

Recherche d'optimisations dans la production de cellules souches embryonnaires murines.

Bruno Estebe

▶ **To cite this version:**

Bruno Estebe. Recherche d'optimisations dans la production de cellules souches embryonnaires murines. . Biologie cellulaire. 2017. hal-01646344

HAL Id: hal-01646344
https://ephe.hal.science/hal-01646344

Submitted on 29 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.

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE

Présenté

Par

Estebe Bruno

pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

TITRE : Recherche d'optimisation dans la production de cellules souches embryonnaires murines

soutenu le 15 novembre 2017

devant le jury suivant :

M. Jean-Marie Exbrayat– Président
M. Frédéric Fiore– Tuteur scientifique
Mme. Mireille Rossel– Tuteur pédagogique
Mme. Francina Langa Vives – Rapporteur
Mme. Marie-Christine Birling – Examinateur

Mémoire préparé sous la direction de :

M. Frédéric Fiore
Laboratoire de : Centre d'Immunophénomique (CIPHE)
Directeur : M. Bernard Malissen

et de

Mme. Mireille Rossel
Laboratoire de : Mécanismes moléculaires des Démences Neurodégénératives
Directeur : M. Jean-Michel Verdier
EPHE (Sciences de la Vie et de la Terre)

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE

Présenté

Par

Estebe Bruno

pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

TITRE : Recherche d'optimisation dans la production de cellules souches embryonnaires murines

soutenu le 15 novembre 2017

devant le jury suivant :

M. Jean-Marie Exbrayat– Président
M. Frédéric Fiore– Tuteur scientifique
Mme. Mireille Rossel– Tuteur pédagogique
Mme. Francina Langa Vives – Rapporteur
Mme. Marie-Christine Birling – Examinateur

Mémoire préparé sous la direction de :

M. Frédéric Fiore
Laboratoire de : Centre d'Immunophénomique (CIPHE)
Directeur : M. Bernard Malissen

et de

Mme. Mireille Rossel
Laboratoire de : Mécanismes moléculaires des Démences Neurodégénératives
Directeur : M. Jean-Michel Verdier
EPHE (Sciences de la Vie et de la Terre)

Remerciements

Il me sera difficile de remercier chaque personne à la hauteur de son mérite et d'être exhaustif, mais je vais m'efforcer de résumer ce dont mon entourage m'a fait bénéficier depuis mon arrivée sur la plateforme GEMTis et depuis le début de ma formation « Diplôme SVT » de l'EPHE.

Je remercie tout d'abord l'Ecole Pratique des Hautes Etudes et par là, tout le personnel impliqué dans la création et le maintien de cette formation essentiellement basée sur l'expérience professionnelle. Cette formation est idéale pour toute personne qui souhaite reprendre ses études tout en conservant son activité professionnelle. Maintenant au terme de ma formation, je constate avec beaucoup d'enthousiasme que celle-ci m'a apporté bien plus que je ne l'espérais. La confrontation directe avec toutes les activités liées à un projet de recherche m'a beaucoup appris sur la conduite d'un projet scientifique mais surtout sur mes propres capacités face aux différentes problématiques rencontrées. L'investissement dont j'ai fait preuve au cours de mon projet a développé en moi un intérêt grandissant pour la biologie des cellules souches, intérêt qui me pousse désormais à centrer ma carrière professionnelle sur l'étude des mécanismes liés à la pluripotence et aux multiples voies de différenciation cellulaire.

Mes tuteurs scientifique et pédagogique ont eu des rôles de conseil et de soutien essentiels dans ma formation. Je remercie chaleureusement Madame Mireille Rossel, qui suit mon évolution en tant que tutrice pédagogique depuis mon inscription au diplôme SVT en septembre 2011, pour sa disponibilité, ses conseils, et son investissement dans mon encadrement. Quand à mon tuteur scientifique, Monsieur Frédéric Fiore, plus que son rôle de tuteur scientifique, c'est pour son rôle de Mentor, et tout ce que cela implique, que je le remercie très amicalement.

Merci Frédéric pour tes encouragements, tes conseils inépuisables, la justesse de tes remarques et pour ton soutien indéfectible à mon égard depuis que tu m'as formé à la recherche scientifique lors de mon stage de BTS en 2006 et au cours des onze années suivantes. Comme certains de mes professeurs, tu es une de ces personnes qui perçoivent l'étincelle cachée en chacun de nous, qui savent lui donner le combustible et l'oxygène dont elle a besoin pour créer la flamme originelle de chaque passion. Tu as su m'apporter tout le soutien, la matière à penser et la liberté dont j'avais besoin au fil de mon évolution pour préciser mon parcours professionnel, transformant mon métier en vocation.

Je remercie la direction du CIPHE composée de Bernard Malissen et Ana Zarubica pour l'attention qu'ils portent à chaque personnel du CIPHE et pour leurs encouragements collectifs qui dirigent chaque acteur de cette structure vers une optimisation commune de nos activités.

Concernant mon équipe, la plateforme GEMTis, plus que des collègues de travail, vous avez été en quelque sorte ma seconde famille, qui me motive, m'encourage, me supporte et me soutient. J'ai vécu avec vous de nombreux évènements au cours de ma formation EPHE, aussi bien professionnels que personnels tels que les débuts de la démarche qualité, le déménagement de notre plateforme du CIML au CIPHE, la spécialisation en service, notre certification « ISO9001 » et les nombreux concours de recrutement qui font vibrer toute l'équipe à chaque fois. Je me souviendrais aussi des jours de fêtes au CIML et au CIPHE, et des colonies de sangliers avec qui nous partageons le campus. Merci à vous tous : Frédéric Fiore, Anne-Marie Mura, Fabien Danjan, Mireille Richelme, Elodie Caccomo-Garcia, Ingrid Hinchliffe, Sandrine Caré, Alexandre Bagnolini,

Fabien Angelis, Naïs Philippe, Aziz Adda-Benatia, Coralie Questaigne, Thomas Bagarre, Elisabeth Sleiman, Mélanie Roger, Guillaume Poulain, Corine Arnoux, Tristan Chaussard.

Merci à toi Sandrine, ma confidente et mon double depuis mon arrivée sur la plateforme en janvier 2009. Dans la démarche de compréhension technique et d'amélioration continue que nous partageons, personne ne s'étonne de nous voir constamment décortiquer et analyser chaque étape de nos modes opératoire et de nos dysfonctionnements pour dissiper toutes zones d'ombre dans la maitrise de notre cœur de métier. Afin de ne pas m'étendre trop longuement sur le sujet, je te remercie simplement pour tous nos fou-rires et toutes les discussions passionnées que l'on a partagé sur les sciences biologiques, les sciences humaines et tant d'autres domaines. Je ne compte plus les nombreux conseils avisés que tu m'as dispensé, agissant tel un catalyseur tu clarifiais toujours ma problématique avec une incroyable agilité. Merci pour ton soutien inconditionnel toujours dynamisant qui m'a fréquemment réconforté pendant mon Diplôme EPHE.

Merci à toi Ingrid, mon binôme de biologie cellulaire, pour ta collaboration sans faille qui débuta par le pilotage du processus de biologie cellulaire puis se renforça pendant notre apprentissage sur l'isolation de culture primaire de cellules ES à l'Institut Clinique de la Souris à Strasbourg. Merci pour ce rôle de « garde-fou » que tu avais parfois sur mes idées débordantes. Merci pour ta complémentarité extraordinaire qui nous a permis d'être le plus efficace possible, et de me dégager du temps pour la poursuite de mon projet EPHE. Merci pour nos conversations et débats, pour nos quelques différents très enrichissants et ta bonne humeur contagieuse.

Merci à ceux et celles qui ont quotidiennement partagé cette aventure avec moi dans le service de biologie cellulaire : Ingrid, Alexandre, Mélanie et Tristan. Merci à eux d'avoir parfois pris en charges les tâches qui m'incombaient me permettant de dégager du temps pour effectuer des recherches bibliographiques, concevoir mes expérimentations, les réaliser, les analyser, les interpréter et analyser l'impact de nos nouvelles procédures sur l'activité globale de la plateforme. Merci Tristan pour ton volontariat, ton implication et ta gaieté permanente.

Merci à notre « coach qualité » Anne-Marie pour nous avoir tous formé à la mise en place d'un système de management de la qualité répondant à la norme « ISO9001 ». Système nous permettant d'améliorer notre maitrise de chaque aspect de notre métier. Merci pour tes conseils sur mes questions « points qualité », pour tes encouragements et ton implication dans le « avancer ensemble » que représente notre démarche.

Merci à Fabien et Mireille pour leur pédagogie, leurs attentions et leur patience lors de ma formation à la micro-injection. Merci à vous deux ainsi qu'à Naïs, Thomas et Guillaume pour nos discussions au sujet de la micro-injection et du développement embryonnaire ainsi que pour toutes les données de micro-injection que vous nous avez fournies, indispensables à l'analyse fonctionnelle de nos cellules pluripotentes.

Merci à la plateforme d'Immunophénotypage qui m'a formé aux techniques de la cytométrie en flux. Je les remercie pour leur disponibilité, leurs conseils avisés et les nombreuses occasions où ils m'ont « dépanné » en marqueur de viabilité cellulaire et en « Fc block ». Merci en particulier à Hervé Luche, Pierre Grenot, Lillia Hadjem et Marielle Mello qui se rendaient toujours disponible pour répondre à mes questions sur la compensation du signal et sur la standardisation en cytométrie de flux, avec une mention particulière pour Lillia que j'ai souvent sollicitée.

Merci à mes colocs d'open-space Amandine Sansoni et Camille Pierini pour leurs plaisanteries, leur humour et leur bonne humeur inébranlable.

Merci à toutes les personnes du service administratif, Mylène Bosler, Raphaël Danyach, Anabelle Mello et Céline Ayala, qui s'efforcent de nous faciliter la vie malgré une réglementation qui nous parait toujours plus contraignante.

Je remercie Mme. Francina Langa Vives, Mme. Marie-Christine Birling, et M. Jean-Marie Exbrayat d'avoir accepté de faire partie de mon jury de soutenance. Je les remercie d'avoir étudier mon mémoire et d'évaluer ma soutenance ainsi que ma démarche expérimentale.

Merci à tous ceux que j'ai moins cité et avec qui j'ai collaboré d'une manière ou d'une autre pendant mon Diplôme SVT mais surtout pendant ces neuf dernières années au sein de la plateforme GEMTis et du CIPHE.

Pour finir je remercie mon entourage, famille et amis, pour leur soutien et leurs encouragements. Merci à ma mère Sophie, mon père Henri, mon frère Laurent, ma grand-mère Anne-Marie, mes oncles et tantes Madeleine, Marcel, Marc, Françoise, Alice, Jean, Marguerite mes cousins/cousines et leurs conjoints Audrey, Fabien, Cédric, Laura, Florent, Marcel, Chantal et Emilie. Merci à ma compagne Margot, ses parents Ettore et Clelia, son frère Edoardo et toute sa famille. Merci à tous mes amis, qui ne m'ont pas beaucoup vu ces derniers temps : Eugène, Alexandra, Rudy, Fedoua, Thibault, Ludovic, Marine, Kevin, Elodie, Sébastien, Renaud, Laurent K, Yannick, Laurent A, Adeline, Rémi, Julia, Coralie, Charlotte, Laurie, Damien, Aurélie, Camille, Victor pour toutes les discussions que nous avons eues et pour leur soutien. Merci à vous tous que j'ai privé de tant d'instants lors des soirées, week-ends et vacances, passés sur l'analyse de mon métier, la préparation de certaines expérimentations, la rédaction de ce mémoire et la préparation de ma soutenance.

Table des matières

Liste des figures 3
Liste des tableaux 5
Liste des abbreviations 5
1 Introduction 7
1.1 Contexte professionnel 7
1.1.1 Le Centre d'Immunophénomique 7
1.1.2 La plateforme GEMTis 8
1.1.3 Mise en place d'une procédure de contrôle de la pluripotence 8
1.2 Contexte scientifique 9
1.2.1 La théorie cellulaire 9
1.2.2 Le développement de l'embryon précoce 9
1.2.3 Muter les gènes pour les caractériser 12
1.2.4 Etude des tératocarcinomes 13
1.2.5 Découverte des cellules souches embryonnaires murines 14
1.2.6 Un Marqueur Spécifique : les Phosphatases Alcalines 16
1.2.7 La pluripotence 20
2 Matériels et méthodes 38
2.1 Culture des cellules souches embryonnaires de souris 38
2.1.1 Utilisations de MEF 38
2.1.2 Le milieu « DKO+LIF » 39
2.1.3 Le milieu « 2i+LIF » 39
2.1.4 Etablissement de lignées ES 39
2.2 Méthodes d'analyse des cultures cellulaires 40
2.2.1 Taux de croissance 41
2.2.2 Observations morphologiques 41
2.2.3 Dosage des phosphatases alcalines par colorimétrie 42
2.2.4 Quantité optimale de cellules ES à lyser et temps de lecture 45
2.2.5 Quantification des facteurs de transcription NOS par cytométrie en flux 48
2.2.6 Analyse des résultats 55
3 Résultats 59
3.1 Comparatif de réactifs de dissociation cellulaire 59
3.1.1 Dosage des PAL 59
3.1.2 Taux de croissance 61

3.1.3 Les facteurs de transcription NOS 62
3.2 Comparaison de SVF et de KSR 63
3.2.1 Morphologie cellulaire 63
3.2.2 Taux de croissance 64
3.2.3 Dosage des PAL 65
3.2.4 Les facteurs de transcription NOS 65
3.3 Etablissements de nouvelles lignées de cellules ES 67
3.3.1 Morphologie cellulaire 67
3.3.2 Détection du chromosome Y 67
3.3.3 Observation du caryotype 67
3.3.4 Taux de croissance 68
3.3.5 Dosage des PAL 69
3.3.6 Les facteurs de transcription NOS 70
3.4 Utilisation du milieu 2i+LIF 71
3.4.1 Morphologie cellulaire 71
3.4.2 Taux de croissance 72
3.4.3 Dosage des PAL 73
3.4.4 Quantification des facteurs NOS 73
3.5 Résultats fonctionnels 76
3.5.1 Utilisation du milieu 2i+LIF 77
3.5.2 Comparatif de réactifs de dissociation cellulaire 79
4 Discussion et perspectives 82
4.1 Evaluations de réactif et de lignée cellulaire 82
4.1.1 Utilisation du milieu 2i+LIF 82
4.1.2 Les réactifs de dissociation cellulaire 83
4.1.3 Comparaison de SVF et de KSR 84
4.1.4 Etablissement de nouvelles lignées de cellules ES 84
4.2 Impact de nos procédures de biologie cellulaire 84
4.2.1 Bilan sur l'optimisation de nos procédures 84
4.2.2 Différences entre les cellules in vitro et in vivo 86
4.2.3 Equilibre entre les cellules ES exogène et endogène 87
4.3 Morphologie et pluripotence : les cadhérines E 88
5 Conclusion 91
6 Références bibliographiques 93

Liste des figures

Numéro de figure	Titre de la figure	Numéro de page
1	Les premières étapes du développement embryonnaire	10
2	Formation des lignages germinaux	11
3	Différenciation in vitro : le CEB	15
4	Détection de PAL sur les cellules du blastocyste tardif (4 dpc) par microscopie electronique	17
5	La décidualisation	19
6	La cascade de signalisation BMP/Smad	21
7	La voie de signalisation LIF/gp130/STAT3	22
8	La voie de signalisation activée par Wnt	23
9	Activation des voies de signalisation Ras/ERK et PI3K par la fixation de facteurs de croissance	24
10	Expression de Nanog	27
11	Spécification de l'epiblaste et de l'ectoderme primitif.	28
12	Expression mono et bi-allélique de Nanog et Oct4	29
13	Expression bi-allélique d'Oct4 et de Sox2	30
14	Modèle du circuit d'autorégulation de la pluripotence	31
15	Les différents types de modification d'histones	33
16	Morphologie de cellules ESC, FABSC et EpiSC	34
17	Tests fonctionnels pour identifier la compétence développementale	35
18	Etablissement de lignées de cellules ES	40
19	Observation de la morphologie des cellules ES pendant leur différenciation	41
20	Détection de la PAL par coloration histologique au « Fast Red »	42
21	Valeurs d'absorbance de la gamme étalon de CIP	43
22	Valeurs d'absorbance de la gamme étalon pour t= 10, 20 et 30 minutes	44
23	Dosage des PAL contenues dans différentes quantité de cellules ES	45
24	Dosage des PAL contenues dans différentes quantités de cellules SNL	46
25	Quantification des PAL contenues dans différentes quantité de cellules ES et SNL	46
26	Calcul du Stain Index	51
27	Sélection des cellules d'intérêts	53
28	Définition des zones de marquage positif	54

29	Les populations cellulaires analysées	56
30	Formules de calcul de la déviation standard (SD) et de l'erreur standard (SE).	58
31	Détection des PAL après utilisation de différents réactifs de dissociation cellulaire	60
32	Taux de croissance obtenus après dissociation cellulaire	61
33	Analyse des expressions des facteurs de transcription Oct4 et Sox2	62
34	Comparaison morphologique entre culture avec FBS et avec KSR	63
35	Evolution des taux de croissance	64
36	Production de PAL en absence de SVF	65
37	Populations positives pour les marquages Nanog, Oct4 et Sox2	65
38	Expression des facteurs Nanog Oct4 et Sox2 de la population NOS positive	66
39	Numération chromosomique des lignées ABI	68
40	Evolution des taux de croissance	68
41	Concentration en PAL des lignées ES cultivées en DKO+LIF :	69
42	Population de cellules positives pour les marquages Nanog, Oct4, et Sox2	70
43	Intensités des expressions des facteurs NOS	70
44	Impact morphologique du milieu 2i+LIF	72
45	Effet du milieu 2i+LIF sur la croissance cellulaire	72
46	Evolution de l'expression des PAL de la lignée JM8.F6 pendant la culture	73
47	Pourcentage de cellules qui expriment de manière individuelle puis simultanée les facteurs de transcription Nanog, Oct4, Sox2	73
48	Intensité des expressions des facteurs NOS de la population triple positive	75
49	Pourcentage de souris chimères (mâles et femelles) obtenues avec la lignée JM8.F6	77
50	Répartition des souris chimères par catégorie de sexe et de niveau de chimérisme	78
51	Répartition des souris chimères par catégories selon les réactifs de dissociation utilisés	79
52	Pourcentage de naissances obtenues en fonction des réactifs de dissociation utilisés	81
53	Relation entre le taux de naissance et la colonisation des embryons	86
54	La cadhérine E	90

Liste des tableaux

Numéro	Titre de la figure	Numéro de page
1	Majeures différences entre les stades « élémentaire » et « programmé » de la pluripotence	37
2	Potentiel développemental de différents types de cellules pluripotentes	37
3	Anticorps conjugués utilisés pour la quantification par cytométrie en flux	48
4	Référence des réactifs de dissociation cellulaire testés	59
5	Référence des sérums de veau fétal et substitutif testés	63

Liste des abbreviations

Abbréviation	Définition
2i	2 inhibiteurs (CHIRON99021 + PD0325901)
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AFP	alphafoetoprotein
ATP	Adénosine Triphosphate
BMP	Bone Morphenic Protein
BSL3	Bio Safety Level 3
CEB	Cystic Embryoïd Body
CIPHE	Centre d'Immunophénomique
CNRS	Centre National de la Recherche Scientifique
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
DIA	Differentiation Inhibiting Activity
DKO	DMEM-KO
dpc	days post coïtum
EAP	Embyonic Alkaline Phosphatase
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EMS	ethyl methanesulfonate
ENU	N-ethyl-N-nitrosourea
EMT	Epithelial-mesenchymal transition
EpiSC	Epiblast Stem Cell
ERK	extracellular signal-regulated kinases
ESC	Embyonic Stem Cell
EUCOMM	European Conditional Mouse Mutagenesis
FABSC	Fgf4 Activin BIO inhibitor Stem Cell
GCAP	Germ Cell Alkaline Phosphatase
GEMTis	Genetic Engeneering and Mouse Transgenesis
GLT	Germ Line Transmission
GPI	Glycosylphosphatidylinositol

HILDA	Human Inter Leukine for DA cells
IAP	Intestinal Alkaline Phosphatase
ICM	Inner Cell Mass
IKMC	International Knockout Mouse Consortium
INSERM	Insitut National de la Santé et de la Recherche Médicale
iPSC	induce Pluripotent Stem Cell
JAK	Janus kinase
KI	Knock-In
KO	Knock-Out
KOMP	Knockout Mouse Project
KSR	Knock-out Serum Replacement
LEF	lymphoid enhancer-binding factor
LIF	Leukemia Inhibitor Factor
LPS	Lipopolysaccharide
MEF	Mouse Embryonic Fybroblast
MFI	Mean Fluorescence Intensity
NHEJ	Non Homologuous End Joining
NorCOMM	North American Conditional Mouse Mutagenesis
NOS	Nanog Oct4 Sox2
PAL	Phosphatase Alkaline
PGC	Primordial Germ Cell
PI3K	Phospho Inositol 3 Kinase
PLAP	Placental Alkaline Phosphatase
PMEF	Primary Mouse Embryonic Fibroblast
PPi	Pyro Phosphate inorganique
RH	Recombinaison Homologue
SEB	Simple Embryöid Body
SHP2	Src homology region 2-containing protein tyrosine phosphatase 2
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TALEN	transcription activator-like effector nuclease
TCF	T Cell Factor
TGFB	Transforming growth factor-β
TNAP	Tissus Non specific Alkaline Phosphatase
ZFN	Zinc Finger Nuclease

Introduction

1 Introduction

1.1 Contexte professionnel

Les séquençages des génomes de l'homme et de la souris ont révélé que 99% des gènes murins ont un gène de fonction équivalente chez l'homme. Parmi ceux-ci, 90% ont la même fonction dans les deux espèces tout en conservant 75% de colinéarité synténique (ordre des gènes conservé) et 80 % ont un gène orthologue chez l'homme avec certains gènes dont la séquence est intégralement conservée. Le développement de techniques de génie génétique adaptées au génome de la souris, l'existence de lignées de cellules souche embryonnaire de souris et ces nombreuses similitudes génétiques que partage la souris avec l'Homme ont fait de la souris un modèle de prédilection pour l'étude des pathologies humaines et la caractérisation intégrale de notre génome. Pour accélérer le développement de modèles *in vivo,* le consortium international IKMC (International KnockOut Mouse Consortium) a lancé trois programmes internationaux : KOMP (KnockOut Mouse Project), EUCOMM (European Conditional Mouse Mutagenesis) et NorCOMM (North American Conditional Mouse Mutagenesis) qui se coordonnent pour produire 20000 modèles conditionnels. Parmi ces modèles, 12000 sont des « gene trap » qui permettent d'inactiver un gène tout en reportant son expression, et 8000 sont des modèles de mutations géniques responsables de pathologies (Belizário et al., 2012).

1.1.1 Le Centre d'Immunophénomique

Le Centre d'Immunophénomique (CIPHE) s'intègre à cet effort scientifique international en réalisant des prestations des programmes EUCOMM et KOMP. En tant qu'unité mixte de service de l'INSERM d'Aix-Marseille Université et du CNRS, le CIPHE réalise différentes prestations de biotechnologie pour des structures académiques et privées. Le CIPHE propose des prestations de création de souris génétiquement modifiées, leur hébergement, leur cryoconservation et leur phénotypage. L'expertise du CIPHE est composée d'une cinquantaine de personnes réparties sur les cinq plateformes technologiques du centre : la plateforme GEMTis (Genetic Engineering and Mouse Transgenesis) qui crée des lignées de souris génétiquement modifiées, les équipes d'hébergement et de zootechnies, un service de cryopréservation, et deux plateformes de phénotypage dont une dédiée aux analyses d'animaux infectés par des pathogènes de risque biologique de niveau 3.

1.1.2 La plateforme GEMTis

Mon équipe, la plateforme GEMTis, utilise les techniques de la transgénèse par recombinaison homologue qui combinent les domaines de la biologie moléculaire, de la biologie cellulaire et de la transgénèse. Cette plateforme est constituée de trois services répartis par domaine d'activité. Le service de biologie moléculaire construit les vecteurs de ciblage génique qui sont par la suite utilisés par le service de biologie cellulaire, dans lequel je travaille, pour obtenir des cellules souches embryonnaires murine (mESC) porteuses de la mutation souhaitée. La dernière étape, réalisée par le service de micro-injection consiste en la micro-injection des mESC mutées dans des embryons au stade blastocyste et leur réimplantation dans des souris pseudo-gestantes. A l'issue de la gestation nous obtiendrons les premières souris chimères porteuses de la mutation. La nouvelle lignée murine est établie lorsque ces souris chimères transmettent à leur descendance l'information génétique des cellules ES injectées. Depuis la création de la plateforme, nous nous efforçons d'améliorer continuellement nos prestations. Souhaitant valoriser nos efforts, nous avons mis en place un système de management de la qualité selon la norme ISO9001, pour lequel nous sommes certifiés depuis 2014.

