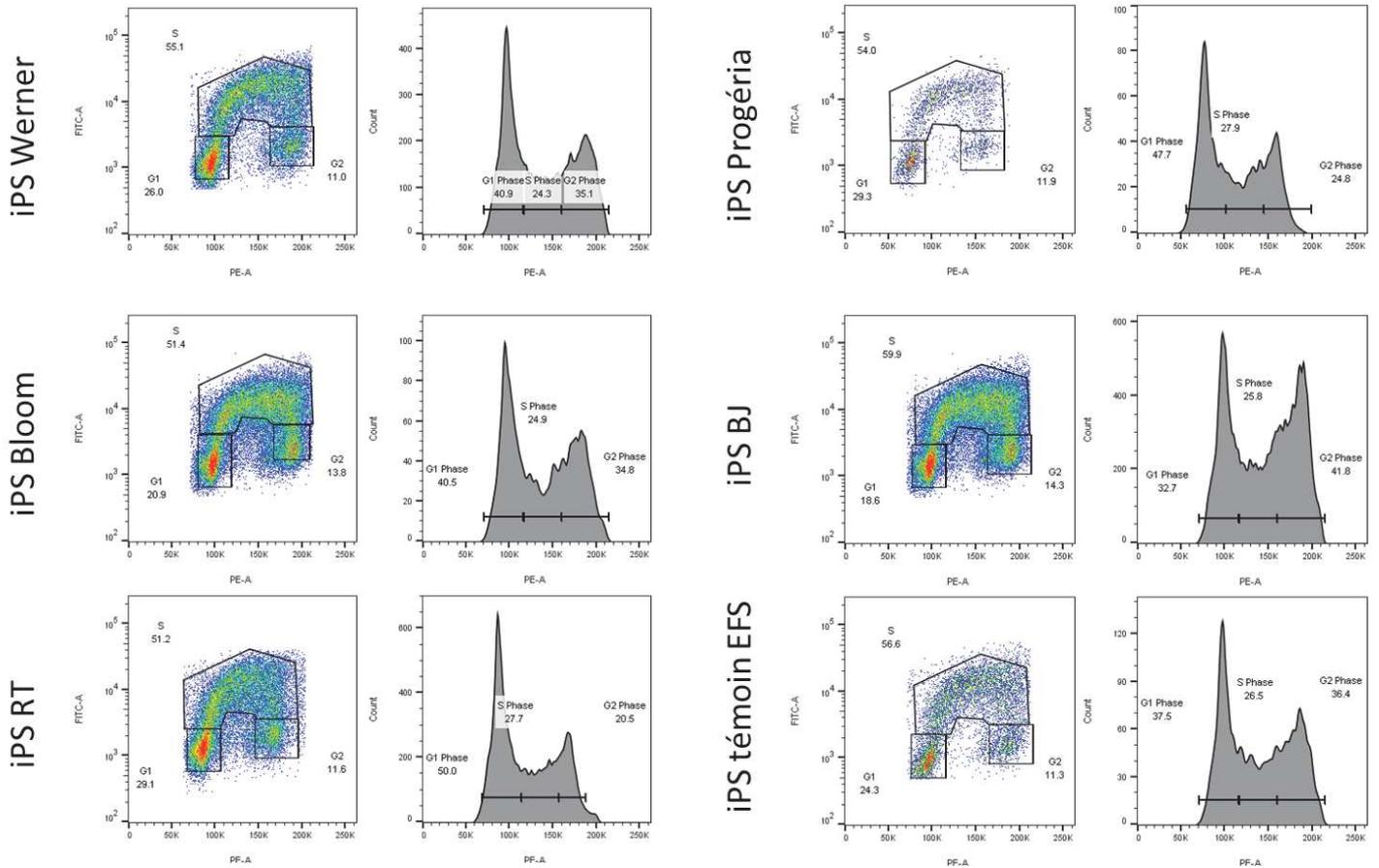
## Annexe 12

Amorces utilisées pour le séquençage Sanger des mutations causales

| Gène          | Transcrit   | Sens    | Séquence amorce         | Tm (°C) |
|---------------|-------------|---------|-------------------------|---------|
| <i>WRN</i>    | NM_000553.4 | Forward | TGAGCTCCCCATAAAAAGGGAA  | 59.35   |
| <i>WRN</i>    | NM_000553.4 | Reverse | TGGCCAAACTAAACTTGCTGC   | 59.93   |
| <i>BLM</i>    | NM_000057   | Forward | TGGCACCAGGGACAATATGC    | 60.40   |
| <i>BLM</i>    | NM_000057   | Reverse | ACTGCAAATTTAACTGCTGTGCT | 59.93   |
| <i>RECQL4</i> | NM_004260.3 | Forward | CATGGTCCCATCCCCTGAC     | 60,11   |
| <i>RECQL4</i> | NM_004260.3 | Reverse | CTGCAGGAAGAGGTGGCAG     | 60,68   |
| <i>LMNA</i>   | NM_170707   | Forward | TTGGGCTGAGTGGTCAGTC     | 61,77   |
| <i>LMNA</i>   | NM_170707   | Reverse | GACCCGCCTGCAGGATTTGG    | 63,78   |

## Annexe 13

### Analyse du cycle cellulaire des lignées iPS



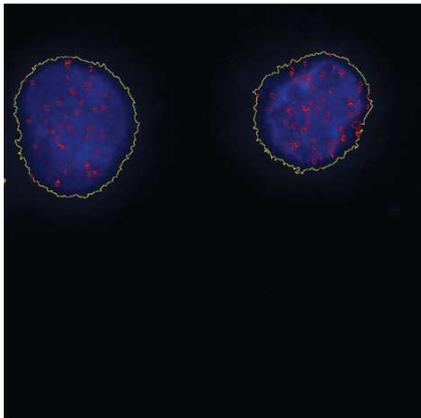
Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux après incorporation de BrdU.

Pour chacune des 6 lignées testées :

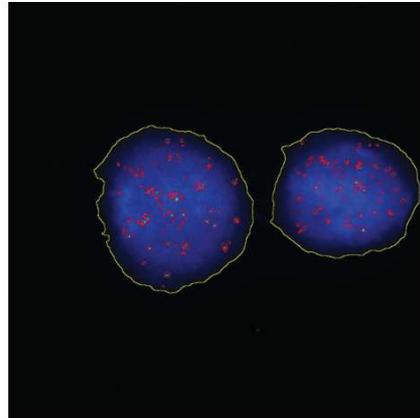
- A gauche : graphique bidimensionnel. Emission de fluorescence de l'iodure de propidium en abscisse. Emission de fluorescence de l'anticorps anti-BrdU en ordonnée. Délimitation des nuages de points des populations en phase G0/G1, S et G2/M avec leurs pourcentages respectifs.
- A droite : graphique monoparamétrique. Emission de fluorescence de l'iodure de propidium en abscisse. Les proportions indiquées ne doivent pas être prises en compte car elles sont moins justes que celles déterminées sur le graphique bidimensionnel.

## Annexe 14

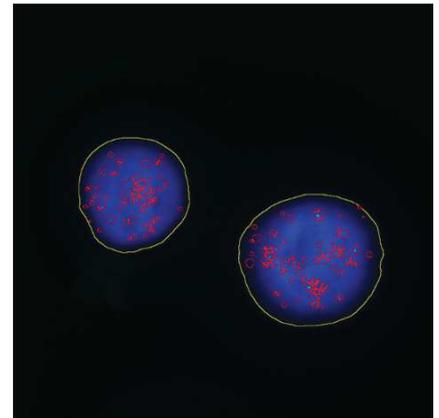
### Estimation de la longueur des télomères des cellules iPS



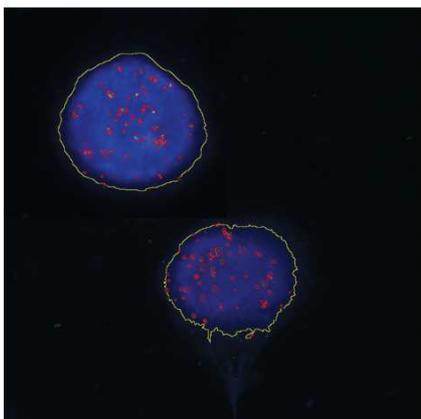
iPS Werner



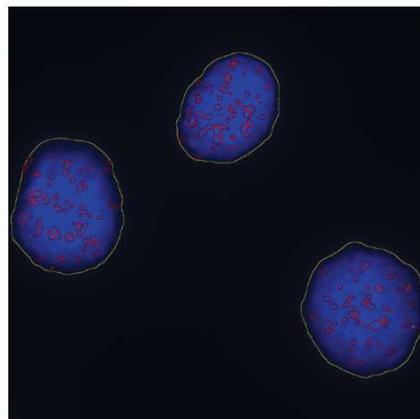
iPS Bloom



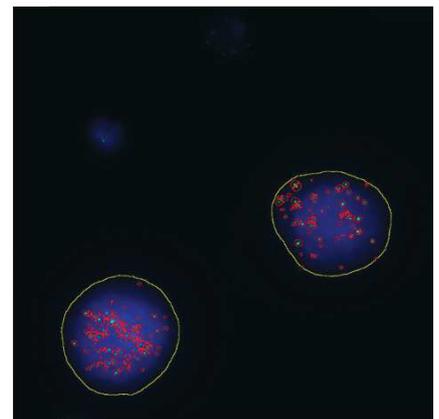
iPS RT



iPS Progéria



iPS BJ



iPS témoin EFS

Capture d'images par microscopie à épifluorescence des noyaux de chacune des lignées iPS. Sondes PNA FITC spécifiques des séquences télomériques (vert). Contre-coloration au DAPI (bleu). Analyse des images avec le logiciel CellProfiler®. Délimitation de la surface des noyaux colorés au DAPI (contours jaunes) et des signaux d'émission de fluorescence FITC (contours rouges).

## Annexe 14 (suite)

### Estimation de la longueur des télomères des cellules iPS

Etude statistique des intensités de fluorescence :

A : iPS Werner      C : iPS RT      E : iPS BJ  
 B : iPS Bloom      D : iPS Progéria      F : iPS témoin EFS

| Treatment                   | A           | B           | C           | D           | E           | F           | Pooled Total |
|-----------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| observations N              | 92          | 73          | 84          | 62          | 84          | 107         | 502          |
| sum $\sum x_i$              | 19,585      | 28,068      | 34,319      | 21,987      | 30,999      | 42,594      | 177,552      |
| Mean                        | 212.8804    | 384.4932    | 408.5595    | 354.6290    | 369.0357    | 398.0748    | 353.6892     |
| sum of squares $\sum x_i^2$ | 5,701,685   | 13,603,682  | 16,231,381  | 9,240,165   | 13,200,689  | 20,392,808  | 78,370,410   |
| sample variance $s^2$       | 16,839.7987 | 39,051.7812 | 26,626.8277 | 23,654.6962 | 21,216.2758 | 32,426.5227 | 31,082.1907  |
| sample std. dev. S          | 129.7683    | 197.6152    | 163.1773    | 153.8008    | 145.6581    | 180.0737    | 176.3014     |
| std. dev. of mean           | 13.5293     | 23.1291     | 17.8041     | 19.5327     | 15.8926     | 17.4084     | 7.8687       |

Test ANOVA :

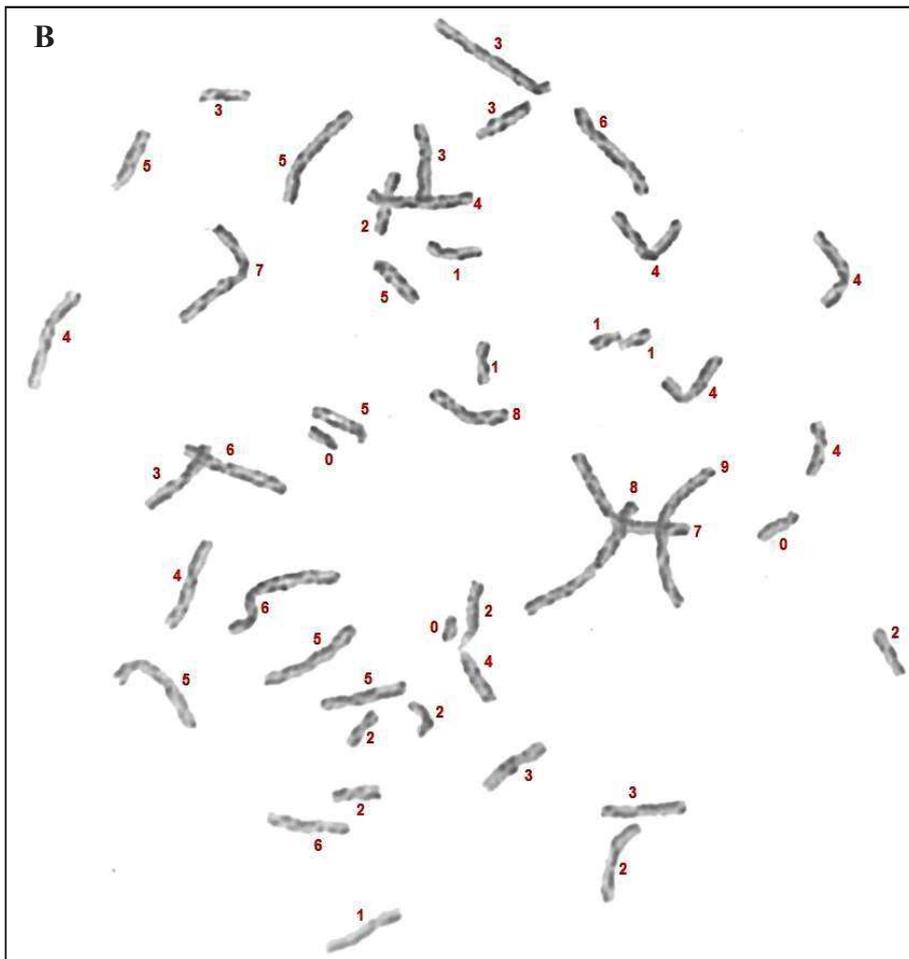
| source    | sum of squares  | degrees of freedom | mean square  | F statistic | p-value    |
|-----------|-----------------|--------------------|--------------|-------------|------------|
| treatment | 2,376,902.1257  | 5                  | 475,380.4251 | 17.8692     | 2.2204e-16 |
| error     | 13,195,275.3962 | 496                | 26,603.3778  |             |            |
| total     | 15,572,177.5219 | 501                |              |             |            |

Test post hoc de Tukey :

| treatments pair | Tukey HSD Q statistic | Tukey HSD p-value | Tukey HSD inference |
|-----------------|-----------------------|-------------------|---------------------|
| A vs B          | 9.4931                | 0.0010053         | ** p<0.01           |
| A vs C          | 11.2426               | 0.0010053         | ** p<0.01           |
| A vs D          | 7.4799                | 0.0010053         | ** p<0.01           |
| A vs E          | 8.9718                | 0.0010053         | ** p<0.01           |
| A vs F          | 11.2936               | 0.0010053         | ** p<0.01           |
| B vs C          | 1.3041                | 0.8999947         | insignificant       |
| B vs D          | 1.4993                | 0.8960987         | insignificant       |
| B vs E          | 0.8376                | 0.8999947         | insignificant       |
| B vs F          | 0.7757                | 0.8999947         | insignificant       |
| C vs D          | 2.7928                | 0.3589762         | insignificant       |
| C vs E          | 2.2209                | 0.6023186         | insignificant       |
| C vs F          | 0.6236                | 0.8999947         | insignificant       |
| D vs E          | 0.7461                | 0.8999947         | insignificant       |
| D vs F          | 2.3601                | 0.5456346         | insignificant       |
| E vs F          | 1.7272                | 0.8033131         | insignificant       |

## Annexe 15

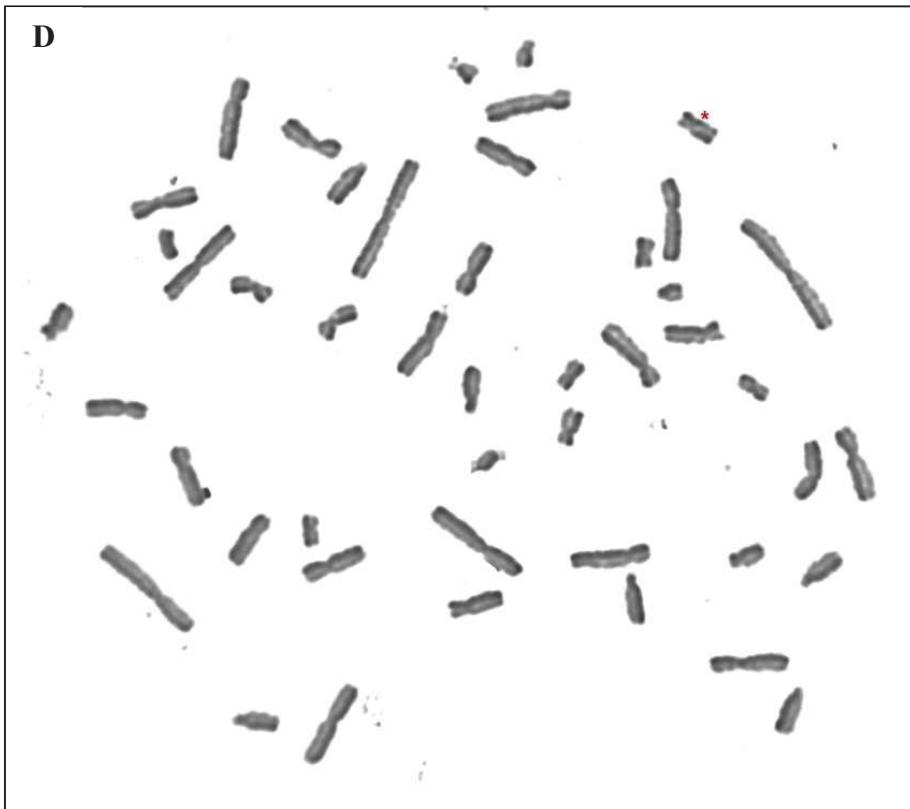
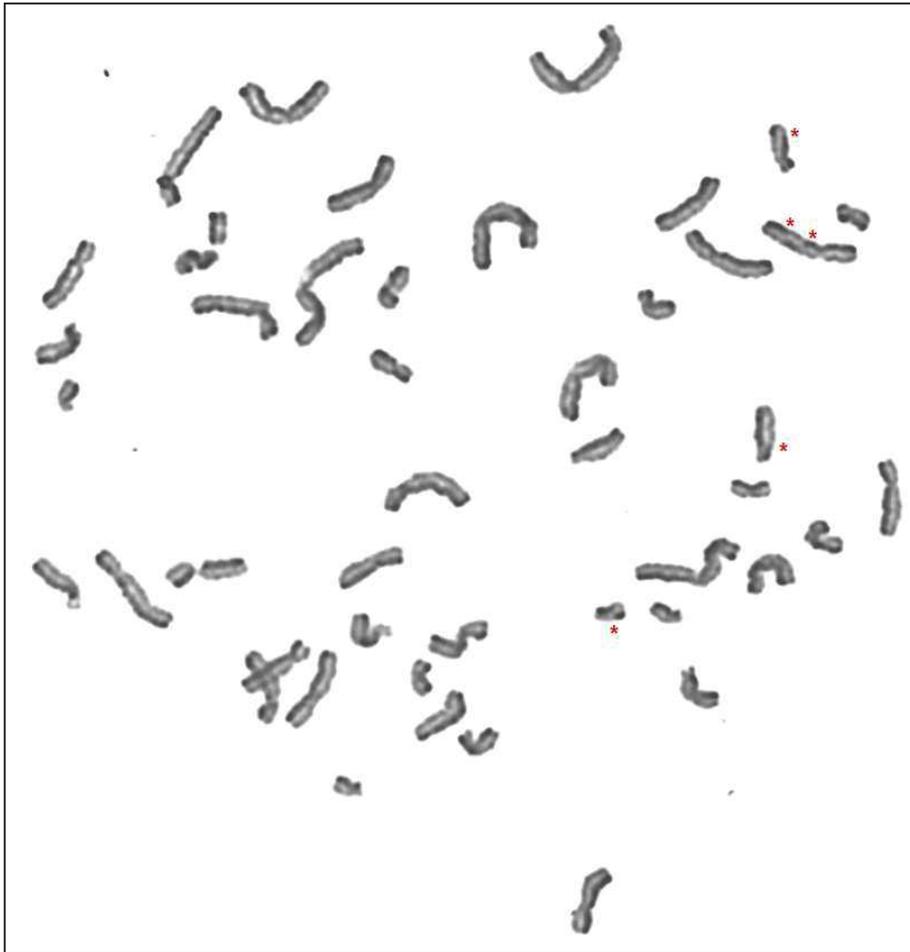
*Sister Chromatid Exchanges* observés sur métaphases de cellules iPS



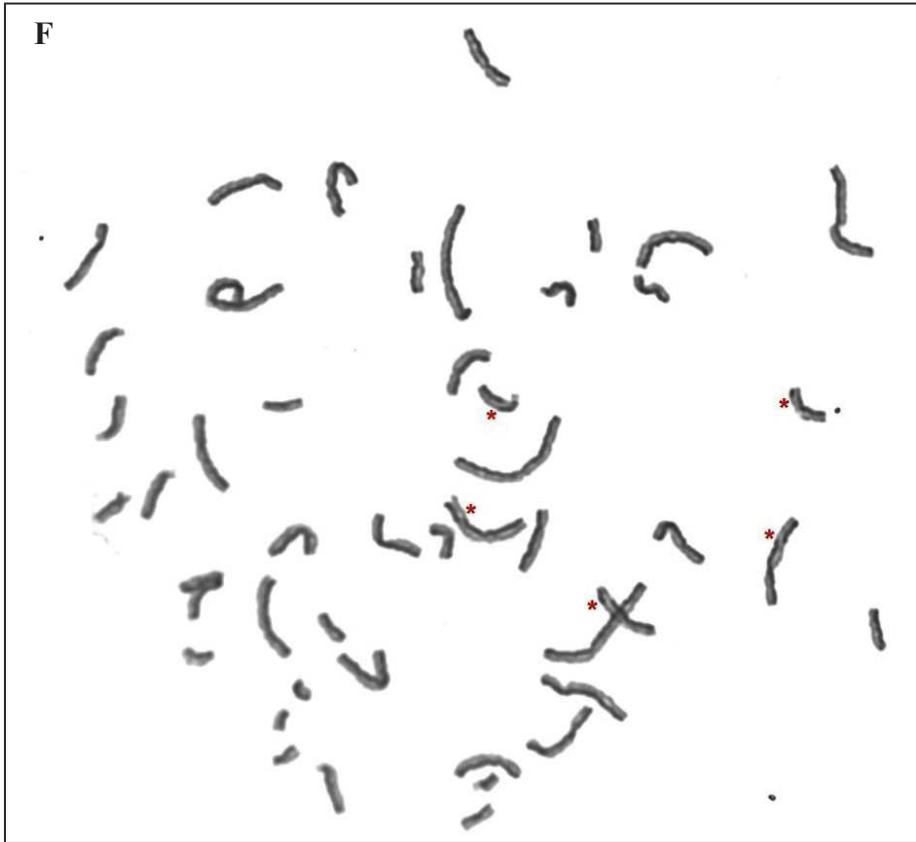
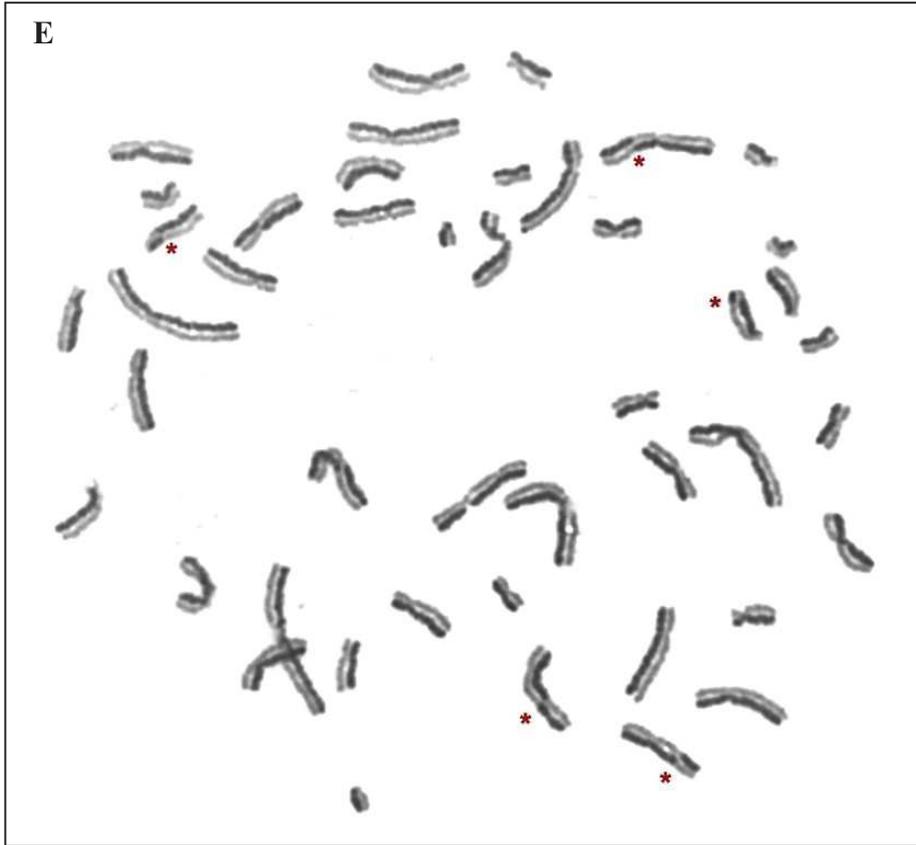
Les étoiles rouges montrent la présence d'un échange entre chromatides sœurs. Les nombres rouges indiquent le nombre d'échanges entre chromatides sœurs pour le chromosome situé à proximité.

A. Werner

B. Bloom



Les étoiles rouges montrent la présence d'un échange entre chromatides sœurs.  
C. Rothmund-Thomson      D. Progeria



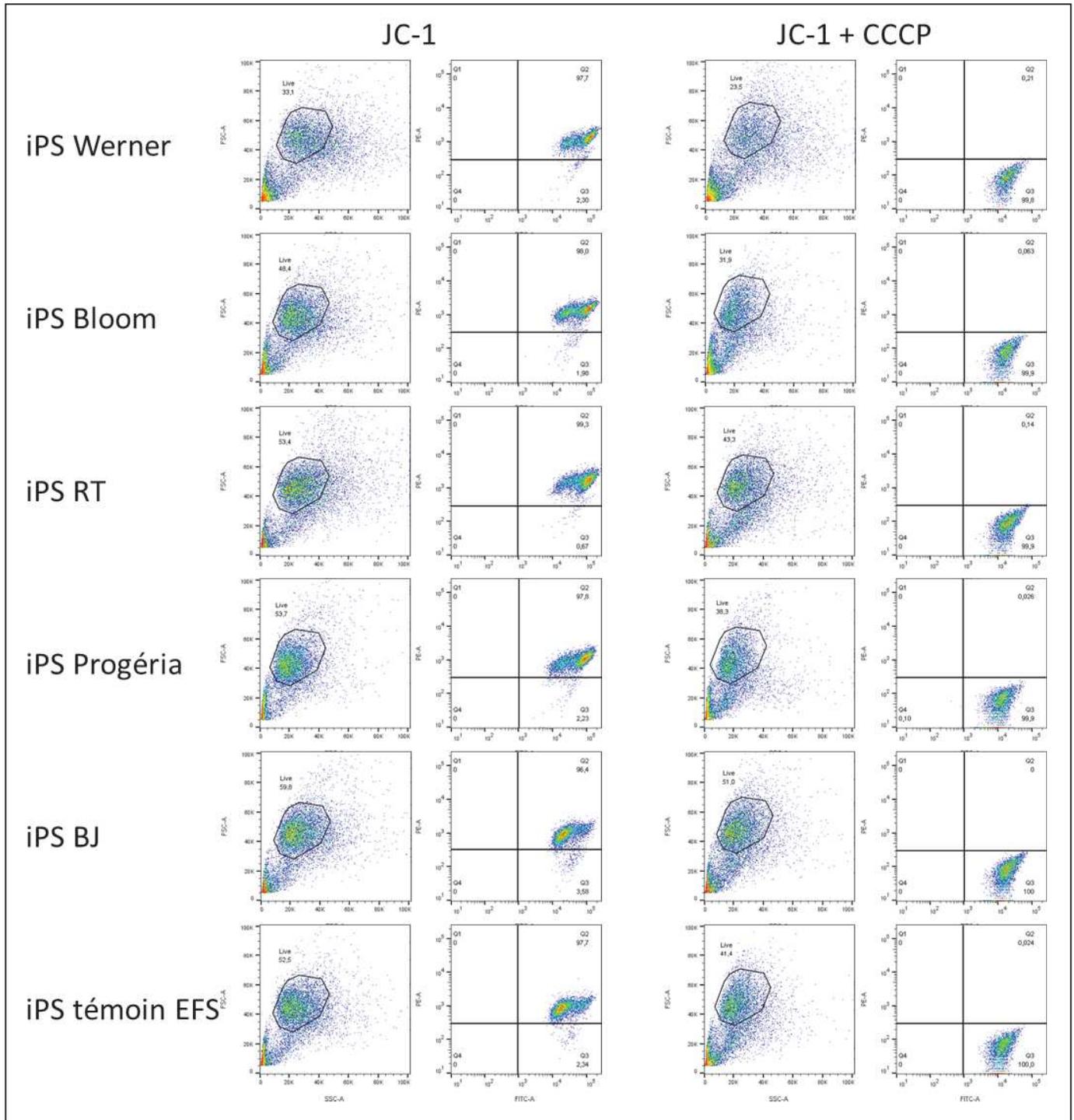
Les étoiles rouges montrent la présence d'un échange entre chromatides sœurs.