1.1.3 Mise en place d'une procédure de contrôle de la pluripotence

Au vu du nombre de prestations fournies par la plateforme chaque année et de l'importance que revêtent les cellules ES dans un projet de modification génique par recombinaison homologue, il est indispensable de pouvoir maitriser leur qualité. En culture *in vitro* le maintien de la pluripotence est primordial pour l'obtention de la lignée murine porteuse de la mutation. Puisqu'il dépend des procédures de culture utilisées nous devons disposer de tests fiables pour évaluer la qualité de nos cellules ES tout au long des différentes étapes de leur manipulation.

Mon objectif est de mettre en place une procédure de contrôle pour mesurer rapidement et facilement l'état de pluripotence cellulaire. Ceci nous permettrait de valider de nouvelles lignées de cellules ES et d'optimiser nos instructions de travail. Le but de cette démarche est d'augmenter l'indépendance, l'expertise et donc la performance de la plateforme GEMTis. Pour respecter les contraintes de productivité, le temps, le budget et la quantité de matériel biologique nécessaire seront pris en compte pour choisir les types de contrôles à mettre en place. Par exemple, un test peu coûteux, nécessitant peu de matériel biologique et rapide à mettre en œuvre nous permettra d'installer un contrôle de « surveillance », destiné à être fréquemment utilisé. A l'inverse, si le test mis en place est long, onéreux et utilise une grande quantité de cellules il s'agira d'un contrôle utilisé de manière ponctuelle pour la « validation » de nouvelles lignées ES, de nouvelles procédures ou lors de l'identification de dysfonctionnements récurrents.

1.2 Contexte scientifique

1.2.1 La théorie cellulaire

La biologie cellulaire a débuté au 17e siècle lorsque les technologies de microscopie furent assez perfectionnées pour observer des cellules végétales. Robert Hooke, scientifique de cette époque utilisa le terme « cellule » pour définir l'unité de base des tissus végétaux (Hooke, 2005). A la fin du 19e siècle William Turner rédigea une synthèse des découvertes scientifiques réalisées dans le domaine de la biologie cellulaire qu'il intitula « La théorie cellulaire ». Martin Barry découvrit en 1838 la cellule originelle des organismes vivants qu'est le zygote. Il observa le développement embryonnaire du lapin décrivant un amas cellulaire ressemblant à une mûre ouvrant la voie à la biologie de développement (Turner, 1890).

1.2.2 Le développement de l'embryon précoce

Lors de la fertilisation, les pronucléus mâle et femelle fusionnent pour créer un noyau diploïde (figure n°1). Cette première cellule diploïde nommée zygote contient des facteurs épigénétiques et transcriptionnels clés, hérités de l'oocyte, qui régule le développement précoce. Le basculement du zygote dans le programme de développement embryonnaire se produit quand la transcription s'initie à la fin du stade zygotique ou au stade 2 cellules (Solter, 2006). Cette transcription est suivie par le développement préimplantatoire pendant lequel six cycles de division cellulaires transforment le zygote en blastocyste (Surani et al., 2007).

Au cours de ces cycles se forme la morula à 3 dpc (day post coïtum), puis la blastula formée de 64 cellules et le blastocyste préimplantatoire composé d'environ 128 cellules (Belizário et al., 2012; Chou et al., 2008). Le blastocyste représente le premier stade embryonnaire où deux types cellulaires distincts peuvent être identifiés : les cellules de la masse cellulaire interne (Inner Cell Mass) d'où sont issues les cellules ES et les cellules du trophoblaste, composant la couche externe, qui vont uniquement former les annexes extra-embryonnaires (Gan et al., 2007). Le rôle du trophoblaste est de permettre l'implantation du blastocyste dans la paroi utérine et de former les annexes extra embryonnaires (figures n°1 et 5).

Après implantation dans la paroi utérine, l'ICM commence à former l'épiblaste du stade « egg cylinder » (figure n°1). Sous l'influence des tissus extra embryonnaires cet épiblaste initiera l'étape de gastrulation pendant laquelle il formera les lignages germinaux de l'embryon qui sont l'endoderme, le mésoderme et l'ectoderme (Chou et al., 2008; Nichols and Smith, 2009; Surani et al., 2007) (figure n°2).

A la suite de l'implantation dans les embryons femelles, les cellules de l'épiblaste commencent à s'orienter vers les différents lignages embryonnaires (Nichols and Smith, 2009) lorsqu'un de leurs deux chromosomes X qui s'inactive (Heard, 2004). Chez les mammifères, seuls le zygote et les blastomères de l'embryon au stade « deux cellules » sont totipotents (Solter, 2006; Kelly, 1977) et peuvent générer tous les tissus embryonnaires

et extra-embryonnaires. Les cellules de l'ICM ont été cultivées *in vitro* sous le nom de cellules souches embryonnaires (Embryonic Stem Cells). Ces cellules sont qualifiées de pluripotentes car elles peuvent produire tous les types cellulaires d'un organisme, mais demeurent incapables de générer le lignage du trophoblaste.

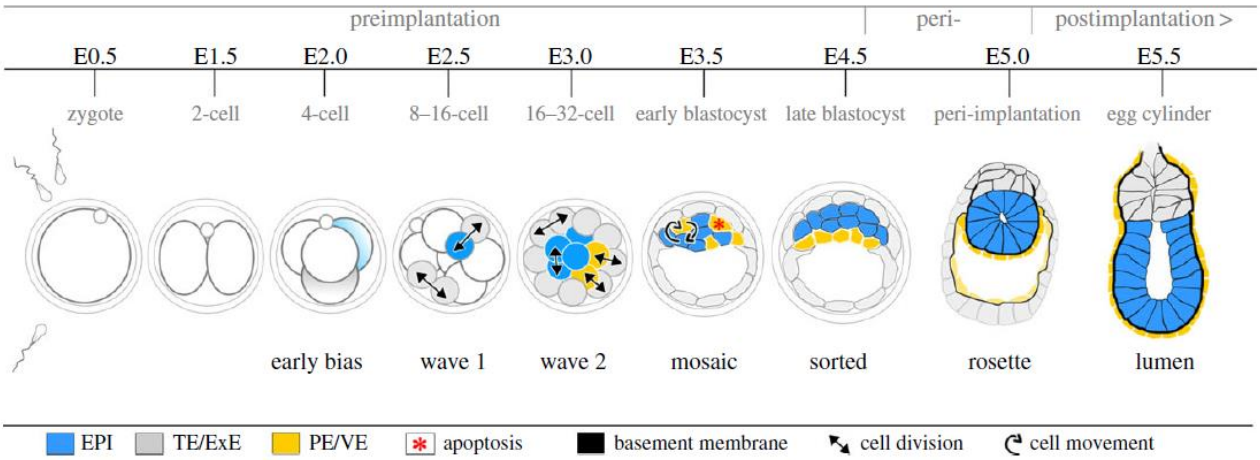


Figure n°1 : Les premières étapes du développement embryonnaire.

Les cellules embryonnaires et extra-embryonnaires se distinguent dans l'embryon préimplantatoire lors de deux phases de spécification cellulaire. La première phase a lieu aux stades 8 et 16 cellules lorsque la division asymétrique des blastomères donne naissance à des cellules internes et à des cellules externes (wave 1). Les cellules internes formeront par la suite l'ICM et les cellules externes structureront le trophectoderme (TE). Dans la seconde phase (wave 2), les cellules de l'ICM se divisent en cellules de l'endoderme primitif (PE), tissus extra embryonnaires, et en cellules de l'épiblaste (EPI), qui formeront tous les tissus embryonnaires. A 4 jours de développement, le blastocyste s'implante dans la paroi utérine, puis passe au stade « egg cylinder » dans lequel apparaissent les différents lignages germinaux de l'embryon.
ExE, extraembryonic ectoderm; PE, primitive endoderm; VE, visceral endoderm. Source : Bedzhov, I., Graham, S.J.L., Leung, C.Y., Zernicka-Goetz, M., 2014. Developmental plasticity, cell fate specification and morphogenesis in the early mouse embryo. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 369. doi:10.1098/rstb.2013.0538 (figure n°1).

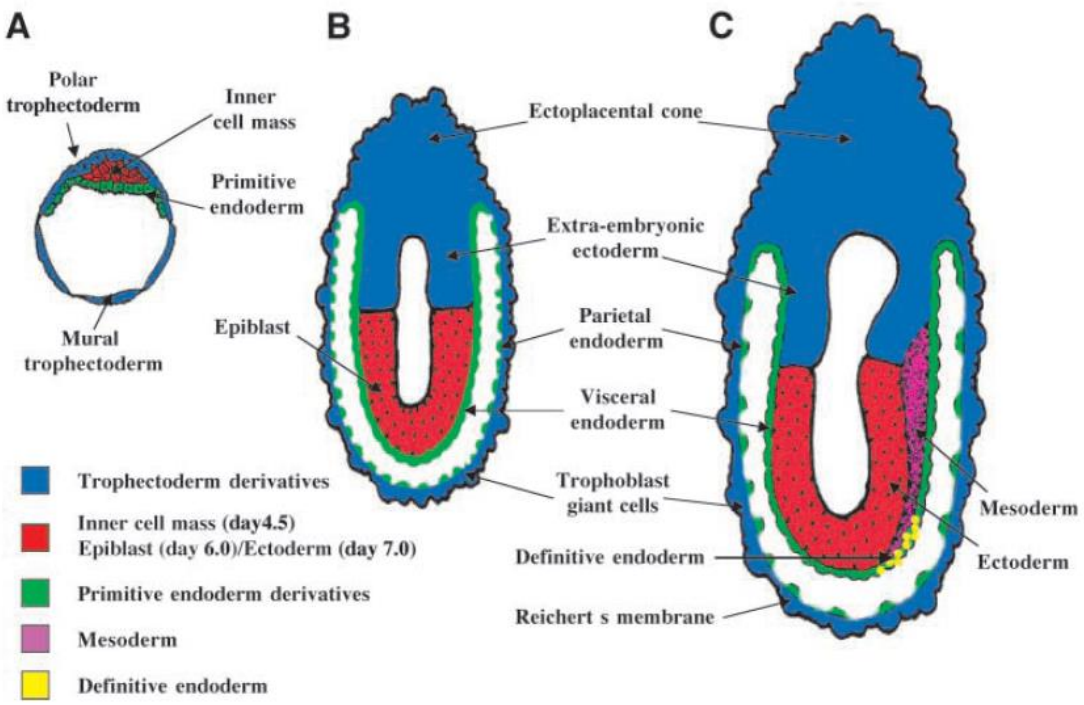


Figure n°2 : Formation des lignages germinaux

Suite à l'implantation du blastocyste à 4,5 dpc (schéma A), l'embryon passe au stade « egg cylinder » (schéma B à 6 dpc et schéma C à 7 dpc). L'endoderme primitif du blastocyste va former l'endoderme pariétal et l'endoderme viscéral. Le trophectoderme mural va produire les « giant cells » du trophectoderme et le trophectoderme polaire formera l'ectoderme extra-embryonnaire et le cône ectoplacental. Ces tissus représentent les annexes extra embryonnaires. La masse cellulaire interne (ICM) va donner naissance à l'épiblaste (B) qui se différencie par la suite en ectoderme, mésoderme et endoderme définitif (C). Ces trois lignages cellulaires composeront tous les tissus embryonnaires.
Source : Tam, P.P.L., Rossant, J., 2003. Mouse embryonic chimeras: tools for studying mammalian development. Dev. Camb. Engl. 130, 6155–6163. doi:10.1242/dev.0089 (Figure n°1).

Lors du développement les cellules transitent de la totipotence du zygote à la pluripotence de l'ICM et de l'épiblaste du blastocyste. Puis les cellules pluripotentes se différencient en cellules souches multipotentes telles que les cellules souches hématopoïétiques (HSC) ou les précurseurs des cellules germinales (PGC). Ces cellules multipotentes deviennent des cellules souches unipotentes comme par exemple les cellules souches spermatogoniales (SSC), qui vont à leur tour se différencier en cellules somatiques nullipotentes, ici les spermatozoïdes. Chaque étape de cette transition se caractérise par des modifications épigénétiques distinctes (Gan et al., 2007; Jaenisch and Young, 2008; Solter, 2006; Surani et al., 2007). Malgré leur spécialisation, les cellules germinales présentent un programme transcriptionnel qui réprime leur programme somatique. Ces cellules sont les seules à exprimer les gènes spécifiques de la pluripotence après la gastrulation et les seules à subir un effacement des marques épigénétiques accumulées lors du développement qui aboutira après fertilisation au retour à l'état totipotent.

1.2.3 Muter les gènes pour les caractériser

Au cours du 19e siècle les avancées technologiques de la microscopie ont accéléré les découvertes en donnant accès à l'échelle subcellulaire. Le botaniste Robert Brown décrivit le noyau cellulaire en 1831 puis Flemming, dans les années 1870, décrivit les fibres de chromatine et le réarrangement de l'ADN dans le noyau au cours de la division cellulaire et Waldeyer nomma les formes compactes de la chromatine « chromosome » (Turner, 1890). Chaque avancée dans la compréhension de la génétique nous incita à modifier les gènes pour les caractériser. L'induction de modifications géniques débuta avec la découverte des effets mutagènes des rayons X sur Drosophila Melanogaster par Muller en 1927, puis en 1944 Charlotte Auerbach publia son premier article sur la caractérisation d'agents mutagènes chimiques comme par exemple la procarbazin, l'ENU (N-ethyl-N-nitrosourea) ou l'EMS (ethyl methanesulfonate) (Auerbach, 1949). Ces nombreux agents chimiques ou physiques favorisent les mutations génétiques de manière aléatoire nécessitant un criblage intensif pour sélectionner les mutants désirés.

Dans les années 1970, la découverte des enzymes de restrictions bactériennes favorisa le développement du génie génétique, permettant ainsi de construire la mutation souhaitée avant de l'insérer dans le génome par les techniques de mutagénèse dirigée (Belizário et al., 2012). Chez la souris, le transfert de gènes a été effectué dans le zygote avant l'apparition des premières lignées de cellules souches embryonnaires. La faculté des virus à infecter des cellules, puis à incorporer leur génome à celui de leur hôte, a été utilisée pour créer les premiers outils de transgénèse que sont les vecteurs viraux. Ces vecteurs sont très efficaces, mais ne peuvent contenir des transgènes de taille importante (supérieure à 10 Kb). En 1974 Jaenish et Mintz produisent des souris génétiquement modifiées par infection virale d'un embryon pré-implantatoire, puis Stewart en 1985 utilise cette technique sur les cellules souches de tératocarcinome et d'embryon (Jaenisch and Mintz, 1974; Stewart et al., 1985). En parallèle, d'autres ont fait le choix comme Gordon en 1980, d'utiliser des techniques de micro-injection pour introduire des vecteurs plasmidiques dans le pronucléus d'un zygote (Gordon et al., 1980). Avec cette technique l'ADN injecté est inséré de manière aléatoire à l'ADN chromosomique par le mécanisme NHEJ (Non-Homologuous End Joining). De multiples copies du transgène, souvent plus de cinquante, s'insèrent ainsi au génome sous forme de concatémères (Belizário et al., 2012). Cette méthode devenue très populaire a été largement utilisée dans la création de souris transgéniques. Toutefois, ces insertions aléatoires peuvent causer plusieurs problèmes. Si le transgène est inséré dans une région génomique inactive (centromère, télomère, régions inter-génique) il sera faiblement exprimé, il faut donc être prudent lorsqu'aucun phénotype n'est observé. La surexpression du transgène dû à des insertions multiples peut être létale durant le développement embryonnaire pour certains tissus ou pour l'embryon entier. L'insertion aléatoire du transgène peut également perturber l'expression de nombreux gènes : dans ce cas le phénotype observé sera indépendant de la mutation insérée et sera causé par des « effet de position » (Belizário et al., 2012). Par ailleurs dans le cas d'insertion multiple du transgène, celle-ci se fait principalement sous la forme de plusieurs concatémères qui au cours des générations ont tendance à être éliminé du génome de l'hôte par recombinaison intramoléculaire. Il y a donc forte réduction voir la perte d'expression de l'élément transgénique.

Après l'apparition des premières lignées de cellules souches embryonnaires, la communauté scientifique s'intéressa au mécanisme génétique de la recombinaison homologue. Ce mécanisme cellulaire de réparation d'ADN, a été utilisé pour développer de nouvelles techniques de mutagénèse dirigée. Ce système de recombinaison a l'avantage de remplacer la séquence génomique ciblée par son homologue qui a été muté *in vitro*. Une seule copie de la mutation est donc insérée de manière spécifique dans la séquence ciblée (Belizário et al., 2012; Bronson and Smithies, 1994). Smithies et ses collaborateurs utilisent en 1985 ce système pour muter de façon spécifique des cellules de carcinomes humains (Smithies et al., 1985). En 1986 Gossler suivi par Thomas en 1987 utilisent cette technique dans les cellules souches embryonnaires murines pour créer des souris génétiquement modifiées (Thomas and Capecchi, 1987; Gossler et al., 1986). Les avantages de cette technique en ont fait la méthode la plus utilisée pour la création de modèles murins.

Plus récemment de nombreuses technologies utilisant des nucléases ont été développées pour couper l'ADN de manière spécifique. La découverte et la mise au point des technologies ZFN (Zinc Finger Nuclease) dans les années 2000, puis des TALENs (Transcription Activator-Like Effector Nucleases) et des CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) au début des années 2010 optimisent encore les techniques actuelles de modification génique. Ces technologies utilisent des endonucléases pour couper la séquence ciblée, où les systèmes de réparation des mécanismes NHEJ ou HR (Homologuous Recombination) vont intervenir. Le système NHEJ insérera des mutations aléatoires lors de la réparation, alors que le mécanisme HR effectuera une recombinaison homologue aboutissant à une mutation spécifique, évènement plus rare. Les technologies CRISPR ont l'avantage d'être utilisables directement sur le zygote. L'inconvénient majeur de ces techniques est l'obtention d'animaux dits « mosaïque » qui portent simultanément différents allèles du locus ciblé : séquence correctement mutée, séquence mutée de manière aléatoire (remplacement ou insertion/délétion) et séquence native non modifiée. L'efficacité de la technologie CRISPR-CAS9 (Yoshimi et al., 2016) permet l'obtention de modèles animaux d'espèces pour lesquelles l'ingénierie génétique était quasiment impossible, voire très complexe, souvent très chère et pour de faibles résultats. Par ailleurs l'engagement de cette technologie permet aussi d'envisager des modifications du génome dans des cellules somatiques primaires ce qui n'était pas possible jusqu'à ce jour.

1.2.4 Etude des tératocarcinomes

Les tératocarcinomes sont des tumeurs issues spontanément de cellules germinales. Composées de nombreux types cellulaires observés chez l'embryon, le terme « tératos » qui signifie « monstre » illustre bien la composition complexe et anarchique de ces tumeurs. Les tératocarcinomes ont été très utilisés au 20^{e} siècle pour étudier la différenciation cellulaire. Askanazy émet l'hypothèse en 1907 que des cellules indifférenciées sont la souche des différents lignages cellulaires présents dans ces tumeurs (Pierce and Dixon, 1959). Needham, Willis, et Nicholson découvrent dans les années 1930-1940 que les cellules différenciées retrouvées dans les tératocarcinomes sont issues des trois lignages germinaux de l'embryon et cela sera confirmé par Pierce en 1958 (Pierce and Dixon, 1959). En 1964 Kleinsmith et Pierce veulent savoir si toutes ces cellules différenciées sont issues d'un seul et même type cellulaire. Pour cela, ils injectent une seule cellule

indifférenciée de tératome dans l'espace intrapéritonéal d'une souris et constatent la formation de nouveaux tératomes (Kleinsmith and Pierce, 1964; Solter, 2006). Ils concluent donc que les tératomes contiennent un type cellulaire dont le potentiel de développement est très important. En 1967 Tarkowski s'intéresse à la compétence des blastomères à former tous les lignages cellulaires d'un organisme adulte, tandis que Finch and Ephrussi cultivent *in vitro* les cellules indifférenciées des tératomes et établissent les lignées de carcinome embryonnaires (Finch and Ephrussi, 1967). Ces lignées EC (Embryonal Carcinoma cell lines), souvent aneuploïdes, colonisent peu l'embryon et se différencient mal *in vitro*. En 1970 Leroy C. Stevens reproduit des tératocarcinomes en greffant des embryons sur des testicules de souris et maintient ces tumeurs contenant des cellules indifférenciées sur plus de 40 générations. Il montre ainsi que des cellules peuvent être maintenues dans un stade indifférencié sur de longues périodes (lignée cellulaire OTT6050) et que les cellules indifférenciées de tératomes sont identiques ou très similaires aux cellules embryonnaires (Stevens, 1970). Pour approfondir la comparaison des cellules de tératomes et des cellules embryonnaires, Brinster en 1974 et Mintz en 1975 injectent des cellules de lignées EC dans des blastocystes pour évaluer leur faculté à participer à un développement normal (Brinster, 1974; Illmensee and Mintz, 1976). Après injection dans un embryon ces cellules contribuent parfois au développement du fœtus montrant que la tumorigénicité peut être contrôlée par l'environnement cellulaire et que les cellules EC conservent leur identité embryonnaire (Brinster, 1974). Des cultures de fibroblastes STO (cellules SIM Thiocyanine et Ouabain résistantes) sont utilisées pour cultiver ces cellules EC et favorisent leur maintien dans un état indifférencié (Martin and Evans, 1975). Mintz démontrera que les cellules de cette lignée s'auto-renouvellent sans différenciation pendant les 8 années de leur culture *in vivo*. Pour connaitre le potentiel de développement des cellules EC, Beatrice Mintz et Karl Illmensee en 1976 injectent une seule cellule de la lignée OTT6050 dans des blastocystes et obtiennent des souris chimériques dont les tissus embryonnaires ont été colonisés par la cellule micro-injectée (Illmensee and Mintz, 1976; Diwan and Stevens, 1976).

1.2.5 Découverte des cellules souches embryonnaires murines

En 1974 et 1975 Martin et Evans identifient les cellules indifférenciées dont sont issus les tératomes (Solter, 2006) : elles prolifèrent indéfiniment et produisent des tératomes lors d'injections sous-cutanées. Ces cellules aux larges noyaux forment de petites colonies compactes qui se développent en sphères, puis en corps embryoïdes simples, SEB (Simple Embryoid Bodies). Ces SEB, composés de cellules souches en leur centre, sont recouverts par une couche de cellules épithéliales et évoluent en Cystic Embryoid Bodies, où de nombreux types cellulaires se développent autour d'une cyste (Doetschman et al., 1985; Martin and Evans, 1975) (figure n°3).

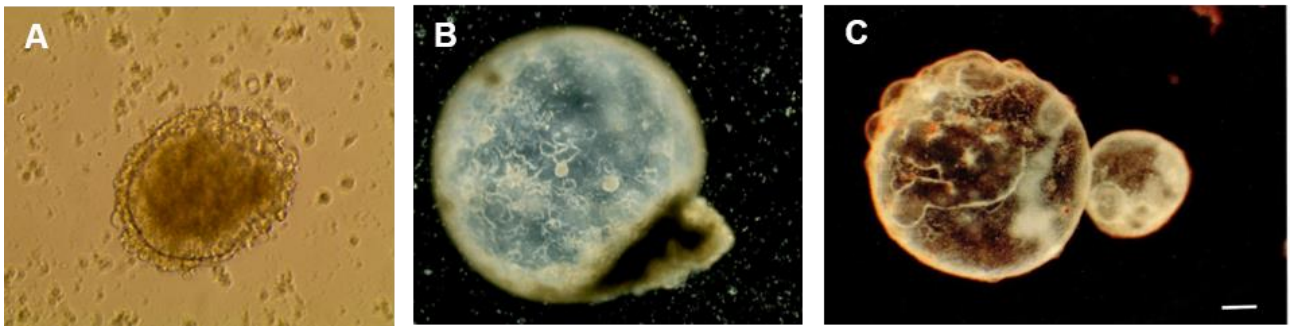


Figure n°3 : Différenciation in vitro : le CEB

A : Simple Embryoid Body. B et C : Cystic Embryoid Body. Ces CEB ont été formés par des cellules ES au bout de 12 jours de culture en condition non adhérente. C : Sur la cyste sont visibles des îlots de cellules sanguines (en orange), ainsi que des zones de cellules mésodermales (zones blanches) et des compartiments de cellules endodermales. Echelle = 200 µm. Source de la photo C : Doetschman, T.C., Eistetter, H., Katz, M., Schmidt, W., Kemler, R., 1985. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. J. Embryol. Exp. Morphol. 87, 27–45 (Figure n°6).

Des cultures de fibroblastes sont utilisées comme matrice nourricière pour la culture d'embryon de différents stades. Cette technique a permis l'établissement de lignées de cellules indifférenciées semblables aux lignées EC, mais dont le karyotype est normal. Suite à leur injection dans l'embryon, ces cellules colonisent largement le fœtus et donnent naissance à des souris hautement chimériques. Ces chimères sont capables de transmettre à leur descendance le matériel génétique des cellules injectées. Ces cellules issues d'embryons pré implantatoires dont le potentiel de développement est élevé sont initialement nommées EK pour « Embryonal line with normal Karyotype » (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981) et constituent les premières lignées de cellules souches embryonnaires de souris (Embryonic Stem cells) (Chambers and Smith, 2004). Chaque cellule de cette lignée peut former des corps embryoïdes qui se différencient dans les trois principaux lignages embryonnaires après six semaines de culture. Ces cellules ES sont capables d'auto-renouvellement sans différenciation sous des conditions de culture adaptées et reprennent leur développement normal en contribuant à tous les lignages embryonnaires lorsqu'elles sont injectées dans un blastocyste. Au regard de leurs nombreuses similitudes, l'ICM et plus précisément l'épiblaste préimplantatoire a été identifié comme étant le tissu originel des cellules ES. Cette théorie sera plus tard confirmée par la micro dissection de blastocystes (Batlle-Morera et al., 2008; Brook and Gardner, 1997).

Les cellules ES désormais établies en lignées cellulaires vont être largement étudiées afin de mieux connaître leurs facultés de différenciation et de déterminer leurs rôles dans le développement embryonnaire. L'avantage des cellules pluripotentes est la possibilité de les cultiver indéfiniment *in vitro*. Cela permet, à la suite de leur modification génique, de les caractériser et de les sélectionner avant leur incorporation dans un embryon (Bradley et al., 1984; Gossler et al., 1986). L'obtention de cellules pluripotentes euploïdes et le développement de la technique de microinjection a permis d'envisager la « construction » d'individus génétiquement modifiés. Les cellules ES ayant la capacité de se différencier en cellules germinales, leur micro-injection dans des embryons est un très bon outil pour obtenir des souris capables de transmission germinale et établir ainsi une nouvelle lignée murine. Pour mieux appréhender ce nouvel outil qu'est la cellule ES, la communauté scientifique s'est intéressée à leur origine embryonnaire afin de définir les conditions expérimentales qui

aboutissent à une transmission germinale. Après cultures et modifications *in vitro*, les cellules ES sont réintroduites dans l'embryon au stade développemental dont elles sont issues, le blastocyste préimplantatoire de 3,5 dpc. Les premiers paramètres testés sont le stade développemental dont sont issus les cellules et la quantité de cellules injectées dans le blastocyste. En 1984 Bradley et Robertson obtiennent des GLT (Germ Line Transmission) avec les lignées de cellules pluripotentes de tératocarcinome qu'ils utilisent en injectant un minimum de dix cellules par blastocyste (Bradley et al., 1984). Lorsqu'ils réduisent ce nombre à 3 ou 5 cellules ils ne constatent plus de transmission germinale. Gardner observe en 1985 que les lignées de cellules ES établies à partir d'embryons au stade post-implantatoire (6 dpc : stade early egg cylinder) colonisent moins l'embryon que celles obtenues à partir d'embryons pré-implantatoires (entre 3 et 4,5 dpc : stade blastocyste). Cette diminution de colonisation de l'embryon par des cellules ES de stade post-implantatoire est également décrite par Wells en 1991 (Wells et al., 1991). En 1989, Robertson et Beddington micro-injectent une ou dix cellules ES par blastocyste et analysent les fœtus obtenus à dix jours de gestation pour déterminer le niveau de colonisation des trois feuillets embryonnaires : trophectoderme, primitif endoderme, et épiblaste. Avec une seule cellule injectée, 22% des souris obtenues sont des chimères dont le chimérisme maximal avoisine les 50%. Pour dix cellules injectées ils obtiennent 50% de souris chimères, dont la moitié ont un chimérisme supérieur à 50%. Lors de leurs analyses d'embryons et de souris chimères, ils observent que les cellules ES participent à l'épiblaste (ectoderme primitif) de l'embryon au stade blastocyste et contribuent ensuite en grande partie aux tissus embryonnaires (Beddington and Robertson, 1989). En 1990 Andras et Rossant publient leurs travaux sur la faculté des cellules ES à participer seules au développement d'un fœtus de souris (Nagy et al., 1990). Ils utilisent la technique de l'agrégation d'embryons tétraploïdes pour comparer le développement embryonnaire effectué par un ICM complet et celui obtenu avec des lignées de cellules ES. Les résultats de chimérisme sont similaires entre les ICM « précoces » et les cellules ES lorsqu'ils utilisent 15 à 20 cellules. Avec cette méthode Andras et Rossant obtiennent des résultats qui confirment la pluripotence des ESC. En 2004, Jaenish et Wang démontrent que seulement 10 à 30% des cellules ES micro-injectées parviennent à coloniser l'ICM du blastocyste hôte. Ils précisent ainsi que le niveau de colonisation de l'embryon hôte ne dépend pas uniquement du nombre de cellules ES micro-injectées mais aussi et surtout de leur niveau de pluripotence (Wang and Jaenisch, 2004).

1.2.6 Un Marqueur Spécifique : les Phosphatases Alcalines

Mulnard en 1955 a reporté la présence de phosphatases alcalines (PAL) chez les embryons de mammifères aux stades préimplantatoires. Depuis cette découverte, les PAL ont été au centre de très nombreuses études, visant à identifier les caractéristiques spatiotemporelles de leur expression (Dehghani et al., 2000). En 1973 Edward G Bernstine fait une corrélation entre l'expression des phosphatases alcalines mesurées dans les tératocarcinomes et leur composition cellulaire (Berstine et al., 1973). Il observe dans les cellules de carcinome embryonnaire une expression des PAL jusqu'à cent fois supérieure à celle des cellules somatiques. Suite à leur différenciation les cellules de carcinomes embryonnaires expriment nettement moins de PAL. Cette enzyme est détectée à la surface des cellules embryonnaires des stades 2-4 cellules jusqu'au stade blastocyste, où l'expression se localise sur les cellules de l'ICM (Johnson et al., 1977; Mulnard and Huygens,

1978). Les PAL se concentrent dans les zones intercellulaires des cellules pluripotentes : les jonctions ICM-trophoblastes sont dépourvues de PAL, alors que les jonctions ICM-ICM sont riches en PAL au même titre que les jonctions inter-blastomèriques (figure n°4). Au bout de cinq jours de développement les cellules de l'ectoderme primitif conservent une expression des PAL similaire à celle de l'ICM tandis que les cellules de l'endoderme et du trophectoderme expriment une quantité de PAL qui décroit au fil de leur différenciation. La PAL devient le premier marqueur des cellules pluripotentes. En 1989 il a été découvert que la PAL présente chez l'embryon est biochimiquement différente des isozymes connus jusqu'alors (Dehghani et al., 2000). Ce nouvel isotype nommé EAP (Embryonic Alkaline Phosphatase) est codé par le gène Akp5.

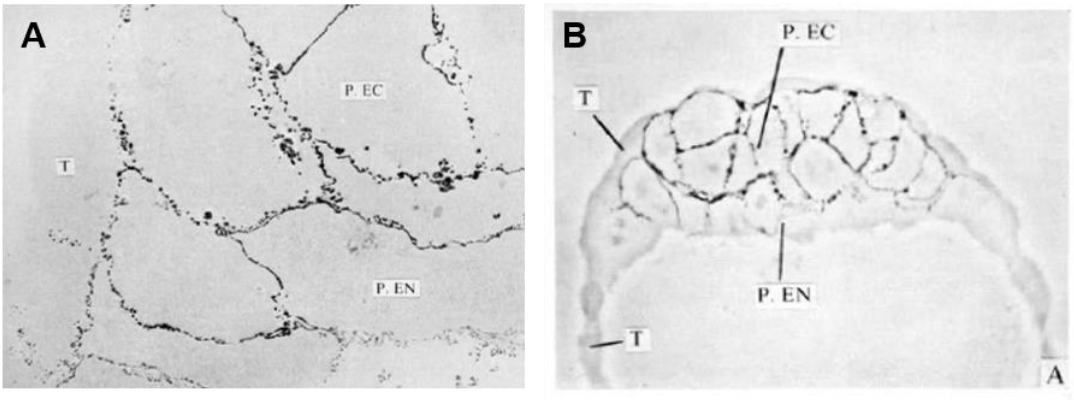


Figure n°4 : Détection de PAL sur les cellules du blastocyste tardif (4 dpc) par microscopie electronique.

A- Les jonctions inter-cellulaires des cellules de l'ectoderme primitif (P.EC) présentent de nombreuses phosphatases (points noirs) à l'inverse des jonctions inter-cellulaires des cellules du trophectoderme (T) et de l'endoderme primitif (P.EN), qui ne sont pas en contact avec des cellules de l'ectoderme primitif. Source : (Mulnard and Huygens, 1978) Mulnard, J., Huygens, R., 1978. Ultrastructural localization of non-specific alkaline phosphatase during cleavage and blastocyst formation in the mouse. J. Embryol. Exp. Morphol. 44, 121–131 (figure n°4).

1.2.6.1 Caractérisation

La phosphatase alcaline (EC3.1.3.1) est une métalloglycoprotéine homodimérique dont les sites actifs contiennent deux atomes de zinc et un de magnésium (Millán, 2006). Cette enzyme est liée aux membranes cellulaires par l'intermédiaire des GPI (glycosylphosphatidylinositol) dans l'espace extracellulaire (Camolezi et al., 2002; Murdoch et al., 1978). Cette enzyme au pH optimal alcalin (pH 10,5) est également active à des pH neutres, elle est dotée d'une activité phosphatase lorsqu'elle hydrolyse un phosphate mono-ester pour libérer un phosphate inorganique et une fonction alcool, et d'une activité phosphotranférase (Ciancaglini et al., 1997) en présence d'une forte concentration de molécules acceptrices de groupement phosphate. Cette fonction lui permet d'importer des groupements phosphates dans la cellule, indispensables à de nombreux mécanismes cellulaires dont la synthèse de macromolécules phosphatées telles que les nucléotides, la phosphorylation de protéines... Parmi les substrats majoritaires de la PAL nous retrouvons le PPi et l'ATP. Les PAL sont capables d'hydrolyser les molécules d'ADN et d'ARN, exerçant ainsi un contrôle sur leur synthèse (Warnes, 1972). Au vu de sa localisation cellulaire, de son abondance dans les reins et l'intestin et de sa capacité à hydrolyser

l'ATP, la PAL serait impliquée dans le transport actif de molécules à travers la membrane plasmique (Bucci and Murphy, 1995).

Les phosphatases alcalines ont été conservées par de très nombreux organismes au cours de l'évolution, de la bactérie jusqu'à l'homme (Whyte et al., 1995). Chez la souris comme chez l'homme, les phosphatases alcalines sont représentées sous quatre isoformes codées par des loci distincts. Ces isoformes sont caractéristiques de certains tissus et stades du développement embryonnaire. Par comparaison avec l'homme, nous retrouvons chez la souris la TNAP, codée par le gène Akp2 et la IAP, représentée sous deux isoformes distincts : dIAP (duodenum IAP), codé par le gène Akp3, et gIAP (gut IAP), codé par le gène Akp6, alors que les PLAP et GCAP semblent être remplacées par un même isoforme nommé EAP (Embyonic Alkaline Phosphatase) codé par le gène Akp5 et exprimé par les cellules embryonnaires aux stades préimplantatoires, puis par les testicules.

L'embryon exprime les isoformes TNAP et EAP. L'activité de l'EAP est associée avec la compaction des blastomères et la séparation du trophectoderme et de la masse cellulaire interne au cours du développement préimplantatoire. Jusqu'à l'implantation, l'EAP est plus exprimée que la TNAP, après l'implantation le ratio d'expression de ces deux isoformes s'inverse : l'expression de l'EAP est réduite, tandis que celle des TNAP augmente (Hahnel et al., 1990). Les PAL détectées chez l'embryon précoce par Edward G Bernstine en 1973 correspondaient donc à l'isoforme EAP (Millán, 2006). Les études d''invalidation génique des gènes Akp2 (TNAP), Akp3 (IAP) et Akp5 (EAP) ont respectivement démontré un défaut de formation du squelette, une altération du transport des acides gras et un retard de développement des embryons au stade préimplantatoire (Hahnel et al., 1990; Lei et al., 2013).

1.2.6.2 Au cours du développement embryonnaire

Au cours du développement préimplantatoire de l'embryon une série de changements cellulaires et moléculaires accompagnent la prolifération des cellules embryonnaires pour convertir le zygote en blastocyste. Ces changements sont indispensables aux différentes étapes du développement tels que le remodelage de la chromatine du zygote, l'activation du génome embryonnaire, l'activation des protéines kinases, la compaction des blastomères et la formation du blastocèle (Dehghani et al., 2000). L'isoforme EAP fait partie des premiers gènes transcrits indispensables à la première transition morphologique et génétique de l'embryon (Dehghani et al., 2000).
En tant que PAL majoritairement exprimée chez l'embryon préimplantatoire, l'invalidation du gène Akp5 perturbe le développement embryonnaire. Le développement de chaque stade est ralenti avec un taux de dégénération plus important. Un retard de développement allant jusqu'à 24h est observé avant le stade 8 cellules, accompagné d'une diminution du nombre de cellules. La gestation est également perturbée avec une période rallongée et une taille des portées réduite (Dehghani et al., 2000).

1.2.6.3 Pendant la gestation

Chez les rongeurs et les primates, l'implantation du blastocyste dans l'utérus est un processus d'attachement et d'invasion de l'épithélium luminal par l'embryon. Le succès de l'implantation d'un embryon nécessite un remodelage rapide des cellules du stroma utérin, réarrangement cellulaire nommé décidualisation. Il s'agit de la prolifération et de la différenciation des cellules endométriales en cellules déciduales. Ce processus permet la mise en place de l'interface embryon/organisme maternel pendant l'implantation (Lee et al., 2007). Une corrélation a été établie entre cette décidualisation et l'activité très élevé des PAL dans les cellules du stroma utérin (Finn and Hinchliffe, 1964). Lors de l'implantation du blastocyste dans la paroi utérine, les PAL sont impliquées dans le transport de métabolites entre les cellules épithéliales de l'utérus et celles du trophectoderme du blastocyste (Bucci and Murphy, 1995). Chez la souris, le dosage des phosphatases alcalines dans l'utérus a révélé une augmentation dans l'activité des PAL pendant la période d'implantation (Murdoch et al., 1978), puis leur répression à la suite de l'implantation (Bucci and Murphy, 1995).

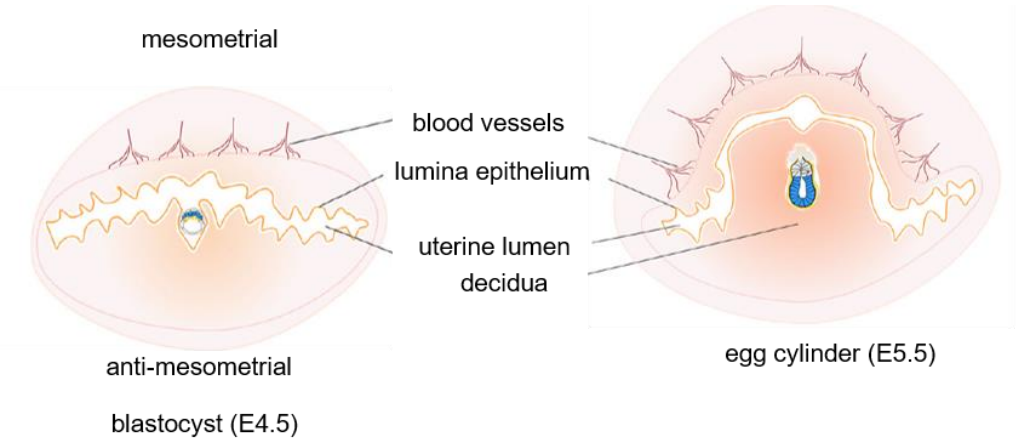


Figure n°5 : La décidualisation

Après s'être débarrassé de la zone pellucide, le blastocyste adhère à l'épithélium luminal de l'utérus et envahit le stroma de la partie anti-mesométriale de l'utérus. En réponse à ce stimuli, les cellules du stroma utérin se différencient en cellules déciduales qui vont réguler l'invasion du trophoblaste, permettre les échanges nutritifs et gazeux et assurer une tolérance immunitaire des tissus maternels envers le fœtus (E4,5). Un jours plus tard (E5,5), les cellules déciduales prolifèrent rapidement pour permettre le soutien du blastocyste lors de son développement post-implantatoire, qui débute par le stade « egg cylinder ». Source : Bedzhov, I., Graham, S.J.L., Leung, C.Y., Zernicka-Goetz, M., 2014. Developmental plasticity, cell fate specification and morphogenesis in the early mouse embryo. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 369. doi:10.1098/rstb.2013.0538 (figure n°4).

1.2.6.4 Mécanisme d'immunité innée

La PAL est capable de déphosphoryler (Lei et al., 2013) le lipide A contenu dans les lipopolysaccharides (LPS) des bactéries de type gram négatif. Cette endotoxine perd ainsi la faculté de se fixer aux récepteurs cellulaires et donc sa toxicité (Koyama et al., 2002). Cela permettrait à la PAL exprimée par les cellules épithéliales de la paroi intestinale et de la paroi utérine de combattre les infections, causes d'infertilité et de défaut de gestation (Bolean et al., 2015; Millán, 2006; Nakano et al., 2004; Poelstra et al., 1997). La démonstration que l'administration orale de LPS dans l'intestin induit deux heures plus tard une élévation de la concentration des

IAP soutient cette théorie de détoxification (Koyama et al., 2002). De plus, la forte concentration des PAL à la surface luminale des cellules épithéliales de l'intestin et de l'utérus, zones de contact entre l'organisme et l'environnement extérieur, corrèle avec ce rôle de barrière contre les infections. Les PAL pourraient donc, en addition de leurs autres fonctions, faire partie des mécanismes de défense de l'immunité innée (Koyama et al., 2002).

1.2.6.5 Une régulation des PAL

De manière générale les PAL, par leur fonction de transport actif, jouent un rôle dans les échanges cellulaires impliqués dans de nombreux mécanismes dont l'ossification, la différenciation embryonnaire et la décidualisation. Leur action de déphosphorylation prend également une place importante dans la protection de l'organisme contre les infections dues aux bactéries gram négatif.

Dans le contexte de l'ossification, les TNAP ont été identifiées comme marqueurs de différentiation des ostéoblastes. Leur expression est stimulée par l'activation de la voie BMP/SMAD par fixation des Bone-Morphogenetic-Protein-2 (BMP2) à leur récepteur, facteur essentiel de la différenciation des ostéoblastes et des ostéoclastes (Kim et al., 2004).
Pendant la gestation, plus précisément lors du processus d'implantation de l'embryon, les BMP2 sont décrites comme facteurs importants de la décidualisation (Lee et al., 2007). Avant l'implantation, elles ne sont pas exprimées : leur expression débute lors de l'implantation dans la zone de contact avec le blastocyste. Parmi les nombreux facteurs de la famille BMP exprimés pendant la gestation, les BMP2 sont les seuls qui aient été spatiotemporellement corrélés avec le processus d'implantation. Sans BMP2 l'épithélium utérin ne parvient pas à initier le processus de décidualisation et aucun site d'implantation ne peut donc être formé. Parmi les voies de signalisation impactées par l'invalidation de BMP2 nous trouvons la voie métabolique Wnt/B-Catenin/TCF (Lee et al., 2007), impliquée par ailleurs dans le maintien de la pluripotence.

1.2.7 La pluripotence

Compte tenu de la grande diversité des mécanismes qui régissent l'auto-renouvèlement et la pluripotence des cellules ES murines je citerai uniquement certaines voies de signalisation qui sont favorisées ou inhibées par les réactifs que nous utilisons dans mon service pour la culture de cellules pluripotentes. Il s'agit des voies de signalisation BMP/Smad, LIF/STAT, Wnt/β-catenin, PIP3/Akt, et Ras/Raf/ERK.
Au niveau génomique, je me focalise sur les trois principaux facteurs de transcription de la pluripotence (Nanog, Oct4 et Sox2) et sur un mécanisme épigénétique caractéristique des cellules pluripotentes.

1.2.7.1 Voie de signalisation BMP/Smad

Les protéines de la famille « Bone Morphogenetics Proteins » font partie de la superfamille des TGF-β (Transforming Growth Factor B), ils se fixent à des récepteurs de type I (ALK2, ALK3, ALK6) ou de type II (BMPRII, ActRII, ActRIIB) et activent la voie de signalisation SMAD (figure n°6). Après avoir été phosphorylées, les différentes catégories de protéines SMAD (SMAD1, SMAD5, SMAD8) forment des complexes qui sont transportés dans le noyau pour induire l'expression de nombreuses protéines dont celles de la famille Id (Inhibitor of differentiation) (figure n°6). Les protéines Id inhibent les facteurs de transcription bHLH (basic helix–loop–helix) impliqués dans de nombreuses voies de différenciation cellulaire, dont la détermination neurale. En présence de LIF seul (sans sérum, ni BMP4) les cellules ES s'engagent dans la voie de différenciation neuronale. Lorsque le BMP4 est utilisé seul, les cellules ne peuvent pas se différencier en neuro-ectoderme, mais l'engagement dans la voie du mésoderme est facilitée, l'expression du facteur de transcription Brachyury augmente (Miyanari and Torres-Padilla, 2012). En absence de sérum, SMAD peut activer les différenciations non-neurales, alors que STAT3 réprime ces mêmes voies de différenciation. Ainsi, en absence de LIF, la voie BMP induit un signal de différenciation, et en présence de LIF ce signal induit l'auto-renouvèlement. La synthèse des BMP est induite par l'activation de la voie Wnt/β-Catenin/TCF (Okita and Yamanaka, 2006).

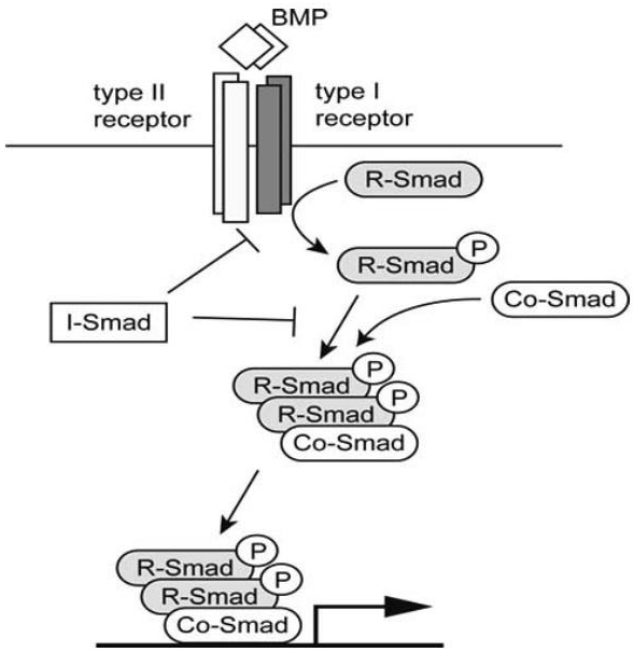


Figure n°6 : La cascade de signalisation BMP/Smad

Les récepteurs des cytokines de la famille des TGF-β sont des complexes hétéromériques constitués de récepteurs à sérine-thréonine kinase de types 1 et 2. La fixation des protéines BMP à leur récepteur membranaire induit la phosphorylation de R-smad par le récepteur sérine-thréonine kinase de type 1. Les molécules R-Smad phosphorylées se lient aux molécules Co-smad pour former un complexe qui est par la suite transporté dans le noyau. Les complexes R-smad/Co-smad s'accumulent dans le noyau et régulent la transcription de leurs gènes cibles. Les protéines I-smad inhibent la formation de ces complexes Smad par de nombreux mécanismes. Chez la souris, la protéine BMP4 induit l'expression des protéines Id et empêche la différentiation neuronale alors que chez l'homme ces protéines induisent la différenciation des cellules ES. Source: Okita, K., Yamanaka, S., 2006. Intracellular signaling pathways regulating pluripotency of embryonic stem cells. Curr. Stem Cell Res. Ther. 1, 103–111 (Figure n°2).