**E.** Témoin BJ      **F.** Témoin EFS



## Annexe 16

### Etude de la perméabilité membranaire des mitochondries



Analyse par cytométrie en flux du marquage des lignées iPS par JC-1.

Panel de gauche : traitement par JC-1 seul.

Panel de droite : traitement par JC-1 et CCCP (déstabilisant de la membrane mitochondriale) pour établir un témoin négatif.

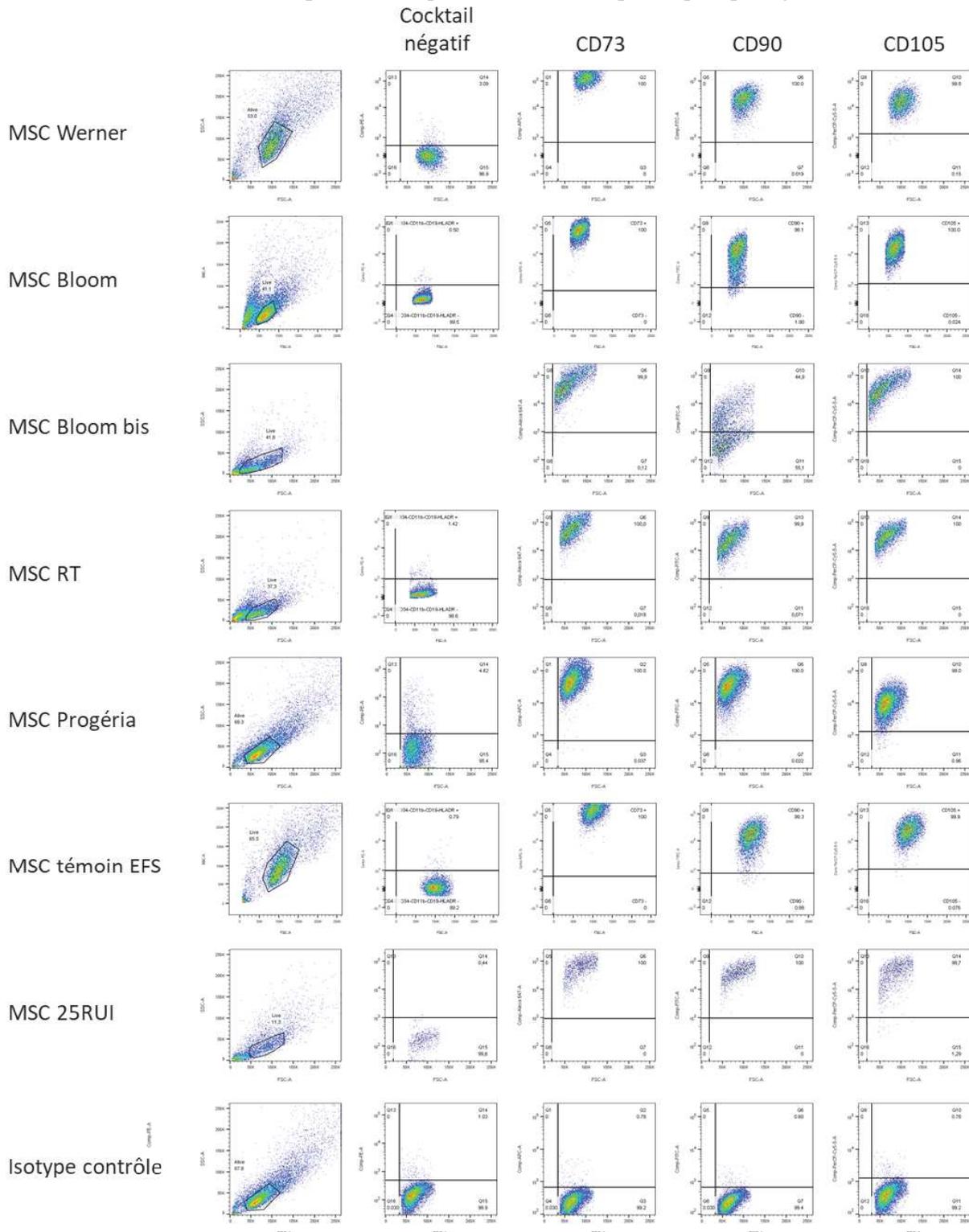
Pour chaque condition :

A gauche : graphique bidimensionnel avec taille en abscisse (FSC) et granularité en ordonnée (SSC). Sélection du nuage de points correspondant aux cellules vivantes.

A droite : graphique bidimensionnel avec intensité de fluorescence FITC (vert) en abscisse et PE (rouge) en ordonnée, parmi les cellules sélectionnées.

## Annexe 17

Caractérisation des MSC par les marqueurs de surface spécifiques par cytométrie en flux



A gauche : graphique bidimensionnel avec taille en abscisse (FSC) et granularité en ordonnée (SSC). Sélection du nuage de points correspondant aux cellules vivantes.

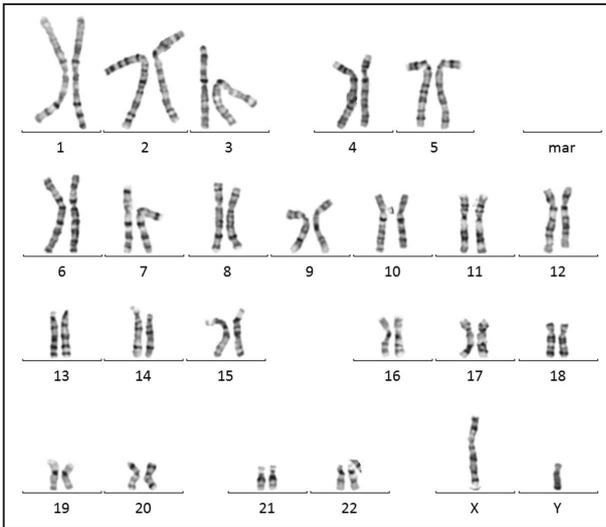
Cocktail négatif : ensemble de 5 anticorps (CD34, CD11b, CD19, CD45, HLA-DR) marqués par le même fluorochrome PE. Tous doivent être absents à la surface des cellules pour définir une MSC.

CD73, CD90, CD105 : chacun des 3 anticorps marqués à l'APC, au FITC et à la Cy 5.5 respectivement. Tous doivent être présents à la surface des cellules pour définir une MSC.

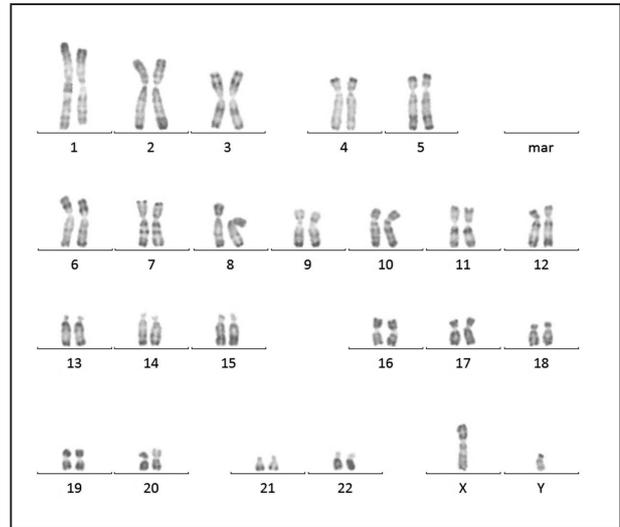
Les noms des lignées sont indiqués à gauche. La lignée BLM a été testée sur deux passages différents. Le même test a été réalisé avec un isotype contrôle sur la lignée progéria pour démontrer la spécificité des marquages.

## Annexe 18

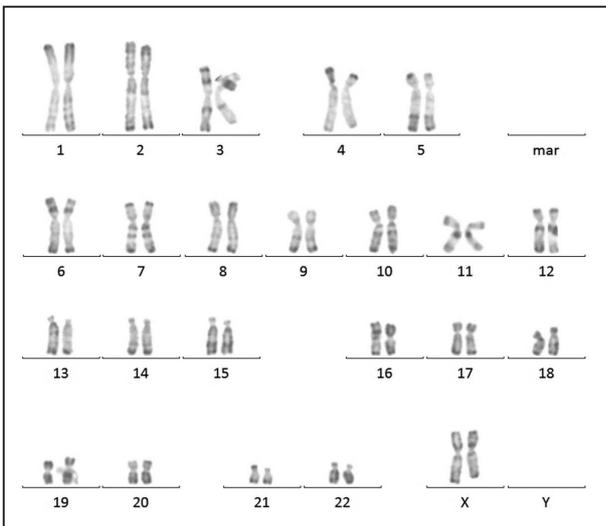
Caryotypes des cellules natives sans anomalie décelée



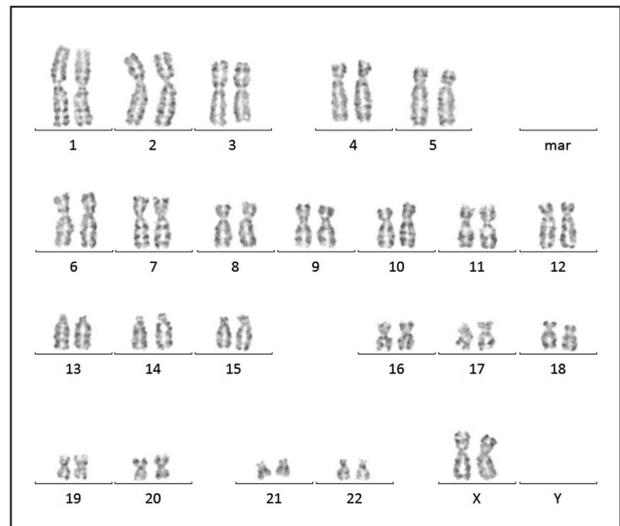
Lignée Werner - Lymphocytes



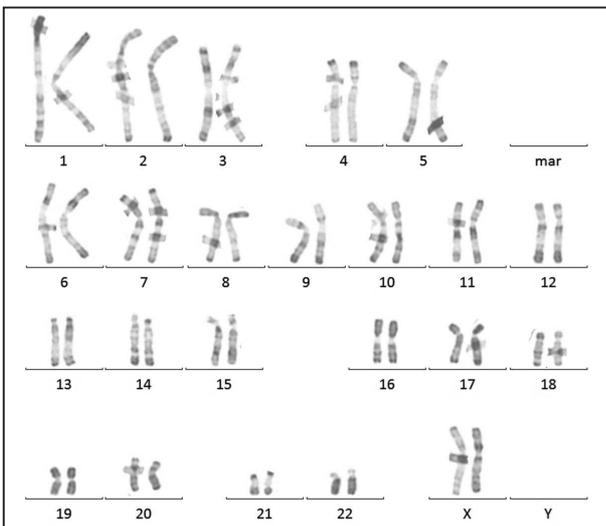
Lignée BJ - Fibroblastes



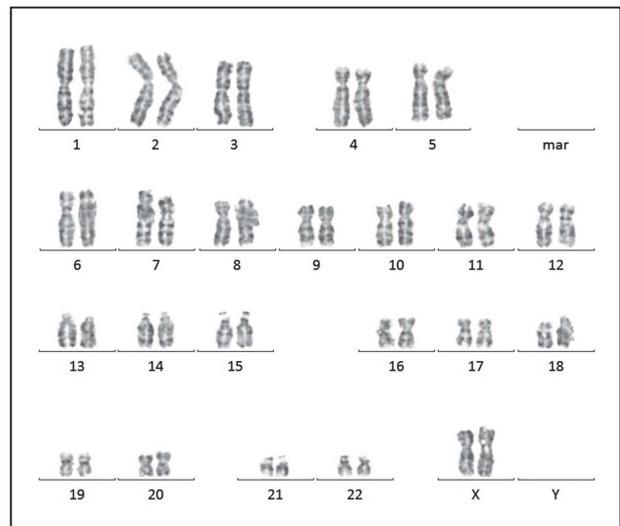
Lignée Bloom - Lymphocytes



Lignée Bloom - Fibroblastes



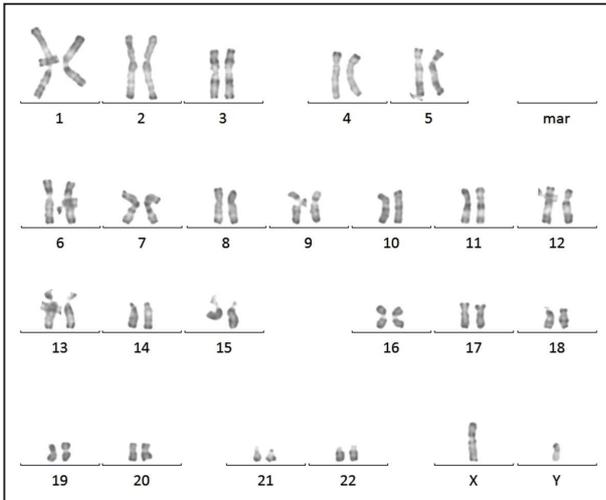
Lignée RT - Lymphocytes



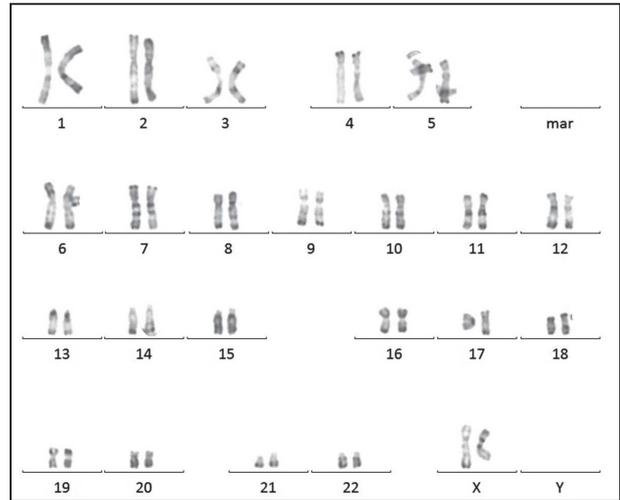
Lignée RT - Fibroblastes

## Annexe 19

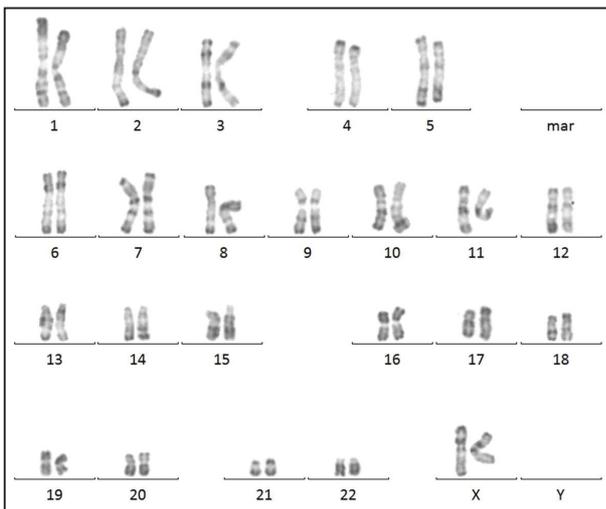
### Caryotypes des cellules iPS



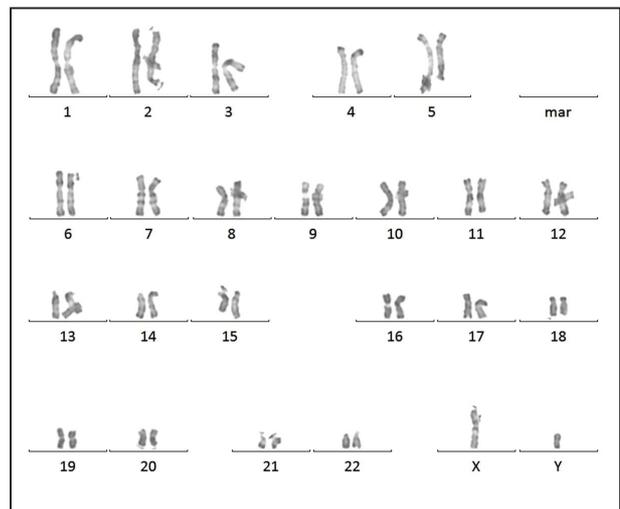
Lignée Werner - iPS P17



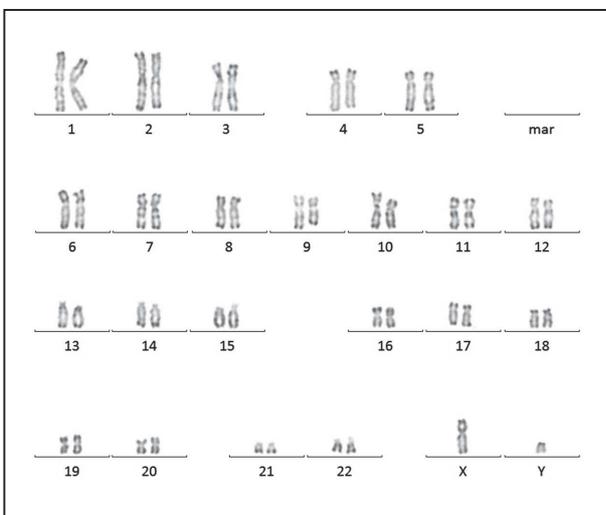
Lignée Bloom - iPS P31



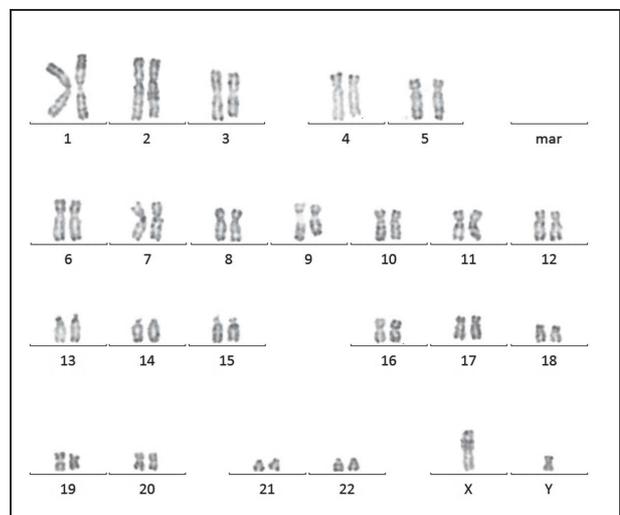
Lignée RT - iPS P22



Lignée Progéria - iPS P17



Lignée BJ - iPS P43



Lignée témoin EFS - iPS P17

## Annexe 20

### Détails des CNV retenus par *calling* manuel lors des ACPA

Comparaison des profils de déviation des sondes définissant les bornes des CNV pour les cellules natives et les cellules iPS d'une même lignée, éventuellement comparées à un témoin sans CNV.  
Le profil est défini par les points et le tracé de la même couleur pour un type cellulaire.

Profil **bleu** : témoin sain sans CNV dans la région étudiée.

Profil **vert** : cellules iPS de la lignée

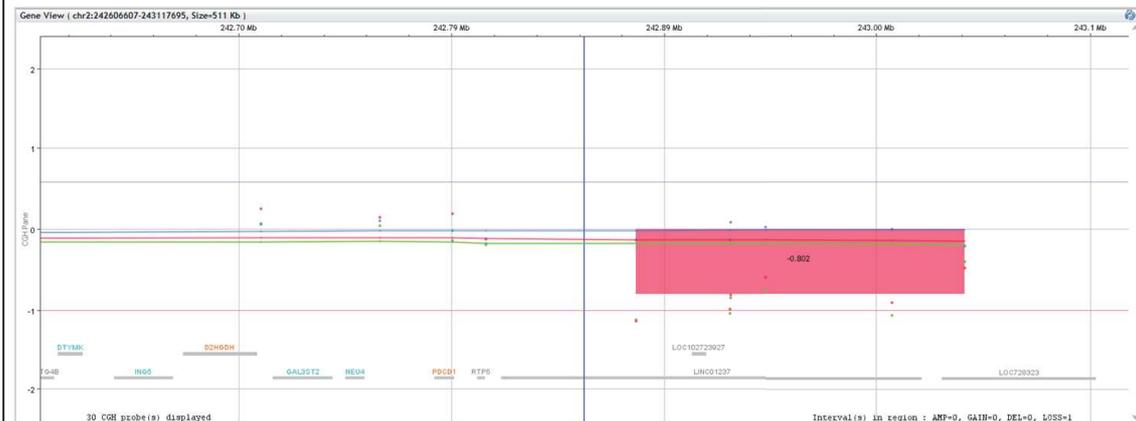
Profil **rouge** : cellules natives de la lignée (sang, PBMC ou fibroblastes).

Les rectangles montrent les CNV obtenu par *calling* automatique du logiciel du fournisseur.

Calling manuel

## Werner sang vs Werner iPS P8

Témoin normal → Pas de déviation significative = pas de CNV  
WRN iPS P8 }  
WRN sang } → Déviations similaires = même CNV

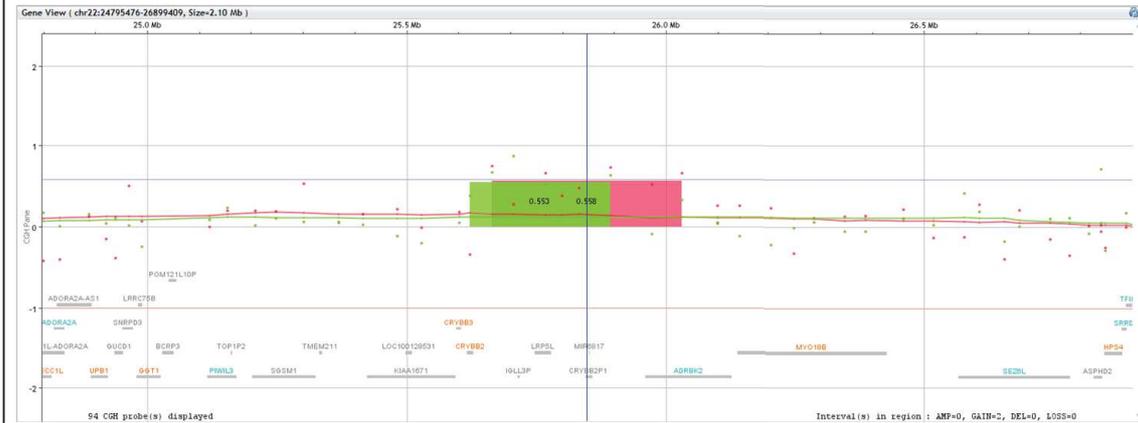




Calling manuel

# Progéria PBMC vs Progéria iPS P10

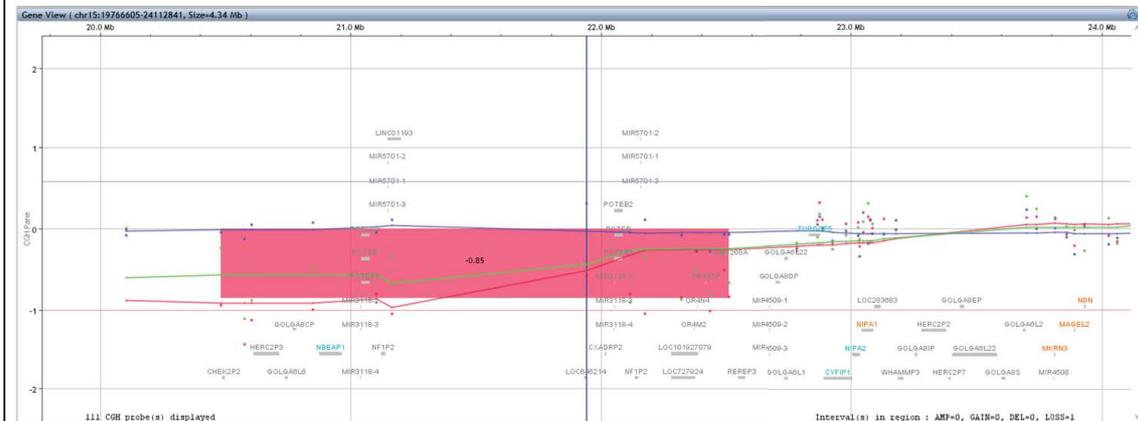
Progéria iPS P10 }  
Progéria PBMC } → Déviations similaires = même CNV



Calling manuel

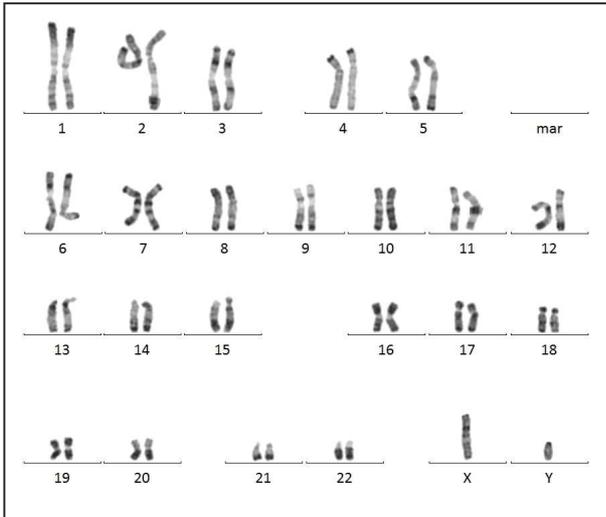
# BJ Fibroblastes P11 vs BJ iPS P10

Témoin normal → Pas de déviation significative = pas de CNV  
BJ Fibro P11 }  
BJ iPS P10 } → Déviations similaires = même CNV

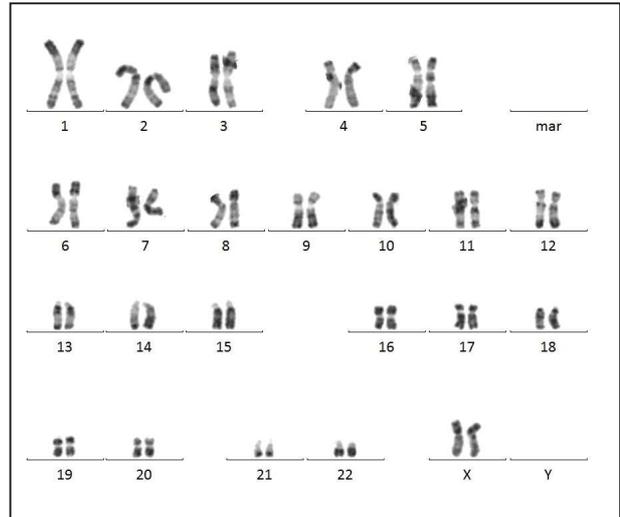


## Annexe 21

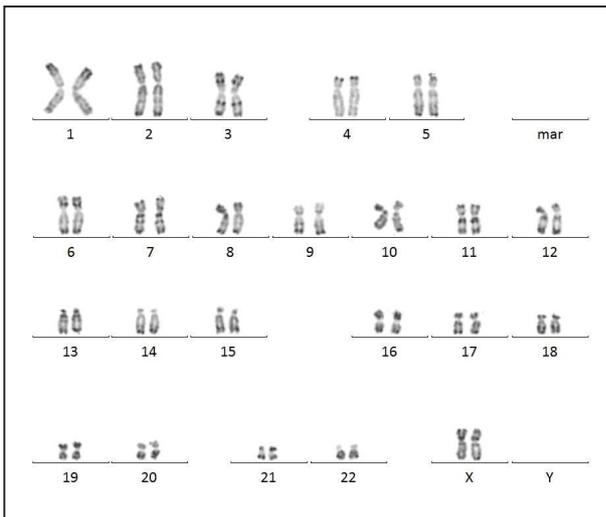
### Caryotypes des cellules MSC



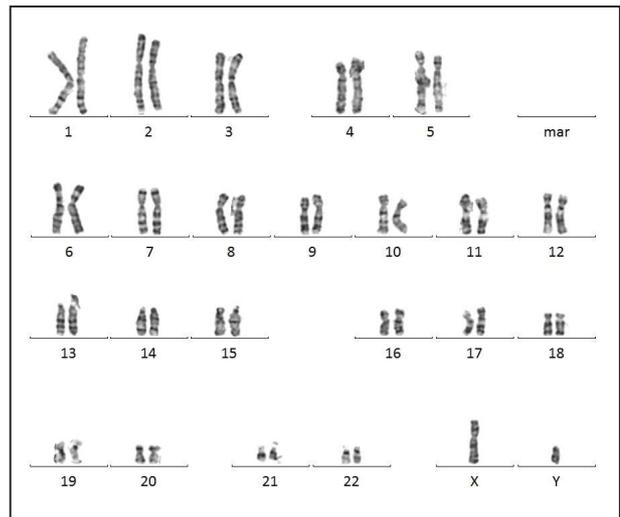
Lignée Werner - MSC P13



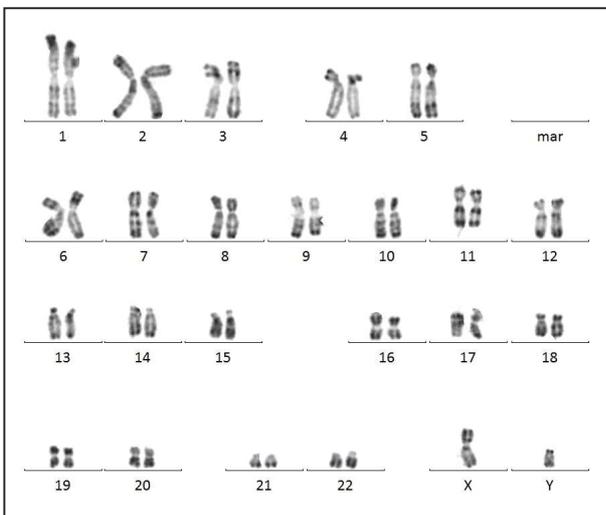
Lignée Bloom - MSC P11



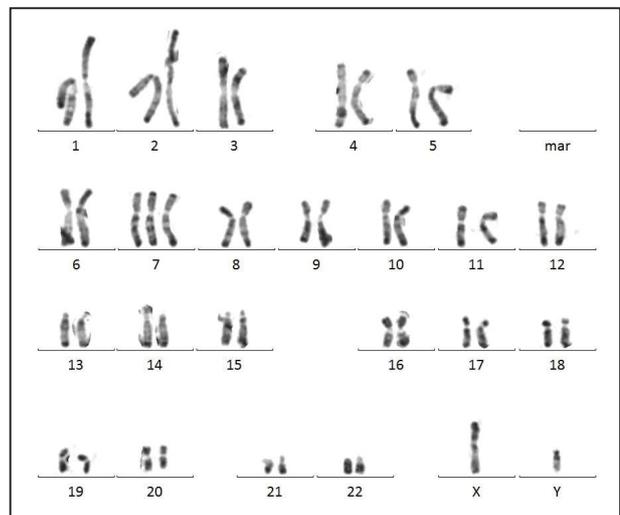
Lignée RT - MSC P11



Lignée Progéria - MSC P13



Lignée témoin EFS - MSC P13



Lignée 25RUI - MSC P11

## 10 Publications

**Chromothripsis: potential origin in gametogenesis and preimplantation cell divisions. A review.**

Pellestor F, **Gatinois V**, Puechberty J, Geneviève D, Lefort G.

*Fertil Steril.* 2014 Dec;102(6):1785-96. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.09.006. Epub 2014 Oct 18. PMID : 25439810

**Le Chromothripsis, une forme insoupçonnée de complexification extrême des remaniements chromosomiques.**

Pellestor F, **Gatinois V**, Puechberty J, Geneviève D, Lefort G.

*Med Sci (Paris).* 2014 Mar;30(3):266-73. doi: 10.1051/medsci/20143003014. Epub 2014 Mar 31. Review. French. PMID : 24685217

**Les remaniements chromosomiques complexes. Un paradigme pour l'étude de l'instabilité chromosomique.**

**Gatinois V**, Puechberty J, Lefort G, Geneviève D, Pellestor F.

*Med Sci (Paris).* 2014 Jan;30(1):55-63. doi: 10.1051/medsci/20143001014. Epub 2014 Jan 24. Review. French PMID : 24472460

# Chromothripsis: potential origin in gametogenesis and preimplantation cell divisions. A review

Franck Pellestor, Ph.D.,<sup>a,b</sup> Vincent Gatinois, Pharm.D.,<sup>a,b</sup> Jacques Puechberty, M.D.,<sup>a</sup> David Geneviève, M.D.,<sup>a</sup> and Geneviève Lefort, M.D.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Chromosomal Genetics, Department of Medical Genetics, Arnaud de Villeneuve Hospital, Montpellier CHRU; and <sup>b</sup> INSERM Unit Plasticity of the Genome and Aging, Institute of Functional Genomics, Montpellier, France

**Objective:** To review the discovery of chromothripsis and analyze its impact on human reproduction.

**Design:** Database and literature analysis.

**Setting:** University hospital.

**Patient(s):** Carriers of massive and complex chromosomal rearrangements.

**Intervention(s):** Cytogenetic analysis and molecular testing (fluorescence in situ hybridization, microarray, whole-genome sequencing).

**Main Outcome Measure(s):** Chromothripsis occurrence in human gametes and preimplantation embryos, with regard to the potential causative mechanisms described in literature.

**Result(s):** Databases were searched for the literature published up to March 2014. Chromothripsis is characterized by the shattering of one (or a few) chromosome segments followed by a haphazard reassembly of the fragments generated, arising through a single initial catastrophic event. Several mechanisms involving abortive apoptosis, telomere erosion, mitotic errors, micronuclei formation, and p53 inactivation might cause chromothripsis. The remarkable point is that all these plausible mechanisms have been identified in the field of human reproduction as causal factors for reproductive failures and the genesis of chromosomal abnormalities. Specific features of gametogenesis and early embryonic development such as the weakness of cell cycle and mitosis checkpoints and the rapid kinetics of division in germ cells and early cleavage embryos may contribute to the emergence of chromothripsis.

**Conclusion(s):** The discovery of this new class of massive chromosomal rearrangement has deeply modified our understanding on the genesis of complex genomic rearrangements. Data presented in this review support the assumption that chromothripsis could operate in human germlines and during early embryonic development. Chromothripsis might arise more frequently than previously thought in both gametogenesis and early human embryogenesis. (Fertil Steril® 2014;102:1785–96. ©2014 by American Society for Reproductive Medicine.)

**Key Words:** Chromothripsis, embryo, fertilization, gametogenesis, massive chromosomal rearrangement

**Discuss:** You can discuss this article with its authors and with other ASRM members at <http://fertilityforum.com/pellestorf-chromothripsis-gametogenesis-preimplantation/>



Use your smartphone to scan this QR code and connect to the discussion forum for this article now.\*

\* Download a free QR code scanner by searching for "QR scanner" in your smartphone's app store or app marketplace.

Complex chromosomal rearrangements (CCRs) are defined as structural abnormalities involving at least three breakpoints on two or more chromosomes (1, 2). Human CCRs are rare and disparate events (<300 reported cases), but their clinical impact is significant because

CCR carriers can have congenital disorders, mental retardation, and infertility.

Most of the CCRs arise de novo. They result from meiotic errors during gametogenesis in individuals with a normal karyotype or occur after fertilization during early cleavage divisions.

Complex chromosomal rearrangements constitute difficult challenges for genetic as well as reproductive counseling. The advent of efficient techniques for fast in situ chromosomal detection and precise genome analysis has contributed to improve our understanding of CCR formation and etiology (3, 4). Today, several laboratories propose preimplantation genetic diagnosis (PGD) procedures for couples with CCRs, thus offering an alternative to prenatal diagnosis and pregnancy termination (5–8). The occurrence of CCRs also constitutes a feature of numerous cancers (9). According to

Received June 24, 2014; revised and accepted September 4, 2014; published online October 18, 2014. F.P. has nothing to disclose. V.G. has nothing to disclose. J.P. has nothing to disclose. D.G. has nothing to disclose. G.L. has nothing to disclose.

Reprint requests: Franck Pellestor, Ph.D., Laboratory of Chromosomal Genetics, Department of Medical Genetics, Arnaud de Villeneuve Hospital, Montpellier CHRU, 371 Avenue du Doyen Gaston Giraud, 34295 Montpellier, France (E-mail: [f-pellestor@chu-montpellier.fr](mailto:f-pellestor@chu-montpellier.fr)).

Fertility and Sterility® Vol. 102, No. 6, December 2014 0015-0282/\$36.00  
Copyright ©2014 American Society for Reproductive Medicine, Published by Elsevier Inc.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.09.006>

the prevailing sequential model of cancer development, CCRs are thought to result from the gradual accumulation of independent structural alterations through several cell divisions in somatic cells (10). The recent identification of an unanticipated mechanism coined chromothripsis (from chromo for chromosome, and thripsis for breaking into small pieces) and governing massive and chaotic chromosomal rearrangements have radically modified the view of how complex rearrangements are generated.

Initially described in cancers (11) and then in congenital disorders (12), chromothripsis is characterized by the shattering of one or a few chromosomal segment(s) followed by a chaotic reassembly of the chromosomal fragments, both events occurring during one unique cellular event. The diversity and the high complexity of chromothripsis alterations raise questions about the origin of this phenomenon, its ties to chromosome instability, and its impact in pathology. Several causative mechanisms, involving abortive apoptosis, telomere erosion, mitotic errors, micronuclei formation, and p53 inactivation, have been proposed. The remarkable point is that all these potential mechanisms have been identified in the field of human reproduction as causal factors for reproductive failures and chromosomal abnormality formation. It is thus essential to consider this unanticipated catastrophic phenomenon in the context of fertilization and early embryonic development, and discuss in detail its potential implication in both in vivo and in vitro human reproduction.

## MATERIALS AND METHODS

For this review, we selected and analyzed recent key-articles on chromothripsis and informative articles on DNA repair mechanisms, cellular control of genome stability, and the generation of complex genomic alterations during gametogenesis and early embryonic development. We searched electronic databases including PubMed, Embase, and the Cochrane Library. The selection criteria for articles included the terms chromothripsis, chromosomal rearrangements, genomic instability, gametes, zygote, and embryogenesis. Eligibility was confined to trials published as full articles. In addition, the references of all eligible trials were reviewed, and cross searches were performed in PubMed, Embase, and the Cochrane Library. We further analyzed and included some references cited in the retrieved articles that concerned chromosomal segregation, micronuclei formation, and apoptosis as well as p53 functions and DNA repair processes.

Data were extracted by two independent investigators, and the results were compared. Any disagreement was resolved by discussion. The articles cited were selected on the basis of relevance and quality. The latest search was done March 2014. A total of 125 articles were relevant for this review. The preparation and the edition of this review were approved by the review board of our institute.

## AN OVERVIEW OF CHROMOTHRIPSIS

### Discovery of Chromothripsis in Cancers and Congenital Diseases

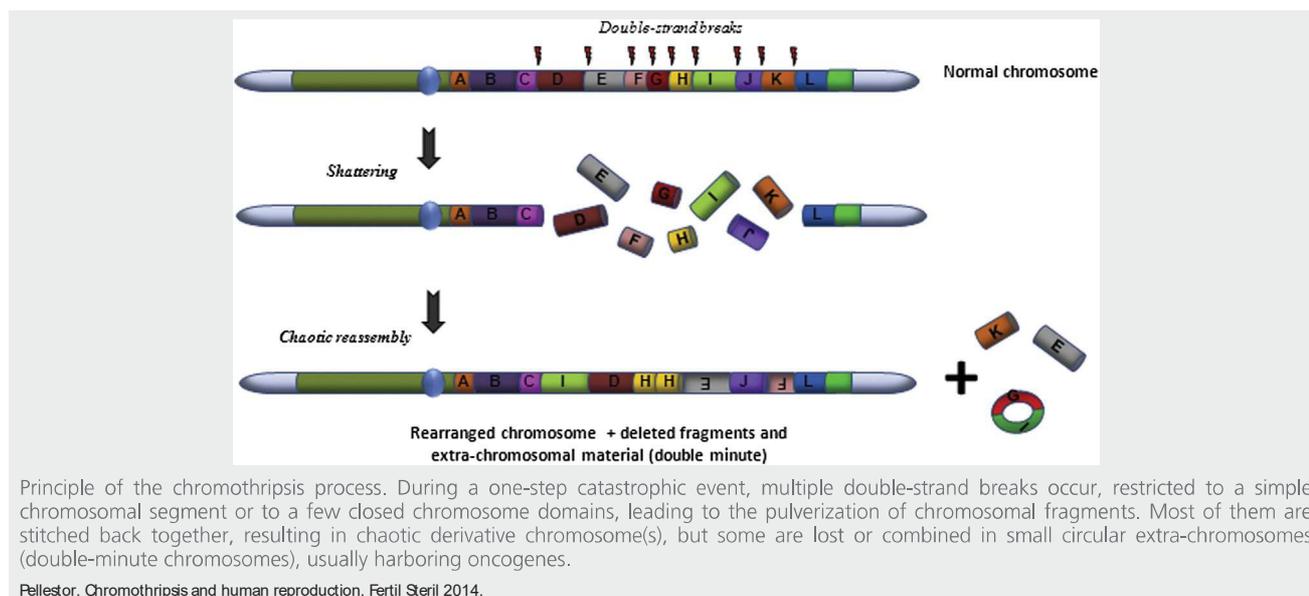
The complexity of chromosomal rearrangements reached a paroxysm with the discovery of the cataclysmic mechanism

of chromothripsis. The hallmark of chromothripsis is the occurrence of tens to hundreds of genomic rearrangements confined to one or a few chromosomal segment(s) through a unique cellular event, leading to chaotically reassembled chromosomes like a patchwork (Fig. 1).

This catastrophic scenario was first proposed after the highlighting of 42 somatic acquired rearrangements on the long arm of a chromosome 4 in a 62-year-old woman with chronic lymphocytic leukemia (11). The discovery of such a pattern of complex interchromosomal rearrangements, including joining deletions, duplications, and inversions, was made by combining single nucleotide polymorphism (SNP) assays and next-generation paired-end sequencing. Similar cataclysmic phenomena have been documented in various cancers such as medulloblastoma, neuroblastoma, myeloma, melanoma, colorectal cancers, prostatic cancers, and hematologic malignancies (13–18). Recently, a survey of 4,934 cancers indicated that chromothripsis was found in 5% of all samples, with incidences ranging from 0 in head carcinoma to 16% in glioblastoma (19). A large copy-number profiling analysis of 8,227 cancers revealed the occurrence of massive genomic rearrangements, similar to chromothripsis, in 1% to 2% of the sample (20). Together, these findings provide evidence that at least 2% to 4% of all human cancers involve chromothripsis events, affecting one or a few chromosomes (21). Glioblastoma and bone tumors appear to be the most affected types of cancer, with up to 39% and 25% of chromothripsis, respectively (11, 22). In all cases, chromothripsis is associated with aggressive forms of cancer and poor patient survival (23, 24). However, chromothripsis has also been observed in uterine leiomyomas, a common and low-malignant smooth-muscle tumor, indicating that chromothripsis does not systematically have a dramatic oncogenic effect but can also contribute to the progression of benign tumors (25).

During the same period, chromothripsis was also evidenced in congenital disorders. Kloosterman et al. (12) were the first to describe massive de novo rearrangements in a child with a complex developmental disorder and carrying a t(1;4;10) translocation. Data from mate-pair sequencing performed in the patient and his parents revealed a series of 25 intra- and interchromosomal rearrangements. Most of these rearrangements were balanced and clustered to small domains (1–2.5 Mb) in the vicinity of the identified chromosomal breakpoints. The phenomenon was rapidly identified in other patients. Liu et al. (26) described chromothripsis in 17 patients referred with developmental delay and cognitive abnormalities. Complex rearrangement patterns were observed, involving translocations and inversions as well as deletions, duplications, and triplications. These rearrangements were either de novo abnormalities or inherited. In 2012, Chiang et al. (27) performed a pair-end sequencing reanalysis of 52 patients carrying classic structural rearrangements (45 reciprocal translocations and 7 inversions) previously cytogenetically interpreted as balanced. A significant group (19.2%) of these carriers presented more complex inter- and intra-chromosomal rearrangements, compatible with chromothripsis-related events. A second report confirmed the existence of constitutional chromothripsis in a sample

FIGURE 1



of 10 patients with severe congenital disorders who carried inherited or de novo CCRs (28). All these findings have validated the occurrence of chromothripsis in the human germline or in early embryonic development, but also have confirmed its compatibility with viability and transmission to subsequent generations.

### Hallmarks of Chromothripsis

Based on data obtained in cancer cells, from studies of patients with congenital disorders, and on simulation approaches, several key-features common to all chromothripsis events have been proposed. These criteria permit reliably defining a new class of chromosomal alterations termed chromothripsis and distinguish them from other complex genomic aberrations:

1. Chromothripsis always occurs in a unique catastrophic genomic event.
2. This cataclysmic event leads to the generation of tens to hundreds of rearrangements, locally on one single chromosome or a few chromosomes rather than scattered throughout the whole genome.
3. Breakpoints and rejoining fragments show a pronounced tendency for clustering in small chromosomal segments. Up to 10 breaks can be identified within 50-kb segments.
4. Fragments resulting from shattering originate from a single parental chromosome, whereas progressive acquired rearrangements would affect each chromosome randomly.
5. Most of the reassembled fragments are joined without preference, order, or preferential orientation of the fragment ends.
6. Fragments do not display any sequence homology at their breakpoints or only microhomology of a few nucleotides.

7. Across the rearranged chromosomal domains, the number of copy numbers oscillates between 1 (for segmental losses) and 2 (for normal copy number), occasionally 3. Under a model of progressive alteration, the copy number state would increase with the accumulation of breaks. Such a genomic conformation results in the alternation of segments of preserved heterozygosity and segments with loss of heterozygosity (LOH).

Additionally, in some tumoral chromothripsis, the chaotic reorganization may lead to the generation of circular, extra double-minute chromosome markers that often include oncogenes and are frequently amplified (11, 29). This contributes to substantial changes in copy number states as well as chromosomal instability in tumoral cells. On the other hand, congenital chromothripsis is characterized by low copy number changes and relatively balanced status. This does not signify that unbalanced chromothripsis events do not occur in germline or during postzygotic divisions, but it strongly emphasizes the effect of selective pressure as a bias factor in the assessment of congenital chromothripsis because only balanced chromothripsis outcomes compatible with life have been found in individuals to date. Altogether, these key-features define a molecular signature of chromothripsis (30–32) and have important implications for understanding how and where chromothripsis arises.

### General Mechanism of Chromothripsis: Chromosome Pulverization and Reassembly

The occurrence of chromothripsis in a cell addresses the conceptual question about how chromosomes get shattered and how the pulverized fragments are stitched together through a single cellular event. Multiple double-strand breaks (DSBs) can arise from various exogenous sources such as ionizing

radiation, free radicals, environmental toxins, or chemotherapeutic drugs. Each of these sources is classically evoked to explain the spectrum and the extent of rearrangements in cancer genomes (33). Other exogenous causal factors might include certain viral infections that can induce multiple DNA breaks (34). Several processes involving the action of nucleases, dysfunction of enzymes such as DNA topoisomerase, or DNA replication stress have been suggested as endogenous stimuli (35). Recent reports have proposed other plausible explanations based on various cellular events such as telomere erosion, premature chromosome condensation (PCC), mitotic errors, abortive apoptosis, or micronuclei formation. The potential implication of these mechanisms remains open to discussion and will be analyzed in the second part of this review which focuses on the link between chromothripsis and human reproduction.

Concerning chromosomal fragment reassembly, initial findings indicate that recombination-based mechanisms such as nonhomologous end joining (NHEJ) can underlie the occurrence of chromothripsis. NHEJ is preferentially involved in the nonrecurrent and random rearrangements (36). It is a prevalent DSB repair pathway in higher eukaryotes, but it ligates DSBs in an error-prone manner, with a high probability for sequence alterations at the junctions (37). Because of the multiple breakpoints involved in chromothripsis, alternative mechanisms based on errors of DNA replication have also been proposed. They are the so-called fork stalling and template switching (FoSTeS) model (38) and the microhomology-mediated break-induced replication (MMBIR) model (39). The majority of breakpoints observed in tumoral chromothripsis display either a lack of sequence homology or short microhomology (one to five nucleotides), suggesting NHEJ as the preferential mechanism for fragment reassembly in cancer cells (40). In some reported cases of congenital chromothripsis, the high-resolution inspection of breakpoints also has observed similarities with the NHEJ-mediated stitching procedure identified in cancer (12). However, other constitutional chromothripsis involve multiple duplications and triplications (26, 27). These reassociation patterns cannot be explained by a NHEJ-mediated mechanism but are consistent with defective DNA replicative processes such as FoSTeS and MMBIR (41). All these findings suggest that in constitutional chromothripsis the two distinctive mechanisms, NHEJ and replication-based processes, are operating in the reassembling of chromosome fragments after their pulverization. Certain investigators favor the hypothesis of a combined action of the two types of mechanisms in constitutional chromothripsis to generate relatively balanced complex rearrangements compatible with viability (27).

## CHROMOTHRIPSIS DURING SPERMATOGENESIS

In several cases of constitutional chromothripsis, the parental origin of the rearrangements was tested by SNP-array analysis. Results showed that most of the chromothripsis arise in the male germline (12, 26, 27). This finding underlines the great vulnerability of spermatogenesis to DNA damage and

clearly points to spermatogenesis as a critical stage in the genesis of congenital chromothripsis.

The male germline displays a limited DNA-repair capacity as compared with somatic tissue cells, and the mutation rate is greater in spermatogenesis than in oogenesis (42). In the course of spermatogenesis, chromothripsis can arise either during the premeiotic division of diploid spermatogonia, through the first meiotic division, or during the differentiation of round spermatids into spermatozoa (i.e. spermiogenesis). During each of the three steps, environmental stimuli such as ionizing radiations or free radicals can act as triggers for DNA damage. Some studies have also demonstrated that exposure to environmental toxicants such as alcohol, cigarette smoke, or polluting agents may induce DNA damage in human sperm (43) as well as iatrogenic factors such as bacterial infections, lapsed time after ejaculation, or storage temperatures (44–46).

In spermatogonia, the DNA quality-control pathway operates in combination with the apoptosis process. About 50% of cells that enter meiosis I are eliminated by apoptosis (47). However, the DNA-repair pathway of spermatogonia appears to be significantly different than that of somatic cells, with the absence of some DNA-damage-sensing proteins (H2AX and 53BP1) on the sites of DSBs, variable kinetics, and the potential involvement of different repair proteins (48). The existence of alternative DNA-repair pathways in spermatogonia could reflect a distinctive feature of spermatogonia: the complete lack of compacted heterochromatin in these cells. This strengthens the emerging idea of a correlation between chromatin packing, gene repression, and DNA-damage response (49, 50). In addition, spermatogonia must undergo hundreds of mitotic divisions before entering into meiotic prophase (51), which implies that these cells are particularly prone to DNA damage. Consistent with the role of DNA replication defects in the chromothripsis process, replicative stress can then serve as an endogenous stimulus. Various events such as inhibition of DNA polymerase activity, defective topoisomerase, alteration of S-phase checkpoints, decreased stability of stalled forks, accelerated depletion of nucleotide pools, or inappropriate replication origin firing (52, 53) may initiate DNA replication stress during the S-phase of premeiotic divisions. Replication stress and mitotic error could synergize to induce chromosomal instability and chromothripsis occurrence (54). Mitotic error can result from numerous aspects of mitosis: dysregulation of the spindle assembly checkpoints, extra centrosomes, chromatid cohesion defect, or merotelic chromosome attachment (40, 55, 56).

Other plausible mechanisms may trigger chromothripsis in spermatogonia. Because some examples of chromothripsis rearrangements affect chromosome ends, it has been proposed that chromothripsis could arise via telomere attrition (11). Indeed, uncapped chromosome-ends are prone to fusion, leading to the formation of dicentric chromosomes. During mitosis, dicentric chromosomes can yield complex rearrangements through breakage-fusion-bridge (BFB) cycles (57). Also, Tubio and Estivill (58) proposed that chromothripsis might be caused by abortive apoptosis. Whereas apoptosis was considered as an irreversible cascade of extensive

chromatin fragmentation leading to cell death (59), several lines of evidence have suggested that abortion of apoptosis could contribute to the occurrence of chromosome rearrangements (60). Thus, a small subset of cells could undergo a restricted form of apoptosis and survive. The subsequent DNA repair might be accomplished through a fast and incorrect repair process, promoting the emergence of chaotic chromosomal rearrangement. To support this hypothesis, a recent report has shown that the apoptosis process could be reversed (61). During spermatogenesis, apoptosis is a major mechanism controlled by Sertoli cells for the elimination of defective germ cells. Among the cells undergoing apoptosis, a few could undergo a restricted form of apoptosis or escape the process and subsequently survive after performing rapid DNA repair to maintain their genome integrity (62). This could generate multiple and chaotic chromosome rearrangements in some spermatogonia.

An attractive explanation to link all these causal processes with the confined nature of damages created during chromothripsis is that the damaged chromosome(s) is (are) incorporated into a micronucleus in which chromothripsis-related damages will occur (Fig. 2).

Crasta et al. (63) have shown that defective or delayed DNA repair and replication occur in micronuclei. The initiation of chromothripsis in micronuclei can then arise in several distinct ways. First, the chromatin sequestered in the micronuclei can undergo defective replication through MMBID or FoSTeS mechanisms, resulting in the formation of complex rearranged chromosomes (64). Because the disassembly of the micronuclear membrane often fails at the onset of the subsequent mitosis, the micronucleus may persist in daughter cells over several cell-cycles before being eliminated or reincorporated into the regular nucleus, especially if they contain a centromere (65). Alternatively, the DNA replication in the micronucleus is asynchronous compared with that of the regular nucleus. The entry of the cell into mitosis while the micronucleus is still undergoing DNA replication will result in micronuclear DNA pulverization due to premature chromosome compaction, with the subsequent NHEJ-mediated chaotic reassembly of chromosome fragments (63). These micronucleus-based models have the potential to explain many features of chromothripsis, especially how such massive damage can be confined to one or just a few chromosomal segments. Previous studies have shown that micronuclei formation promotes aneuploidy (66, 67). Thus, mitotic errors during chromosome segregation may be a key event for the initiation of chromothripsis in human gametes, which are highly sensitive to aneuploidy (68).