1.2.7.2 Voie de signalisation LIF/gp130/STAT3

La co-culture sur fibroblastes embryonnaires de souris (Mouse Embryonics Fibroblastes) céda la place en 1987 au premier milieu de culture permettant le maintien de la pluripotence des cellules souches (Smith and Hooper, 1987). Ce milieu, conditionné par les « buffalo rat liver » cells, contenait un polypeptide qui supprime la différenciation des cellules ES. La cytokine impliquée, nommée DIA (Differentiation Inhibitor Activity), appartient à la famille de l'IL-6 et rend inutile le recours aux MEF (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981; Smith et al., 1988).

Le DIA, par analogie de structure et de fonction avec l'inhibiteur HILDA/LIF (Human InterLeukine for DA cells/Leukemia Inhibitor Factor) utilisé pour la culture de cellules humaines, a été renommé LIF. Le LIF se fixe directement au récepteur transmembranaire LIFR qui recrute la sous unité gp130 pour former un complexe trimérique (Chambers and Smith, 2004). Ce complexe recrute les protéines STAT1, STAT3 (Signals Transducers And Activators of Transcription) et SHP2 qui sont phosphorylées par la tyrosine kinase JAK (Janus Kinase) fixée au récepteur, ce qui active les voies de signalisation STAT3, SMAD, PI3K/Akt et Ras/ERK. Les protéines STAT activées se dimérisent et sont transportées dans le noyau, où elles exercent leur fonction de facteur de transcription (figure n°7). L'activation de STAT3 joue un rôle important dans le maintien de la pluripotence et serait suffisant pour l'auto renouvellement des ES en présence de sérum (Okita and Yamanaka, 2006). La suppression du LIF ou l'inhibition de STAT3 induisent la différenciation des cellules ES (Pan and Thomson, 2007).
L'action coopérative des deux cytokines LIF et BMP4 maintient les cellules souches dans leur état pluripotent même en absence de sérum (Chambers and Smith, 2004; Okita and Yamanaka, 2006). Une étude identifie la cadhérine E comme cible clé de l'action coopérative du LIF et du BMP4 (Chou et al., 2008).

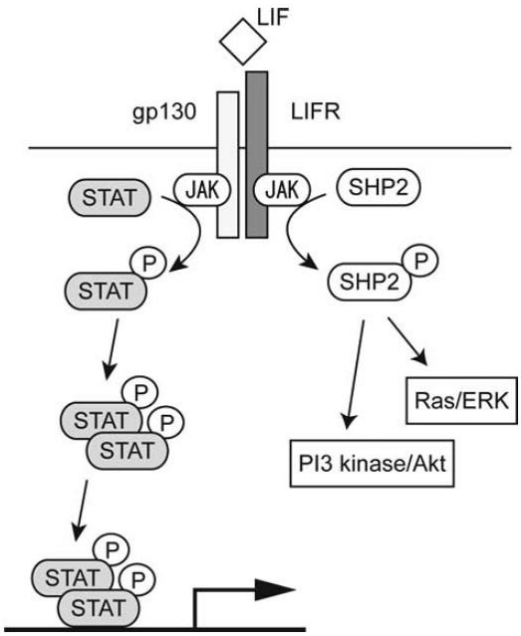


Figure n°7 : La voie de signalisation LIF/gp130/STAT3

Lorsque le LIF se lie à son récepteur hétéromérique, composé des sous-unités LIFR et gp130, de nombreuses voies de signalisation sont activées, dont les voies STAT3, Ras/ERK, et PI3K. La voie de signalisation STAT3 est essentielle pour

la maintenance de la pluripotence des cellules ES murines, mais ce n'est pas le cas pour les cellules ES de primates. Source : Okita, K., Yamanaka, S., 2006. Intracellular signaling pathways regulating pluripotency of embryonic stem cells. Curr. Stem Cell Res. Ther. 1, 103–111 (Figure n°1).

1.2.7.3 Voie de signalisation Wnt/B-Catenin/TCF

Les Cadhérines E, impliquées dans l'adhésion cellulaire, modulent les niveaux intracellulaires de β-caténine (Chou et al., 2008). Lorsque Wnt se fixe à ses récepteurs Frizzled et LRP5/6, le complexe enzymatique APC/Axin/GSK3B (Adenomatous Polyposis Coli gene /Axin/glycogen synthase kinase 3b) est inhibé et ne provoque plus la dégradation des β-caténines par le protéasome (Watanabe et al., 2006). La concentration cytoplasmique de la β-caténine augmente alors jusqu'à ce qu'une partie des molécules entrent dans le noyau (figure n°8). A ce moment-là, la β-caténine forme des hétérodimères avec les facteurs de transcription LEF (Lymphoid Enhancer Factor) et TCF (T Cell Factor), dont les sites de fixation co-localisent avec ceux de Nanog et Oct4. LEF et TCF modulent l'expression des gènes de la pluripotence et de l'auto renouvèlement. L'inhibition de GSK3β induite par l'activation de cette voie est ainsi suffisante pour maintenir la pluripotence des cellules souches (Nichols and Smith, 2009; Watanabe et al., 2006).

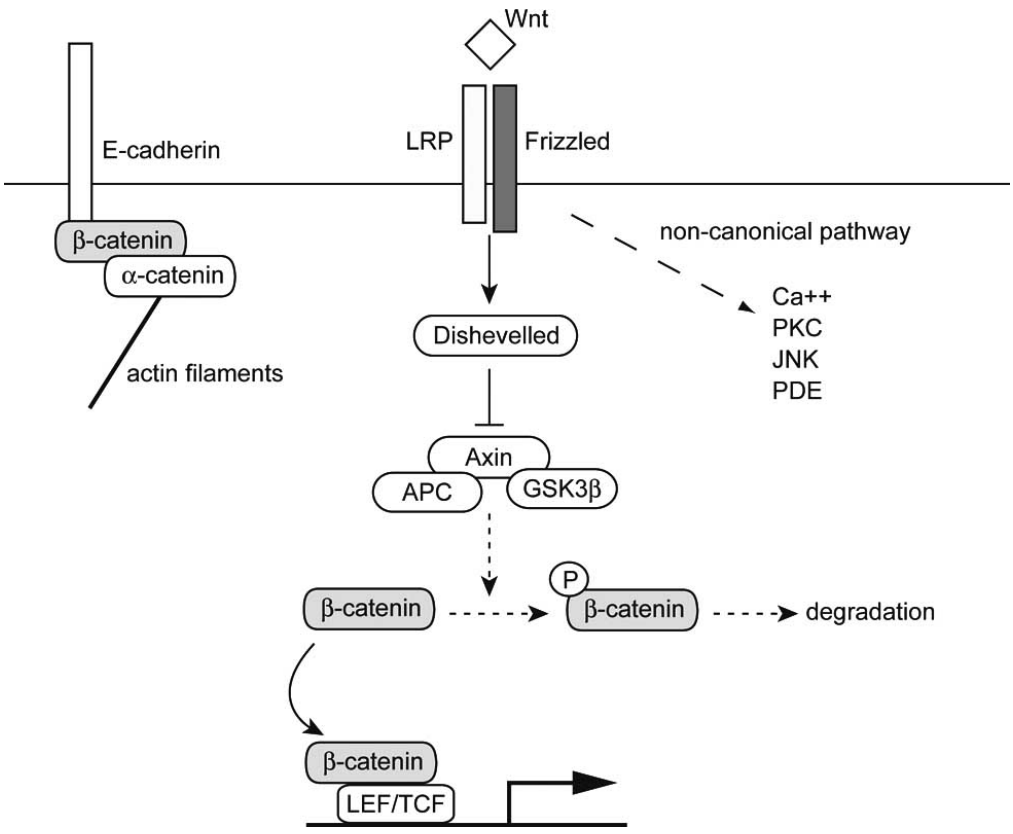


Figure n°8 : La voie de signalisation activée par Wnt

La liaison de la molécule Wnt à son récepteur composé de Frizzled et LRP5 ou LRP6 active la molécule Dishevelled, qui inhibe alors le complexe APC/Axin/GSK3β. Ce complexe, lorsqu'il est actif, phosphoryle la β-caténine pour qu'elle soit dégradée. L'inactivation de ce complexe entraine une augmentation de la concentration nucléaire des β-caténines, qui active les facteurs de transcriptions LEF/TCF. Cette voie de signalisation est liée à l'auto-renouvellement des cellules ES

chez l'homme comme chez la souris. Source : Okita, K., Yamanaka, S., 2006. Intracellular signaling pathways regulating pluripotency of embryonic stem cells. Curr. Stem Cell Res. Ther. 1, 103–111 (Figure n°3).

1.2.7.4 Facteurs de croissance/PIP3/Akt1

Après activation via de nombreux facteurs de croissance (FGF, EGF, PDGF) les PI3 kinases phosphorylent l'inositol phospholipide (PIP2 devient PIP3). Suite à la fixation du PIP3, Pdk1 active Akt1, un régulateur important de la prolifération des cellules ES, impliqué dans le maintien de la pluripotence. La voie PI3 kinase (Phosphatidyl Inositol 3 kinase) est activée par des facteurs exogènes comme l'insuline, mais aussi endogènes comme Eras (ES cell-expressed Ras), protéine spécifique des cellules ES constitutivement active qui se lie à la kinase PI3 pour l'activer (Okita and Yamanaka, 2006). Akt peut aussi inhiber la GSK3β par phosphorylation et ainsi permettre l'accumulation de β-caténine qui aboutira au maintien de l'état pluripotent (Watanabe et al., 2006) (figure 9).

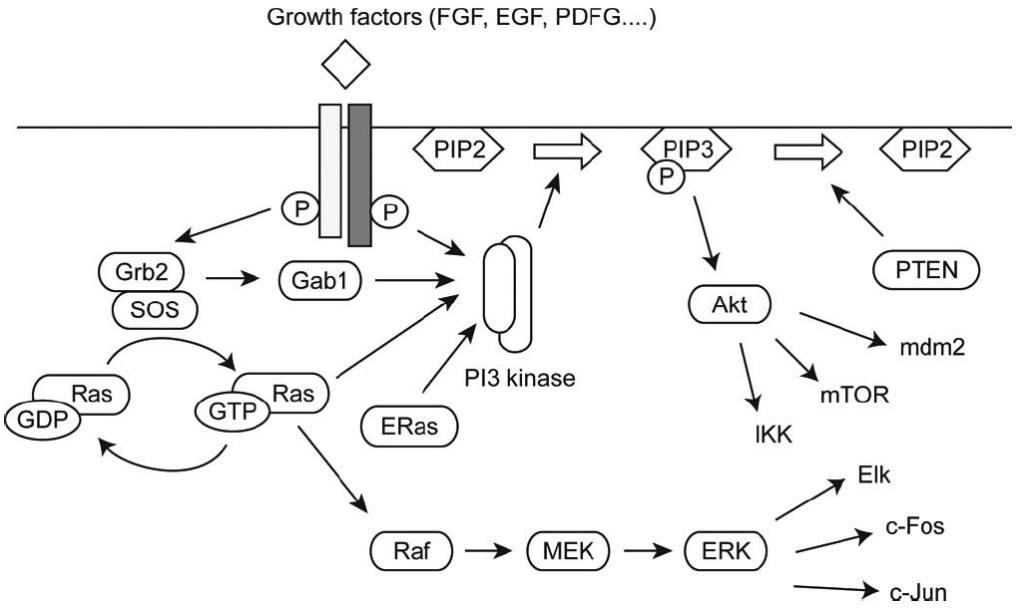


Figure 9 : Activation des voies de signalisation Ras/ERK et PI3K par la fixation de facteurs de croissance

La fixation des facteurs de croissance à leur récepteur provoque la phosphorylation de ces derniers, ou des protéines qui leur sont associées. La protéine adaptatrice Grb2 se fixe aux résidus de tyrosine phosphorylés par son domaine SH2 et active ainsi la voie de signalisation Ras/ERK par l'intermédiaire du facteur SOS qui est un échangeur de GTP-GDP. L'activation de la voie Ras/ERK induit alors la différenciation des cellules ES murines. La voie PI3K peut être activée par trois modes différents. En premier lieu, Gab1 peut se lier à Grb2, induisant la phosphorylation de tyrosines, puis la voie PI3 kinase. Le deuxième mode d'activation de PI3K est la fixation de la sous-unité régulatrice p85 à une tyrosine phosphorylée du récepteur. La dernière alternative est l'activation de PI3K par la molécule Ras activée, qui provoque la localisation membranaire de la sous-unité catalytique de la PI3K et ainsi son activation. Chez les cellules ES murines, ERas active constitutivement la voie PI3K et PTEN est un régulateur négatif de la voie PI3K. La voie PI3K peut promouvoir l'auto-renouvèlement des cellules souches embryonnaires murines par suppression de la voie ERK. Source : Okita, K., Yamanaka, S., 2006. Intracellular signaling pathways regulating pluripotency of embryonic stem cells. Curr. Stem Cell Res. Ther. 1, 103–111 (Figure 4).

1.2.7.5 Voies de signalisations Ras/Raf/ERK

La protéine Ras appartient à la superfamille des protéines de faible poids moléculaire qui lient le GTP (GTP-binding proteins). De nombreux facteurs de croissance sont capables d'activer la voie Ras par liaison avec leurs récepteurs de type tyrosine kinase. Après phosphorylation Ras active de nombreux acteurs tels que la kinase sérine/thréonine Raf, qui active à son tour ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase) et mène à l'activation de facteurs de transcriptions parmi lesquels Elk, c-Fos et c-Jun (figure 9). La voie Ras/ERK est impliquée dans la prolifération, la survie et la différenciation de nombreux types cellulaires (Okita and Yamanaka, 2006). La stimulation de la voie ERK par le FgF4 et d'autres facteurs induit la différenciation des cellules ES murines, alors que ce facteur FgF4 maintient la pluripotence des ESC humaines. L'indépendance vis-à-vis de cette voie de signalisation serait donc un critère des cellules pluripotentes murines. L'utilisation d'inhibiteurs de la voie ERK cumulée à l'inhibition de la cascade de signalisation dépendante de GSK3β facilite l'établissement de lignées de cellules ES murines et le maintien de leur pluripotence (Nichols and Smith, 2009). Les BMP4 en association avec la voie des PI3K favorisent le maintien de la pluripotence par le même mécanisme d'inhibition de la voie ERK (Okita and Yamanaka, 2006). Grb2 et SHP2 activent la voie ERK qui réprime de nombreux gènes dont Nanog et Tbx3. Cela stoppe l'auto-renouvèlement des cellules et induit leur différenciation. Si le gène Grb2 est invalidé la différenciation en endoderme est compromise. SHP2 n'est pas nécessaire pour l'auto-renouvèlement des ES, mais pour assurer le bon déroulement de leur différenciation (Okita and Yamanaka, 2006).

Toutes ces voies de signalisation interagissent à plusieurs niveaux et peuvent être impliquées d'une part dans le maintien de la pluripotence et d'autre part dans l'induction de la différenciation cellulaire. La voie de signalisation activée par le BMP4 soutient l'action du LIF en promouvant la pluripotence, ou induit la différenciation lorsqu'elle interagit avec le facteur de transcription Notch (Chambers and Smith, 2004; Jaenisch and Young, 2008). Le LIF, par exemple, en plus d'initier la voie STAT, active SHP2 qui se lie d'une part à Grb2 pour induire la voie Ras/ERK et active d'autre part la voie PI3 kinase par l'intermédiaire de Gab (Grb2-associated binder). Les voies PI3 kinase et BMP4 maintiennent l'état indifférencié des ES par inhibition respective des voies ERK (Chambers and Smith, 2004) et ERK/p38.
L'élimination des signaux de différenciation, émis par les MAP kinases (mitogen-activated protein) ERK1 et 2, additionnée à l'inhibition des GSK3 (glycogen synthase kinase 3) sont suffisantes pour maintenir l'auto-renouvèlement. Cette absence de stimulation cytokine-dépendante a été confirmée par l'isolation de cellules ES génétiquement dépourvues de STAT3 en présence des inhibiteurs PD184352, SU5402 et CHIR99021. Les cellules ES disposent donc d'un programme inné d'auto-renouvèlement qui ne requiert aucun facteur extérieur (Ying et al., 2008).

1.2.7.6 Les facteurs de transcriptions « NOS »

L'analyse moléculaire des systèmes de régulation de la pluripotence a permis d'identifier trois facteurs de transcription majeurs : Nanog, Oct4, et Sox2 (ci-après nommés NOS). Leurs rôles clés pendant les premières étapes du développement embryonnaire les désignent comme maîtres d'œuvre de la régulation transcriptionnelle caractéristique des cellules ES, ce sont les premiers gènes de la pluripotence à être exprimés (Chambers et al., 2003; Hart et al., 2004; Nichols et al., 1998). Ces régulateurs sont exclusivement associés avec l'établissement, puis le maintien du compartiment pluripotent. Les délétions de Nanog et Oct4 ont montré que ces gènes sont indispensables pour la création et le maintien de l'ICM. A partir de l'étape de gastrulation où les cellules de l'épiblaste se différencient, Nanog et Oct4 sont éteints dans tous les lignages somatiques sauf dans les PGC (Nichols and Smith, 2009). L'inactivation d'un de ces trois gènes NOS induit la perte de la pluripotence et provoque une différenciation anormale de l'ICM et des cellules ES en trophectoderme et en endoderme extra embryonnaire (Chambers et al., 2003; Jaenisch and Young, 2008; Nichols et al., 1998; Yeo and Ng, 2013).

1.2.7.6.1 Nanog

Le facteur de transcription Nanog est une homéoprotéine régulée par Oct4 et Sox2. Ce facteur de transcription active ou réprime l'expression de nombreux gènes. Nanog est détecté dans l'embryon à partir du stade morulae où l'épiblaste commence à émerger jusqu'au stade blastocyste pré-implantatoire. Dans l'ICM précoce les cellules expriment Nanog ou Gata6 (marqueur spécifique de l'hypoblaste). Lors de la maturation de l'ICM les cellules qui expriment Nanog migrent à l'intérieur de l'ICM pour former l'épiblaste et les cellules qui expriment Gata6 migrent à la surface et forment l'hypoblaste au contact de la cavité blastocoelique. Ainsi, dans le blastocyste mature, l'hypoblaste est composé exclusivement de cellules qui expriment Gata6, et l'épiblaste est composé uniquement de cellules exprimant Nanog (Nichols and Smith, 2009).

L'expression de Nanog décline ensuite fortement après l'implantation, mais reste détectable dans les cellules germinales. La surexpression de Nanog rend les cellules ES indépendantes de la voie STAT3 via les stimuli du LIF et son inactivation provoque la différenciation des ES en endoderme primitif malgré la présence de LIF. De plus, la majorité des lignées EC qui ne nécessitent ni apport de LIF ni de co-cultures sur MEF ont un karyotype anormal avec une trisomie du chromosome 6, chromosome qui contient le gène Nanog (Okita and Yamanaka, 2006). Nanog est essentiel pour assurer la différenciation de l'ICM en épiblaste (Pan and Thomson, 2007), puis pour bloquer la différenciation en endoderme primitif, maintenant ainsi la pluripotence des cellules ES (Okita and Yamanaka, 2006; Yeo and Ng, 2013).

En absence de LIF, de faibles concentrations des molécules BMP induisent la différenciation des cellules ES en mésoderme, alors qu'en présence de LIF cette même concentration de BMP permet le maintien de la pluripotence (Miyanari and Torres-Padilla, 2012). En présence de LIF, les molécules STAT3 activées se fixent à Brachyury pour former un complexe qui va par la suite se lier au promoteur de Nanog et augmenter son

expression. La concentration en protéines Nanog augmente alors jusqu'à atteindre un niveau qui leur permet de se lier directement aux molécules SMAD1 et ainsi inhiber la différenciation en mésoderme induite par BMP/SMAD (Miyanari and Torres-Padilla, 2012). L'expression de Nanog est majoritairement mono-allélique au stade 8 cellules (98%) jusqu'au stade blastocyste, puis elle passe bi-allélique pour permettre la maturation de l'ICM en épiblaste fonctionnel (70% d'expression bi-allélique) et en endoderme primitif. Cet état d'expression bi-allélique de Nanog est indispensable à l'apparition de l'état élémentaire de la pluripotence nommé « ground state » (Miyanari and Torres-Padilla, 2012). Après l'implantation, l'épiblaste exprime de nouveau un seul allèle de Nanog et perd sa pluripotence. Pendant son expression bi-allélique, les deux allèles sont activés et réprimés à tour de rôle. L'épiblaste nouvellement formé dit « naïf » a un ratio d'expression de Nanog « bi-allélique/mono-allélique » plus important que celui des cellules ES cultivées en présence de sérum. Lors d'une culture *in vitro* en milieu contenant du sérum et du LIF, Nanog est exprimé par 60 à 70% des cellules ES en mono-allélique et sa réplication est asymétrique alors que d'autres gènes liés à la pluripotence, dont Oct4 et Sox2, ont une expression bi-allélique. En absence de sérum et lorsque les voies métaboliques FGF/ERK sont inhibées, son expression devient bi-allélique et Nanog se réplique de manière symétrique. Le milieu 2i permet ainsi la culture de cellules ES dans leur état « naïf » avec une expression bi-allélique et plus homogène de Nanog (Miyanari and Torres-Padilla, 2012).

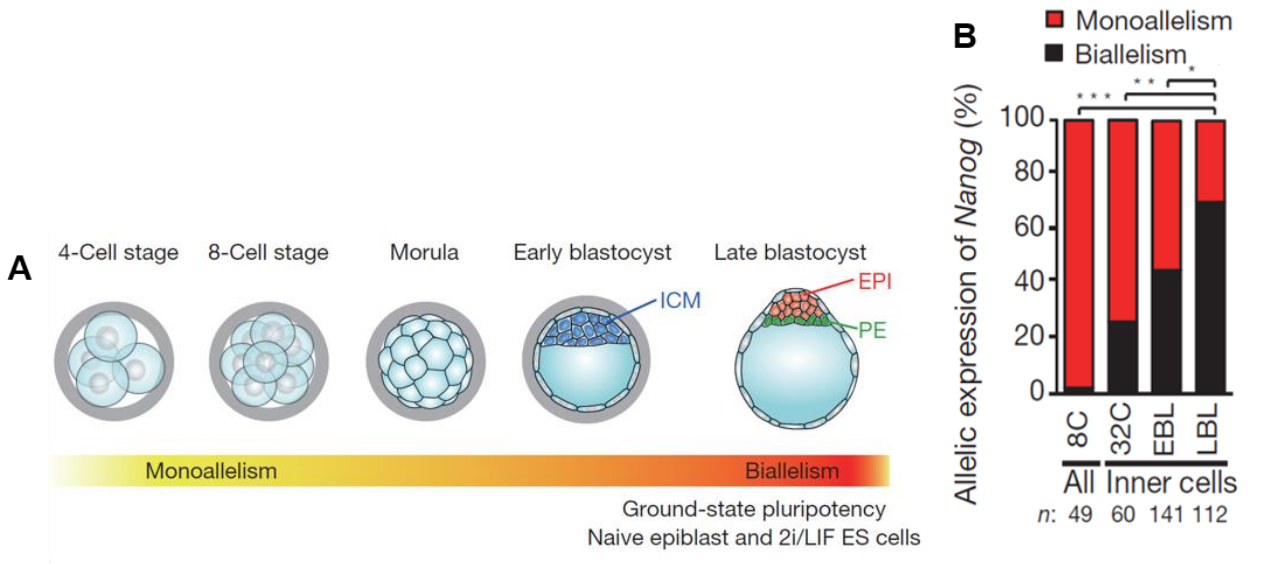


Figure 10 : Expression de Nanog

A : Un seul allèle de Nanog est exprimé entre le stade 4 cellules et le stade blastocyste, puis son expression devient bi-allélique lors de la maturation de l'ICM en épiblaste et en endoderme primitif. L'expression bi-allélique retrouvée dans l'epiblaste naïf est également observée in vitro lorsque les cellules sont cultivées en milieu 2i+LIF. B : Quantification de l'expression de Nanog dans les cellules embryonnaires aux stades 8 cellules, 32 cellules blastocyste précoce (EBL) et blastocyste tardif (LBL). Test exact de Fisher : *, P58.831025; **, P53.131023; ***, P,1.0310213. Source : Miyanari, Y., Torres-Padilla, M.-E., 2012. Control of ground-state pluripotency by allelic regulation of Nanog. Nature 483, 470–473. doi:10.1038/nature10807 (figure 4)

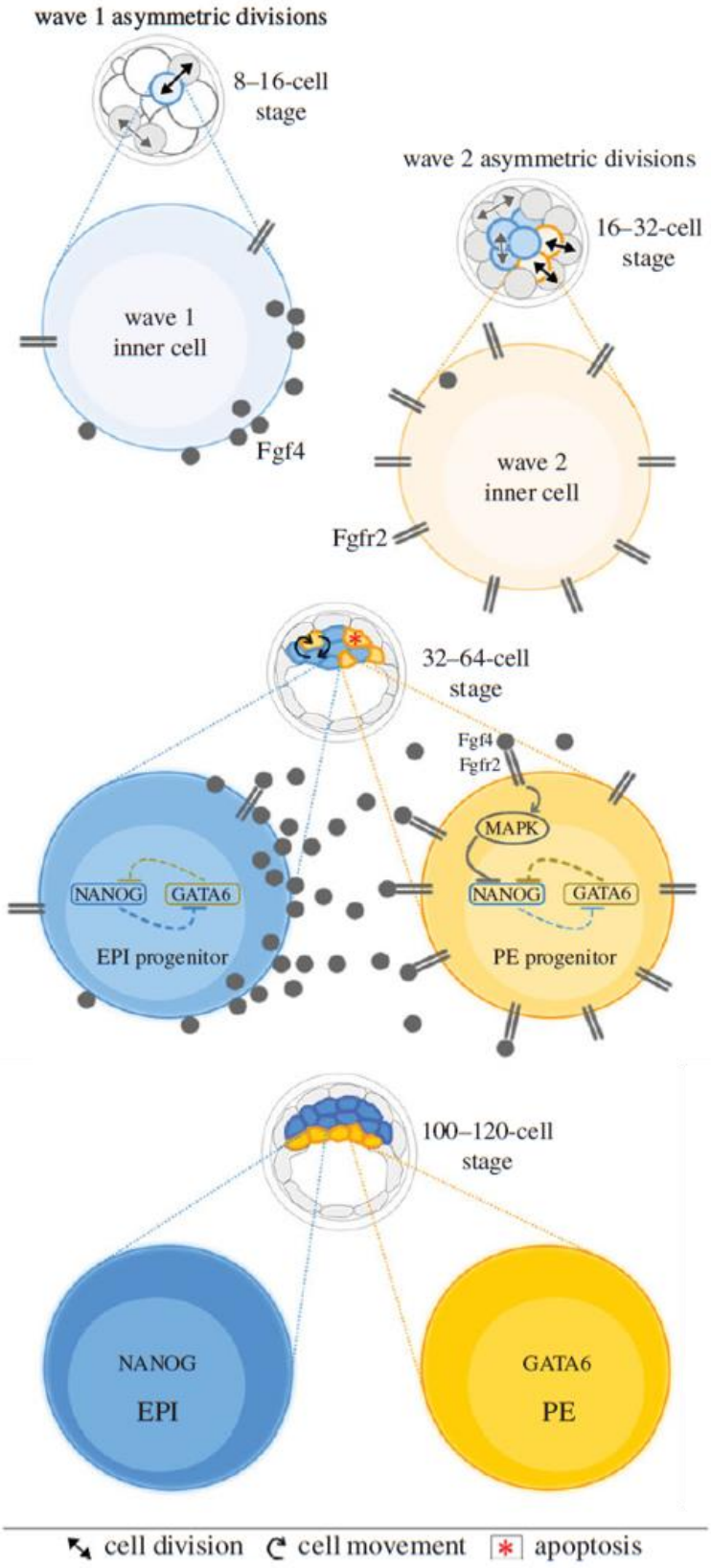


Figure n°11 : Spécification de l'epiblaste et de l'ectoderme primitif.

Lors de la première vague de division cellulaire asymétrique (stade 8-16 cellules), les cellules internalisées dans l'ICM surexpriment FgF4, tandis que les cellules internalisées au cours de la seconde phase de division (16-32 cellules) surexpriment le récepteur Fgfr2. La fixation des molécules de Fgf4 à ces récepteurs active la voie MAPK qui inhibe alors Nanog permettant l'expression de Gata6 dans les cellules de l'endoderme primitif (PE). Source : Bedzhov, I., Graham, S.J.L., Leung, C.Y., Zernicka-Goetz, M., 2014. Developmental plasticity, cell fate specification and morphogenesis in the early mouse embryo. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 369. doi:10.1098/rstb.2013.0538 (figure n°3)

1.2.7.6.2 Oct4

Oct4 est un facteur de transcription à homéo domaine POU (Pit-Oct-Unc) codé par le gène POU5F1. Il est exclusivement exprimé dans l'oocyte avant la fécondation, réparti dans tous les blastomères lors des premières divisions embryonnaires (Nichols and Smith, 2009), puis restreint à l'épiblaste pluripotent et aux PGC (Yeo and Ng, 2013). Lors des premiers clivages de l'embryon, les blastomères expriment Oct4 et Cdx2 qui se répriment réciproquement jusqu'à la compaction, où les cellules périphériques de la morulae expriment Cdx2 mais pas Oct4, et inversement pour les cellules internes. Oct4 est ainsi associé avec la formation de l'ICM et Cdx2 l'est avec la formation du trophectoderme (Boyer et al., 2006). Après la formation du blastocyste Oct4 est progressivement réprimé dans le trophoblaste. Dans le blastocyste mature les protéines Oct4 sont détectées dans toutes les cellules de l'épiblaste. Oct4 est aussi exprimé transitoirement par l'hypoblaste, mais après l'implantation aucune cellule des tissus extra-embryonnaires ne l'exprime (Nichols and Smith, 2009). Oct4 est indispensable pour établir la capacité de développement de l'ICM (Nichols and Smith, 2009). Au même titre que Nanog, son niveau d'expression est un déterminant important de la différenciation de l'ICM en cellules ES. Oct4 peut se dimériser avec les facteurs de transcription de type « High Mobility Group » dont Sox2 fait partie (Jaenisch and Young, 2008). Son inactivation ou sa répression de 50% empêche les cellules de se différencier en hypoblastes et épiblastes, les obligeant à se différencier en trophoblastes, alors que sa surexpression de 50% induit la différenciation des cellules ES en endoderme primitif et en mésoderme (Chambers and Smith, 2004; Yeo and Ng, 2013). La formation de l'hypoblaste et de l'épiblaste est donc dépendante de l'expression d'Oct4 (Nichols and Smith, 2009). La délétion d'Oct4 dans les cellules souches somatiques n'ayant pas d'incidence fonctionnelle, il a été démontré qu'Oct4 n'est pas impliqué dans l'auto-renouvèlement des cellules souches (Jaenisch and Young, 2008). Si Oct4 est suffisamment exprimé, les cellules ES ne requièrent plus de LIF ni de BMP4 pour maintenir leur pluripotence (Yeo and Ng, 2013). Son expression est rapidement éteinte lorsque les différenciations cellulaires débutent (Jaenisch and Young, 2008).

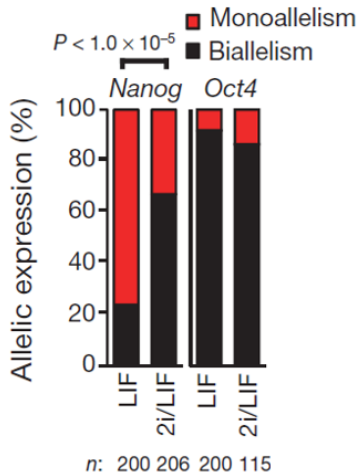


Figure 12 : Expression mono et bi-allélique de Nanog et Oct4

Proportion de cellules cultivées en présence de LIF et de 2i+LIF qui expriment un ou deux allèles de Nanog, Oct4 et Actb. Le traitement des cellules ES avec du milieu 2i+LIF accroit le nombre de cellules qui expriment les deux allèles de Nanog. Source : Miyanari, Y., Torres-Padilla, M.-E., 2012. Control of ground-state pluripotency by allelic regulation of Nanog. Nature 483, 470–473. doi:10.1038/nature10807 (figures 2b et 2g)

1.2.7.6.3 Sox2

Sox2 fait partie, comme Nanog et Oct4, du « cœur » transcriptionnel de la pluripotence. En coopération avec Nanog et Oct4, il se fixe sur de nombreux gènes ayant un rôle dans la pluripotence et dans le développement embryonnaire (Avilion et al., 2003). Sox2 est un facteur de transcription de la famille des gènes Sox « SRY-related HMG box » qui compte 20 membres (Avilion et al., 2003). Il contient un domaine de liaison à l'ADN de type « high mobility group». Il joue un rôle important dans la maintenance de la pluripotence et dans la spécification des différents lignages cellulaires. Exprimé dans l'ICM, puis dans l'épiblaste du blastocyste pré-implantatoire ainsi que dans les cellules germinales, l'expression de Sox2 n'est toutefois pas restreinte aux cellules pluripotentes car il est retrouvé dans différents types cellulaires multipotents tels que le trophectoderme, l'ectoderme extra-embryonnaire et de nombreux précurseurs neuronaux, intestinaux et respiratoires (Avilion et al., 2003; Boyer et al., 2006). Qu'il s'agisse de pluripotence ou de multipotence, sa répression induit la différenciation cellulaire (Avilion et al., 2003). Sox2 agit en synergie avec Oct4 pour former les complexes activateurs Oct-Sox, très représentés dans les cellules ES à l'inverse des cellules différenciées. Ces complexes, pouvant aussi être formés par Sox4, Sox11 ou Sox15, vont réguler l'expression de nombreux gènes importants de la pluripotence dont Nanog, Oct4 et Sox2 eux-mêmes (Masui et al., 2007). Cette synergie Sox2/Oct4 est indispensable pour la formation de l'épiblaste, tandis qu'Oct4 seul est requis pour la formation de l'endoderme extra-embryonnaire et Sox2 seul est nécessaire à la formation de l'ectoderme extra-embryonnaire (Avilion et al., 2003; Yeo and Ng, 2013). Chez les cellules ES, un déficit en Sox2 cause l'inactivation d'Oct4, ce qui fait encore diminuer l'expression de Sox2. En conséquence, l'expression des facteurs de transcription liés à la formation du trophectoderme augmente et les cellules ES se différencient en trophectoderme. Chez les cellules ES, Sox2 entretient la pluripotence par le maintien de l''expression d'Oct4 au niveau requis par la pluripotence (Masui et al., 2007). Lors du développement, Sox2 prépare la différenciation des cellules souches en « marquant » certains gènes pour « pré-activer » leur expression, puis Sox2 serait séquentiellement remplacé par d'autres facteurs de transcription de la famille Sox (Avilion et al., 2003).

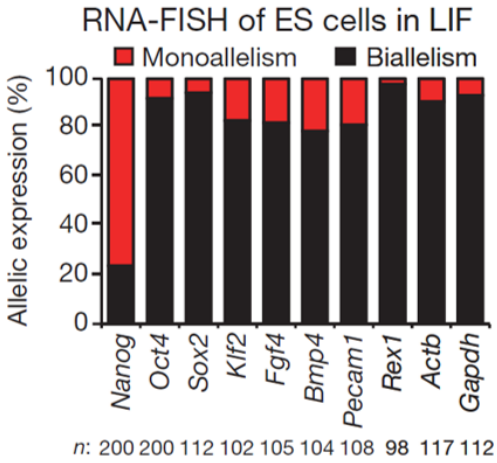


Figure 13 : Expression bi-allélique d'Oct4 et de Sox2

Chez les cellules ES cultivées en présence de LIF, Nanog est exprimé en mono allélique à l'inverse de nombreux gènes, dont Oct4 et Sox2 font partie. Source : Miyanari, Y., Torres-Padilla, M.-E., 2012. Control of ground-state pluripotency by allelic regulation of Nanog. Nature 483, 470–473. doi:10.1038/nature10807 (figure 2e)

1.2.7.6.4 Autorégulation collaborative

L'identification des gènes cibles des trois facteurs NOS a démontré qu'ils se fixent directement à leur promoteur et à ceux de leurs partenaires pour former une boucle d'autorégulation (Jaenisch and Young, 2008). Cela suggère qu'ils fonctionnent de façon collaborative pour maintenir leur propre niveau d'expression et ainsi améliorer la stabilité du programme transcriptionnel requis par la pluripotence (figure 14). Cette autorégulation est confirmée par les knock-out de chacun d'eux qui aboutissent tous au même phénotype : l'inactivation des trois gènes NOS. Ces trois facteurs se fixent souvent de manière coopérative sur leurs cibles principalement classées en deux groupes : les gènes liés à la pluripotence, qui sont donc exprimés pendant la pluripotence, gènes codant des protéines, des miRNA et des ARN non-codants, et les gènes liés au développement qui sont réprimés pendant la pluripotence, gènes codant des régulateurs spécifiques des différents lignages cellulaires (figure 14). Les NOS agissent donc simultanément sur l'activation de la pluripotence et la répression du développement (De Los Angeles et al., 2015; Jaenisch and Young, 2008; Loh et al., 2006).

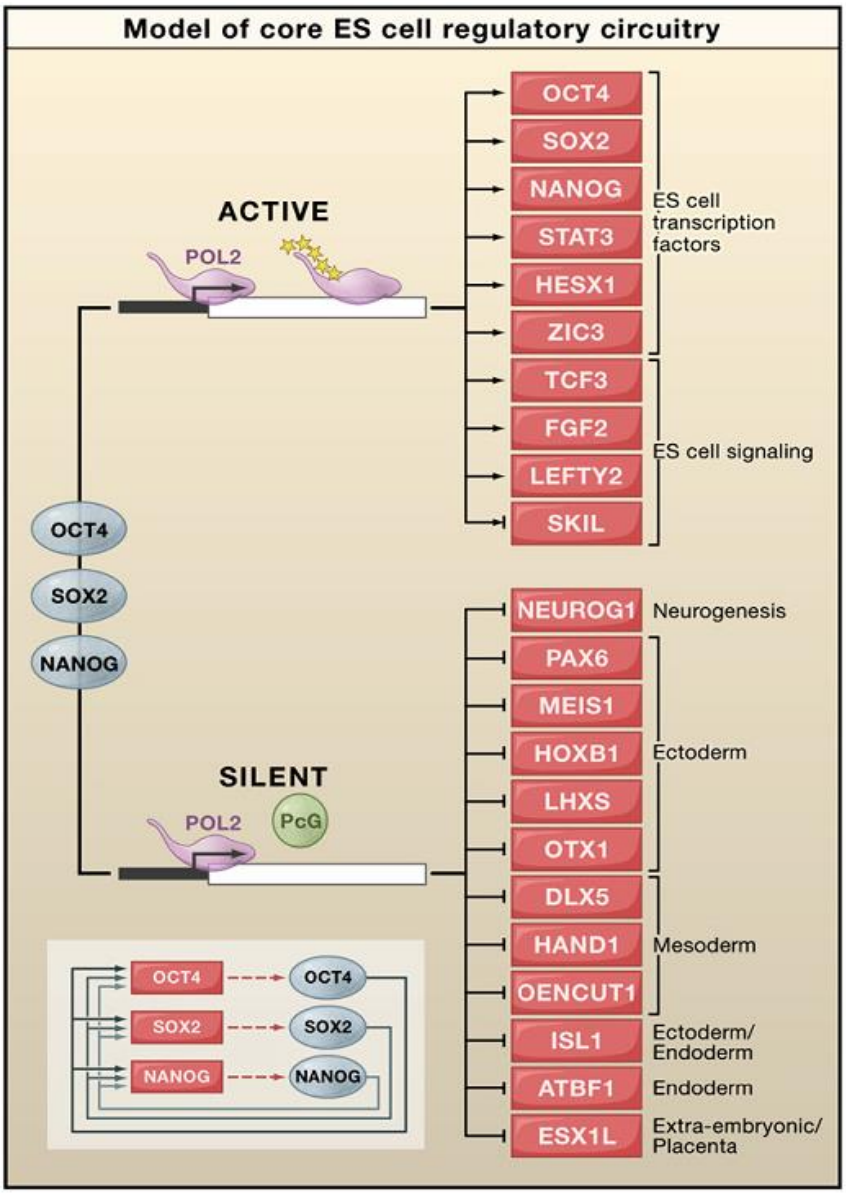


Figure 14 : Modèle du circuit d'autorégulation de la pluripotence

Les facteurs de transcription Oct4, Sox2 et Nanog occupent les gènes activement transcrits dont ceux des facteurs de transcription et des molécules impliquées dans le signalosome des cellules ES. Ces trois régulateurs occupent aussi les gènes éteints qui sont impliqués dans les différentes voies de différenciation cellulaire. Pour cette dernière catégorie de gènes, la RNA polymérase 2 (POL2) initie la transcription mais ne parvient pas à produire un transcript complet à cause de l'action répressive des protéines PcG sur la polymérase. Les facteurs de transcription Nanog, Oct4 et Sox2 activent leurs propres gènes dans une boucle d'autorégulation. Source : Jaenisch, R., Young, R., 2008. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. Cell 132, 567–582. doi:10.1016/j.cell.2008.01.015 (figure n°5)

1.2.7.7 Modification épigénétique : la chromatine "bivalente"

Les modifications épigénétiques telles que les méthylations CpG et les modifications d'histones jouent un rôle clé dans la régulation de la transcription des gènes et par conséquent dans le maintien de la pluripotence. Comme pour de nombreux gènes, le profil de méthylation des gènes Oct4 et Nanog est l'opposé de leur profil d'expression : non méthylé et exprimé dans les cellules pluripotentes, et méthylé et non exprimé chez les cellules différenciées. L'activation des deux allèles de Nanog est corrélée avec la présence de motifs activateurs H3K4me3. Les cellules ES dont les Dnmt (DNA methyltransferase) sont mutées, ont une expression anormale de leurs gènes, mais peuvent tout de même se différencier (Okita and Yamanaka, 2006). Si l'expression des Dnmt est maintenue, la pluripotence est conservée sans nécessité de LIF. La moitié des gènes ciblés par Nanog, Oct4 et Sox2 portent une structure de la chromatine qualifiée de « bivalente » (Surani et al., 2007). Chez les cellules ES, cette structure a été retrouvée sur certains gènes clés du développement et pourrait promouvoir le maintien de la pluripotence (Gan et al., 2007). Les promoteurs de nombreux régulateurs de la différenciation portent simultanément sur leurs histones associées des motifs activateurs (méthylation de la lysine 4 de l'histone 3 : H3K4me3) et répresseurs (méthylation de la lysine 27 de l'histone 3 : H3K27me3). Cet état bivalent de la chromatine facilite l'activation des gènes du développement après la sortie de la pluripotence (De Los Angeles et al., 2015). L'équilibre entre les méthylations H3-Lys4 et H3-Lys27 pourrait induire une conformation « permissive » de la chromatine rendant certains gènes plus accessibles aux complexes de modification de la chromatine et aux facteurs de transcriptions (figure n°15). Une telle conformation, où l'engagement dans les différentes voies de différenciation cellulaire n'est ni activé ni inhibé, jouerait un rôle clé dans le maintien de la pluripotence. La capacité des NOS à activer les gènes nécessaires au maintien des cellules ES à travers la répression de régulateurs spécifiques de certains lignages cellulaires est la principale caractéristique de l'auto-renouvèlement et de la pluripotence (De Los Angeles et al., 2015). La pluripotence est donc un état permissif, où toutes les voies de différenciation restent ouvertes mais inactives.

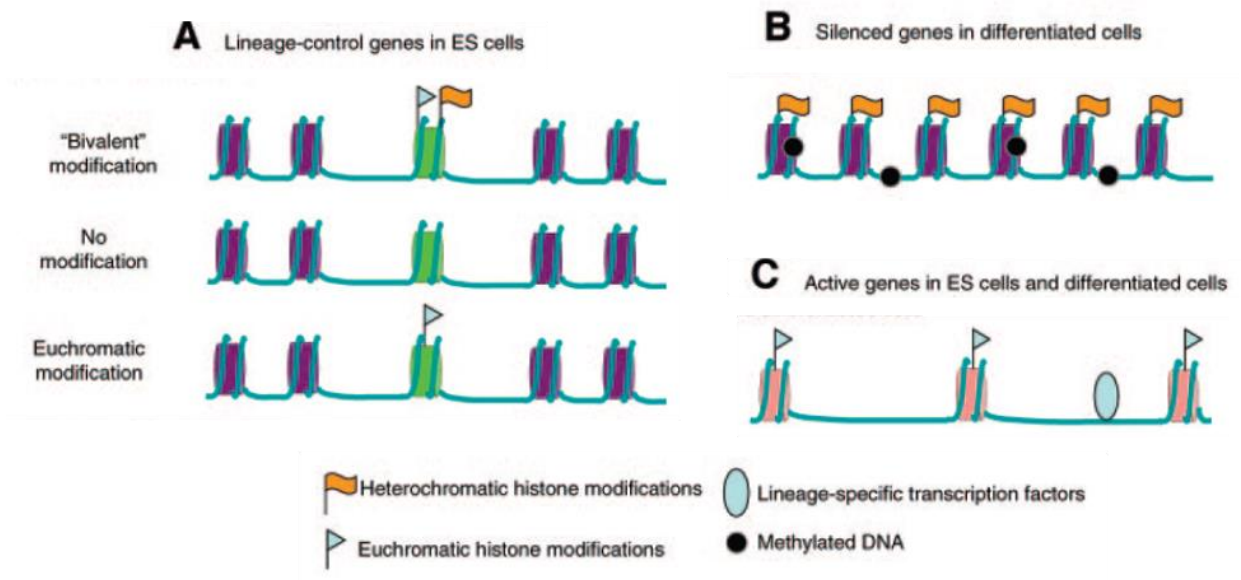


Figure n° 15 : Les différents types de modification d'histones

A- Chez les cellules ES les gènes qui contrôlent les différentes voies du développement embryonnaire présentent trois types de modification d'histones, dont le plus particulier est le type bivalent qui regroupe des motifs activateurs (méthylation sur la lysine 4 de l'H3) et des motifs répresseurs (méthylation sur la lysine 27 de l'H3). Les deux autres types sont l'absence de modification et la présence de motifs activateurs. B- Dans les cellules somatiques différenciées, les gènes inactifs sont réprimés par des motifs répresseurs qui sont résistants à l'activation transcriptionelle, contrairement au motif bivalent retrouvés chez les cellules ES. C- Les gènes actifs sont chez les cellules somatiques différenciées, tout comme chez les cellules ES, marqués par des motifs activateurs et situés dans une région ouverte de la chromatine, favorable à la fixation des facteurs de transcription et autres acteurs de la transcription. Source : Gan, Q., Yoshida, T., McDonald, O.G., Owens, G.K., 2007. Concise review: epigenetic mechanisms contribute to pluripotency and cell lineage determination of embryonic stem cells. Stem Cells Dayt. Ohio 25, 2–9. Doi:10.1634/stemcells.2006-0383 (figure n°1)

1.2.7.8 Les cellules souches pluripotentes

Les mécanismes moléculaires impliqués dans la pluripotence sont favorisés en culture *in vitro* par l'utilisation d'inhibiteur ou de facteur de croissance, définissant ainsi les différents milieux de culture utilisés pour l'établissement de lignée de cellules pluripotentes. Le stade embryonnaire auquel sont isolées les cellules pluripotentes et les conditions de cultures sui leur sont appliquées vont définir les niveaux de pluripotence moléculaire et fonctionnelle de ces cellules. Il existe plusieurs types de cellules souches pluripotentes, classées en fonction de leurs propriétés fonctionnelles, qui dépendent des conditions de culture sous lesquelles elles ont été dérivées (De Los Angeles et al., 2015). Les lignées de mESC et de mFAB-SC sont respectivement dérivées de l'ICM d'un blastocyste préimplantatoire en présence de « LIF + BMP4 », et de « FGF4 +Activin + inhibiteur BIO + anticorps anti-LIF ». Les lignées de mEpiSC sont dérivées de l'épiblaste d'un blastocyste post-implantatoire en présence de LIF et de BMP4 (Chou et al., 2008). Les cellules ES et les EpiSC ont de profondes différences dans la combinaison des facteurs de croissance qui maintiennent leur pluripotence. La comparaison des mESC, hESC, mFABSC et mEPiSC démontre que la pluripotence des cellules souches n'est pas une base fixe, mais un état fortement influencé par le contexte environnemental et développemental. Les ESC, les FAB-SC et les EpiSC expriment toutes les marqueurs de la pluripotence

Nanog, Oct4 et Sox2, mais à la différence des ESC et des FAB-SC, les EpiSC expriment fortement les marqueurs de l'épiblaste post-implantatoire (Chou et al., 2008; Nichols and Smith, 2009; Ying et al., 2008).