During meiosis, the chromatin of spermatocytes sustains programmed structural changes that require the formation and the repair of DSBs (i.e. meiotic recombination). This implies the expression of numerous genes (69) and the recruitment of DSB repair proteins on the synaptonemal complexes, some of which are identical to proteins used in somatic cells and others specific to spermatocytes (70). This has led some investigators to speculate that DSB processing in spermatogenesis might involve alternative but not yet well-defined pathways, even if the nonallelic homologous recombination process seems to act predominantly in meiosis (48, 71). The

DSB occurrence and repair during meiosis present two specificities: first, meiotic DSBs are induced by a controlled genetic program, and second, meiotic recombination requires homologous pairing between nonsister chromatids whereas normal DSB repair in somatic cells involves sister chromatids.

Meiotic processes involve two critical checkpoints, a pachytene checkpoint responsible for the detection of abnormalities in synapsis and recombination, and a spindle checkpoint controlling the metaphase-anaphase transition in meiosis I. Thus, pachytene cells with asynapsed chromosomal segments are detected and usually eliminated by activation of apoptotic cell death pathways. Apoptosis appears to be less efficient in spermatocytes than in spermatogonia. An interesting question is whether this low efficiency of apoptosis in spermatocytes might promote the occurrence of abortive apoptosis and the subsequent emergence of massive structural rearrangements. There is increasing evidence that in the case of incomplete pairing of homologous chromosomes, the formation of nonhomologous synapsis (heterosynapsis) before the activation of apoptosis is a strategy for spermatocytes to escape the pachytene checkpoint (72). It is well established that this process promotes the formation of chromosomal structural rearrangements (73, 74). It could also be a way to generate chromothripsis-related rearrangements.

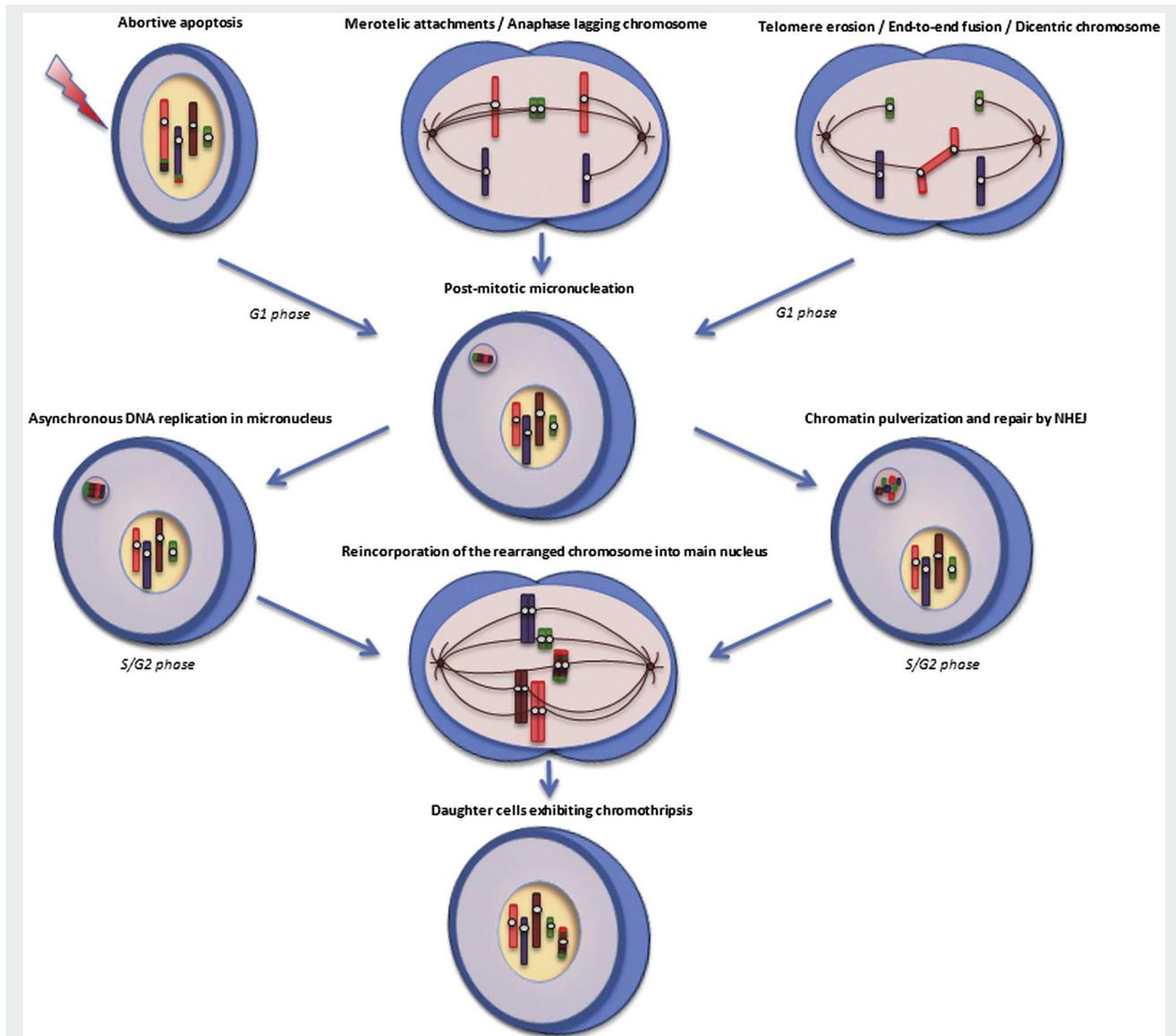
During spermiogenesis, spermatids undergo remarkable genomic reorganization involving the histone-to-protamine transition that leads to the packaging of the haploid genome in spermatozoa. This progressive and extensive chromatin remodeling requires the creation and the ligation of DSBs as well as the relaxation of the DNA superhelicity mediated by topoisomerase 2 (75). Alterations in these processes can lead to DNA fragmentation, and incomplete protamination has been correlated with decreased DNA integrity (76). This DNA damage will make spermatozoa more susceptible to posttesticular assaults, especially during transport through epididymis (77).

Spermatids have a slower and less efficient repair capacity than spermatogonia or somatic cells, and this moderate capacity declines during the latter part of spermiogenesis (48). At this stage, DSB cannot be repaired by homologous recombination because spermatids lack sister chromatids for homologous repair. Consequently, repair is processed either by homology-independent and error-prone mechanisms such as NHEJ or by still undetermined alternative repair pathways (78). During spermiogenesis, effective checkpoints trigger the elimination of damaged cells by apoptosis. However, this process might not always operate efficiently because a variable proportion of defective spermatozoa are observed in the ejaculate. This could be potentially associated with the occurrence of abortive apoptosis, stimulating the occurrence of chromothripsis events.

## CHROMOTHRIPSIS DURING OOGENESIS

The possibility of chromothripsis occurrence in female meiosis cannot be neglected. During oogenesis, the primordial germ cells undergo only a few mitotic divisions before undergoing

FIGURE 2



Chromothripsis and micronuclei in gametogenesis. There are several pathways by which a micronucleus can be generated during mitotic division in gametic germ cells, involving abortive apoptosis, mitotic errors, merotelic kinetochore attachment, or telomere erosion and end-to-end fusion. The generated micronucleus can undergo asynchronous DNA replication or chromosome pulverization and chaotic repair, leading to the formation of highly complex derivative chromosome(s). During subsequent cell divisions, the rearranged chromosomes trapped in the micronucleus can be reintegrated into the main nucleus of one of the daughter cells.

Pellestor. Chromothripsis and human reproduction. *Fertil Steril* 2014.

complex meiotic events of synapsis and recombination, and entering the protracted arrest phase in late prophase (79). Consequently, oocytes are particularly vulnerable to environmental attacks and DNA alteration, and can cumulate genomic and chromosomal damage for decades (80).

Numerous studies have documented the occurrence of chromosomal abnormalities in human female gametes as well as the significant impact of maternal aging (81–84). Oocytes are sensitive to various exogenous agents that can generate DSB during the meiotic prophase, follicle

formation, oocyte growth, and meiotic completion (82, 85). In contrast to male germ cells, oocytes are able to repair DNA damage throughout the complete oogenesis process, using either homologous recombination or NHEJ (86). DNA repair genes are expressed at high levels in human oocytes (87, 88). However, this capacity depends on the cytoplasmic and the genomic quality of oocytes, and on extrinsic oocyte factors such as the quality of the surrounding granulosa cell and maternal age (89, 90). Thus, the DNA repair ability is highly variable from oocyte to oocyte. Also, oocytes display

permissive cell-cycle checkpoints (91, 92). Marangos and Carroll (93) have reported that DSBs that usually cause G2 arrest in somatic cells do not prevent entry into the M-phase in meiotically competent mouse oocytes. The molecular basis for this lack of a DNA-repair pathway appears to be the oocyte's failure to activate ataxia-telangiectasia mutated (ATM) kinase, an essential regulator of the DNA damage response (94).

Failure in these DNA-repair pathways may have similar consequences as those previously described in male germ cells, with the potential occurrence of abortive apoptosis, telomere erosion, or replication stress as a trigger of chromothripsis. The synergistic combination of replicative stress and mitotic error might be particularly prevalent in oogenesis because of the frequent occurrence of chromosome malsegregation in female gametes. A recent study has indicated that the presence of an extra chromosome in human oocytes could alter meiotic recombination (95). Chromosome malsegregation or premature separation of sister chromatids occurring during the two female meiotic divisions can induce genome instability, micronuclei formation, and chromothripsis events. The particular cytokinesis operating in female meiosis between the large-sized oocyte and the small polar bodies can also facilitate the initiation of chaotic structural rearrangements (96).

## CHROMOTHRIPSIS IN ZYGOTES AND PREIMPLANTATION EMBRYOS

During the fertilization process, many genomic changes occur. Female meiosis is complete, and maternal chromosomes decondense. The paternal nucleus also decondenses and undergoes chromatin remodeling and DNA replication corresponding to male pronucleus formation (97). This new extensive modification of chromatin structure has an impact on DNA-repair mechanisms. DNA breaks generated during spermiogenesis and sperm transport as well as DNA damage generated in oocytes need to be repaired in the G1 phase, before the first round of DNA replication in the zygote, to create a safe zygotic diploid nucleus compatible with embryonic development. This crucial phase of DNA repair depends entirely on the repair capacities of the oocyte because maternal gene products persist until complete activation of the embryo nucleus, at the four-to eight-cell stage.

However, it seems that the ability of human oocytes to repair DNA damage from the fertilizing sperm nucleus does not exceed 8% to 10% of the haploid genome (98). This rate is probably highly variable among oocytes according to their genetic background, their maturity status, and the woman's age (82). When confronted with extensive DNA damage, the classic error-free homologous recombination repair pathway could be saturated and inefficient, and the zygote could die. In this context, good-quality zygotes might undergo abortive apoptosis and/or initiate fast and error-prone repair machinery to maintain a relatively complete and balanced genome despite the generation of massive rearrangements. This scenario might be facilitated by relaxed cell-cycle checkpoints, always operating in zygotes (99). Practically speaking, this can be translated into a mitotic catastrophe: direct death in

mitosis, or delayed or unequal first-cell divisions such as those commonly observed in *in vitro* fertilization (IVF) procedures.

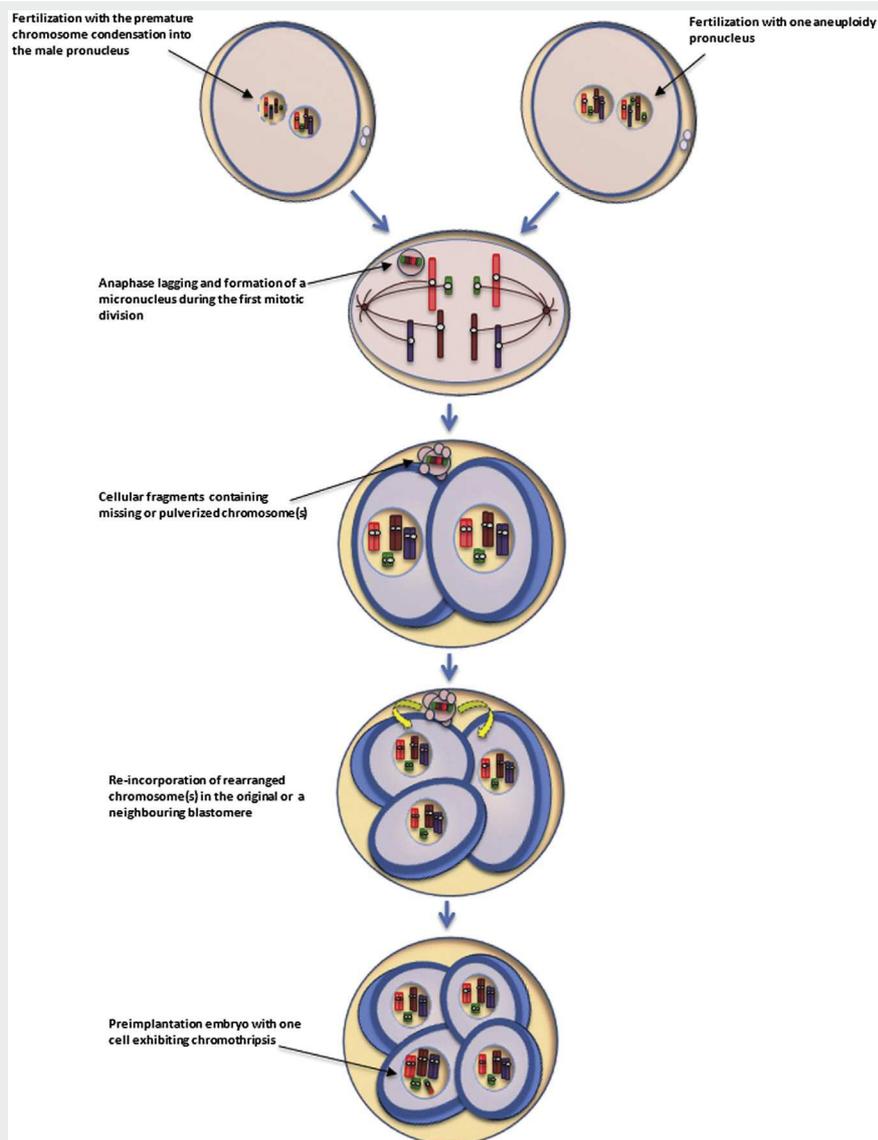
Another mechanism that may initiate chromothripsis during fertilization is premature chromosome condensation (PCC) of sperm nuclei (100). This phenomenon is caused by asynchrony between the female nucleus blocked in the metaphase-II stage and the male nucleus in the S-phase, and the abnormal activity of persistent mitotic promoting factors in zygotic cytoplasm. Thus, incompletely replicated male chromosomes can be partially pulverized and compacted. Both oocyte cytoplasmic immaturity and sperm protamine deficiency stimulate PCC (101, 102). In the vast majority of cases, zygotes with such extensive damage will die through an apoptotic process, but the induction of PCC might subsequently corrupt the G2 checkpoint. A zygote with partially underreplicated and fragmented DNA might then prematurely enter mitosis (34) and generate the formation of micronuclei in which fragmented chromosomes can undergo random repair before being reincorporated into the nucleus of a daughter embryonic cell (103).

All the causative mechanisms evoked also can potentially arise during early cleavage divisions. Accumulating data show that human preimplantation embryos display an extremely high rate of numerical abnormalities (50% to 80%), including frequent chromosomal mosaicisms and chaotic chromosomal patterns (104, 105). It has also been reported that good-quality human preimplantation embryos present a remarkably high incidence of structural abnormalities involving complex segmental rearrangements and chromosomal instability (106, 107). On the morphologic level, nuclei with apoptotic chromatin were detected in 10% of blastomeres of good-morphology IVF embryos and in more than 50% of blastomeres of fragmented embryos (108).

The new technique of noninvasive time-lapse imaging now allows direct analysis of the *in vitro* behavior of human embryos (109). By combining this approach with the analysis of the chromosomal constitution of each blastomere, Chavez et al. (110) observed a direct correlation between the aneuploidy status of four-cell embryos and blastomere asymmetry or fragmentation. A large proportion of embryos displayed either mitotic aneuploidy (55%) or meiotic aneuploidy (20%), with an 80% global rate of complex mosaics. Some but not all fragments contained chromosomal material arising from embryonic micronuclei. According to time-lapse analysis, fragments might stay isolated in the periphery of embryos or alternatively they might be reintegrated into their original blastomeres or in a neighboring blastomere. These observations suggest a new way for the intercellular diffusion of altered chromosome material via the process of fragmentation-reintegration (Fig. 3), and they stress the potential role of micronuclei in the genesis of chromothripsis during early embryonic divisions.

The high incidence of chromosome abnormalities and the frequent fragmentations observed in cleaved human embryos support the assumption that chromothripsis may arise more frequently than thought during early human embryogenesis. Various mechanisms may stimulate the initiation of embryonic chromothripsis during the first cleavage

FIGURE 3



Chromothripsis in preimplantation embryo via micronucleus. Both aneuploidy fertilization and premature chromosome condensation in the male pronucleus can lead to the formation of an embryonic micronucleus sequestering extra or pulverized chromosome(s) during the first embryonic division. In the micronucleus, the chromosomal materials undergo defective replication and/or chaotic reorganization. The micronucleus can be incorporated into extracellular fragments, often detected *in vitro* at the two-cell stage in preimplantation embryos, and then be reincorporated later into the blastomere from which it originated or a neighboring blastomere. Thus, the rearranged chromosome(s) can be subsequently reintegrated into the main nucleus of one blastomere and thereafter maintained with chromothripsis-related rearrangements.

Pellestor. Chromothripsis and human reproduction. *Fertil Steril* 2014.

divisions, such as defects in chromosome cohesion or attachment, centrosome dysfunctions, or chromosome anaphase lag. Favoring factors for this particular vulnerability of early mitosis can be the lack of cell-cycle checkpoints in human cleavage-stage embryos and the rapid kinetics of cell division in human blastomeres (99). In this context, the preimplantation embryo might favor the fast and error-prone NHEJ pathway to manage both the quick resolution of extensive chromatin alterations and the vital necessity of rapid cell proliferation. During the first cell divisions, the maintenance

of cells, even if genome damaged, is essential for the survival of the embryo (111). Regarding early embryonic development, genomic stability and genomic integrity seem to be two contradictory requirements. It seems clear that early development requires the regulation of genomic stability more than genomic quality. Short cell cycles, relaxed checkpoints, and potentially dysregulated apoptotic machinery contribute to rapidly reaching a sufficient embryonic mass that is indifferent to the accumulation of chromosomal abnormalities.

The combination of chaotic chromosomal rearrangements and gene dosage alterations in chromothripsis should preferentially lead to nonviable embryos. Alternatively, chromothripsis resulting in balanced and stable chromosomal rearrangements would be viable and transmissible, despite a chaotic and complex chromosomal reorganization. According to the embryonic stage where the catastrophic event occurs, chromothripsis will be confined to extra-embryonic tissues or be present as full chromothripsis or mosaic chromothripsis in the embryonic lineage and have pathogenic consequences in live-borns (112).

## LINK BETWEEN CHROMOTHRIPTIS AND P53 FAMILY PROTEINS

The occurrence of chromothripsis has been strongly associated with dysregulation or loss of p53 tumor suppressor genes. Genome sequencing-based analysis of different Li-Fraumeni-associated tumors from patients with germline p53 mutations identified patterns of complex chromosomal abnormalities, revealing a striking association between p53 mutations and chromothripsis occurrence in these tumors (29). These findings led the investigators to propose that massive chromothripsis rearrangement could occur as a consequence of preceding p53 mutations. Known as the guardian of the genome, p53 plays a major role in maintaining genome stability by mediating cell cycle arrest, apoptosis, and cell senescence in response to DNA damage (113, 114). Germline p53 mutations could either predispose cells to catastrophic DNA rearrangements by facilitating chromosome malsegregation and micronuclei formation or facilitate survival of cells with massive rearrangements by disrupting cell cycle arrest and apoptosis. In addition, reduced p53 activity seems to favor nonhomologous DNA repair mechanisms, which are a feature of chromothripsis.

The p53 family proteins, including p53, p63, and p73, play important roles in reproduction. In testes, p53 is highly expressed, in particular in early spermatocytes where it mediates DNA damage-induced apoptosis (115). In p53 null mice, a high incidence of multinucleated cells and limited apoptosis are observed. The expression of p53 was also detected in human preimplantation embryos (116), and recently p53 has emerged as a fertility regulator controlling egg implantation (117). The p63 isoform appears to be exclusively expressed in the female, where it is essential for the process of eliminating a damaged oocyte by apoptosis (118, 119). Oocytes without p63 are resistant to DNA damage induced-apoptosis. The third transcription type p73 is also involved in the regulation of oocyte quality through its interaction with the spindle assembly checkpoint (SAC) complex. The p73-deficient oocytes exhibit spindle abnormality and an increased rate of chromosomal defects (120).

All these findings show that the p53 family members are implicated in different steps of the regulation of reproduction. Consequently, alterations of the p53 family member pathways in male and female germlines and embryonic development could initiate or facilitate chromothripsis in a cell-context specific manner as in somatic cells. To date, increased rates of aneuploidy have been found in the sperm of

Li-Fraumeni syndrome carriers (121), indicating a link between p53 mutations and the generation of chromosomal abnormalities in male gametes. Further investigations on the functions of these proteins in reproduction may shed light on the mechanisms governing the process of chromothripsis in the field of reproduction.

## CONCLUSION

Chromothripsis is an unexpected, extraordinary phenomenon whose discovery has modified our perception of the genesis of complex genomic rearrangements and their impact on human reproduction. Although the causes of chromothripsis are still being debated, various mechanisms might act to initiate this catastrophic phenomenon, including telomere erosion, mitotic errors, abortive apoptosis, and micronuclei formation. In addition, the possible connection between chromothripsis occurrence and p53 alterations provides an attractive genetic and mechanistic basis for chromothripsis triggering. Regardless of the molecular details of these mechanisms, critical events inferring chromothripsis can occur during distinct steps of gametogenesis, such as during the premeiotic divisions of diploid spermatogonia, meiosis I prophase or spermatid differentiation, or the rapid division of preimplantation cells.

Data compiled in this review examine and discuss the fact that several of these causative mechanisms (micronuclei formation, abortive apoptosis, and PCC induction) are operating in human germline cells and during early embryonic development, strongly suggesting that chromothripsis could frequently occur in gametes and embryos (122). In the biological context of fertilization and early embryonic development, an important characteristic of chromothripsis is its emergence through a unique cellular event, because of the strong impact of each early division on the genetic status of the future embryo and its viability. Due to the complexity of chromothripsis-associated rearrangements, most of chromothripsis must lead to the formation of nonviable embryos. However, there is also evidence that chromothripsis can generate massive but balanced genomic rearrangements, compatible with embryonic and fetal viability and thus contributing to the occurrence of congenital disorders.

Critical considerations have been advanced concerning the concept of chromothripsis and its causative mechanisms. The lack of efficient methods to identify chromothripsis as well as variations in the criteria used to annotate chromothripsis events have been recently criticized (123, 124). Without a doubt, more data need to be accrued to validate the existence of chromothripsis and to demonstrate its impact in human reproduction. However, whereas studies on tumoral cell lines benefit from the large amount of DNA available to perform cytogenetic and molecular analysis and verify this phenomenon, assays in the human reproduction field are limited by the amount and the accessibility of DNA from gametes, zygotes, and preimplantation human embryos.

It is interesting that *in vitro* experimental models have been recently described to simulate the chaotic process of chromothripsis and investigate its functional impact (125). Also, an elegant approach such as the combination of

noninvasive time-lapse imaging with blastomeric karyotypic reconstruction may be an efficient system for studying chromosome dynamics and the potential emergence of chromothripsis in preimplantation embryos (109). In parallel, the development of robust tools for objectively quantifying chromothripsis events in large-scale genomic data constitutes a significant advance to validate the phenomenon (32).

Thanks to advances in next-generation DNA sequencing, information drawn from emerging single-cell genome analysis should also provide further insight into the emergence of this cataclysmic phenomenon in human reproduction. This constitutes a great challenge and implies further efforts be made to adapt these new techniques on human gametes, zygotes, and preimplantation embryos. Nevertheless, in the light of all the data compiled in this review, chromothripsis as a mechanism for profound genome modification in human germlines and early embryonic development can be regarded as a credible mechanism.

## REFERENCES

- Pellestor F, Anahory T, Lefort G, Puechberty J, Liehr T, Hédon B, et al. Complex chromosomal rearrangements: origin and meiotic behavior. *Hum Reprod Update* 2011;17:476–94.
- Madan K. Balanced complex chromosome rearrangements: reproductive aspects. A review. *Am J Med Genet A* 2012;158:947–63.
- Loup V, Bernicot I, Janssens P, Hédon B, Hamamah S, Pellestor F, et al. Combined FISH and PRINS sperm analysis of complex chromosomes rearrangement t(1;19;13): an approach facilitating PGD. *Mol Hum Reprod* 2010;16:111–6.
- Godo A, Blanco J, Vidal F, Parriego M, Boada M, Anton E. Sequential FISH allows the determination of the segregation outcome and the presence of numerical anomalies in spermatozoa from a t(1;8;2)(q42;p21;p15) carrier. *J Assist Reprod Genet* 2013;30:1115–23.
- Lim CK, Cho JW, Kim JY, Kang IS, Shim SH, Jun JH. A healthy live birth after successful preimplantation genetic diagnosis for carriers of complex chromosomes rearrangements. *Fertil Steril* 2008;90:1680–4.
- Escudero T, Estop A, Fisher J, Munné S. Preimplantation genetic diagnosis for complex chromosome rearrangements. *Am J Med Genet A* 2008;146:1662–9.
- Vanneste E, Melotte C, Voet T, Robberecht C, Debrock S, Pexsters A, et al. PGD for a complex chromosomal rearrangement by array comparative genomic hybridization. *Hum Reprod* 2011;26:941–9.
- Scriven PN, Bint SM, Davies AF, Mackie Ogilvie C. Meiotic outcomes of three-way translocations ascertained in cleavage-stage embryos: refinement of reproductive risks and implications for PGD. *Eur J Hum Genet* 2014;22:748–53.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646–74.
- Yates LR, Campbell PJ. Evolution of the cancer genome. *Nat Rev Genet* 2012;13:795–806.
- Stephens PJ, Greenman CD, Fu B, Yang F, Bignell GR, Mudie LJ, et al. Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell* 2011;144:27–40.
- Kloosterman WP, Gurvey V, van Roosmalen M, Duran KJ, de Bruijn E, Bakker SC, et al. Chromothripsis as a mechanism driving complex de novo structural rearrangements in the germline. *Hum Mol Genet* 2011;20:1916–24.
- Magrangeas F, Avet-Loiseau H, Munshi NC, Minvielle S. Chromothripsis identifies a rare and aggressive entity among newly diagnosed multiple myeloma patients. *Blood* 2011;118:675–8.
- Molenaar JJ, Koster J, Zwiijnenburg DA, van Sluis P, Valentijn LJ, van der Ploeg I, et al. Sequencing of neuroblastoma identifies chromothripsis and defects in neurogenesis genes. *Nature* 2012;483:589–93.
- Nagel S, Meyer C, Quentmeier H, Kaufmann M, Drexler HG, MacLeod RA. Chromothripsis in Hodgkin lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2013;52:741–7.
- Teles Alves I, Hiltmann S, Hartjes T, van der Spek P, Stubbs A, Trapman J, et al. Gene fusions by chromothripsis of chromosome 5q in the VCaP prostate cancer cell line. *Hum Genet* 2013;132:709–13.
- Hirsch D, Kemmerling R, Davis S, Camps J, Meltzer PS, Ried T, et al. Chromothripsis and focal copy number alterations determine poor outcome in malignant melanoma. *Cancer Res* 2013;73:1454–60.
- Boeva V, Jouannet S, Daveau R, Combaret V, Pierre-Eugène C, Cazes A, et al. Breakpoint features of genomic rearrangements in neuroblastoma with unbalanced translocations and chromothripsis. *PLoS One* 2013;26:e72182.
- Zack TI, Schumacher SE, Carter SL, Cherniack AD, Saksena G, Tabak B, et al. Pan-cancer patterns of somatic copy-number alteration. *Nat Genet* 2013;45:1134–40.
- Kim TM, Luquette LJ, Park RW, Johnson MD, Park PJ. Functional genomic analysis of chromosomal aberrations in a compendium of 8000 cancer genomes. *Genome Res* 2013;23:217–27.
- Wyatt AW, Collins CC. In Brief: chromothripsis and cancer. *J Pathol* 2013;231:1–3.
- Malhotra A, Lindberg M, Faust GG, Leibowitz ML, Clark RA, Layer RM, et al. Breakpoint profiling of 64 cancer genomes reveals numerous complex rearrangements spawned by homology-independent mechanisms. *Genome Res* 2013;23:762–76.
- Forment JV, Kaidi A, Jackson SP. Chromothripsis and cancer: causes and consequences of chromosome shattering. *Nat Rev Cancer* 2012;12:663–70.
- Kloosterman WP, Koster J, Molenaar JJ. Prevalence and clinical implications of chromothripsis in cancer genomes. *Curr Opin Oncol* 2014;26:64–72.
- Mehine M, Kaasinen E, Mäkinen N, Katainen R, Kämpjärvi K, Pitkänen E, et al. Characterization of uterine leiomyomas by whole-genome sequencing. *N Engl J Med* 2013;369:43–53.
- Liu P, Erez A, Sreenath Nagamani SC, Dhar SU, Kolodziejzka KE, Dharmadhikari AV, et al. Chromosome catastrophes involve replication mechanisms generating complex genomic rearrangements. *Cell* 2011;146:889–903.
- Chiang C, Jacobsen JC, Ernst C, Hanscom C, Heilbut A, Blumenthal I, et al. Complex reorganization and predominant non-homologous repair following chromosomal breakage in karyotypically balanced germline rearrangements and transgenic integration. *Nat Genet* 2012;44:390–7.
- Kloosterman WP, Tavakoli-Yaraki M, van Roosmalen M, van Binsbergen E, Renkens I, Duran KJ, et al. Constitutional chromothripsis rearrangements involve clustered double-stranded DNA breaks and nonhomologous repair mechanisms. *Cell Rep* 2012;1:648–55.
- Rausch T, Jones DT, Zapotka M, Stütz AM, Zichner T, Weischenfeldt J, et al. Genome sequencing of pediatric medulloblastoma links catastrophic DNA rearrangements with TP53 mutations. *Cell* 2012;148:59–71.
- Korbel JO, Campbell PJ. Criteria for inference of chromothripsis in cancer genomes. *Cell* 2013;152:1226–36.
- Kloosterman WP, Cuppen E. Chromothripsis in congenital disorders and cancer: similarities and differences. *Curr Opin Cell Biol* 2013;25:341–8.
- Govind SK, Zia A, Hennings-Yeomans PH, Watson JD, Fraser M, Anghel C, et al. ShatterProof: operational detection and quantification of chromothripsis. *BMC Bioinformatics* 2014;15:78.
- Tsai AG, Lieber MR. Mechanisms of chromosomal rearrangement in the human genome. *BMC Genomics* 2010;11(Suppl):S1.
- Stevens JB, Abdallah BY, Regan SM, Liu G, Bremer SW, Ye CJ, et al. Comparison of mitotic cell death by chromosome fragmentation to premature chromosome condensation. *Mol Cytogenet* 2010;3:20–30.
- Kasperek TR, Humphrey TC. DNA double-strand break repair pathways, chromosomal rearrangements and cancer. *Semin Cell Dev Biol* 2011;22:886–97.
- Lieber MR. NHEJ and its backup pathways in chromosomal translocations. *Nat Struct Mol Biol* 2010;17:393–5.
- Huertas P. DNA resection in eukaryotes: deciding how to fix the break. *Nat Struct Mol Biol* 2010;17:11–6.

38. Lee JA, Carvalho CM, Lupski JR. A DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders. *Cell* 2007;131:1235–47.
39. Hastings PJ, Ira G, Lupski JR. A microhomology-mediated break-induced replication model for the origin of human copy number variation. *PLoS Genet* 2009;5:e1000327.
40. Holland AJ, Cleveland DW. Chromoanagenesis and cancer: mechanisms and consequences of localized, complex chromosomal rearrangements. *Nat Med* 2012;18:1630–8.
41. Liu P, Carvalho CM, Hastings PJ, Lupski JR. Mechanisms for recurrent and complex human genomic rearrangements. *Curr Opin Genet Dev* 2012;22:211–20.
42. Huttley GA, Jakobsen IB, Wilson SR, Easteal S. How important is DNA replication for mutagenesis? *Mol Biol Evol* 2000;17:929–37.
43. Rubes J, Selevan SG, Sram RJ, Evenson DP, Perreault SD. GSTM1 genotype influences the susceptibility of men to sperm DNA damage associated with exposure to air pollution. *Mutat Res* 2007;625:20–8.
44. Gallegos G, Ramos B, Santiso R, Goyanes V, Gosalvez J, Fernandez JL. Sperm DNA fragmentation in infertile men with genitourinary infection by *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma*. *Fertil Steril* 2008;90:328–34.
45. Gosalvez J, Lopez-Fernandez C, Fernandez JL, Gouraud A, Holt WV. Relationships between the dynamics of iatrogenic DNA damage and genomic design in mammalian spermatozoa from eleven species. *Mol Reprod Dev* 2011;78:951–61.
46. Jackson RE, Bormann CL, Hassun PA, Rocha AM, Motta EL, Serafini PC, et al. Effects of semen storage and separation techniques on sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril* 2010;94:2626–30.
47. Sakkas D, Alvarez JG. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril* 2010;93:1027–36.
48. Rube CE, Zhang S, Miebach N, Fricke A, Rube C. Protecting the heritable genome: DNA damage response mechanisms in spermatogonial stem cells. *DNA Repair (Amst)* 2011;10:159–68.
49. Pandita TK, Richardson C. Chromatin remodeling finds its place in the DNA double-strand break response. *Nucleic Acids Res* 2009;37:1363–77.
50. Price BD, D'Andrea AD. Chromatin remodeling at DNA double-strand breaks. *Cell* 2013;152:1344–54.
51. Hurst LD, Ellegren H. Sex biases in the mutation rate. *Trends Genet* 1998;14:446–52.
52. Bartek J, Lukas C, Lukas J. Checking on DNA damage in S phase. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5:792–804.
53. Green BM, Finn KJ, Li JJ. Loss of DNA replication control is a potent inducer of gene amplification. *Science* 2010;329:943–6.
54. Jones MJ, Jallepalli PV. Chromothripsis: chromosomes in crisis. *Dev Cell* 2012;23:908–17.
55. Cimini D, Howell B, Maddox P, Khodjakov A, Derassi F, Salmon ED. Merotelic kinetochore orientation is a major mechanism of aneuploidy in mitotic mammalian tissue cells. *J Cell Biol* 2001;153:517–27.
56. Pihan GA. Centrosome dysfunction contributes to chromosome instability, chromoanagenesis, and genome reprogramming in cancer. *Front Oncol* 2013;3:277.
57. Gisselsson D, Jonson T, Petersen A, Strombeck B, Dal Cin P, Hoglund M, et al. Telomere dysfunction triggers extensive DNA fragmentation and evolution of complex chromosome abnormalities in human malignant tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:12683–8.
58. Tubio JM, Estivill X. When catastrophe strikes a cell. *Nature* 2011;470:476–7.
59. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:231–41.
60. Ciavarrà G, Zacksenhaus E. Multiple pathways counteract cell death induced by RB1 loss: implications for cancer. *Cell Cycle* 2011;15:1533–9.
61. Tang HL, Tang HM, Mak KH, Hu S, Wang SS, Wong KM, et al. Cell survival, DNA damage, and oncogenic transformation after a transient and reversible apoptotic response. *Mol Biol Cell* 2012;23:2240–52.
62. Sakkas D, Seli E, Bizzaro D, Tarozzi N, Manicardi GC. Abnormal spermatozoa in the ejaculate: abortive apoptosis and faulty nuclear remodeling during spermatogenesis. *Reprod Biomed Online* 2003;7:428–32.
63. Crasta K, Ganem NJ, Dagher R, Lanterman AB, Ivanova EV, Pan Y, et al. DNA breaks and chromosome pulverization from errors in mitosis. *Nature* 2012;482:53–8.
64. Terradas M, Martin M, Tusell L, Genesca A. Genetic activities in micronuclei: is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell? *Mutat Res* 2010;705:60–7.
65. Huang Y, Jiang L, Yi Q, Lv L, Wang Z, Zhao X, et al. Lagging chromosomes entrapped in micronuclei are not “lost” by cell. *Cell Res* 2012;22:932–5.
66. Decordier I, Cundari E, Kirsch-Volders M. Survival of aneuploidy, micronucleated and/or polyploidy cells: crosstalk between ploidy control and apoptosis. *Mutat Res* 2008;651:30–9.
67. Fenech M, Kirsch-Volders M, Natarajan AT, Surrallés J, Crott JW, Parry J, et al. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cell. *Mutagenesis* 2011;26:125–32.
68. Delhanty JD, Pellestor F. Aneuploidy. Preface. *Cytogenet Genome Res* 2011;133:89–90.
69. Baarends WM, van der Laan R, Grootegoed A. DNA repair mechanisms and gametogenesis. *Reproduction* 2001;121:31–9.
70. Ahmed EA, van der Vaart A, Barten A, Kal HB, Chen J, Lou Z, et al. Differences in DNA double strand breaks repair in male germ cell types: lessons learned from a differential expression of Mdc1 and 53BP1. *DNA Repair* 2007;6:1243–54.
71. Nussenzweig A, Nussenzweig MC. A backup DNA repair pathway loves to the forefront. *Cell* 2007;131:223–5.
72. Oliver-Bonnet M, Ko E, Martin RH. Male infertility in reciprocal translocation carriers: the sexbody affair. *Cytogenet Genome Res* 2005;111:434–46.
73. Martin RH. Cytogenetic determinants of male fertility. *Hum Reprod Update* 2008;14:379–90.
74. Ioannou D, Griffin DK. Male fertility, chromosome abnormalities, and nuclear organization. *Cytogenet Genome Res* 2011;133:269–79.
75. Laberge RM, Boissonneault G. On the nature and origin of DNA strand breaks in elongating spermatids. *Biol Reprod* 2005;73:289–96.
76. Aoki VW, Liu L, Carrell DT. Identification and evaluation of a novel sperm protamine abnormality in a population of infertile males. *Hum Reprod* 2005;20:1298–306.
77. Oliva R. Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update* 2006;12:417–35.
78. Ahmed EA, de Boer P, Philippens ME, Kal HB, de Rooij DG. Parp1-XRCC1 and the repair of DNA double strand breaks in mouse round spermatids. *Mutat Res* 2010;683:84–90.
79. Rodrigues P, Limback D, McGinnis LK, Plancha CE, Albertini DF. Oogenesis: prospects and challenges for the future. *J Cell Physiol* 2008;216:355–65.
80. Carroll J, Marangos P. The DNA damage response in mammalian oocytes. *Front Genet* 2013;4:1–9.
81. Pellestor F, Anahory T, Hamamah S. The chromosomal analysis of human oocytes. An overview of established procedures. *Hum Reprod Update* 2005;11:15–32.
82. Hunt PA, Hassold TJ. Human female meiosis: what makes a good egg go bad? *Trends Genet* 2008;24:86–93.
83. Miao YL, Kikuchi K, Sun QY, Schatten H. Oocyte aging: cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility. *Hum Reprod Update* 2009;15:1–13.
84. Homer H. New insights into the genetic regulation of homologue disjunction in mammalian oocytes. *Cytogenet Genome Res* 2011;133:209–22.
85. Yuen WS, Merriman JA, O'Bryan MK, Jones KT. DNA double strand breaks but not interstrand crosslinks prevent progress through meiosis in fully grown mouse oocytes. *PLoS One* 2012;7:e43875.
86. Marchetti F, Essers J, Kanaar R, Wyrobek AJ. Disruption of maternal DNA repair increases sperm-derived chromosomal aberrations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:17725–9.
87. Ménéz Y, Russo G, Tosti E, El Moutassim S, Benkhalifa M. Expression profile of genes coding for DNA repair in human oocytes using pangenomic microarrays, with a special focus on ROS linked decays. *J Assist Reprod Genet* 2007;24:513–20.

88. Jaroudi S, Kakourou G, Cawood S, Doshi A, Ranieri DM, Serhal P, et al. Expression profiling of DNA repair genes in human oocytes and blastocysts using microarrays. *Hum Reprod* 2009;24:2649–55.
89. Grondahl ML, Yding Andersen C, Boqstad J, Nielsen FC, Meinertz H, Borup R. Gene expression profiles of single human mature oocytes in relation to age. *Hum Reprod* 2010;25:957–68.
90. Santonocito M, Guglielmino MR, Vento M, Raqusa M, Barbagallo D, Borzi P, et al. The apoptotic transcriptome of the human MI1 oocyte: characterization and age-related changes. *Apoptosis* 2013;18:201–11.
91. LeMaire-Adkins R, Radke K, Hunt PA. Lack of checkpoint control at the metaphase/anaphase transition: a mechanism of meiotic nondisjunction in mammalian females. *J Cell Biol* 1997;139:1611–9.
92. Steuerwald N. Meiotic spindle checkpoints for assessment of aneuploid oocytes. *Cytogenet Genome Res* 2005;111:256–9.
93. Marangos P, Carroll J. Oocytes progress beyond prophase in the presence of DNA damage. *Curr Biol* 2012;22:989–94.
94. Kastan MB, Lim DS. The many substrates and functions of ATM. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000;1:179–86.
95. Robles P, Roig I, Garcia R, Briño-Enríquez M, Martín M, Cabero L, et al. Presence of an extra chromosome alters meiotic double-stranded break repair dynamics and MLH1 foci distribution in human oocytes. *Chromosoma* 2013;122:93–102.
96. Howe K, Fitzharris G. Recent insights into spindle function in mammalian oocytes and early embryos. *Biol Reprod* 2013;105:1–9.
97. McLay DW, Clarke HJ. Remodeling the paternal chromatin at fertilization in mammals. *Reproduction* 2003;125:625–33.
98. Ahmadi A, Ng SC. Developmental capacity of damaged spermatozoa. *Hum Reprod* 1999;14:2279–85.
99. Harrison RH, Kuo HC, Scriven PN, Handyside AH, Ogilvie CM. Lack of cell cycle checkpoints in human cleavage stage embryos revealed by a clonal pattern of chromosomal mosaicism analysed by sequential multicolour FISH. *Zygote* 2000;8:217–24.
100. Johnson RT, Rao PN. Mammalian cell fusion: induction of premature chromosome condensation in interphase nuclei. *Nature* 1970;226:717–22.
101. Eichenlaub-Ritter U, Schmiady H, Kertenich H, Soewarto D. Recurrent failure in polar body formation and premature chromosome condensation in oocytes from a human patient: indicators of asynchrony in nuclear and cytoplasmic maturation. *Hum Reprod* 1995;10:2343–9.
102. Nasr-Esfahani MH, Naghshizadian N, Imani H, Razavi S, Mardani M, Kazemi S, et al. Can sperm protamine deficiency induce sperm premature chromosomal condensation? *Andrologia* 2006;38:92–8.
103. Meyerson M, Pellman D. Cancer genomes evolve by pulverizing single chromosome. *Cell* 2011;144:9–10.
104. Mertzaniidou A, Wilton L, Cheng J, Spits C, Vanneste E, Moreau Y, et al. Microarray analysis reveals abnormal chromosomal complements in over 70% of 14 normally developing human embryos. *Hum Reprod* 2013;28:256–64.
105. Van Echten-Arends J, Mastenbroek S, Sikkema-Raddatz B, Korevaar JC, Heineman MJ, van der Veen F, et al. Chromosomal mosaicism in human preimplantation embryos: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2011;17:620–7.
106. Vanneste E, Voet T, Le Caigec C, Debrock S, Sermon K, Staessen C, et al. Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos. *Nat Med* 2009;15:577–83.
107. Voet T, Vanneste E, Vermeesch JR. The human cleavage stage embryo is a cradle of chromosomal rearrangements. *Cytogenet Genome Res* 2011;133:160–8.
108. Delimitreva SM, Zhivkova RS, Vatev IT, Toncheva D. Chromosomal disorders and nuclear and cell destruction in cleaving human embryos. *Int J Dev Biol* 2005;49:409–16.
109. Wong CC, Loewke KE, Bossert NL, Behr B, De Jonge CJ, Baer TM, et al. Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nat Biotechnol* 2010;10:1115–21.
110. Chavez SL, Loewke KE, Han J, Moussavi F, Colls P, Munne S, et al. Dynamic blastomere behaviours reflects human embryo ploidy by the four-cell stage. *Nat Commun* 2012;3:1251.
111. Ambartsumyan G, Clark AT. Aneuploidy and early human embryo development. *Hum Mol Genet* 2008;17:R10–5.
112. Lebedev I. Mosaic aneuploidy in early fetal losses. *Cytogenet Genome Res* 2011;133:169–83.
113. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature* 2000;408:307–10.
114. Fridman JS, Lowe SW. Control of apoptosis by p53. *Oncogene* 2003;22:9030–40.
115. Odorisio T, Rodriguez TA, Evans EP, Clarke AR, Burgoyne PS. The meiotic checkpoint monitoring synapsis eliminates spermatocytes via p53-independent apoptosis. *Nat Genet* 1998;18:257–61.
116. Wells D, Bermudez MG, Steuerwald N, Thornhill AR, Walker DL, Malter H, et al. Expression of genes regulating chromosome segregation, the cell cycle and apoptosis during human preimplantation development. *Hum Reprod* 2005;20:1339–48.
117. Corbo RM, Gambina G, Scacchi R. How contemporary human reproductive behaviors influence the role of fertility-related genes: the example of the P53 gene. *PLoS One* 2012;7:e35431.
118. Suh AK, Yang A, Kettenbach A, Bamberger C, Michaelis AH, Zhu Z, et al. p63 protects the female germ line during meiotic arrest. *Nature* 2006;444:624–8.
119. Levine A, Tomasini R, McKeon FD, Mak TW, Melino G. The p53 family: guardians of maternal reproduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011;12:259–65.
120. Hu W, Zheng T, Wang J. Regulation of fertility by the p53 family members. *Genes Cancer* 2011;2:420–30.
121. Paulasova P, Diblik J, Trkova M, Macek M Sr, Sedlacek Z. Increased sperm aneuploidy in two male carriers of germline TP53 mutations. *Cancer Genet* 2011;204:278–81.
122. Pellestor F. Chromothripsis: how does such a catastrophic event impact human reproduction? *Hum Reprod* 2014;29:388–93.
123. Righolt C, Mai S. Shattered and stitched chromosomes—chromothripsis and chromoana synthesis—manifestations of a new chromosome crisis? *Genes Chromosomes Cancer* 2012;51:975–81.
124. Kinsella M, Patel A, Bafna V. The elusive evidence for chromothripsis. *Nucleic Acids Res* 2014;42:8231–42.
125. Liu G, Stevens JB, Horne SD, Abdallah BY, Ye KJ, Bremer SW, et al. Genome chaos: survival strategy during crisis. *Cell Cycle* 2014;13:1–10.

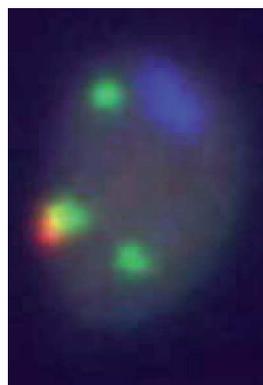
> La découverte récente, dans différents cancers, d'un nouveau type de remaniements chromosomiques massifs, baptisés *chromothripsis* (du grec *chromo* pour chromosome, et *thripsis* pour briser en éclat), bouleverse les modèles établis de développement progressif des tumeurs. En effet, ce phénomène se caractérise par la pulvérisation d'un (ou de quelques) segment(s) chromosomique(s) et le réassemblage aléatoire des fragments chromosomiques générés, et se produit au cours d'un seul événement cellulaire. Le même phénomène a été identifié en génétique constitutionnelle chez des patients atteints de diverses pathologies du développement, indiquant que le *chromothripsis* survient aussi au niveau germinale. Les causes du *chromothripsis* sont variées : radiations, érosion télomérique, apoptose abortive, etc. Deux voies de réparation « express » du génome sont utilisées par la cellule pour restructurer de manière chaotique les régions chromosomiques concernées : les mécanismes de jonction des extrémités non homologues et la réparation par stress réplicatif. L'étude approfondie des séquences d'ADN des zones de *chromothripsis* permet désormais de mieux cerner la signature moléculaire de ce processus et de mieux appréhender son rôle, jusqu'alors insoupçonné, dans le développement de pathologies congénitales et la progression des cancers. <

Les remaniements chromosomiques complexes se définissent comme des anomalies de structure portant au minimum sur deux chromosomes et impliquant au moins trois points de cassure distincts [1]. Lorsqu'ils sont constitutionnels, ces réarrangements complexes sont rares et associés à des manifestations pathologiques très variées, incluant des retards mentaux et des anomalies congénitales complexes [2]. Les remaniements

## Le chromothripsis

### Une forme insoupçonnée de complexification extrême des remaniements chromosomiques

Franck Pellestor, Vincent Gatinois, Jacques Puechberty, David Geneviève, Geneviève Lefort



Laboratoire de génétique chromosomique, hôpital Arnaud de Villeneuve, CHRU de Montpellier, 371, avenue du doyen Gaston Giraud, 34295 Montpellier, France.  
f-pellestor@chu-montpellier.fr

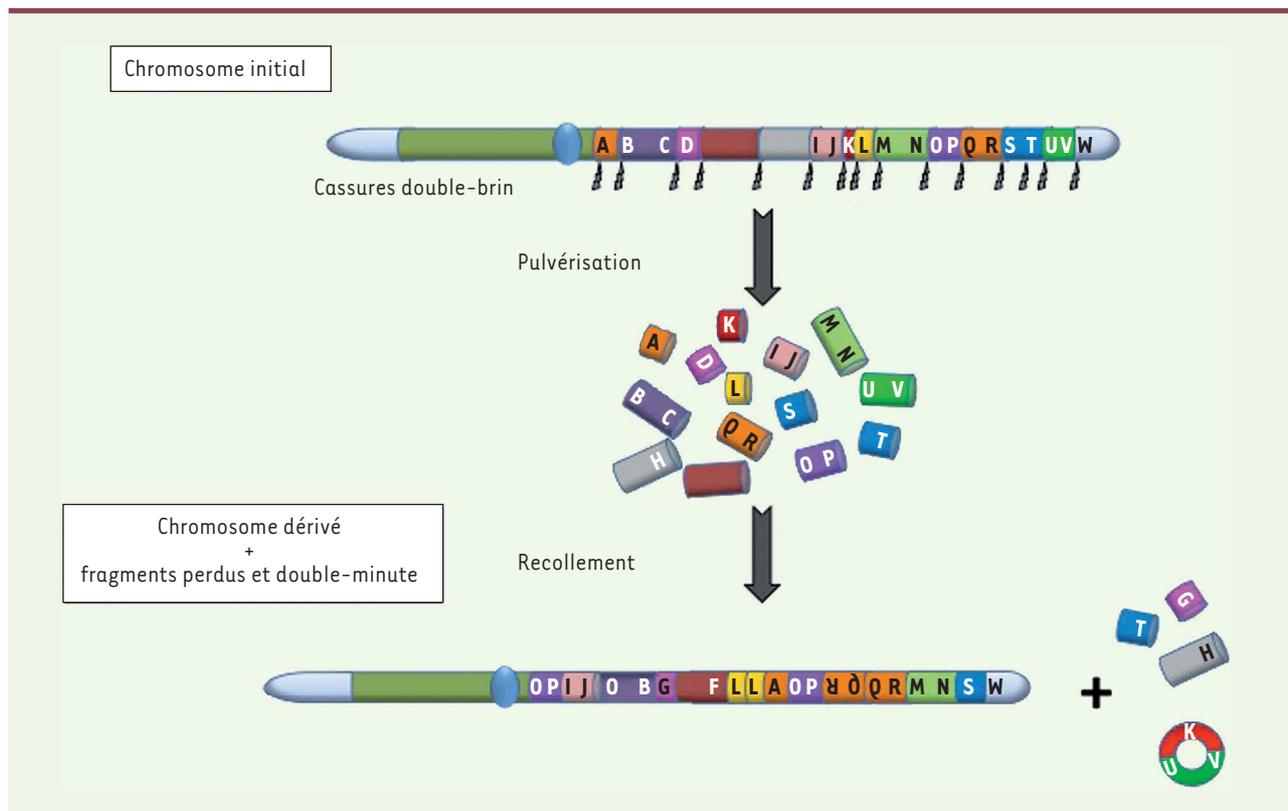
complexes acquis sont l'apanage de nombreux cancers et correspondent à des altérations de structure formées progressivement dans des cellules somatiques différenciées au cours de leur cycle de vie. Les réarrangements observés dans les cancers sont souvent bien plus complexes que les remaniements chromosomiques constitutionnels, dont le maintien doit faire face à une forte pression de sélection, de la conception à la naissance. Toutefois, les mécanismes moléculaires impliqués dans l'émergence de ces remaniements complexes à différentes périodes de la vie sont généralement considérés comme étant identiques. Les progrès des techniques d'investigation du génome humain ont largement contribué à améliorer notre connaissance de ces anomalies [3]. Mais, alors que l'étiologie des remaniements complexes, leurs mécanismes de formation et leurs diagnostics semblaient être de mieux en mieux cernés, la découverte d'un nouveau type de réarrangement chromosomique complexe est venue bouleverser les schémas biologiques établis.

#### La découverte du chromothripsis

La complexité des réarrangements chromosomiques atteint désormais son paroxysme avec une nouvelle variété de réarrangements complexes et massifs du génome, baptisée *chromothripsis*, dans laquelle de multiples réarrangements (jusqu'à plusieurs centaines) se produisent au cours d'un seul événement cellulaire, pour aboutir à la formation d'un ou de plusieurs chromosomes fortement remaniés, à l'image d'un *patchwork* (Figure 1) [4].

Ce scénario catastrophe a été initialement proposé à la suite de la mise en évidence de 42 remaniements localisés sur le bras long d'un chromosome 4 chez un patient atteint de leucémie lymphoïde chronique [5]. La découverte d'un si grand nombre de remaniements confinés à une seule région chromosomique a été rendue possible par l'utilisation combinée de l'analyse des polymorphismes par *micro-array* (*single nucleotide polymorphism* [SNP] *array*) et d'une nouvelle technique de séquençage massif à haut débit (*paired-end sequencing*) qui permet d'identifier tous les types de réarrangements génomiques avec une résolution de l'ordre de la paire de bases. L'analyse ultérieure de plus de 700 lignées cancéreuses et de 2 700 tumeurs a permis d'évaluer à 2-3 % la fréquence globale de ces réarrangements massifs dans les tumeurs, avec une incidence particulièrement élevée de 25 % dans les tumeurs osseuses [5]. Rapidement, ce phénomène a été identifié dans d'autres types de cancer, comme les cancers colorectaux [6] et prostatiques [7], les myélomes [8], les neuroblastomes [9] et les lymphomes de Hodgkin [10]. Toutes ces observations ont remis en question les modèles classiques de cancérogénèse, basés sur l'acquisition progressive, ou par paliers, de multiples remaniements chromosomiques indépendants les uns des autres, et s'accumulant au fil du temps pour constituer une population de cellules malignes [11].