1.2.7.8.1 Les ESC

In vivo, les cellules de l'épiblaste préimplantatoire ont le même état biochimique que les cellules ES et ne nécessiteraient pas ou peu d'adaptation pour être cultivées *in vitro* lorsque la voie métabolique de Erk est inhibée. Avant que les cellules de l'épiblaste préimplantatoire se différencient, toutes les cellules ont le même potentiel de développement. Ce potentiel appelé pluripotence semble avoir deux niveaux : le « ground state » et le « primed state », qui opposent les cellules dotées d'une pluripotence moléculaire et fonctionnelle à celles présentant une pluripotence purement moléculaire. L'état élémentaire (ground state) correspond au stade de création de l'épiblaste et donc des cellules pluripotentes, puis vient l'état « programmé » (primed state) dans lequel les cellules de l'épiblaste se préparent à leur future différenciation (Nichols and Smith, 2009). Les termes « naïve » et « primed » désignent respectivement les cellules dérivées des phases précoces et tardives de développement de l'épiblaste que sont les cellules ESC et les EpiSC (De Los Angeles et al., 2015). Les cellules pluripotentes de ces deux états développementaux ne sont pas distinguables par l'expression de leurs marqueurs de la pluripotence (De Los Angeles et al., 2015). L'obtention d'ESC à l'état « naïf », facilitée par l'utilisation du milieu « 2i+LIF » qui bloque la voie de signalisation Erk/Mek, pousse à croire que les cellules « naïves » ont un métabolisme indépendant de cette voie de signalisation (De Los Angeles et al., 2015; Nichols and Smith, 2009). Dans cet état, les ESC femelles ont les deux chromosomes X activés et un faible taux de méthylation du génome, utilisent préférentiellement la séquence activatrice « distale » d'Oct4 et expriment les facteurs de transcription Rex1, NrOb1 et Fgf4 (De Los Angeles et al., 2015; Yeo and Ng, 2013). Les ESC « programmées » pour la différenciation que sont les « primed ESC » sont obtenues lors d'une culture en présence de Fgf4 et d'Activin (De Los Angeles et al., 2015). Les cellules femelles ont un seul chromosome X actif, un génome très méthylé, une utilisation préférentielle des séquences activatrices « proximales » d'Oct4 et présentent une répression des facteurs de transcription Rex1, NrOb1 et Fgf4 (De Los Angeles et al., 2015).

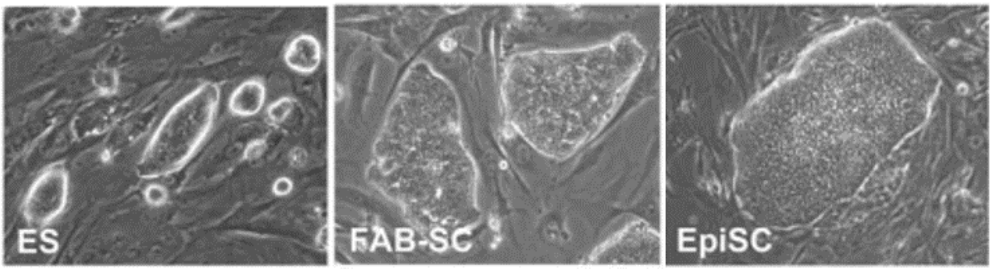


Figure n°16 : Morphologie de cellules ESC, FABSC et EpiSC

Observations de cellules ESC, FABSC et EpiSC par contraste de phase. Dans une culture de cellules ES les cellules forment des amas compacts très réfringents dans lesquels il est impossible de distinguer les jonctions cellulaires. Les cultures de FABSC et d'EpiSC sont plus plates, la lumière n'est pas diffusée à travers les différentes couches cellulaires qui se superposent rendant visible les jonctions inter-cellulaires, à l'inverse d'une culture de cellules ES. Source : Chou, Y.-F., Chen, H.-H., Eijpe, M., Yabuuchi, A., Chenoweth, J.G., Tesar, P., Lu, J., McKay, R.D.G., Geijsen, N., 2008. The growth factor environment defines distinct pluripotent ground states in novel blastocyst-derived stem cells. Cell 135, 449–461. doi:10.1016/j.cell.2008.08.035 (figure n°1)

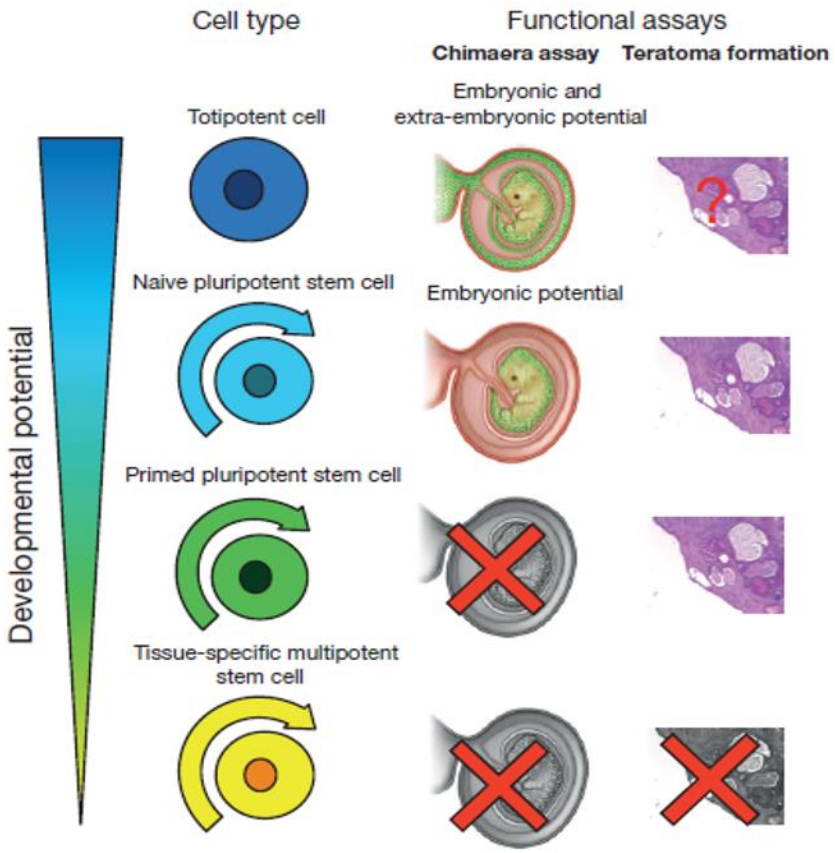


Figure n°17 : Tests fonctionnels pour identifier la compétence développementale

Les deux expériences majeures pour définir le niveau de compétence développementale des cellules pluripotentes sont la formation de chimères et de tératomes. Les résultats de ces tests permettent de classer les cellules dans la totipotence, la pluripotence naïve, la pluripotence programmée et la multipotence. La formation de chimères permet d'observer si la cellule peut participer aux tissus embryonnaires et aux tissus extra embryonnaires. Une cellule totipotente sera capable de coloniser les deux types de tissus, alors qu'une cellule pluripotente naïve ne colonisera que les tissus embryonnaires. Bien qu'une cellule pluripotente programmée soit incapable de coloniser l'embryon au même titre qu'une cellule multipotente, la cellule pluripotente formera des tératomes à l'inverse de la cellule multipotente. Source : De Los Angeles, A., Ferrari, F., Xi, R., Fujiwara, Y., Benvenisty, N., Deng, H., Hochedlinger, K., Jaenisch, R., Lee, S., Leitch, H.G., Lensch, M.W., Lujan, E., Pei, D., Rossant, J., Wernig, M., Park, P.J., Daley, G.Q., 2015. Hallmarks of pluripotency. Nature 525, 469–478. doi:10.1038/nature15515 (figure n°1)

1.2.7.8.2 Les FAB-SC

Les lignées cellulaires FAB-SC ont été établies en 2008 à partir de l'ICM d'un blastocyste préimplantatoire en utilisant les molécules bFGF, Activin, et l'inhibiteur BIO. Ces lignées, morphologiquement identiques aux EpiSC (figure n°16), expriment les marqueurs de la pluripotence Oct4, Nanog, et Sox2, mais ne sont pas capables de passer les tests fonctionnels de la pluripotence que sont la formation de tératome, le développement de chimères et la transmission à la lignée germinale. Toutefois, ces cellules souches FAB peuvent retrouver leur potentiel de développement embryonnaire lorsqu'elles subissent une induction avec le LIF et le Bmp4. Les FAB-SC peuvent alors former des tératomes contenant les trois lignages embryonnaires

et des chimères capables de transmission germinale comme le font les ESC. Suite à cette induction les FAB-SC conservent des niveaux d'expression des marqueurs de la pluripotence semblables à ceux des ESC sans nécessité de LIF ni de Bmp4. Ces molécules induisent chez les FAB-SC une augmentation de l'expression des-cadhérines E jusqu'à un niveau comparable à celui observé chez les cellules ES. Lorsque cette expression est diminuée les FAB-SC se différencient rapidement. Le profil d'expression des miRNA des FAB-SC et des EpiSC est clairement différent et corrèlent avec l'origine réciproque de ces cellules. Les FAB-SC expriment des miRNA typiques des cellules ES alors que les EpiSC expriment de nombreux miRNA spécifiques du développement post implantatoire de l'épiblaste. Les FAB-SC se distinguent toutefois des ESC car elles n'expriment pas de nombreux gènes associés avec la différenciation des cellules germinales comme Stella (Dppa3), Blimp1 (Prdm1) ou Daz1. Les FAB-SC se situent, par leur état moléculaire et leur potentiel développemental, entre les ESC et les EpiSC (Chou et al., 2008)

1.2.7.8.3 Les EpiSC

La mise en culture d'épiblastes post-implantatoires en présence de FgF et d'Activin a permis d'obtenir des lignées d'EpiSC. Comme les FAB-SC, les EpiSC expriment les marqueurs de la pluripotence Oct4, Nanog (De Los Angeles et al., 2015) et Sox2, mais n'ont pas de pluripotence fonctionnelle. Comme toutes cellules multipotentes, les EpiSC sont capables de se différencier *in vitro* dans certains lignages cellulaires pour lesquels elles ont été programmées *in vivo* par l'embryon avant leur dérivation. Les ESC peuvent générer spontanément des EpiSC en culture, mais l'inverse n'a pour l'instant pas été observé. Lorsqu'une ESC femelle devient EpiSC, un de ces chromosomes X s'inactive comme chez les FAB-SC (Nichols and Smith, 2009; Yeo and Ng, 2013). Avant la découverte des ESC très peu de cellules EC étaient capables de coloniser l'embryon pour former des souris chimères puis transmettre à la lignée germinale : cela a été attribué à l'aneuploïdie fréquente de ces lignées. Depuis la découverte des EpiSC il est probable que ces lignées de cellules EC étaient en réalité plus proches des EpiSC que des ESC (Nichols and Smith, 2009).

L'idée d'un état élémentaire stable de la pluripotence (ground state) est remis en question par des études « single-cell », qui suggèrent que la pluripotence est un état méta-stable. Dans ces études, l'hétérogénéité du profil d'expression de chaque cellule indique que différents états moléculaires et fonctionnels coexistent dans les populations de cellules souches cultivées en présence de sérum (De Los Angeles et al., 2015). Même des cellules qui partagent un état pluripotent plus homogène montrent des variations dans l'expression de leurs facteurs de transcription liés à la pluripotence (De Los Angeles et al., 2015).

Table 1. Comparison of Naive and Primed Pluripotent States

Property	Ground State	Primed State
Embryonic tissue	early epiblast	egg cylinder or embryonic disc
Culture stem cell	rodent ESCs	rodent EpiSCs; primate "ESCs"
Blastocyst chimaeras	yes	no[a]
Teratomas	yes	yes
Differentiation bias	none	variable
Pluripotency factors	Oct4, Nanog, Sox2, Klf2, Klf4	Oct4, Sox2, Nanog
Naive markers[b]	Rex1, NrOb1, Fgf4	absent
Specification markers	absent	Fgf5, T
Response to Lif/Stat3	self-renewal	none
Response to Fgf/Erk	differentiation	self-renewal
Clonogenicity	high	low
XX status	XaXa	XaXi
Response to 2i	self-renewal	differentiation/death

[a] Not applied to primate cells.
[b] Representative examples.

Tableau n°1 : Majeures différences entre les stades « élémentaire » et « programmé » de la pluripotence

Source : Nichols, J., Smith, A., 2009. Naive and primed pluripotent states. Cell Stem Cell 4, 487–492. doi:10.1016/j.stem.2009.05.015 (table 1)

Table 1 | Different PS cell types and their developmental potentials

Starting cells	Pluripotent stem cell	Criteria for pluripotency						
		In vitro differentiation	Teratoma	Postnatal chimaera	Germ line transmission	4*n* complementation	State of pluripotency	Ref.
Mouse germline tumour	ECCs	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Naive	4
Mouse oocyte	Parthenogenetic ES cells	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Naive	101
Mouse blastomere	ES cells	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Naive	102
Mouse ICM	ES cells	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Naive	5,6
Mouse Epiblast	EpiSCs	Yes	Yes	No	No		Primed	9,10
Mouse primordial germ cell	Embryonic germ cells	Yes	Yes	Yes	Yes	?	Naive	11,103
Mouse SSCs	GS cells, gPS cells; MASC	GS cells, gPS cells, MASC	GS cells, gPS cells, MASC	GS cells, gPS cells	GS cells, gPS cells	?	Naive (GS cells, gPS cells) Primed (MASCs)	12,104
Mouse somatic cells	iPS cells	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Naive	3
Mouse somatic cells	Nuclear-transfer ES cells	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Naive	105
Human germline tumour	ECCs	Yes	Yes	No	No	No	?	106
Human oocyte	Parthenogenetic ES cells	Yes	Yes	N/A	N/A	N/A	Primed	107
Human blastomere	ES cells	Yes	Yes	N/A	N/A	N/A	Primed	108
Human ICM	ES cells	Yes	Yes	N/A	N/A	N/A	Primed	7
Human somatic cells	iPS cells	Yes	Yes	N/A	N/A	N/A	Primed	109
Human somatic cells	Nuclear transfer ES cells	Yes	Yes	N/A	N/A	N/A	Primed	95

All cells listed are able to differentiate *in vitro*. Mouse oocyte-derived, blastocyst-derived ES cells, primordial germ-cell-derived embryonic germ cells, embryonic carcinoma cells (ECCs), SSC-derived cells, and iPS cells are able to generate chimaeras and contribute to the germ line. N/A, not applicable; ?, unknown. GS cells, germline stem cells; MASC, multipotent adult spermatogonial-derived stem cells; gPS cells, germline-derived pluripotent stem cells.

Tableau n°2 : Potentiel développemental de différents types de cellules pluripotentes

Source : De Los Angeles, A., Ferrari, F., Xi, R., Fujiwara, Y., Benvenisty, N., Deng, H., Hochedlinger, K., Jaenisch, R., Lee, S., Leitch, H.G., Lensch, M.W., Lujan, E., Pei, D., Rossant, J., Wernig, M., Park, P.J., Daley, G.Q., 2015. Hallmarks of pluripotency. Nature 525, 469–478. doi:10.1038/nature15515 (table 1)

Matériels et méthodes

2 Matériels et méthodes

Pour mesurer la pluripotence j'ai choisi de quantifier les phosphatases alcalines et les facteurs de transcription Nanog, Oct4 et Sox2. Je vais évaluer la relevance de ces tests sur des comparaisons de réactifs de culture cellulaire, de lignées de cellules ES et de procédures de cultures. J'ai choisi de doser la PAL car cette enzyme est fortement exprimée par les cellules souches et donc facilement détectable par dosage enzymatique. Dans un contexte de production, la facilité de mise en œuvre du dosage des PAL nous permettra de l'utiliser fréquemment. Pour évaluer la corrélation du dosage des PAL avec la pluripotence et affiner mes analyses je vais mesurer l'expression des facteurs de transcription Nanog, Oct4 et Sox2 par la technique de cytométrie en flux.

Dans nos procédures, l'amplification des cellules ES, leur modification génique et la caractérisation des clones recombinants nécessitent entre 12 et 13 passages avant que les cellules soient préparées pour leur micro-injection dans des blastocystes. Ce délai représente une trentaine de jours de culture, je réalise donc des cultures d'un mois dans mes conditions expérimentales avant de faire les analyses.

2.1 Culture des cellules souches embryonnaires de souris

2.1.1 Utilisations de MEF

La culture des cellules souches se réalise sur des cultures primaires de MEF (Primary Mouse Embryonics Fibroblasts), des lignées de MEF immortalisés telle que les lignées STO et SNL (cellules STO Néomycine résistantes et productrices de LIF). Ces fibroblastes embryonnaires composent la matrice extracellulaire qui favorise l'adhérence des cellules souches et leur apporte de multiples cytokines dont le LIF, connu pour son rôle dans le maintien de la pluripotence. L'utilisation de cellules nourricières a historiquement permis l'établissement et la culture *in vitro* des premières lignées de cellules ES de souris. Pour favoriser la qualité de mes cellules ES j'utilise préférentiellement des PMEF pour cultiver les cellules ES. Pour cela j'ai isolé des PMEF à partir d'embryons de 13,5 dpc, puis je les ai irradiés (30 Gray) pour inactiver leur division cellulaire, afin qu'ils ne prolifèrent pas pendant la culture des ES.
Je prépare chaque support de culture des cellules ES en deux étapes. La première consiste à recouvrir les supports avec de la gélatine porcine à 0,1% afin d'améliorer l'adhérence des PMEF. La seconde étape est l'ensemencement des PMEF sur les supports gélatinés à une densité de 40000 cellules/cm² avant d'y déposer les cellules ES.

2.1.2 Le milieu « DKO+LIF »

Les cellules ES sont cultivées dans un milieu contenant 15% de sérum de veau fétal (PAA référence A15-301, lot A30112-0137) composé à partir de « DMEM Knock-Out » (Gibco référence 10829-018). Ce milieu contient les constituants classiquement utilisés pour la culture cellulaire que sont les acides aminés non essentiels (Gibco référence 11140035, utilisés à 1X), la L-glutamine (Gibco référence 35050038, utilisée à 1X), et du sodium pyruvate (Gibco référence 11360039, utilisé à 1 mM). Nous ajoutons des antibiotiques comme la pénicilline et la streptomycine (Gibco référence 15070063, utilisées à 1X) ou de la gentamycine (Gibco référence 15750037, utilisée à 33 µg/mL) dont le spectre d'action est plus large. Afin d'inhiber la différenciation des cellules ES, du LIF est rajouté au milieu de culture à une concentration finale de 1000 U/mL (Millipore référence ESG1107). Les cellules souches étant très sensibles au stress oxydatif qui induit leur différenciation, les milieux de cultures doivent contenir un agent réducteur tel que le MTG ou le β-mercaptoéthanol, nous utilisons donc ce dernier à une concentration finale de 100 µM (Gibco référence 31350-010).

2.1.3 Le milieu « 2i+LIF »

J'utilise également un second milieu pour la culture des cellules souches, plus exactement pour la sélection des cellules souches « naïves ». Ce milieu créé en 2008 (Ying et al., 2008) ne contient pas de sérum, mais divers compléments tels que le N2 (Gibco référence 17502048, utilisé à 0,5X), le B27 (Gibco référence 17504-044, utilisé à 0,5X), de l'insuline (Sigma référence I1882-100mg, utilisée à 10 µg/mL), et de la BSA (Sigma référence A3311-10g, utilisée à 25 µg/mL). La base Dmem-Ko est remplacée par du Dmem-F12 (Gibco référence 31331-028, utilisé à 0,5X) et du Neurobasal (Gibco référence 21103-049, utilisé à 0,5X). Concernant les constituants habituels précédemment décrits (acides aminés non essentiels, L-glutamine, sodium pyruvate, pénicilline/streptomycine ou gentamycine), leurs concentrations sont identiques à celles utilisées dans le milieu « DKO+LIF ». La particularité de ce milieu est l'utilisation de deux inhibiteurs de la différenciation cellulaire que sont les molécules PD0325901 (Axon medchem référence Axon 1408, utilisé à 1 µM) et Chiron99021 (Axon medchem référence Axon 1386, utilisé à 3 µM). Ils inhibent respectivement les voies de signalisation MEK et GSK3β impliquées dans la différenciation cellulaire.

2.1.4 Etablissement de lignées ES

Pour établir de nouvelles lignées de cellules souches embryonnaires je prélève des embryons au stade blastocyste (3,5 dpc) que je dépose sur une boite de 3 cm de diamètre contenant des PMEF. La culture peut se réaliser en milieu « DKO+LIF » contenant du sérum ou du KSR (Knock-out Serum Replacement) ou en milieu « 2i+LIF ». Au bout de 12 à 24h la zone pellucide se détache et le blastocyste s'implante sur la couche de PMEF, la masse cellulaire interne est alors récupérée pour être dissociée et est remise en culture sur une nouvelle boite contenant des PMEF. Le milieu 2i+LIF facilite cette étape de récupération de la masse cellulaire

interne car celle-ci ne s'étale pas sur la boite, mais prend une forme de sphère. La culture est observée chaque jour et dissociée lorsque les colonies de cellule ES ont atteint une taille convenable pour être de nouveau dissociés. Au bout de 4 à 6 jours de culture après l'implantation du blastocyste, les cellules qui se sont adaptées aux conditions de cultures *in vitro*, constituent une nouvelle lignée de cellules ES (figure n°18C).

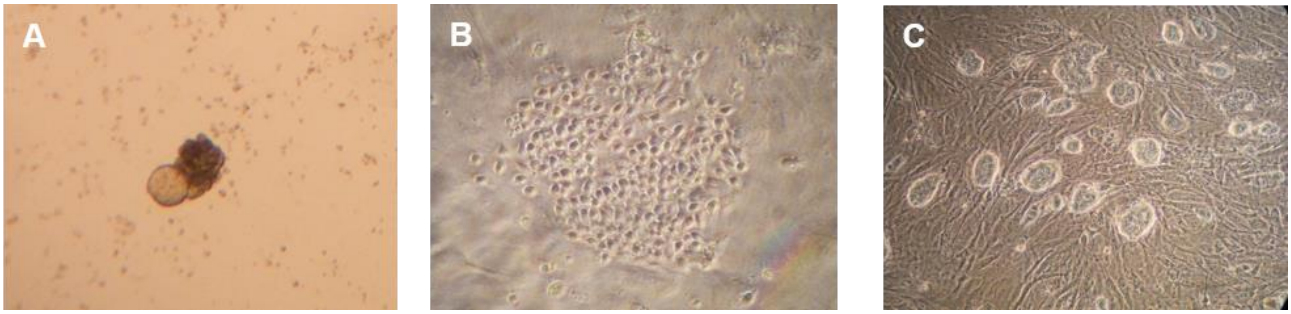


Figure n°18 : Etablissement de lignées de cellules ES

A : Blastocyste 24 h après mise en culture en milieu 2i+LIF (x40). La sphère claire située en bas à gauche est la masse cellulaire interne (ICM) du blastocyste, l'amas cellulaire sombre est le trophectoderme. B : Cellules d'un ICM différenciées (x200). C : Colonies de cellules ES en milieu 2i+LIF 48h après dissociation de l'ICM (x100)

La réussite de la culture primaire des cellules ES est visible dès les premiers jours de culture. Les cellules pluripotentes de la masse cellulaire interne qui se sont adaptées aux conditions de la culture *in vitro* ont formé les premiers amas de cellules ES. Toutefois, seulement quelques lignées conserveront leur pluripotence au cours des générations suivantes et pourront être qualifiées de lignées de cellules souches embryonnaires murines. Ces dernières sont facilement reconnaissables par leur mode de croissance : elles se divisent en conservant le niveau de compaction de leur tissu originel, la masse cellulaire interne du blastocyste. Les cellules ES forment ainsi des amas très compacts dont l'épaisseur est plus ou moins importante en fonction de leur niveau de compaction.

2.2 Méthodes d'analyse des cultures cellulaires

Jusqu'à présent chaque modification de nos procédures était validée par la formation de souris chimères, ce qui demande beaucoup de travail et retarde nos prestations en monopolisant des créneaux de micro-injection. La quantification des marqueurs de la pluripotence PAL, Nanog, Oct4 et Sox2 nous permettront d'utiliser ce test *in vivo* seulement pour la validation finale des réactifs de culture cellulaire et des lignées de cellules ES avant de les utiliser pour réaliser nos prestations.

2.2.1 Taux de croissance

Lorsque les cellules ES sont micro-injectées dans les blastocystes et qu'elles se sont réintroduites dans la masse cellulaire interne, elles vont être en compétition avec les cellules ES endogènes qui la composent. Le résultat de cette course développementale est la formation des souris chimères. Utiliser une lignée dont le taux de croissance est élevé permettra de favoriser la colonisation de l'embryon après micro-injection, sous réserve que les cellules ES soient bien pluripotentes. A l'inverse, une lignée dont le taux de croissance est faible risque de ne pas se diviser assez rapidement pour prendre le dessus sur les cellules ES endogènes du blastocyste. Dans ce dernier cas, les souris issus des embryons micro-injectés seront soit faiblement chimériques soit complètement issues des ES endogènes. Je calcule le taux de croissance de chaque culture en faisant le rapport de la quantité totale de cellules ES obtenues à 48h de culture sur la quantité de cellules ES ensemencées.

2.2.2 Observations morphologiques

L'observation visuelle quotidienne des cultures cellulaires nous donne des indices essentiels sur l'état d'indifférenciation des cellules ES. Toutes les observations morphologiques sont réalisées avec des microscopes inverses à contraste de phase de type EVOS. Ces microscopes pourvus d'un écran nous permettent d'enregistrer les photos de nos observations. Toutes les photos présentées ont été prises avec les grossissements x40 et x100.

Les cellules ES se développent en colonies en trois dimensions qui forment des demi-sphères (figure n°19A et A+). En fonction de l'état de pluripotence des cellules ES ces amas sont plus ou moins plats. Lorsque les cellules ES perdent leur pluripotence elles s'étalent et se différencient (figure n°19B et B+). Les cellules en périphérie de la colonie se différencient en premier et ne forment plus de colonies sphériques, mais un tapis cellulaire où les jonctions intercellulaires deviennent très visibles.

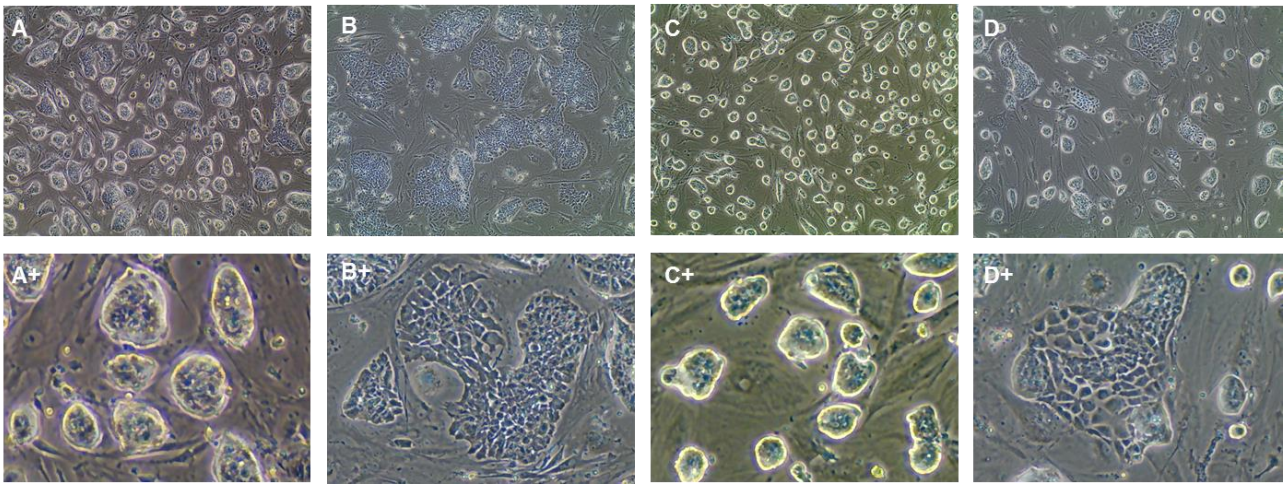


Figure n°19 : Observation de la morphologie des cellules ES pendant leur différenciation

A, B, C et D : objectif x100. Les photos « + » sont des agrandissements des photos A, B, C et D.
A et A+ : cellules ES pluripotentes en milieu DKO+LIF. B et B+ : cellules ES en cours de différenciation en milieu DKO+LIF.
C et C+ : cellules ES pluripotente en milieu 2i+LIF. D et D+ : cellules ES en cours de différenciation en milieu 2i+LIF.

Malgré l'utilisation de procédures qui favorisent le maintien de la pluripotence il arrive parfois que certains clones de cellules ES perdent leur pluripotence fonctionnelle ou se différencient pendant leur culture. La présence de LIF dans nos milieux de culture limite ces pertes de pluripotence, mais ne les empêche pas (figure n°19B et B+). Lorsqu'un clone ES commence à changer de morphologie en milieu DKO+LIF nous le faisons passer en milieu 2i+LIF pour sélectionner les cellules qui sont toujours dans leur état naïf (figure n°19C et C+). Si les cellules se sont différenciées, le milieu 2i+LIF ne permettra pas de stopper la différenciation (figure n°19D et D+) ou de dédifférencier les cellules. Les observations morphologiques nous permettent de détecter rapidement ces différenciations.

2.2.3 Dosage des phosphatases alcalines par colorimétrie

L'évaluation de la pluripotence de nos cellules ES était jusqu'à présent uniquement visuelle. Les PAL étaient détectées par coloration au FastRed en utilisant le kit « Alkaline Phosphatase chromogen kit (Fast Red) » de GeneTex.

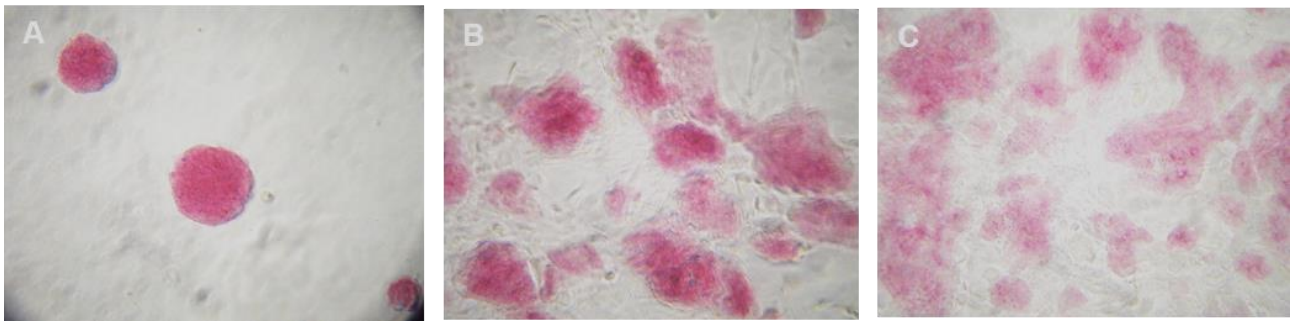


Figure n°20 : Détection de la PAL par coloration histologique au « Fast Red »

A, B, C : objectif x400. A : cellules ES pluripotentes en milieu 2i+LIF. B : cellules ES pluripotentes en milieu DKO+LIF. C : cellules ES en cours de différenciation en milieu DKO+LIF.

Les nuances de coloration des amas de cellules ES étaient généralement classées en trois nuances allant du rouge foncé au rose clair. Cette coloration nous permettait d'identifier des cellules ES pluripotentes et des cellules en cours de différenciation (figure 20C) mais n'était pas assez résolutive pour être utilisée dans l'évaluation de nos procédures de culture cellulaire. De plus l'appréciation de la coloration étant réalisée par les expérimentateurs cela rendait les résultats subjectifs, il était donc nécessaire d'utiliser un test quantitatif.

La phosphatase alcaline est une orthophosphoric-monoester phosphohydrolase dont le pH optimum est alcalin (E.C.3.1.3.1). Elle peut catalyser l'hydrolyse de la liaison ester d'un grand nombre de substrats comme le para nitro phényl phophate (pNP-P). Lors de l'hydrolyse de ce substrat par la PAL, les produits formés sont le para

nitro phényl (pNP) et un phosphate inorganique. Le pNP est jaune et a une absorbance maximale à 405 nm. L'absorbance à 405 nm est corrélée avec la quantité de pNP produite et donc avec la quantité de PAL présente dans l'échantillon. Dans le but d'utiliser un test rapide à mettre en œuvre, peu coûteux et disponible à tout moment pour notre équipe, je me suis orienté vers un dosage colorimétrique par spectrophotométrie. J'ai utilisé le kit « SensoLyte pNPP Alkaline Phosphatase Assay Kit colorimetric » (Sensolyte référence AS-72146).

2.2.3.1.1 Gamme étalon

Lors de l'utilisation du kit de dosage, tous les réactifs doivent être à température ambiante. La gamme étalon prévue par le fournisseur utilise une CIP à 10 µg/µL. Il est préférable de réaliser la gamme étalon dans une plaque à 96 (P96) puits à fond rond, déposer 170 µL de tampon B 1x dans une ligne entière, soit douze puits, et rajouter 173 µL dans le premier puit pour avoir un volume de 343 µL dans ce dernier. Il faut diluer 7 µL de la solution étalon stock à 10 µg/µL dans les 343 µL de tampon pour obtenir la première solution étalon à 200 ng/µL de PAL. Il suffit désormais de diluer cette dilution au demi, en cascade sur les onze puits restants pour obtenir une gamme étalon allant de 200 ng/µL à 0,19 ng/µL. Répartir ensuite à la pipette multicanaux 50 µL de chaque solution en triplicat sur trois lignes d'une P96 à fond rond. Pour m'assurer de la validité de mes résultats et pouvoir comparer les données de différents dosages je réalise une gamme étalon pour chacun de mes dosages.

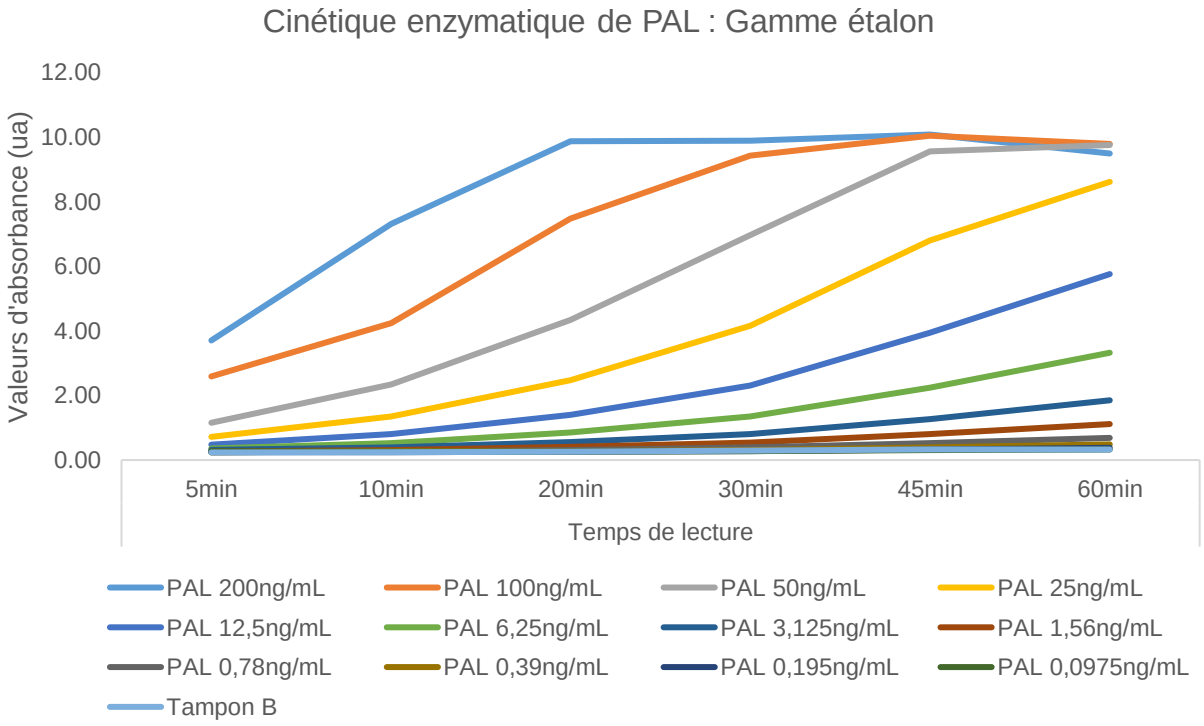


Figure n° 21 : Valeurs d'absorbance de la gamme étalon de CIP

Lecture de l'absorbance à 405 nm : les valeurs d'ordonnées sont données en unité arbitraire d'absorbance.

La gamme étalon préconisée par le fournisseur est comprise entre 200 ng/mL et 0,0975 ng/mL de CIP (Calf Intestinal Phosphatase). La première solution étalon (200 ng/mL) sature le signal au bout de 20 minutes, la deuxième solution (100 ng/mL) au bout de 30 minutes et la troisième (50 ng/mL) à partir de 45 minutes. Si la lecture des absorbances est réalisée trop tard la quantité de pNP produite devient saturante et l'absorbance de la solution n'est plus proportionnelle à la concentration de PAL. Pour rester dans la zone de linéarité de cette gamme étalon il est nécessaire d'effectuer les lectures d'absorbance avant t=20 min si la solution est très concentrée, ou au plus tard à t=30 min, sinon les solutions étalons à 200 ng/ml et 100 ng/mL devront être exclues.

Gamme étalon				
N° solution	concentration en PAL (ng/mL)	t=10min	t=20min	t=30min
S1	200	7.07	9.60	9.60
S2	100	4.00	7.20	9.14
S3	50	2.10	4.07	6.68
S4	25	1.12	2.21	3.87
S5	12.5	0.57	1.14	2.02
S6	6.25	0.29	0.59	1.08
S7	3.125	0.14	0.29	0.52
S8	1.5625	0.07	0.14	0.26
S9	0.78125	0.02	0.05	0.10
S10	0.390625	0.04	0.02	0.03
S11	0.1953125	0.01	0.00	0.00
S12	0.09765625	0.02	0.00	-0.01
Tampon B	0	0.00	0.00	0.00

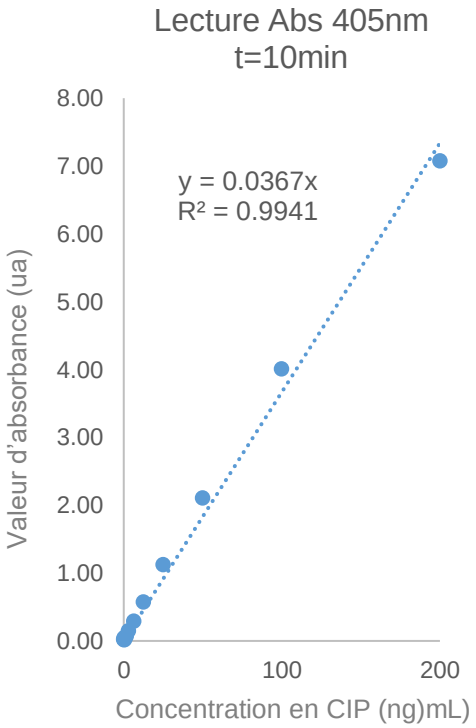


Figure n° 22 : Valeurs d'absorbance de la gamme étalon pour t= 10, 20 et 30 minutes

Afin d'avoir une résolution maximale il faut lire les absorbances le plus tard possible tout en restant dans la zone de linéarité de la gamme étalon. Pour déterminer les concentrations en PAL de mes échantillons je détermine d'abord le coefficient de corrélation R^2 de la droite de régression. Si R^2 est compris entre 0,9900 et 0,9999 je considère que la proportionnalité entre l'absorbance à 405 nm et la concentration en PAL est correcte, j'utilise donc l'équation de la droite de régression pour déterminer les concentrations de mes échantillons.

2.2.4 Quantité optimale de cellules ES à lyser et temps de lecture

Pour m'assurer que la quantité de PAL présente dans les échantillons ne soit pas saturante et pour permette une bonne résolution j'ai dû déterminer la quantité de cellules ES à lyser. J'ai dosé les phosphatases alcalines contenues dans différentes quantités de cellules ES allant de 10 000 à 500 000 cellules.

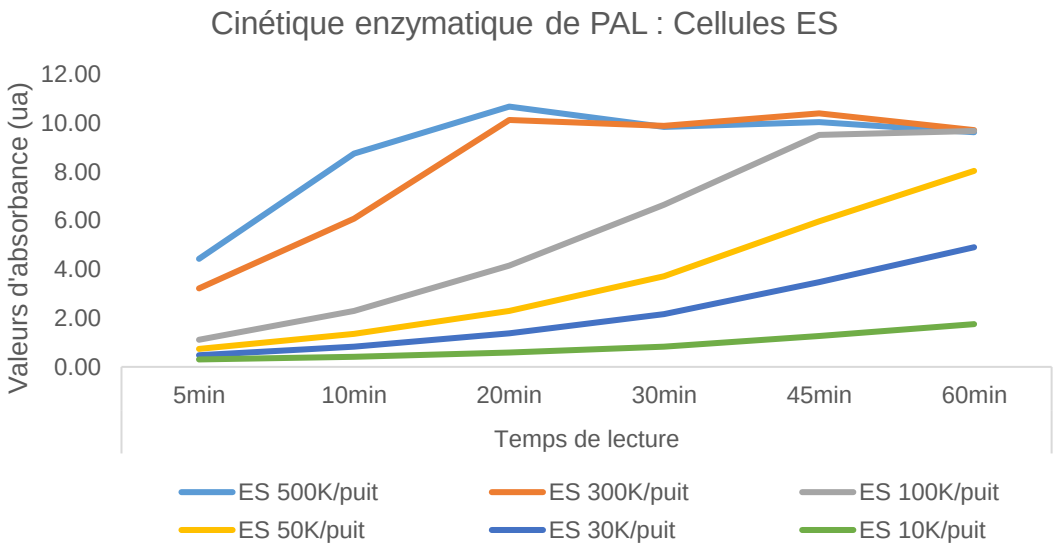


Figure n° 23 : Dosage des PAL contenues dans différentes quantité de cellules ES

Lecture de l'absorbance à 405 nm : les valeurs d'ordonnées sont données en unité arbitraire d'absorbance.

En comparant le dosage des PAL de différentes quantités de cellules ES et la gamme étalon nous observons que la condition à 500 000 cellules sature entre 10 et 20 minutes et que « 300 000 cellules » sature à 20 minutes comme la solution étalon à 200 ng/mL. La quantité « 100 000 cellules » n'arrive à saturation qu'au bout de 45 minutes. Les conditions inférieures à 50 000, 30 000 et 10 000 cellules ne saturent pas, même après 1h de réaction enzymatique.
La condition à 500 000 cellules contient 233 ng/mL de PAL, et 300 000 cellules contiennent 159 ng/mL (figure n°23), ces deux conditions sont trop concentrées et feront rapidement saturer le dosage. La condition à 100 000 cellules, similaire à la solution étalon 54 ng/mL, est le meilleur compromis entre condition non saturante et résolution, jai donc choisi cette condition pour réaliser les dosages de PAL avec ce kit. Pour ne pas être limitant il faudra lyser un minimum de 500 000 cellules par puits pour réaliser le dosage en triplicats de 100 000 cellules chacun.

Bien qu'ayant choisi une quantité de cellules ES équivalente à 50 ng/mL de PAL, cela pourra être différent avec d'autres lignées de cellules ES. Ne sachant pas à l'avance l'ordre de grandeur des concentrations en PAL des futurs échantillons à doser, il est judicieux de prévoir la lecture des absorbances de chaque dosage à 10, 20 puis 30 min ou toutes les 5 min entre 0 et 30 mins. Notre spectrophotomètre nous permettant d'effectuer des lectures d'absorbances de manière automatisée j'ai choisi de lancer des cycles de lectures

toutes les 5 minutes entres t= 0 minutes et t=30 minutes. Le cycle de lecture pour lequel le coefficient de corrélation R^2 est le plus élevé sera choisi pour l'analyse des données.

Pour connaitre la quantité de PAL exprimée par les cellules nourricières que nous utilisons (SNL ou PMEF) j'ai réalisé le même dosage sur des cellules SNL.

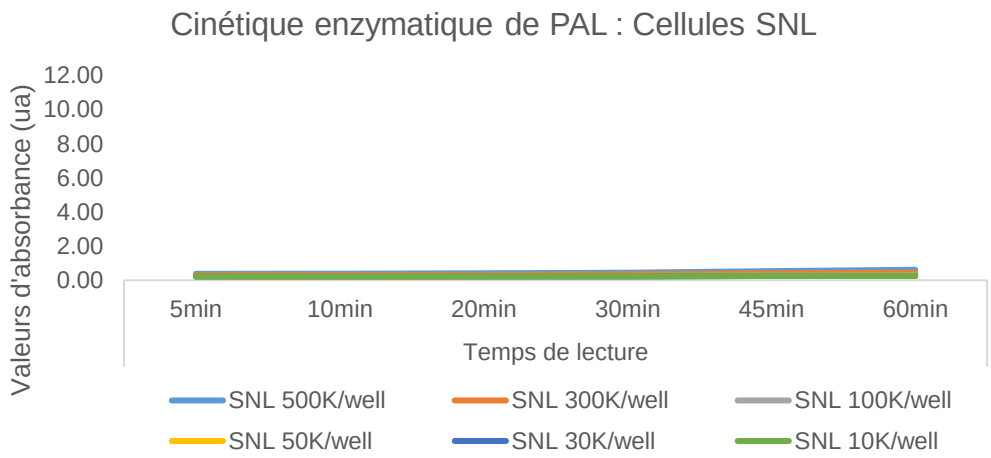


Figure n° 24 : Dosage des PAL contenues dans différentes quantités de cellules SNL

Lecture de l'absorbance à 405 nm : les valeurs d'ordonnée sont données en unité arbitraire d'absorbance.

Nous observons que toutes les conditions, même 500 000 cellules par puit, ont une concentration en phosphatase alcaline quasiment nulle. Lors de la culture des cellules ES la population cellulaire est généralement composée de 4 à 10 fois plus de cellules ES que de cellules nourricières. Additionné au fait que ces cellules nourricières expriment très peu de PAL il sera inutile d'éliminer les cellules nourricières avant le dosage des phosphatases alcalines.

Concentrations en PAL (ng/mL)		
Quantité de cellules	ES	SNL
500K	233.94	1.64
300K	159.52	-0.35
100K	54.70	-2.27
50K	28.82	-2.60
30K	13.86	-2.80
10K	2.30	-3.20

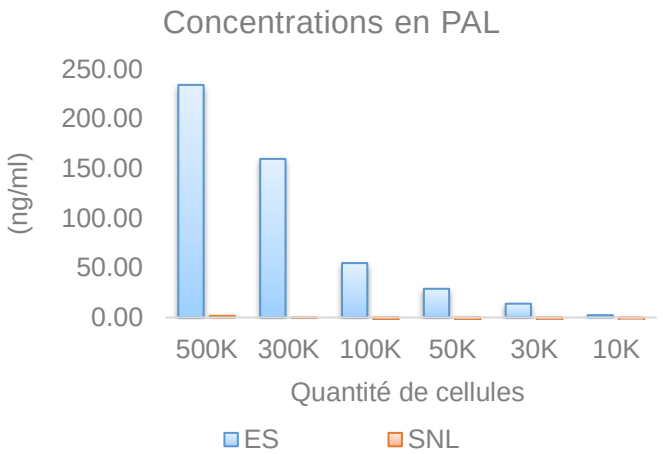


Figure n° 25 : Quantification des PAL contenues dans différentes quantité de cellules ES et SNL

La lecture des absorbances à t=10 min, confirme que 500 000 et 300 000 cellules par puits ont des concentrations trop élevées en PAL pour être utilisées et que 100 000 cellules ES par puits est la quantité optimale parmi celles testées.

Par conséquent, le dosage des PAL avec le kit « Sensolyte pNPP Alkaline Phosphatase Assay Kit » devra être réalisé sur 100 000 cellules par puits en triplicats pour chaque condition avec des lectures d'absorbance toutes les 5 minutes entre t=0 min et t=30 min.

2.2.4.1.1 Dissociation et comptage

Pour quantifier les phosphatases alcalines des cellules ES il est nécessaire de disposer d'au moins 500 000 cellules par condition expérimentale. Pour cela, les cellules à tester doivent être mises en culture 48h avant le dosage dans un support d'au moins 9 cm^2, et de préférence sur 20 cm^2.