Dans le même temps, le phénomène de *chromothripsis* a été découvert en cytogénétique constitutionnelle [12]. On doit à Kloosterman *et al.* [13] la description du premier cas de *chromothripsis* constitutionnel chez un enfant présentant un retard psychomoteur sévère et porteur d'une triple translocation  $t(1;10;4)$ . L'analyse de séquences, menée conjointement chez l'enfant et ses parents, a révélé la présence de 12 réarrangements *de novo* inter- et intrachromosomiques à proximité des points de cassure sur les chromosomes 1, 4 et 10. Par la suite, une étude réalisée chez 17 sujets atteints d'un retard de développement associé à des anomalies cognitives diverses a identifié des profils complexes de remaniements, évocateurs de *chromothripsis*, et associant translocations, inversions, délétions et duplications. Ils sont là encore confinés à de petites régions d'un seul chromosome [14]. Certains de ces remaniements étaient hérités de la mère alors que, chez la plupart des sujets, il s'agissait de remaniements *de novo* issus de la méiose paternelle. En 2012, deux nouvelles études ont confirmé l'existence de *chromothripsis* constitutionnels, d'une part chez des patients atteints



**Figure 1. Principe du chromothripsis.** Au cours d'un seul événement catastrophique, de multiples cassures double-brin se produisent dans une région chromosomique, entraînant une pulvérisation en fragments chromosomiques. La plupart sont recollés de manière aléatoire afin de reformer une structure chromosomique chaotique (chromosome dérivé), alors que certains peuvent être perdus ou combinés sous forme de mini-chromosomes circulaires surnuméraires (double-minute), généralement porteurs d'oncogènes.

de maladies congénitales et porteurs de réarrangements chromosomiques complexes [15], mais aussi chez des sujets porteurs de translocations ou d'inversions simples [16], avec, dans tous les cas, une nette prédominance de l'origine paternelle de ces remaniements.

### La signature moléculaire du *chromothripsis*

Toutes les études de *chromothripsis* rapportées font état, à la fois, de la multiplicité des remaniements et de l'unicité de l'événement de pulvérisation chromosomique aboutissant à de tels réarrangements massifs. Plusieurs caractéristiques communes confèrent une signature particulière au phénomène de *chromothripsis* et permettent de le distinguer des réarrangements chromosomiques complexes classiques [17].

1. Les réarrangements sont limités à une seule région d'un chromosome d'une paire d'homologues, ou à quelques chromosomes dont la structure est conjointement altérée.

2. Les points de cassure sont regroupés en *clusters*. On compte en moyenne de 5 à 10 cassures par segment de 50 kb.

3. Le nouvel agencement des fragments chromosomiques au sein du (ou des) chromosome(s) remanié(s) se fait de manière aléatoire et sans orientation précise de ces fragments.

4. Aucune mosaïque n'est observée dans la répartition cellulaire des réarrangements, ce qui serait logiquement attendu dans un modèle progressif du fait de l'accumulation de nouveaux remaniements au cours de la prolifération cellulaire.

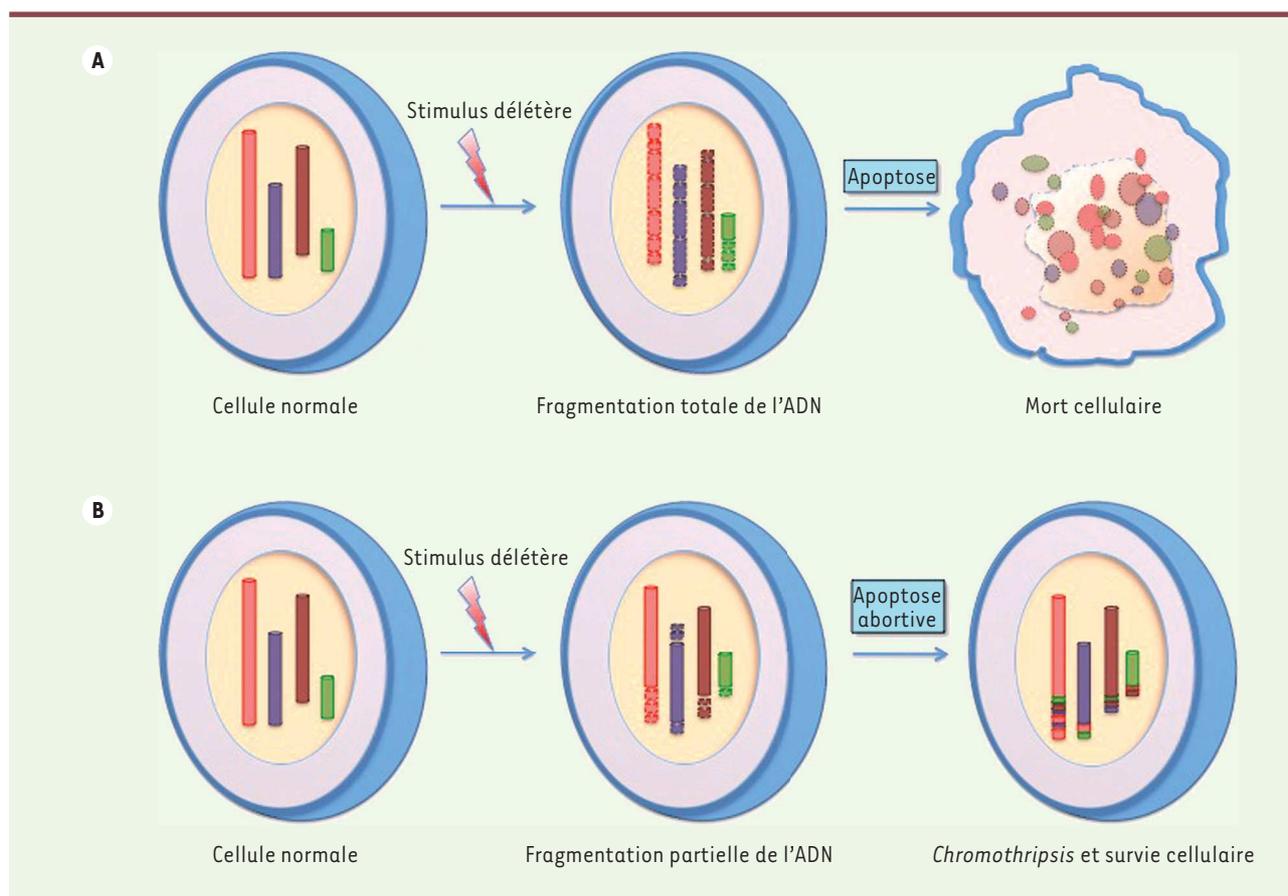
5. Dans les zones remaniées, le nombre de copies des segments concernés oscille généralement entre un et deux, maintenant ainsi l'hétérozygotie allélique. Dans un modèle de formation progressive, toute délétion précoce d'un segment entraînerait une perte définitive d'hétérozygotie, et le nombre de copies d'autres segments devrait augmenter au fur et à mesure de l'accumulation des remaniements.

Dans les tumeurs, les zones de *chromothripsis* se caractérisent par une juxtaposition de zones avec un faible nombre de copies et de segments où le nombre de copies est fortement augmenté. Mais, à l'issue de la pulvérisation chromosomique, des fragments peuvent aussi être perdus ou amplifiés pour donner naissance à des mini-chromosomes surnuméraires (chromosomes double-minutes) contenant des oncogènes [5]. Les *chromothripsis* constitutionnels, quant à eux, présentent un état relativement équilibré en dépit de la présence de nombreuses cassures et réarrangements pouvant être répartis sur plusieurs chromosomes.

### Facteurs causals du *chromothripsis*

L'existence d'un tel phénomène cataclysmique au sein d'une cellule suscite de nombreuses interrogations quant à sa formation et à son impact sur le fonctionnement cellulaire et la pathogénèse. La première question est de savoir quels facteurs peuvent induire la pulvérisation d'un ou de plusieurs chromosomes. Parmi les causes exogènes de cassures chromosomiques multiples, les drogues génotoxiques, les molécules réactives (ions à oxygène, radicaux libres) ou les radiations ionisantes sont classiquement évoquées en cancéro-

logie [18]. D'autres facteurs exogènes, comme certaines infections virales, peuvent aussi induire des cassures multiples de l'ADN [19]. Au niveau cellulaire, divers processus endogènes peuvent être à l'origine de cassures chromosomiques multiples. Ainsi, des dysfonctionnements d'enzymes essentielles, comme les topoisomérases ou les ADN polymérases, sont capables de provoquer de telles lésions. D'autres phénomènes intracellulaires, comme l'érosion des régions télomériques, ont aussi été mis en cause. Cet aminuement progressif des télomères conduit à des processus cycliques de fusion télomérique/pont anaphasique/cassure qui aboutissent à de nombreuses fractures dans les régions télomériques et subtélomériques [20]. Or, beaucoup d'exemples de *chromothripsis* concernent ces régions [5, 14]. Des similitudes ont aussi été notées entre le *chromothripsis* et le phénomène de condensation prématurée des chromosomes qui peut se produire lors de fusions cellulaires ou de fécondations asynchrones. En effet, lorsque les chromosomes d'une cellule en interphase (comme le spermatozoïde mature) subissent une décondensation sous l'effet de facteurs contenus dans une cellule au stade métaphasique (comme l'ovocyte I lors de la fécondation), ils peuvent subir une condensation prématurée de leur chromatine sans phase préliminaire de réplication, pouvant entraîner leur pulvérisation partielle [19]. Tubio et Estivill [21] ont proposé que le *chromothripsis* puisse aussi être causé par un processus d'apoptose incomplète ou abortive dans certaines cellules. Ainsi, la fragmentation de la chromatine déclenchée par l'apoptose pourrait être interrompue, voire inversée, comme cela a été démontré récemment [22], ce qui permet à la cellule de réparer tant bien que mal les cassures de son ADN et de survivre (Figure 2). Jones et Jallepalli [23] ont aussi suggéré que l'apparition du *chromothripsis* puisse résulter de l'effet combiné des erreurs mitotiques de ségrégation, de l'instabilité chromosomique générée et du stress réplicatif qui en découle. Ce stress peut créer des points de cassure au niveau des origines de réplication [24]. Enfin, une étude récente a établi une corrélation entre l'inactivation du gène *TP53*, codant pour la protéine p53, et le *chromothripsis* chez des patients atteints du syndrome de Li-Fraumeni. Chez ces sujets, la signature moléculaire du *chromothripsis* a été retrouvée dans une forte proportion (36 %) des tumeurs qui se développent [25]. Or, la protéine p53 intervient dans de nombreux secteurs clés de la machinerie cellulaire, comme le contrôle de la transition G2/M, l'érosion des télomères et le contrôle de l'apoptose. Il a été démontré que le dysfonctionnement de ce gène pou-



**Figure 2. Hypothèse de l'apoptose abortive.** **A.** Sous l'effet d'un stimulus délétère, la cellule entre en apoptose et subit une fragmentation progressive de son ADN aboutissant à sa mort. **B.** Si les dommages causés à l'ADN ne sont pas trop importants, le processus d'apoptose peut s'interrompre. La cellule peut réparer de manière chaotique la fragmentation de son ADN, et ainsi survivre.

vaît favoriser, voire induire, divers phénomènes, comme les fusions télomériques, la décondensation prématurée des chromosomes, la duplication des centrosomes, l'inhibition de l'apoptose et la survie des cellules dont l'ADN est endommagé, qui sont autant de facteurs impliqués dans les scénarios d'apparition du *chromothripsis*. Un taux élevé de remaniements complexes a aussi été noté chez des patients présentant conjointement des leucémies myéloïdes et des mutations du gène *TP53* [25]. La question se pose donc du lien possible entre le dysfonctionnement du gène *TP53* et l'initiation du *chromothripsis*, en particulier dans les cancers.

### Scénario de réassemblage aberrant des fragments chromosomiques

Si les causes de pulvérisation chromosomique sont multiples et encore largement débattues, les mécanismes de réparation impliqués dans la reformation des chromosomes fragmentés ont été en grande partie élucidés grâce à l'emploi des nouvelles méthodes de séquençage à haut débit. En effet, ces techniques permettent une analyse fine des zones de cassure des chromosomes recomposés.

Dans beaucoup de cas de *chromothripsis* décrits en cancérologie, les points de cassure et de jonction présentent des zones de micro-homologie de quelques nucléotides, ou encore de petites insertions et délétions [5, 26]. Ces observations sont en faveur d'un réassemblage des fragments chromosomiques pulvérisés par le mécanisme de jonction des extrémités non homologues (NHEJ) pour *non homologous end-joining*) ou par le mécanisme de jonction des extrémités orientées par micro-homologie (MHMEJ pour *microhomology mediated end-joining*). Il s'agit de processus simples et rapides de réparation des cassures double-brin qui peuvent être utilisés par la cellule à n'importe quel stade du cycle cellulaire, mais la fidélité de restitution des séquences réparées est assez faible.

Ce type de réparation a été aussi identifié dans plusieurs exemples de *chromothripsis* constitutionnels [6, 15]. Mais de nombreux cas rapportés se caractérisent par la présence, au niveau des points de cassure, d'inversions,

de duplications ou de triplications, ainsi que d'insertions de petites séquences qui sont homologues à d'autres segments du même ou d'un autre chromosome. Ces données suggèrent que les mécanismes de réparation intervenant lors du dysfonctionnement des fourches de réplication participent aussi au processus du *chromothripsis* [14, 16]. Les trois mécanismes identifiés, le FoSTes (*fork stalling and template switching*), le BIR (*break induced replication*) et le MMBIR (*microhomology mediated break induced replication*), combinent des arrêts des fourches de réplication avec des changements de brin servant de matrices pour les brins retardés. Ces processus de désengagement et d'envahissement, facilités ou non par de petites homologies de séquence entre les deux brins, peuvent se répéter plusieurs fois à la suite, d'où leur implication dans la genèse des remaniements chromosomiques complexes [27]. Le regroupement des points de cassure sur un petit segment chromosomique peut être considéré comme un signe de l'intervention de ces mécanismes de réparation par stress réplicatif. Le déclenchement de ce type de réparation pourrait être lié à la stimulation inappropriée des origines de réplication dans la région remaniée [28]. Toutefois, il faut se garder de privilégier cette voie de formation pour les *chromothripsis* constitutionnels, car la possibilité d'un biais d'analyse doit être prise en compte, dans la mesure où seules des formes viables de *chromothripsis* ont été identifiées et analysées jusqu'à présent [29].

La majorité des *chromothripsis* constitutionnels se forment dans les cellules germinales ou au cours des premières divisions du zygote. L'origine paternelle préférentielle, qui est notée dans la plupart des cas rapportés, est en accord avec l'origine masculine attribuée à beaucoup d'anomalies de structure observées à terme [30]. En fonction des modes de réparation impliqués, le phénomène de *chromothripsis* peut se dérouler au cours des divisions préméiotiques ou durant la première division méiotique, mais aussi lors de la phase de différenciation des spermatozoïdes (la spermiogenèse) qui comprend un ré-empaquetage protéique complet de l'ADN par des protamines. Or, cette opération engendre de nombreuses cassures de l'ADN dont la réparation ultérieure dans le zygote peut être incomplète [31]. Cette fragmentation de l'ADN contenu dans les spermatozoïdes est un phénomène détectable *in situ* et analysé dans les bilans de stérilité, mais elle pourrait aussi être corrélée au *chromothripsis*. La survenue de *chromothripsis* au cours de l'ovogenèse doit aussi être prise en compte, du fait de la durée particulière de la méiose féminine et des risques d'exposition des chromosomes aux agents exogènes et endogènes à l'origine de cassures de l'ADN. Enfin, le *chromothripsis* peut avoir lieu au cours des premières divisions embryonnaires qui se caractérisent par une instabilité chromosomique accrue [32], un contrôle du cycle cellulaire très permissif [33], et de fréquentes anomalies de la ségrégation des chromosomes et du clivage des blastomères [34].

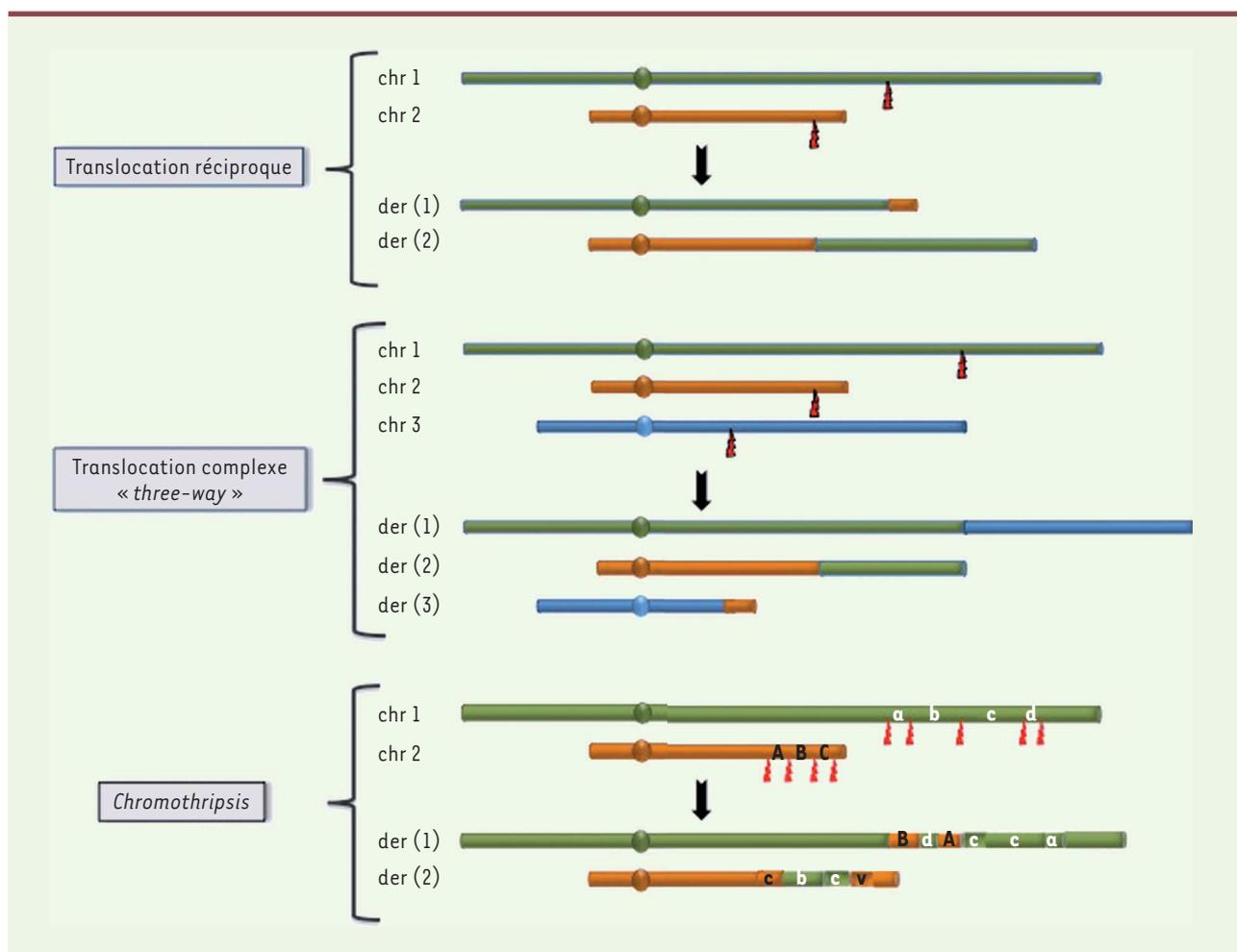
L'apparition du *chromothripsis* au cours d'un seul événement cellulaire, les différents remaniements qui en résultent (translocations, inversions, duplications), ainsi que leur agencement aléatoire, ont conduit Kloosterman et Cuppen [29] à considérer que les *chromothripsis* constitutionnels relevaient du même mécanisme de formation

que les translocations réciproques simples, basé sur le hasard de deux cassures double-brin et la proximité spatiale des deux chromosomes entre lesquels s'opère l'échange des deux fragments chromosomiques. Une extension connue de ce mécanisme est la formation des translocations réciproques à trois chromosomes et d'autres formes de remaniements chromosomiques complexes [1]. La cinétique de formation des *chromothripsis* constitutionnels apparaît similaire, avec un nombre bien plus grand de cassures double-brin entre des chromosomes physiquement proches au moment de la pulvérisation chromosomique initiale (Figure 3).

Quelles sont les conditions pouvant inciter la cellule à utiliser ces deux voies de réparation malgré leur manque de fidélité ? Il est probable que le nombre de cassures double-brin et l'énergie nécessaire à la cellule pour mener à bien les réparations au cours d'un seul cycle soient des paramètres importants. Un excès de cassures double-brin (> 20) peut rapidement saturer les capacités de réparation de l'ADN par les voies classiques « *error-free* » [35], ne laissant à la cellule que le recours à des modes de réparation « *express* », plus approximatifs. Toutefois, ces mécanismes (NHEJ ou stress réplicatif) ne sont nullement exclusifs, puisque l'utilisation des deux modes de réparation a été identifiée dans les *chromothripsis* tumoraux et constitutionnels. Dans les régions télomériques, les réarrangements peuvent résulter tout aussi bien de mécanismes de type NHEJ [36] que de mécanismes de réparation réplicatifs [37].

La localisation préférentielle du *chromothripsis* sur de courts segments chromosomiques laisse penser que le phénomène se produit lorsque les chromosomes sont les plus condensés, à savoir au cours de la mitose. Il est en effet difficile d'imaginer que tant de remaniements localisés sur de petits territoires chromosomiques puissent se produire en interphase, alors que les chromosomes sont amplement décondensés, à moins de considérer la répartition interphasique des chromosomes en territoires bien délimités.

Comme pour les réarrangements chromosomiques complexes, divers éléments de la structure génomique pourraient être impliqués dans la survenue du *chromothripsis*. Ainsi, la présence de séquences répétées, comme les duplications segmentaires ou les séquences Alu, a été fréquemment observée au niveau des points de cassure des *chromothripsis* [6, 14]. La fréquence, la taille, l'agencement de ces séquences, mais aussi la distance les séparant, sont des paramètres intervenant dans la localisation des cassures double-brin [38]. L'agencement des histones et leurs modifications peuvent aussi provoquer



**Figure 3.** Similitudes des processus de formation des translocations réciproques, des remaniements complexes par translocation three-way et du chromothripsis, basées sur des cassures double-brin et des échanges de fragments chromosomiques entre plusieurs chromosomes.

des cassures de l'ADN [39], tout comme certaines configurations spatiales détectées dans l'environnement des points de cassure et qui pourraient favoriser les remaniements intrachromosomiques en créant des zones de fragilité et de susceptibilité aux cassures [40]. Une explication intéressante au confinement du *chromothripsis* à un seul chromosome a été fournie par la découverte qu'un chromosome égaré au cours de l'anaphase et empaqueté dans un micronoyau pouvait y être pulvérisé et subir des réplifications asynchrones [41]. La formation d'un micronoyau peut résulter de divers mécanismes déjà évoqués, tels que la résolution des ponts chromosomiques formés à l'issue de fusion *end-to-end* des télomères, la décondensation prématurée de la chromatine, mais aussi la duplication des centrosomes et l'attachement mérotélique aux kinétochores [42]. Les micronoyaux ainsi formés peuvent persister dans la cellule pendant plusieurs cycles cellulaires et, finalement, aboutir à la réintégration du chromosome remanié au sein du génome de la cellule [41]. Lorsque plusieurs chromosomes sont impliqués dans le *chromothripsis*, comme cela est le cas dans de nombreux cas de *chromothripsis*

constitutionnels, l'organisation nucléaire des chromosomes en territoires doit être prise en compte. Là encore, la présence de configurations génomiques particulières ou de séquences répétées peut être importante pour la localisation du *chromothripsis*. Ces séquences peuvent servir de zones de micro-homologie et, ainsi, faciliter le changement de matrice dans la réparation répllicative. La juxtaposition des territoires chromosomiques au sein du noyau, le regroupement de différents locus ou de motifs particuliers dans ces territoires spécifiques [43], ou encore leur proximité avec des zones de rétention des éléments de la machinerie de réparation ou de réplification (bulle de réplification) [44], sont autant d'éléments qui peuvent constituer le fondement structural de la survenue d'un si grand nombre de remaniements dans des régions chromosomiques distinctes et du regroupement des points de cassure en *cluster*.

## Impact du *chromothripsis*

Devant l'ampleur des remaniements observés, on peut penser que de tels événements catastrophiques ont des conséquences létales et entraînent inéluctablement la mort cellulaire. C'est vraisemblablement le cas pour la plupart des cellules subissant ce type de cataclysme. La localisation restreinte du *chromothripsis* à un seul chromosome, un segment chromosomique ou un petit territoire nucléaire pourrait constituer la limite d'acceptabilité du phénomène par la cellule.

De nombreuses tumeurs ne possèdent pas de génomes stables et se caractérisent par de continues modifications de leur contenu chromosomique, commandées par l'instabilité génomique. Il est donc fort probable que des phénomènes de *chromothripsis* s'y produisent bien plus fréquemment que ce que laisse à penser leur incidence moyenne de 3% [5]. Par ailleurs, les altérations génomiques associées au *chromothripsis* ne créent pas systématiquement les conditions d'un avantage sélectif pour la cellule. Mais lorsque ceci est le cas, divers mécanismes sont impliqués, comme la perte simultanée de gènes suppresseurs de tumeurs, l'amplification de gènes tumoraux, la formation d'oncogènes de fusion, ou la formation de mini-chromosomes surnuméraires porteurs d'oncogènes amplifiés [45].

Cette forme particulière d'évolution rapide des cancers pourrait faire écho au modèle dit de « l'équilibre ponctué », caractérisé par l'accélération soudaine du développement tumoral sous l'impulsion d'un événement cellulaire unique qui permet à la cellule de court-circuiter le processus graduel de transformation maligne [4, 46].

Pour les *chromothripsis* constitutionnels, la réorganisation complexe des chromosomes qui s'opère à la suite de leur fragmentation pourrait permettre à la cellule de conserver un statut équilibré à son génome. Le recours à des modes simples de réparation, comme le NHEJ ou le stress réplicatif, permet de résoudre rapidement la pulvérisation chromosomique au prix de la génération de remaniements ultra-complexes, qui peuvent parfois s'avérer stables et transmissibles. La découverte du phénomène de *chromothripsis* dans les remaniements hérités et *de novo* a mis en lumière la complexité insoupçonnée de nombreux réarrangements constitutionnels. Elle fournit de nouvelles pistes pour l'étude de pathologies congénitales complexes pour lesquelles l'étiologie restait encore inconnue et les mécanismes de formation mal compris.

Compte tenu de ces hypothèses, Liu *et al.* [14] ont suggéré que l'appellation de *chromoanasyntesis* (*chromo* pour chromosome et *anasyntesis* pour re-synthèse) serait mieux adaptée pour exprimer la reconstruction chromosomique qui s'opère, alors que Holland et Cleveland [42] ont proposé le terme de *chromoanagenesis* pour évoquer la renaissance du chromosome !

Quoi qu'il en soit, les conséquences cliniques de telles catastrophes chromosomiques sont difficiles à appréhender, car elles sont sans doute très variées. En cancérologie, le phénomène a été associé à un mauvais pronostic et à une augmentation de l'agressivité des tumeurs [5, 8]. En cytogénétique constitutionnelle, les conséquences pathologiques du *chromothripsis* couvrent un large spectre de manifestations cliniques, compte tenu de la variété des altérations génomiques pro-

voquées. Cependant, elles partagent une manifestation commune qui est le retard de développement neurologique, lié au déséquilibre génomique engendré par le phénomène. Il se peut que les similitudes observées dans les tableaux cliniques en rapport avec ces pathologies soient le reflet de la dimension multigénique des *chromothripsis* constitutionnels compatibles avec la vie.

## Conclusion

La découverte du phénomène de *chromothripsis* témoigne de la complexité insoupçonnée des phénomènes de restructuration chromosomique et démontre avec force que la mécanique chromosomique ne nous a pas encore livré tous ses secrets. Toutefois, il reste à apporter la preuve expérimentale de l'existence du *chromothripsis*, car comme le soulignent Liu *et al.* [47], ainsi que Righolt et Mai [48], d'autres mécanismes peuvent aussi conduire à une accumulation graduelle des cassures chromosomiques, par exemple la fragilité particulière d'une région chromosomique. Le *chromothripsis* pourrait ne pas être un événement unique et isolé, mais faire partie d'un mécanisme plus complexe et dynamique de gestion de l'instabilité génomique.

Des expériences de simulation du *chromothripsis* dans des cellules en culture sont en cours [16], et des modèles *in silico* sont à l'étude pour mieux caractériser les *chromothripsis* et mieux comprendre les mécanismes qui pilotent leur apparition [49].

D'un point de vue clinique, l'application des nouvelles techniques de séquençage à haut débit de l'ADN pour l'analyse des remaniements chromosomiques constitutionnels va sans doute révéler l'importance du *chromothripsis* dans l'émergence de nombreux désordres congénitaux, alors qu'en cancérologie, le lien découvert entre le *chromothripsis* et le dysfonctionnement du gène *TP53* pourrait ouvrir de nouvelles voies thérapeutiques. ♦

## SUMMARY

### *Chromothripsis, an unexpected novel form of complexity for chromosomal rearrangements*

The recent discovery of a new kind of massive chromosomal rearrangement in different cancers, named "chromothripsis" (*chromo* for chromosome, *thripsis* for shattering) has questioned the established models for a progressive development of tumors. Indeed, this phenomenon, which is characterized by the shattering of one (or a few) chromosome segments followed by a random reassembly of the fragments generated, occurs during one unique cellular event. The same phenome-



non was identified in constitutional genetics in patients with various developmental pathologies, indicating that chromothripsis also occurs at the germ cell level. Diverse situations can cause chromothripsis (radiations, telomere erosion, abortive apoptosis, etc.), and two express “repair routes” are used by the cell to chaotically reorganise the chromosomal regions concerned: non-homologous end-joining and repair by replicative stress. The in-depth analysis of the DNA sequences involved in the regions of chromothripsis leads to a better understanding of the molecular basis of chromothripsis and also helps to better apprehend its unexpected role in the development of constitutional pathologies and the progression of cancers. ♦

## LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

## RÉFÉRENCES

- Pellestor F, Anahory T, Lefort G, et al. Complex chromosomal rearrangements: origin and meiotic behavior. *Hum Reprod Update* 2011; 17 : 476-94.
- Madan K. What is a complex chromosome rearrangement? *Am J Med Genet* 2013; 161 : 1181-4.
- Gatinois V, Puechberty J, Lefort G, et al. Les remaniements chromosomiques complexes : un paradigme pour l'étude de l'instabilité chromosomique. *Med Sci (Paris)* 2013; 30 : 55-63.
- Reynaud C, Billaud M. La théorie de l'équilibre ponctué. *Med Sci (Paris)* 2011; 27 : 921-44.
- Stephens PJ, Greenman CD, Fu B, et al. Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell* 2011; 144 : 27-40.
- Kloosterman WP, Hoogstraal M, Paling O, et al. Chromothripsis is a common mechanism driving genomic rearrangements in primary and metastatic colorectal cancer. *Genome Biol* 2011; 12 : R103.
- Teles Alves I, Hiltmann S, Hartjes T, et al. Gene fusions by chromothripsis of chromosome 5q in the VCaP prostate cancer cell line. *Hum Genet* 2013; 132 : 709-13.
- Magrangeas F, Avet-Loiseau H, Munshi NC, Minvielle S. Chromothripsis identifies a rare and aggressive entity among newly diagnosed multiple myeloma patients. *Blood* 2011; 118 : 675-8.
- Molenaar JJ, Koster J, Zwijnenburg DA, et al. Sequencing of neuroblastoma identifies chromothripsis and defects in neurogenesis genes. *Nature* 2012; 483 : 589-93.
- Nagel S, Meyer C, Quentmeier H, et al. Chromothripsis in Hodgkin lymphoma. *Genes Chrom Cancer* 2013; 52 : 741-7.
- Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature* 2009; 458 : 719-24.
- Reynaud C, Billaud M. Quand la chromothripsis devient germinale. *Med Sci (Paris)* 2011; 27 : 1083.
- Kloosterman WP, Guryev V, van Roosmalen M, et al. Chromothripsis as a mechanism driving complex de novo structural rearrangements in the germline. *Hum Mol Genet* 2011; 20 : 1916-24.
- Liu P, Erez A, Sreenath Nagamani SC, et al. Chromosome catastrophes involve replication mechanisms generating complex genomic rearrangements. *Cell* 2011; 146 : 889-903.
- Kloosterman WP, Tavakoli-Yaraki M, van Roosmalen M, et al. Constitutional chromothripsis rearrangements involve clustered double-stranded DNA breaks and nonhomologous repair mechanisms. *Cell Rep* 2012; 1 : 648-55.
- Chiang C, Jacobsen JC, Ernst C, et al. Complex reorganization and predominant non-homologous repair following chromosomal breakage in karyotypically balanced germline rearrangements and transgenic integration. *Nat Genet* 2012; 44 : 390-8.
- Korbel JO, Campbell PJ. Criteria for inference of chromothripsis in cancer genomes. *Cell* 2013; 152 : 1226-36.
- Okayasu R. Repair of DNA damage induced by accelerated heavy ions. *Int J Cancer* 2012; 130 : 991-1000.
- Stevens JB, Abdallah BY, Regan SM, et al. Comparison of mitotic cell death by chromosome fragmentation to premature chromosome condensation. *Mol Cytogenet* 2010; 3 : 20-31.
- Luo Y, Hermetz KE, Jackson JM, et al. Diverse mutational mechanisms cause pathogenic subtelomeric rearrangements. *Hum Mol Genet* 2011; 20 : 3769-78.
- Tubio JM, Estivill X. When catastrophe strikes a cell. *Nature* 2011; 470 : 476-7.
- Tang HL, Tang HM, Mak KH, et al. Cell survival, DNA damage, and oncogenic transformation after a transient and reversible apoptotic response. *Mol Biol Cell* 2012; 23 : 2240-52.
- Jones MJK, Jallepalli PV. Chromothripsis: chromosomes in crisis. *Dev Cell* 2012; 23 : 908-17.
- Lukas C, Savic V, Bekker-Jensen S, et al. 53BP1 nuclear bodies form around DNA lesions generated by mitotic transmission of chromosomes under replication stress. *Nat Cell Biol* 2011; 13 : 243-53.
- Rausch T, Jones DTW, Zapatka M, et al. Genome sequencing of pediatric medulloblastoma links catastrophic DNA rearrangements with TP53 mutations. *Cell* 2012; 148 : 59-71.
- Meyerson M, Pellman D. Cancer genomes evolve by pulverizing single chromosomes. *Cell* 2011; 144 : 9-10.
- Lee JA, Carvalho CM, Lupski JR. A DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders. *Cell* 2007; 131 : 1235-47.
- Green BM, Finn KJ, Li JJ. Loss of DNA replication control is a potent inducer of gene amplification. *Science* 2010; 329 : 943-6.
- Kloosterman WP, Cuppen E. Chromothripsis in congenital disorders and cancer: similarities and differences. *Curr Opin Cell Biol* 2013; 25 : 1-8.
- Thomas NS, Durkie M, Van Zyl B, et al. Parental and chromosomal origin of unbalanced de novo structural chromosome abnormalities in man. *Hum Genet* 2006; 119 : 444-50.
- Leduc F, Nkoma GB, Boissonneault G. Spermiogenesis and DNA repair; a possible etiology of human infertility and genetic disorders. *Syst Biol Reprod Med* 2008; 54 : 3-10.
- Vanneste E, Voet T, Le Caigec C, et al. Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos. *Nat Med* 2009; 15 : 577-83.
- Kurahashi H, Bolor H, Kato T, et al. Recent advance in our understanding of the molecular nature of chromosomal abnormalities. *J Hum Genet* 2009; 54 : 253-60.
- Mantzouratou A, Delhanty JD. Aneuploidy in the human cleavage stage embryo. *Cytogenet Genome Res* 2011; 133 : 141-8.
- Gudjonsson T, Altmeyer M, Savic V, et al. TRIP12 and UBR5 suppress spreading of chromatin ubiquitylation at damaged chromosomes. *Cell* 2012; 150 : 697-709.
- Palm W, de Lange T. How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu Rev Genet* 2008; 42 : 301-34.
- Yatsenko SA, Hixson P, Roney EK, et al. Human subtelomeric copy number gains suggest a DNA replication mechanism for formation: beyond breakage-fusion-bridge for telomere stabilization. *Hum Genet* 2012; 131 : 1895-910.
- Liu P, Lacaria M, Zhang F, et al. Frequency of nonallelic homologous recombination is correlated with length of homology: evidence that ectopic synapsis precedes ectopic crossing-over. *Am J Hum Genet* 2011; 89 : 580-8.
- George CM, Alani E. Multiple cellular mechanisms prevent chromosomal rearrangements involving repetitive DNA. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2012; 47 : 297-313.
- Halazonetis TD, Gorgoulis VG, Bartek J. An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science* 2008; 319 : 1352-5.
- Crasta K, Ganem NJ, Dagher R, et al. DNA break and chromosome pulverization from errors in mitosis. *Nature* 2012; 482 : 53-8.
- Holland AJ, Cleveland DW. Chromoagenesis and cancer: mechanisms and consequences of localized, complex chromosomal rearrangements. *Nat Med* 2012; 18 : 1630-8.
- Zhang Y, Patton McCord R, Ho YJ, et al. Spatial organization of the mouse genome and its role in recurrent chromosomal translocations. *Cell* 2012; 148 : 908-21.
- Howarth KD, Pole JC, Beavis JC, et al. Large duplications at reciprocal translocation breakpoints that might be the counterpart of large deletions and could arise from stalled replication bubbles. *Genome Res* 2011; 21 : 525-34.
- Maher CA, Wilson RK. Chromothripsis and human disease: piecing together the shattering process. *Cell* 2012; 148 : 29-32.
- Eldredge N, Gould SJ. Punctuated equilibria: an alternative to phyletic gradualism. *Models Paleobiol* 1972; 82 : 82-115.
- Liu P, Carvalho CMB, Hastings PJ, Lupski JR. Mechanisms for recurrent and complex human genomic rearrangements. *Curr Opin Genet Dev* 2012; 22 : 211-20.
- Righolt C, Mai S. Shattered and stitched chromosomes—chromothripsis and chromoanagenesis—manifestations of a new chromosome crisis? *Genes Chrom Cancer* 2012; 51 : 975-81.
- Greenman CD, Pleasance ED, Newman S, et al. Estimation of rearrangement phylogeny for cancer genomes. *Genome Res* 2012; 22 : 346-61.

## TIRÉS À PART

F. Pellestor

► Les remaniements chromosomiques complexes (CCR) regroupent différents types de réarrangements de la structure des chromosomes, dont la juxtaposition peut aboutir à des formules chromosomiques très complexes. Si la réalisation de caryotypes a permis d'identifier un grand nombre de ces remaniements et de distinguer les cas familiaux des cas *de novo*, on doit à la cytogénétique moléculaire et aux techniques de séquençage la description des mécanismes moléculaires de formation des CCR. La complexité et la diversité des CCR posent les questions de l'origine de ces réarrangements, de leur lien avec l'instabilité chromosomique et de leur impact en pathologie. S'il est désormais possible de caractériser avec précision les CCR et de proposer aux patients porteurs le recours à des techniques de diagnostic sophistiquées, comme le diagnostic préimplantatoire, la ségrégation méiotique de ces remaniements reste très complexe. ◀

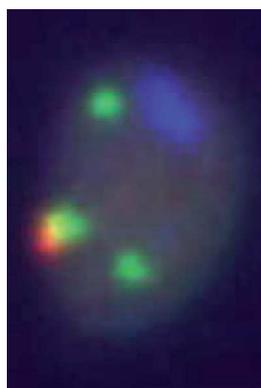
Le terme de remaniement chromosomique désigne les anomalies de la structure des chromosomes, qu'elles soient équilibrées ou non : translocations, délétions, duplications, inversions, insertions, anneaux, etc. Pour caractériser ces anomalies, on utilise la notion de point de cassure. Ainsi définit-on un réarrangement chromosomique comme simple lorsqu'il ne fait intervenir que deux points de cassure, ou complexe (CCR pour *complex chromosomal rearrangements*) s'il nécessite trois points de cassure au minimum pour se former. Il en existe une extrême variété. Toutefois, en dehors du contexte onco-hématologique, les CCR sont rares en cytogénétique constitutionnelle : moins de 270 cas ont été rapportés. Dans leur grande majorité, ces réarrangements concernent des combinaisons de plusieurs translocations [1].

Vignette (Photo © Franck Pellestor).

## Les remaniements chromosomiques complexes

### Un paradigme pour l'étude de l'instabilité chromosomique

Vincent Gatinois, Jacques Puechberty,  
Geneviève Lefort, David Geneviève, Franck Pellestor



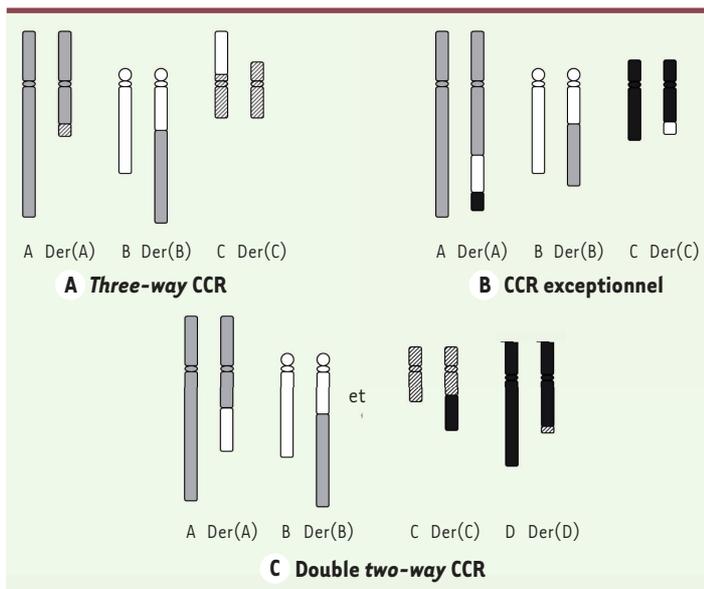
Laboratoire de génétique chromosomique, hôpital Arnaud de Villeneuve, CHRU de Montpellier, 371, avenue du doyen Gaston Giraud, 34295 Montpellier, France.  
f-pellestor@chu-montpellier.fr

### Classification des remaniements chromosomiques complexes

Élaborer une classification des CCR représente une vraie difficulté compte tenu de leur hétérogénéité. En 1982, Kleczkowska *et al.* [2] en ont proposé une première classification basée sur leur mode de transmission, en distinguant les CCR hérités de ceux formés *de novo*. Cette première classification a révélé une nette prévalence de l'origine maternelle des CCR hérités.

En 1987, Kousseff *et al.* [3] proposèrent de classer les CCR en fonction du nombre de points de cassure. Cette classification met ainsi en évidence le fait que les anomalies transmises au travers des générations sont de plus faible complexité (avec moins de cinq points de cassure) que celles qui apparaissent *de novo* et qui font intervenir un nombre plus élevé de points de cassure. Mais, la classification la plus pertinente reste la classification structurale proposée par Kausch *et al.* [4] en 1988. Elle distingue trois catégories de CCR (Figure 1) :

- les remaniements appelés *three-way*, les plus fréquents, mais aussi les moins complexes : trois points de cassure sont identifiés, avec échange des segments chromosomiques distaux ;
- les CCR exceptionnels, pour lesquels plus d'un point de cassure par chromosome est identifiable. Le degré de complexité de ce type de CCR n'a pas de limite. Ainsi, un caryotype à 15 points de cassure a été rapporté par Houge *et al.* [5] ;
- enfin, les remaniements doubles ou triples *two-way*, assez rares, qui correspondent à la coexistence chez un même individu de deux ou trois translocations indépendantes impliquant des chromosomes différents.



**Figure 1. Classification des CCR.** A. *Three-way CCR* : un point de cassure sur chacun des chromosomes A, B et C, donnant naissance à trois dérivés der(A), der(B) et der(C). B. *CCR exceptionnel* : plus de points de cassure que de chromosomes impliqués et aucune limite de complexité dans la formation des dérivés. C. *Double two-way CCR* : anomalies concomitantes mais indépendantes (d'après [1]).

En 1997, Madan *et al.* [6] ont étoffé cette classification structurale en y intégrant la présence additionnelle d'inversions, d'insertions ou de délétions. Cela a permis d'intégrer les translocations dites insertionnelles à la famille des CCR. En 2011, une analyse de 103 nouveaux cas de CCR équilibrés a conduit Madan *et al.* [7] à proposer une ultime variante de cette classification structurale, distinguant quatre types de CCR en fonction du nombre de points de cassure et du mode de ségrégation. Cette difficulté à classer les CCR traduit bien la complexité et la grande variabilité de ce type de remaniements.

### Aspects épidémiologiques et héritabilité des CCR

La rareté de tels événements chromosomiques rend difficile leur analyse épidémiologique. Concernant la présence ou non de phénotypes pathologiques chez les porteurs de CCR, les observations rapportées ont permis de constater que :

- chez 70 % des sujets présentant un CCR, le phénotype est normal. L'examen chromosomique de ces sujets est généralement réalisé en raison d'antécédents de fausses-couches à répétition, d'une infertilité ou de l'enquête diagnostique déclenchée par l'observation d'un phénotype pathologique dans la descendance. Le caryotype de ces personnes est considéré comme équilibré, mais il faut garder à l'esprit que la présence de petits déséquilibres aux points de cassure (délétion/duplication/insertion) peut ne pas engendrer de phénotypes pathologiques ;
- chez 20 à 25 % des patients porteurs de CCR, des atteintes congénitales sont présentes : syndrome polymalformatif et/ou retard mental. Leur génome est le plus souvent déséquilibré, même si le caryotype

standard peut être apparemment équilibré. Quelques rares cas sont liés à des troubles psychiatriques ; – dans 5 à 10 % des cas, le diagnostic est porté en période anténatale.

Trente pour cent des cas de CCR sont familiaux et la transmission de l'anomalie est majoritairement d'origine maternelle. Une origine paternelle n'a été observée que dans quelques cas [8]. Toutefois, la majorité des CCR, soit 70 %, surviennent *de novo* et l'origine de ces anomalies *de novo* serait préférentiellement paternelle. Leur découverte se fait généralement lors de l'exploration de troubles de la reproduction, bien que des cas exceptionnels de sujets fertiles porteurs de CCR aient été rapportés [9]. Il est intéressant de souligner que les CCR survenant *de novo* se répartissent équitablement entre les sujets exprimant un phénotype pathologique (51 %) et les sujets non atteints (49 %).

### Évolution des techniques d'analyse des CCR

Bien que l'analyse chromosomique classique, basée sur la réalisation du caryotype, ait permis d'identifier un grand nombre de CCR, cette approche reste limitée par un faible niveau de résolution (de 5 à 10 Mb). Fort heureusement, l'analyse chromosomique bénéficie aujourd'hui d'un large panel de techniques issues de la biologie moléculaire.

En premier lieu, l'hybridation fluorescente *in situ* (FISH pour *fluorescence in situ hybridization*) a été déclinée par de multiples techniques – peinture chromosomique, FISH multicolore, FISH télomérique ou locus spécifique, ou encore CGH (hybridation génomique comparative) –, et elle a contribué au diagnostic d'un nombre croissant de CCR [1]. Ces approches ont aussi permis aux cytogénéticiens de prendre la pleine mesure de la complexité de nombreux CCR, en révélant des microremaniements que le caryotype ne détectait pas. Un exemple flagrant concerne les translocations insertionnelles : leur incidence était estimée à 1/80 000 naissances en 2000, mais l'utilisation de la CGH a permis de la réévaluer à 1/500 en 2010, soit une proportion 160 fois plus élevée [10]. Plus récemment, les techniques de puces à ADN (ACPA pour analyse chromosomique sur puces à ADN) et de séquençage à haut débit ont accru la résolution de l'analyse jusqu'au nucléotide, permettant ainsi de mieux décrypter les différents mécanismes de formation des CCR [11]. Enfin, des stratégies originales ont été développées pour caractériser les points de cassure des CCR. Citons l'*array painting* basé sur la combinaison du tri chromosomique par cytométrie en flux et de l'ACPA des zones de cassures chromosomiques [12].

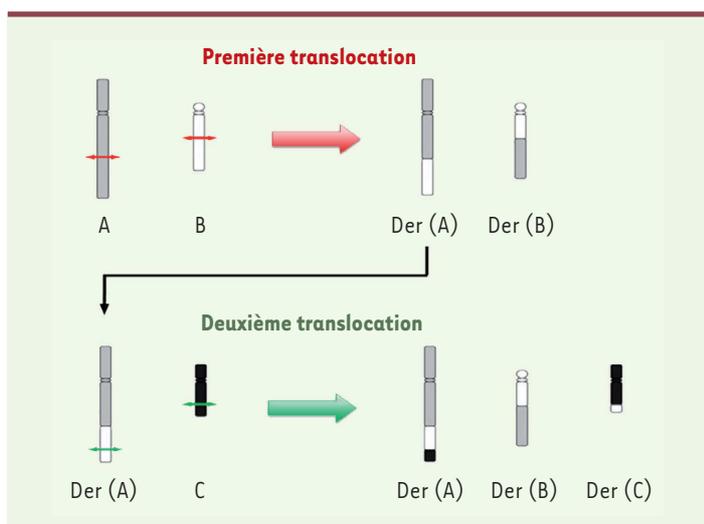


Figure 2. Décomposition théorique d'un CCR exceptionnel en deux étapes.

Une conséquence de ce raffinement des techniques d'analyse est la découverte que 30 à 40 % des porteurs de CCR *de novo* apparemment équilibrés et présentant des anomalies phénotypiques, sont porteurs de microremaniements situés autour des points de cassure de leur CCR [13]. Ainsi, de nombreux CCR se révèlent être bien plus complexes que ce que les analyses initiales permettaient d'envisager. Cette complexité accrue va de pair avec la découverte des multiples mécanismes de formation des CCR.

### Origines des CCR

Plusieurs scénarios sont envisageables pour rendre compte de la formation d'un CCR. Le plus simple est de décomposer l'anomalie complexe en événements chromosomiques simples. Ainsi, un CCR de type exceptionnel peut résulter d'un nombre restreint d'événements chromosomiques indépendants, avec une première étape de translocation réciproque entre deux chromosomes A et B, donnant naissance à deux chromosomes remaniés appelés dérivés der(A) et der(B). Dans un second temps, une autre translocation réciproque se crée entre un troisième chromosome C et l'un des deux dérivés der(A) ou der(B), pour former les trois dérivés finalement observés dans le CCR : der(A), der(B) et der(C) (Figure 2). De cette manière, il est possible d'expliquer l'origine d'anomalies chromosomiques dont la complexité est *a priori* très élevée. Un autre scénario possible fait intervenir des translocations dites « sauteuses » dans lesquelles un segment chromosomique est transféré successivement sur plusieurs autres chromosomes hôtes. Mais il s'agit d'événements rares se produisant au cours de plusieurs cycles cellulaires [14].

Parallèlement à ces modèles séquentiels, un mécanisme en une seule étape a été proposé : toutes les cassures chromosomiques se produiraient en même temps, soit au cours de la méiose chez l'un des parents, soit au cours des premières divisions cellulaires de l'embryon [15]. Le fait que la majorité des CCR ait été diagnostiquée *de novo*, et donc qu'aucun des parents ne présente d'anomalies chromosomiques

simples capables de se complexifier à la génération suivante, est en faveur de ce modèle.

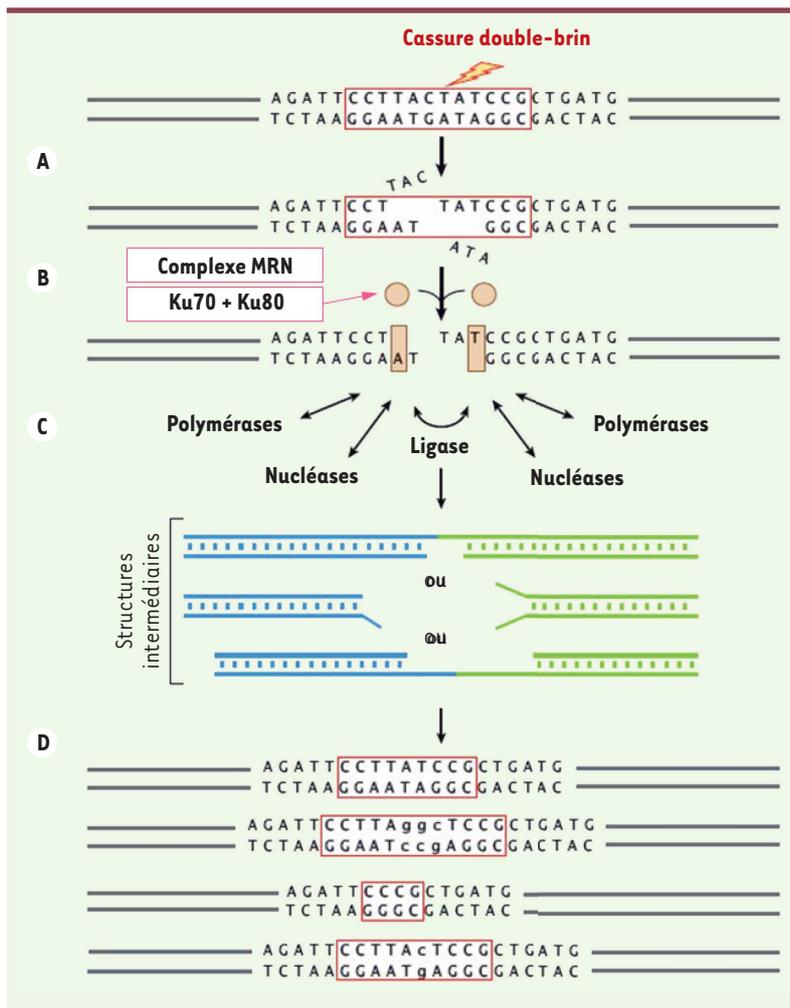
L'origine paternelle préférentielle des CCR *de novo* suggère que leur formation a lieu plutôt au cours de la spermatogenèse que de l'ovogenèse. Durant la spermatogenèse, le nombre très important de mitoses qui se succèdent (supérieur au nombre de mitoses survenant au cours de l'ovogenèse), ainsi que le manque d'efficacité des systèmes cellulaires de réparation de l'ADN, peuvent favoriser l'émergence *de novo* des CCR dans le sexe masculin. L'instabilité chromosomique au cours des premières divisions embryonnaires est un autre paramètre favorable à la formation des CCR [16]. Là encore, la faiblesse des points de contrôle mitotiques a été mise en cause [17]. Cette faiblesse pourrait s'expliquer par la rapidité des premières divisions des blastomères liée à la nécessité pour l'embryon de produire une masse cellulaire suffisante.

### Mécanismes moléculaires à l'origine des CCR

La formation de réarrangements chromosomiques, qu'ils soient simples ou complexes, nécessite que se produise une cassure double-brin de l'ADN (DSB pour *double strand break*), suivie d'une réparation erronée des lésions de l'ADN.

Les cassures double-brin de l'ADN sont des événements nucléaires fréquents. Elles peuvent être induites par un certain nombre d'agents exogènes, dit clastogènes, tels que les radiations ionisantes, la chimiothérapie anticancéreuse, le stress oxydant, les infections virales, etc. Des mécanismes endogènes sont aussi à l'origine de DSB, comme l'action inappropriée d'enzymes nucléaires et le stress répliatif qui se manifeste par la déstabilisation des fourches de réplication face à des obstacles rencontrés dans la structure de l'ADN. Les DSB interviennent aussi dans des mécanismes cellulaires physiologiques, tels que la recombinaison méiotique permettant le brassage de l'information génétique lors de la formation des gamètes [41]. La réparation des cassures double-brin de l'ADN fait intervenir plusieurs enzymes et protéines complexes organisés en divers systèmes de réparation. La cellule utilisera celui qui est le mieux adapté à la situation. L'engagement enzymatique dans l'une de ces voies inhibe les autres systèmes possibles. Le choix d'un processus est guidé par l'espèce, le type cellulaire, la position chronologique de la cellule dans son cycle de vie et la présence éventuelle d'un fragment d'ADN homologue [18].

Deux mécanismes principaux de réparation coexistent. Le système de réparation par jonction des extrémités non homologues (NHEJ) pour *non-homologous end*



**Figure 3. Mécanisme de réparation de type NHEJ des cassures double-brin.** A. Événement déstabilisant et apparition d'une cassure double-brin. B. Le complexe MRN (Mre11, Rad50 and Nbs1) reconnaît la DSB. Les protéines Ku70 et Ku80 stabilisent la structure et favorisent l'action des enzymes de réparation. C. Intervention des différentes enzymes : nucléases (Artemis et DNA-PKc), polymérase ( $\mu$  et  $\lambda$ ) et ligases (XLF [XRCC4-like factor], XRCC4 [X-ray repair cross-complementing protein 4] et DNA ligase IV). D. Brins d'ADN réparés par NHEJ. Ce type de réparation présente un haut degré d'imprécision et est à l'origine de modifications du génome.

de Holliday réunissant les deux structures double-brin et permettant la réparation du brin d'ADN cassé. Une des propriétés de ce mode de réparation est sa grande fidélité, puisque l'ADN lésé est remplacé par une copie strictement identique [20].

Un troisième mécanisme de réparation, mis en évidence récemment, se situe à mi-chemin entre les deux premiers types de réparation décrits. Appelé jonction des extrémités orientée par micro-homologie (MMEJ pour *micro-homology mediated end joining*), il permet de joindre les extrémités libres de l'ADN, à condition que les brins à appairer présentent une micro-homologie de séquence de 5 à 25 pb. Si cet appariement n'est pas suffisamment stable, il se produit une succession de désappariements

et de réappariements de l'ADN, entraînant des variations de séquence dans la zone réparée. De ce fait, ce mécanisme peut conduire à une grande complexité des réarrangements [21].

*joining*) est un mécanisme dit biochimique, dans la mesure où il n'utilise pas et ne dépend pas de l'information génétique pour son action. Il consiste simplement à recoller les extrémités séparées par la cassure (Figure 3). Cette réparation de l'ADN est très rapide et peut survenir à n'importe quel stade du cycle cellulaire. Il s'agit du mode de réparation le plus fréquemment utilisé par la cellule, même si son niveau de fidélité est inférieur à celui des autres mécanismes, car il ne restitue pas intégralement la séquence originale de l'ADN. Les extrémités de la cassure double-brin sont souvent résorbées avant d'être recollées. Aussi, la séquence obtenue diffère souvent de la séquence d'origine. On parle de séquence cicatrice [19].

Les mécanismes de réparation des cassures double-brin de l'ADN ne sont pas infaillibles, et les erreurs commises par ces systèmes enzymatiques sont responsables de l'apparition des remaniements chromosomiques. Il est intéressant de classer les anomalies chromosomiques résultantes en fonction de leur récurrence. On peut alors définir trois classes d'anomalies.

- Les réarrangements chromosomiques récurrents qui sont généralement dus à des erreurs de réparation de type recombinaison homologue. On parle alors de recombinaison homologue non allélique (NAHR pour *non allelic homologous recombination*). La séquence homologue prise comme matrice se trouve sur un locus chromosomique différent de celui à réparer. Ceci peut se produire lorsque la cassure double-brin survient au niveau de séquences répétées de l'ADN, appelées duplications segmentaires ou LCR (*low copy repeat*),

ce qui permet d'expliquer la récurrence de certains réarrangements chromosomiques [22]. Ce type d'erreur peut se produire lors de la mitose ou de la méiose. De nombreuses anomalies récurrentes sont la conséquence de ce type de recombinaison, comme le syndrome de Di George<sup>1</sup> qui comporte une micro-délétion dans la région chromosomique 22q11.2.

- Les réarrangements chromosomiques non récurrents, dont les points de cassure sont aléatoires. Ils sont dus à une erreur de réparation de l'ADN de type NHEJ à la suite de l'apparition d'au moins deux cassures double-brin [23]. Il est possible de retrouver la signature de ces réarrangements grâce à la cicatrice nucléotidique qu'ils laissent au niveau des points de cassure.
- Les réarrangements par stress réplicatif.

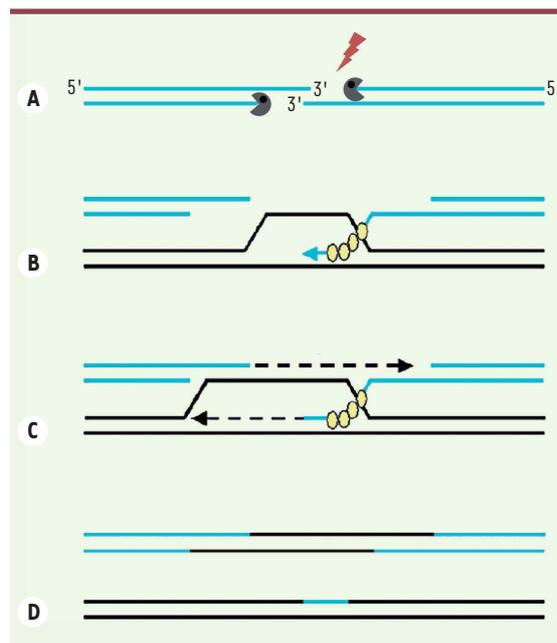
En raison de leur complexité, certaines aberrations ne peuvent pas être expliquées par les recombinaisons de type NAHR ou NHEJ. Aussi, plusieurs autres modèles de formation, basés sur les erreurs de réplication de l'ADN, ont été proposés.

- Le processus FoSTeS (*fork stalling and template switching*) combine un arrêt de la fourche de réplication (le réplisome) avec un changement de brin modèle [24]. On parle alors de stress réplicatif, que l'origine de ce stress soit exogène ou due à une conformation particulière de l'ADN forçant cet arrêt. Si cet arrêt est trop long, le réplisome finit par se démanteler. La partie 3' du brin retardé peut alors envahir une autre fourche de réplication et la polymérase continue la synthèse du brin d'origine en prenant modèle sur le brin envahi. Des homologies de séquence de petite taille (4 à 15 pb) sont nécessaires pour que ce nouvel appariement ait lieu. Cet envahissement peut se faire entre deux fourches de réplication séparées par une grande distance génomique, et les réarrangements engendrés peuvent donc être de très grande taille. Ce processus de désengagement et d'envahissement peut se produire plusieurs fois à la suite, d'où son implication dans la genèse des CCR.

- Le processus MMBIR (*microhomology mediated break induced replication*) [25] nécessite aussi une mise en échec du réplisome aboutissant à une cassure double-brin. L'extrémité simple-brin en 3' s'appariera à tout ADN mono-brin présentant une micro-homologie de séquence. Là encore, cette fourche secondaire peut se dissocier et la séquence libre peut chercher un autre brin présentant une micro-homologie. Au final, le brin réparé peut présenter des réarrangements très complexes de plus ou moins longue taille, en fonction de l'orientation et de la position des différents brins modèles rencontrés. Le même type de mécanisme, basé sur des homologies de grandes tailles, est appelé BIR (*break induced replication*). Ce mécanisme est plus particulièrement impliqué dans la maintenance des régions télomériques et la formation de remaniements dans ces régions [26].

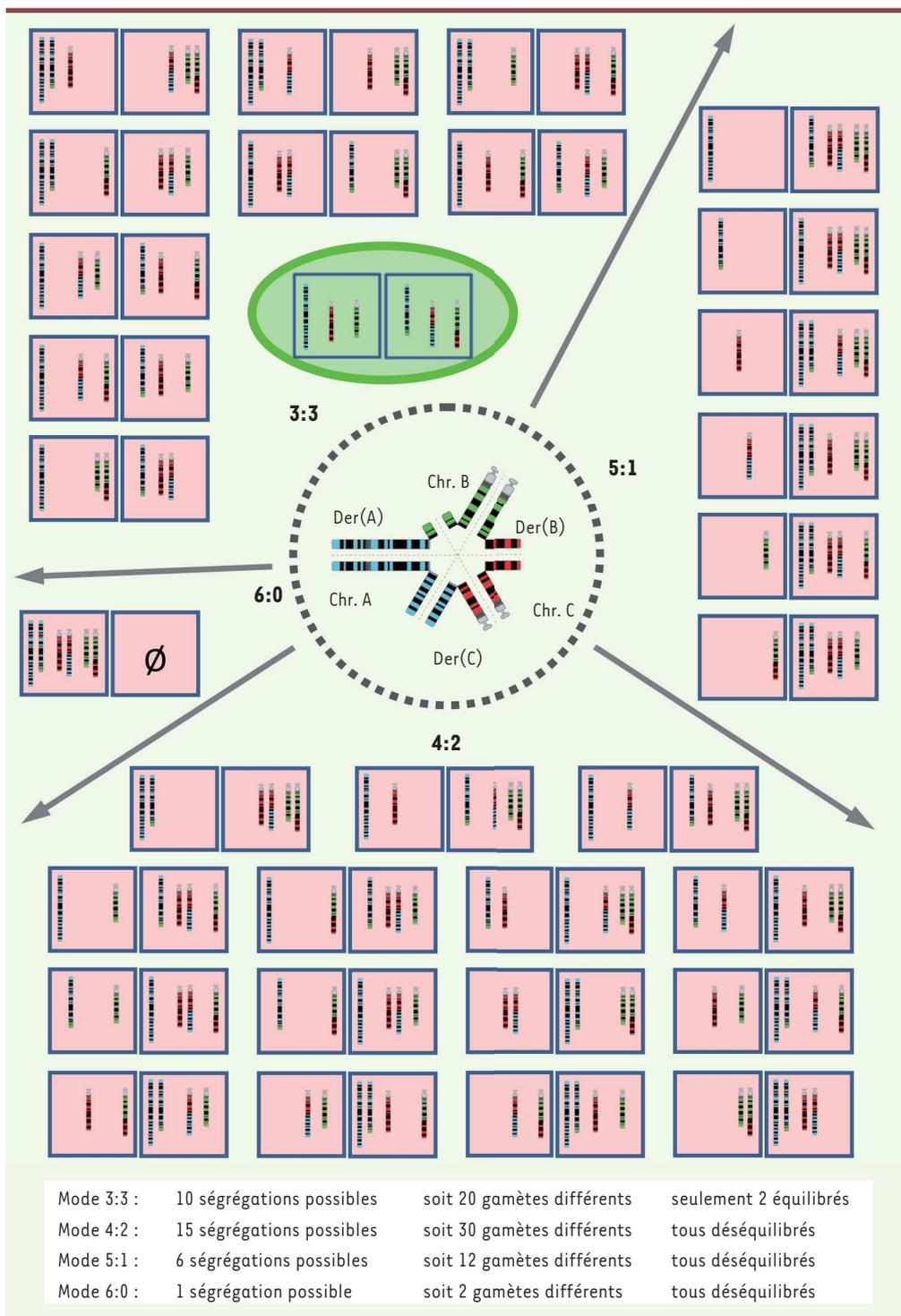
Les analyses de séquences réalisées au niveau des points de cassure de nombreux réarrangements ont montré la présence de séquences ou de motifs particuliers au voisinage de ces zones de cassure. Il peut s'agir

<sup>1</sup> La monosomie 22q11 ou syndrome de DiGeorge se caractérise par l'association de plusieurs malformations : une hypoplasie du thymus (causant une baisse plus ou moins profonde des lymphocytes T) et des parathyroïdes, une cardiopathie congénitale de type conotruncal et une dysmorphie faciale discrète mais caractéristique (source *Orphanet*).



**Figure 4. Système de réparation des cassures double-brin par recombinaison homologue.** **A.** Cassure double-brin et résection des extrémités 5'. **B.** Stabilisation des extrémités 5' par les protéines RPA (*replication protein A*) et Rad51 et invasion d'une séquence homologue par le filament d'ADN simple-brin. **C.** Formation d'un hétéroduplex (appelé D-loop), réparation du brin d'ADN altéré et création d'une structure de Holliday après la ligation des extrémités. **D.** Démantèlement de la structure avec ou sans *crossing-over*.

d'éléments transposables ou de séquences répétées qui peuvent favoriser les phénomènes de recombinaison homologue non allélique (NAHR), ou simplement faciliter le contact et l'appariement des régions réarrangées. On note aussi la présence de séquences capables de créer des structures secondaires particulières, telles que les séquences palindromiques, voire des séquences pouvant induire des modifications de la conformation de la double hélice, comme les séquences polypurines ou polypyrimidines [27]. Enfin, certaines séquences détectées correspondent à des sites de fixation de protéines particulières, comme les translines, retrouvées à proximité des points de cassure de nombreuses translocations, sans que leur rôle exact dans la cassure ou la réparation de la molécule d'ADN aient été élucidés [28]. Beaucoup de ces éléments sont des facteurs d'instabilité génomique susceptibles de perturber la machinerie répllicative, d'exacerber la survenue de cassures double-brin ou de biaiser les mécanismes de réparation. La répartition de ces éléments sur le génome peut donner lieu à l'existence de zones de cassures privilégiées (*hot spot*), comme cela a été rapporté pour



**Figure 5. Schéma de la ségrégation méiotique pour une translocation three-way.** Les carrés bleus représentent les paires de gamètes formés après méiose. Les gamètes déséquilibrés sont dessinés sur fond rose et les gamètes équilibrés sur fond vert.

très dynamiques dont les parties situées en surface peuvent interagir. Il est démontré que les gènes exprimés par une cellule se trouvent plus fréquemment situés à la surface de leurs territoires, dans une « bulle d'expression » où sont réunis les enzymes et les facteurs de transcription [30]. Dans ces zones, la chromatine est particulièrement relâchée, donc plus sensible aux cassures double-brin.

### Comportement méiotique des CCR

Comme toutes les anomalies chromosomiques de structure, les réarrangements complexes peuvent perturber le déroulement de la gamétogenèse et entraîner l'arrêt de la méiose ou la transmission d'une formule chromosomique déséquilibrée.

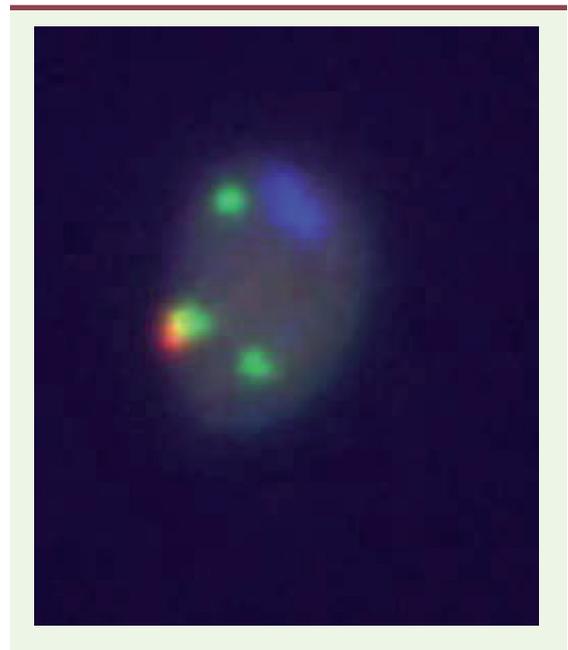
Dans le cas des CCR, la combinaison de différents types de réarrangement et le nombre de chromosomes impliqués rendent délicates l'analyse et la prédiction du comportement méiotique de ces réarrangements. Les outils prédictifs, développés dans le but d'estimer le risque de déséquilibre à terme, ne sont hélas pas adaptés à l'analyse des réarrangements complexes [31].

certaines cancers. Cette notion conduit à prendre en compte le rôle de l'organisation nucléaire des chromosomes dans la formation des réarrangements complexes. La répartition des chromosomes en territoires est une notion admise et confirmée par de nombreuses analyses *in situ* [29]. Plusieurs modèles d'organisation nucléaire ont été proposés en fonction de l'interpénétrabilité de ces territoires, mais tous admettent que leur répartition n'est pas due au hasard. Il s'agit de domaines

certaines cancers. Cette notion conduit à prendre en compte le rôle de l'organisation nucléaire des chromosomes dans la formation des réarrangements complexes. La répartition des chromosomes en territoires est une notion admise et confirmée par de nombreuses analyses *in situ* [29]. Plusieurs modèles d'organisation nucléaire ont été proposés en fonction de l'interpénétrabilité de ces territoires, mais tous admettent que leur répartition n'est pas due au hasard. Il s'agit de domaines

L'exemple des translocations complexes de type *three-way* montre que le diagramme de pachytène formé pendant la méiose I est une structure hexavalente permettant l'appariement des chromosomes homologues. La ségrégation des chromosomes qui en découle peut théoriquement se faire selon les types 3:3, 4:2, 5:1 ou 6:0. Au total, 32 schémas de ségrégation méiotique peuvent se produire donnant 64 gamètes différents, dont seulement deux sont équilibrés (Figure 5). La survenue d'un *crossing-over* ne modifie en rien les produits de ségrégation méiotique. Dans le cas des enfants nés avec un caryotype déséquilibré, les modes de ségrégation méiotique de type 4:2 et 3:3 sont les plus fréquents, comme c'est le cas pour les translocations réciproques classiques [1]. Concernant les translocations complexes exceptionnelles, le nombre de ségrégations méiotiques possibles est encore plus élevé. Comme cette classe d'anomalies est hétérogène, le nombre de possibilités est variable et dépend du nombre de points de cassure et des partenaires chromosomiques impliqués. Kausch *et al.* [4] ont rapporté le cas d'un CCR dont la ségrégation méiotique pouvait donner plus de 70 types de gamètes déséquilibrés. Outre le mode de ségrégation, on peut observer l'apparition de nouveaux chromosomes recombinants à la suite d'un *crossing-over*, ce qui augmente encore les possibilités de déséquilibre. Paradoxalement, ces recombinaisons peuvent donner lieu à un caryotype moins complexe à la génération suivante [32]. Enfin, pour les translocations double ou triple *two-way*, il est théoriquement plus simple de prédire le mode de ségrégation méiotique si on considère que les translocations en présence sont indépendantes. On peut alors calculer un risque de déséquilibre pour chaque anomalie, puis les combiner pour déterminer un risque global. Ces calculs supposent que les différentes anomalies n'interagissent pas entre elles. Il faut enfin noter l'intervention d'un autre phénomène capable d'augmenter encore le risque de déséquilibre méiotique : l'effet inter-chromosomique. Pendant la première division méiotique, la présence de la structure complexe en pachytène peut déstabiliser le plan équatorial du fuseau de division. Il peut en résulter la mauvaise ségrégation d'un chromosome non impliqué dans le CCR, entraînant ainsi une aneuploïdie supplémentaire [33].

L'examen chromosomique direct des spermatozoïdes humains est particulièrement intéressant pour analyser la ségrégation méiotique des CCR. Cependant, très peu d'études de ce type ont été réalisées, du fait de l'hypofertilité de la plupart des sujets porteurs de CCR et des difficultés de mise en œuvre d'une telle technique sur les spermatozoïdes. Seules quatre études ont concerné des porteurs de CCR *triple-way* [1]. Dans tous les cas, l'analyse d'un nombre suffisant de spermatozoïdes (de 660 à 1900) par FISH a permis d'établir les profils de ségrégation des CCR (Figure 6). Des taux élevés de déséquilibres ont été observés (de 69 % à 85 %), ainsi qu'une part non négligeable de gamètes déséquilibrés secondairement à des recombinaisons multiples ou des erreurs de deuxième division méiotique (de 6 % à 9 %). Ces études ont confirmé la complexité de la ségrégation des CCR, mais elles ont aussi apporté la preuve que des patrimoines chromosomiques fortement déséquilibrés pouvaient progresser au travers de la gamétogenèse.



**Figure 6.** Exemple d'analyse chromosomique in situ par FISH sur spermatozoïdes de patients porteurs de CCR. Quatre sondes, marquées par quatre fluorochromes distincts, sont utilisées pour identifier les chromosomes impliqués dans le remaniement et déterminer la forme équilibrée ou déséquilibrée de l'anomalie, dans les noyaux de chaque spermatozoïde. Ainsi est établi le profil de ségrégation méiotique du remaniement.

### Conséquences sur la fertilité

Si la découverte d'un réarrangement complexe *de novo* résulte le plus souvent d'une analyse chromosomique chez un homme, l'observation de cas familiaux de CCR montre que ceux-ci sont majoritairement transmis par la mère. On suppose donc que ces anomalies chromosomiques n'ont pas les mêmes conséquences sur la spermatogenèse et l'ovogenèse. Alors que les points de contrôle au cours de l'ovogenèse semblent être assez permissifs [34], la spermatogenèse apparaît très sensible aux aberrations de structure. L'appariement des chromosomes homologues doit être parfait, sous peine de provoquer l'arrêt du processus méiotique. Échec de synapse<sup>2</sup>, hétérosynapse et association de segments autosomiques avec les gonosomes sont les principales causes d'interruption de la spermatogenèse. Plus le degré de complexité des anomalies chromosomiques est élevé, plus la proportion de segments asynaptiques augmente, entraînant une moindre qualité de

<sup>2</sup> La synapse désigne le processus d'appariement des chromosomes homologues, chacun formé de deux chromatides, qui se regroupent par paires.

l'appariement des chromosomes. De manière bien plus efficace que dans l'ovogenèse, ces anomalies de l'appariement du pachytène sont détectées dans le spermatocyte, pouvant alors conduire à l'arrêt de la méiose et à l'apoptose de la cellule. Les hommes porteurs de CCR présentent donc souvent des problèmes d'hypofertilité liés au nombre de gamètes (oligospermie ou azoospermie) [43]. Si toutefois une grossesse survient, le risque d'anomalies de l'embryon est élevé. La très grande hétérogénéité des anomalies rencontrées fait qu'il est difficile d'évaluer quantitativement ce risque. On considère empiriquement que la probabilité de fausse-couche spontanée pour les couples porteurs de CCR se situe entre 50 % et 100 % des conceptions, et que le risque de donner naissance à un enfant avec un phénotype pathologique lié à un déséquilibre est de 20 % à 90 % [1, 7].

Des méthodes d'assistance médicale à la procréation (AMP) sont proposées aux couples concernés par des anomalies complexes du caryotype, notamment une fécondation *in vitro* (FIV) associée à une injection intracytoplasmique de spermatozoïde (ICSI) [35]. Cependant, cette technique n'évalue pas la qualité chromosomique du spermatozoïde sélectionné, et le risque d'une conception déséquilibrée n'est donc pas maîtrisé. Le pourcentage des grossesses normales est faible et le recours à l'ICSI pose le problème de la propagation potentielle de l'anomalie complexe. Il est aussi possible de pratiquer un diagnostic pré-implantatoire (DPI). Une analyse chromosomique *in situ* par FISH de un ou deux blastomères prélevés permet de sélectionner un embryon ne présentant pas de déséquilibre. Là encore, le degré de complexité et le nombre de chromosomes impliqués conditionnent la faisabilité de la technique. Seuls six cas de DPI chez des couples porteurs de CCR ont été rapportés [1, 36] ; ils totalisent 129 embryons analysés par FISH pour seulement neuf embryons ayant une analyse chromosomique diagnostiquée comme normale ou équilibrée. À ce jour, seules deux grossesses ont été obtenues après transfert d'un embryon sélectionné par DPI. Récemment, Vanneste *et al.* [37] ont réussi à mettre en œuvre une technique de puce à ADN appliquée au DPI pour les couples porteurs d'un CCR, afin de sélectionner les embryons selon leur caryotype moléculaire.

## Conclusion

Les CCR constituent une des manifestations les plus marquantes de l'instabilité génomique qui peut affecter le cycle de vie des cellules [44], au gré de multiples facteurs de perturbation, exogènes ou endogènes. La diversité des mécanismes de réarrangement mis en œuvre et la détection de nombreux micro-remaniements supplémentaires témoignent de la complexité insoupçonnée des CCR. La découverte récente du phénomène de chromothripsis, qui correspond à la pulvérisation d'un ou de plusieurs segments chromosomiques et au réassemblage chaotique des fragments d'ADN au cours d'un seul événement cellulaire, est venue apporter une nouvelle dimension à la complexité des mécanismes chromosomiques à l'origine des CCR [38]. Initialement découvert dans les cancers, ce nouveau mode d'apparition de réarrangements chromosomiques complexes est considéré comme une voie d'aggravation du processus tumoral [39]. Par ailleurs, ce

phénomène de *chromothripsis* a aussi été observé en génétique constitutionnelle, chez des patients atteints de malformations congénitales [40]. Face à cette complexité croissante, le développement de techniques d'analyse du génome de plus en plus fines permet aujourd'hui la caractérisation précise des CCR, l'étude de leur étiologie et de leur formation, ainsi que la prise en charge des patients porteurs de CCR. ♦

## SUMMARY

### Complex chromosomal rearrangements: a paradigm for the study of chromosomal instability

Complex chromosomal rearrangements (CCR) include diverse structural anomalies leading to complex karyotypes which are difficult to interpret. Although karyotype analysis has been able to identify a large number of these rearrangements and to distinguish *de novo* and familial events, it is the advent of molecular cytogenetic and sequence analysis techniques which have led to an understanding of the molecular mechanisms underlying the formation of CCR. The diversity and high level of complexity inherent to CCR raises questions about their origin, their ties to chromosome instability and their impact in pathology. Today it is possible to precisely characterize CCR and to offer carriers sophisticated diagnostic techniques, such as preimplantation diagnosis. However, the meiotic segregation of these rearrangements remains very complex. ♦

## LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

## RÉFÉRENCES

1. Pellestor F, Anahory T, Lefort G, *et al.* Complex chromosomal rearrangements: origin and meiotic behavior. *Hum Reprod Update* 2011 ; 17 : 476-94.
2. Kleczkowska A, Fryns JP, Van den Berghe H. Complex chromosomal rearrangements (CCR) and their genetic consequences. *J Genet Hum* 1982 ; 30 : 199-214.
3. Kousseff BG, Nichols P, Essig YP, *et al.* Complex chromosome rearrangements and congenital anomalies. *Am J Med Genet* 1987 ; 26 : 771-82.
4. Kausch K, Haaf T, Köhler J, Schmid M. Complex chromosomal rearrangement in a woman with multiple miscarriages. *Am J Med Genet* 1988 ; 31 : 415-20.
5. Houge G, Liehr T, Schoumans J, *et al.* Ten years follow up of a boy with a complex chromosomal rearrangement: going from a > 5 to 15-breakpoint CCR. *Am J Med Genet* 2003 ; 118 : 235-40.
6. Madan K, Nieuwint AWM, Van Bever Y. Recombination in a balanced complex translocation of a mother leading to a balanced reciprocal translocation in the child. Review of 60 cases of balanced complex translocations. *Hum Genet* 1997 ; 99 : 806-15.
7. Madan K. Balanced complex chromosome rearrangements: reproductive aspects. A review. *Am J Med Genet* 2012 ; 158 : 947-63.
8. Grasshoff U, Singer S, Liehr T, *et al.* A complex chromosomal rearrangement with a translocation 4;10;14 in a fertile male carrier: ascertainment through an offspring with partial trisomy 14q24-1q22 and partial monosomy 4q27-q28. *Cytogenet Genome Res* 2003 ; 103 : 17-23.