Le jour du dosage, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS (Gibco référence 14040-174) avant d'être dissociées avec un réactif enzymatique de type Accutase (Gibco référence A11105-01). Les boites sont incubées à 37°C pour une durée comprise entre 1 et 4 minutes. Lorsque le tapis cellulaire se détache, il faut dissocier mécaniquement les cellules ES, puis stopper la réaction de dissociation enzymatique avant de réaliser le dosage. Il faut ensuite compter les cellules pour répartir si possible 1 million de cellules (sinon 500 000) dans un tube de 15 mL et centrifuger à 240g pendant 4 minutes. Un lavage des culots cellulaires est réalisé en PBS suivi par une centrifugation (240g/4 min), et à partir de ce premier lavage les échantillons sont déposés sur glace. Deux nouveaux lavages sont réalisés avec le tampon B, fournit dans le kit et dilué au $1/10^e$ en eau déionisée, accompagné de centrifugation (240g/4 min).

2.2.4.1.2 Lyse

A cette étape les cellules sont resuspendues à 2 millions/mL avec le tampon de lyse composé de triton X-100 dilué au $1/500^e$ dans le tampon B 1x. Après avoir correctement resuspendu les échantillons en tampon de lyse, il faut transférer la suspension dans des microtubes de 1,5 mL afin de pouvoir les centrifuger à 2500g une fois la lyse terminée. La lyse est réalisée à 4°C sous agitation douce pendant 10 min, ensuite les tubes sont centrifugés à 2500g pendant 10 min. Il est crucial de respecter ces conditions de centrifugation pour qu'aucun débris cellulaire ne reste en suspension et compromette le dosage.

2.2.4.1.3 Réaction enzymatique

Lorsque les lysats ont été centrifugés, un culot blanc contenant les débris cellulaires est visible, il est primordial de ne pas remettre en suspension ces débris ou d'en récupérer par mégarde lors du prélèvement des lysats. Pour cela il ne faut pas descendre au fond du tube et laisser 50 ou 100 µL de lysats, qui seront éliminés, dans le tube. Disposer 300 µL de chaque lysat dans une ligne d'une plaque 96 puits à fond rond. Répartir les lysats en triplicats ou quadruplats dans la plaque 96 à fond plat contenant la gamme étalon à la pipette multicanaux sans appuyer sur le deuxième cran de la pipette pour ne pas faire de bulles. Lorsque la gamme étalon et les

lysats ont été répartis en triplicats de 50 µL dans la plaque P96 à fond rond, rajouter 50 µL de tampon B en triplicats comme témoin pour évaluer l'absorbance du tampon B. Lorsque le spectrophotomètre est programmé, il faut distribuer 50 µL de substrat pNPP dans chaque puits à l'aide d'une pipette multicanal électronique et démarrer la lecture de la cinétique.

2.2.4.1.4 Mesure des Absorbances

Vérifier le programme de lecture du spectrophotomètre en vérifiant la longueur d'onde d'absorbance de 405 nm, le volume de lecture de 100 µL, le type de P96. Le plan de la plaque doit aussi être vérifié : position des solutions étalons, témoins et échantillons. Il faut programmer une agitation de la plaque en double orbital à 100 rpm pendant 60 s avant le premier dosage, afin de correctement homogénéiser le mélange réactionnel avant la première lecture. La chambre de lecture doit être préchauffée à 37°C, si la plaque de lecture est sur glace il est utile d'essuyer toute condensation sous la plaque car celle-ci peut gêner la lecture pendant les 2 premiers cycles. Il est préférable de programmer la lecture des absorbances toutes les 5 minutes pendant au moins 7 cycles dès le début de la cinétique, soit un total de 7 mesures réparties sur 35 min. Le cycle utilisé pour le recueil des données est le plus tardif pour lequel le coefficient de corrélation est supérieur à 0,99 (R^2>0,99) et pour lequel les échantillons sont compris dans la gamme étalon.

2.2.5 Quantification des facteurs de transcription NOS par cytométrie en flux

2.2.5.1 Choix des anticorps

Afin d'utiliser les anticorps dirigés contre Nanog, Oct4 et Sox2 dans le même mélange réactionnel et de limiter les compensations j'ai choisi d'utiliser des anticorps couplés à des fluorophores qui sont excités par des lasers différents. Les anticorps que j'ai choisis sont présentés dans le tableau n°3.

Nom Anticorps	Référence	Fluorophore	Longueur d'onde d'excitation maximale	Laser d'excitation (LSR Fortessa)	Longueur d'onde d'émission maximale	Canal de lecture du signal
PE Mouse anti-Mouse Nanog	560277	PE	496 nm	vert 561 nm	578 nm	PE
Alexa Fluor® 647 Mouse anti-Oct3/4	560329	A647	650 nm	rouge 640 nm	668 nm	APC
Alexa Fluor® 488 Mouse anti-Sox2	561593	A488	495 nm	bleu 488 nm	519 nm	FITC

Tableau n°3 : Anticorps conjugués utilisés pour la quantification par cytométrie en flux

2.2.5.2 Protocole d'immunomarquage intracellulaire

2.2.5.2.1 Prérequis

Pour quantifier les facteurs de transcription par cytométrie de flux il est préférable de disposer d'au moins 500 000 cellules ES par condition expérimentale. Si un dosage des phosphatases alcalines est réalisé en même temps que l'analyse par cytométrie, il faudra obtenir une quantité minimale d'un million de cellules ES, les cellules à tester doivent donc être mises en culture 48h avant le dosage sur une surface d'au moins 20 cm^2 (boite de 6 cm de diamètre). Pour détecter des facteurs de transcription, je dois réaliser un immunomarquage intracellulaire dans lequel je fixe, puis perméabilise les cellules. La fixation permet d'acquérir les données au cytomètre de flux le lendemain dans le cas où il serait impossible de le faire le jour du marquage.

Avant le marquage, les cellules doivent être dissociées et comptées en suivant la procédure précédemment décrite dans le paragraphe « Dissociation et comptage ». Lorsque les cellules ont été comptées, puis filtrées sur un filtre de 30 µm, je répartis pour chaque condition 500 000 cellules dans un puits de plaque 96 en polypropylène à fond V. Toutes les étapes du marquage seront réalisées sur glace dans cette P96. Chaque lavage est effectué avec un volume de 200 µL/puits et chaque incubation se réalise dans un volume réactionnel de 50 µL/puits. Après chaque étape de lavage et d'incubation, les cellules seront centrifugées à 240g pendant 4 minutes jusqu'à l'étape de fixation, puis à 400g pendant 4 minutes après la fixation. En raison de l'utilisation de fluorophores, toutes les incubations sont réalisées dans l'obscurité.

2.2.5.2.2 Marquage de viabilité

La première étape est le marquage des cellules mortes par le marqueur de viabilité « Zombie NIR » (BioLegend référence BLE423105, utilisé au 1/400^e en PBS). Ce réactif pénètre dans les cellules mortes et se fixe aux protéines, il est donc impératif de réaliser ce marquage avant les étapes de fixation et de perméabilisation. J'effectue un premier lavage des cellules en PBS avant de les incuber 30 min dans le « Zombie NIR ».

2.2.5.2.3 Saturation des récepteurs Fc

Après fixation du « Zombie NIR » dans les cellules mortes, je lave une fois les cellules en « tampon FACS » (sérum de veau fétal à 2% et EDTA à 5 mM en tampon PBS) avant de les incuber avec la solution « 2.4G2 » pendant 15 minutes. Cette solution de type « Fc-Block » est un mélange polyclonal d'immunoglobulines non couplées à des fluorochromes qui vont venir se fixer sur les Fc-récepteurs (CD16, CD32 et CD64). Le but de cette étape est de saturer les récepteurs membranaires sur lesquels se fixent les Immunoglobulines par leurs

fragments Fc pour éviter que les anticorps utilisés dans le marquage se fixent à ces récepteurs. J'utilise une solution 2.4G2 produite en interne par la plateforme d'Immunophénotypage du centre.

2.2.5.2.4 Fixation et perméabilisation

Après un lavage en « tampon FACS » j'utilise une solution de fixation « BD Cytofix » (BD Biosciences référence 554655) que je laisse 30 min sur les cellules. Les cellules doivent ensuite être lavées avec un tampon de perméabilisation, pour cela j'effectue deux lavages avec la solution « BD Perm/wash buffer » (BD Biosciences référence 554723, utilisé à 1X). Enfin je dépose le mélange réactionnel contenant mes anticorps de marquage sur les cellules perméabilisées.

2.2.5.2.5 Immunomarquage

Pour mon marquage j'utilise uniquement des anticorps couplés à des fluorochromes. Après plusieurs titrations de ces anticorps, il s'est avéré que je ne pouvais pas conserver un signal optimal après dilution pour les anti-Nanog et anti-Sox2. En effet, ces anticorps sont commercialisés dans une solution prête à l'emploi pour lesquelles sont mentionnés les volumes à utiliser pour chaque marquage. Ainsi j'utilise pour chaque marquage : 10 µL de l'anti-Nanog, 2,5 µL de l'anti-Oct4 et 2,5 µL de l'anti-Sox2 additionnés de 35 µL de tampon « BD Perm/wash ». Je laisse les anticorps en contact avec les cellules pendant 30 min, puis je lave une dernière fois les cellules avec du tampon « BD Perm/wash » avant de les transférer dans des tubes de 5 mL en polystyrène pour acquérir les données sur le cytomètre en flux « LSR Fortessa » (BD Biosciences).

2.2.5.2.6 Paramétrage du cytomètre

2.2.5.2.6.1 Bruit de fond electronique

Avant toute utilisation du cytomètre en flux il est nécessaire de régler les voltages de chaque PMT (photomultiplicateur) afin que le signal des cellules ES non marquées ne dépasse pas 2,5 fois le bruit de fond électronique du cytomètre (2,5rSD : 2,5 x Electronic Noise robust Standard Deviation). Le fabricant BD Biosciences a défini pour ces cytomètres qu'un signal réglé sur 2,5 fois le bruit de fond électronique est composé de 15% de bruit de fond électronique. Afin que la proportion de ce bruit de fond ne dépasse pas 15%, il est donc nécessaire de paramétrer les voltages de chaque photomultiplicateur (PMT) de sorte que le signal émis par une cellule négative soit égal à 2,5rSD.

2.2.5.2.6.2 Titration des anticorps

Pour mesurer et comparer les intensités de fluorescence de différents fluorochromes, la méthode de calcul du « Stain Index » est généralement utilisée. Cette méthode calcule l'intensité de fluorescence obtenue lors du marquage en divisant le signal de florescence par l'étalement du signal de la population négative.

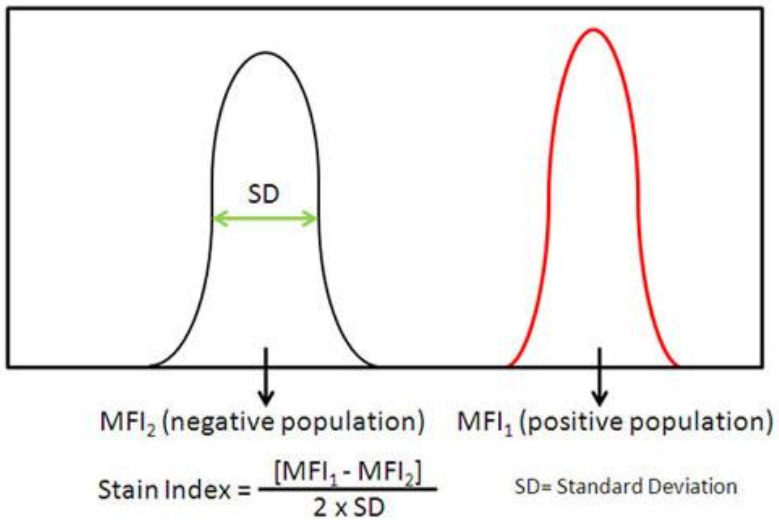


Figure n°26 : Calcul du Stain Index

Le Stain Index est le résultat de la différence (D) entre le signal de la population positive (Mean Fluorescent Intensity positive) et celui de la population négative (Mean Fluorescent Intensity negative) divisé par deux fois la largeur du signal de la population négative (SD).
Source : https://biolegend.tumblr.com/post/101441645849/the-stain-index-what-is-it-and-what-does-it-tell

Après avoir choisi le fluorochrome couplé à chaque anticorps en fonction de son SI (stain index) et de sa compatibilité avec les autres anticorps que l'on souhaite utiliser, il faut définir les concentrations optimales à utiliser. Les SI de chaque dilution sont calculés pour définir l'efficacité des marquages. Cette méthode permet de connaitre l'ordre de grandeur des concentrations optimales de chaque anticorps mais il est tout de même nécessaire de vérifier les signaux de fluorescence obtenus pour trouver la concentration idéale. La dilution qui a le SI le plus élevé sera utilisée pour les marquages. Dans mon cas, les anticorps sont vendus prêt à l'emploi, donc aucune concentration volumique n'est précisée. Après dilution et calcul du SI, j'ai constaté qu'il était préférable de respecter les consignes du fabricant pour conserver un signal optimal.

2.2.5.2.6.3 Matrice de compensation

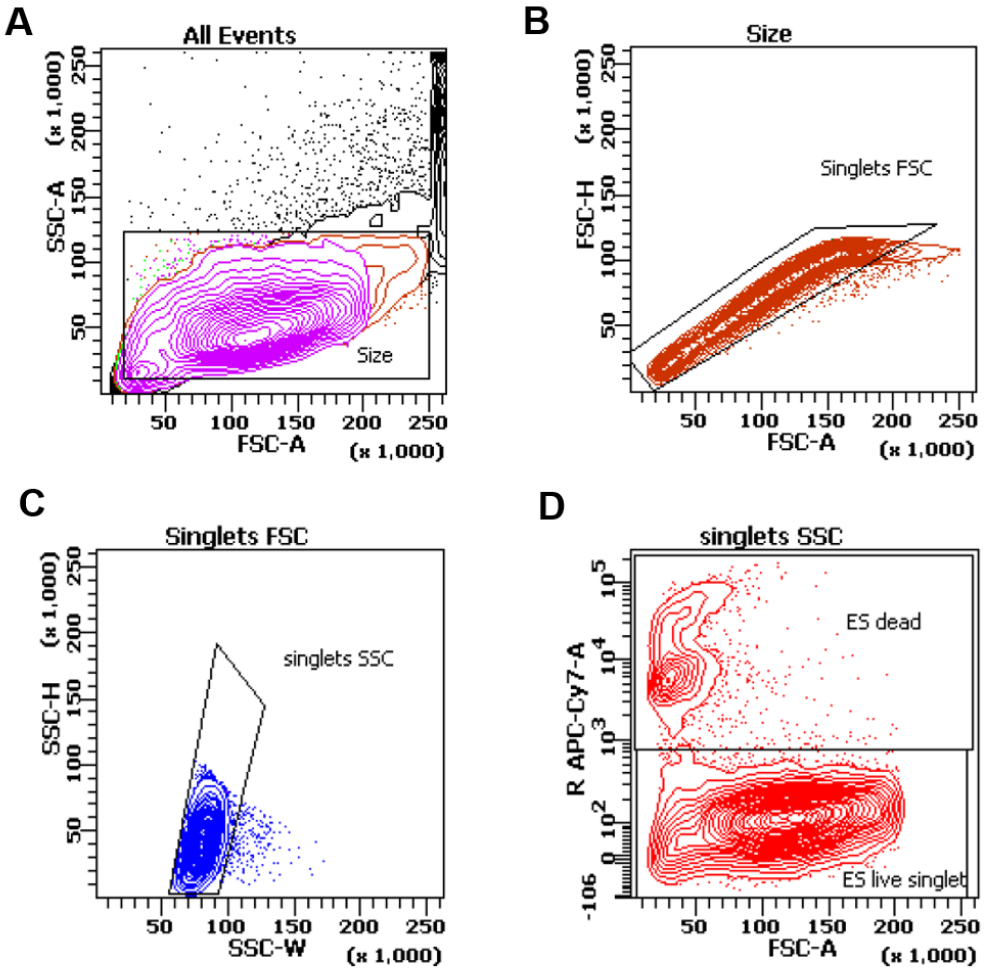
Le cytomètre de flux « LSR Fortessa » du fabricant BD Biosciences permet de calculer automatiquement les compensations à appliquer aux échantillons en réalisant une matrice de compensation. Cela consiste à fixer les anticorps sur des billes et à les acquérir au cytomètre. Le Fortessa va analyser le signal émis par chaque anticorps et calculer les compensations à appliquer sur le mélange réactionnel. Je contrôle ces compensations automatiques avant l'acquisition des échantillons et analyse des données pour être certains qu'aucune distorsion du signal n'est présente. Pour optimiser mes compensations et prendre en compte une éventuelle

perte de signal dû à la dégradation des anticorps au cours du temps, je réalise toujours une matrice de compensation lorsque je fais un immunomarquage par cytométrie en flux (avec les billes de Life Technologies référence A10497).

2.2.5.2.7 Acquisition des données

Avant d'acquérir les signaux de fluorescence de mes échantillons je sélectionne successivement les cellules qui ont la taille (FSC) et la structure (SSC) requise (analyse SSC-A/FSC-A, figure n°27A), qui sont correctement individualisées, ne représentent ni doublets de taille (analyse FSC-H/FSC-A, figure n°27B) ni de structure (analyse SSC-H /SSC-W, figure n°27C), et qui étaient vivantes jusqu'à l'étape de fixation. Je détecte les cellules mortes en réalisant à la première étape de mon immunomarquage une incubation de mes cellules dans du « Zombie NIR ». Les cellules qui auront fixé le Zombie NIR émettront une fluorescence dans le canal APC-Cy7 (figure n°27D).

Lorsque j'ai sélectionné les cellules vivantes correctement individualisées j'analyse des cellules non marquées pour connaitre la valeur de mes signaux négatifs. Cela me permet de définir les intensités de fluorescence où apparaitront mes signaux positifs (figure n°28A). J'estime ainsi le pourcentage de cellules qui ont été marquées par chacun de mes anticorps (figure n°28B).



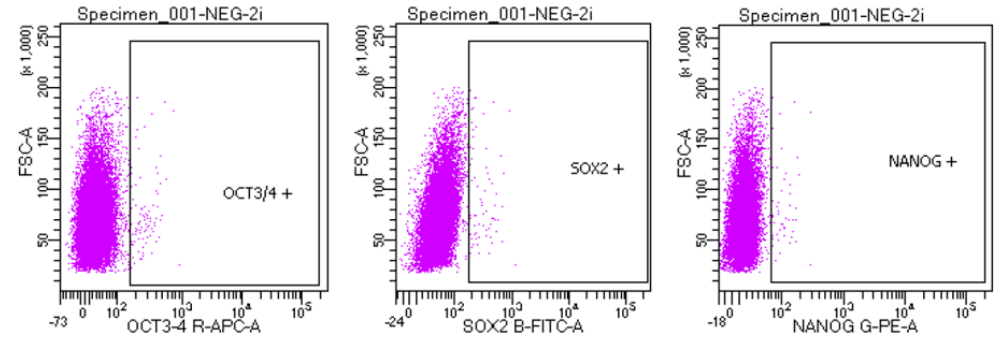
E

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	20,000	####	100.0
Size	16,585	82.9	82.9
Singlets FSC	15,764	95.0	78.8
singlets SSC	15,582	98.8	77.9
ES live singlet	14,036	90.1	70.2
OCT3/4 +	12,632	90.0	63.2
NANOG +	12,266	87.4	61.3
SOX2 +	12,488	89.0	62.4
OCT3/4 + AND NANOG + AND SOX2 +	11,837	84.3	59.2
ES dead	1,554	10.0	7.8

Figure n°27 : Sélection des cellules d'intérêts

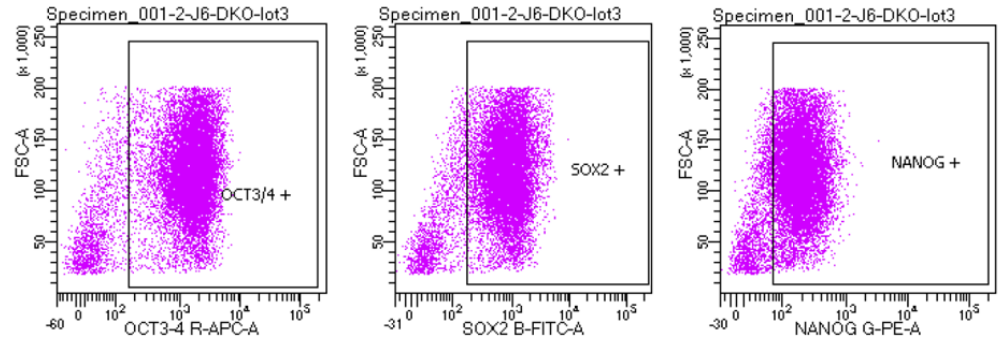
A : Observation des paramètres taille (FSC) sur structure (SSC). B et C : Sélection des cellules correctement individualisées par élimination des doublets de taille (B) et de structure (C). D : Sélection des cellules vivantes et élimination des cellules mortes marquées par le zombie NIR. E : Hiérarchie de ma stratégie d'analyse. Graphes réalisés avec le logiciel FACSDIVA (version 8.0.1).

A



Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	20,000	####	100.0
Size	18,897	94.5	94.5
Singlets FSC	18,702	99.0	93.5
singlets SSC	18,488	98.9	92.4
ES live singlet	18,488	100.0	92.4
OCT3/4 +	82	0.4	0.4
NANOG +	45	0.2	0.2
SOX2 +	69	0.4	0.3
OCT3/4 + AND NANOG + AND SOX2 +	37	0.2	0.2
ES dead	0	0.0	0.0

B



Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	20,000	####	100.0
Size	16,585	82.9	82.9
Singlets FSC	15,764	95.0	78.8
singlets SSC	15,582	98.8	77.9
ES live singlet	14,036	90.1	70.2
OCT3/4 +	12,632	90.0	63.2
NANOG +	12,266	87.4	61.3
SOX2 +	12,488	89.0	62.4
OCT3/4 + AND NANOG + AND SOX2 +	11,837	84.3	59.2
ES dead	1,554	10.0	7.8

Figure n°28 : Définition des zones de marquage positif

A- Délimitation des zones de marquages positifs sur des cellules non marquées. B- Observation du nombre et du pourcentage de cellules positives pour chacun des marquages. Graphes réalisés avec le logiciel FACSDIVA (version 8.0.1).

2.2.6 Analyse des résultats

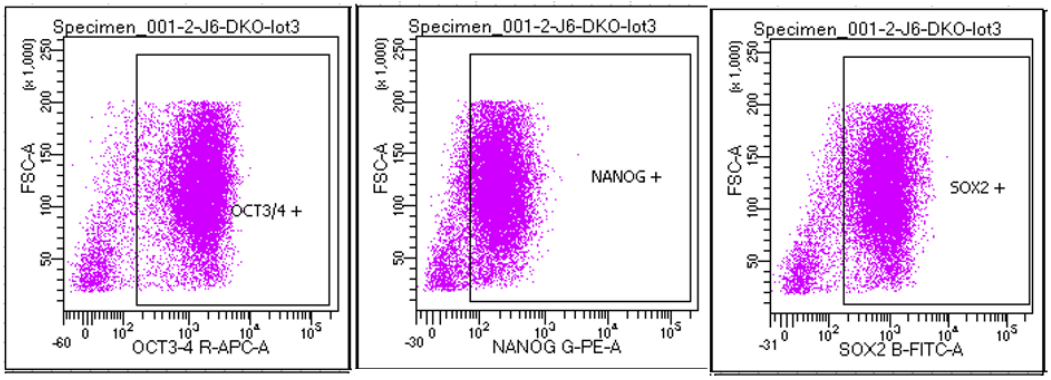
Mes populations d'intérêts sont celles qui expriment individuellement Nanog, Oct4 et Sox2, puis simultanément ces 3 facteurs de transcription (figure n°29A). Ma stratégie de gating me permet de correctement cibler mes populations d'intérêts en éliminant les signaux issus d'artefact, les signaux de fluorescence que j'analyse sont proches d'une courbe de gauss où la médiane, la moyenne et la moyenne géométrique sont égales. Pour éviter que des valeurs positives élevées faiblement représentées dans mon échantillon influent sur la valeur représentative de ma population comme ce serait le cas avec la moyenne, j'ai choisi d'utiliser la valeur médiane de l'intensité de fluorescence. Les valeurs médianes de fluorescences de mes populations sont donc égales ou très proches des valeurs moyennes (maximum 0,5% de différence). Pour chaque analyse de cytométrie en flux je vais donc présenter les pourcentages de cellules que représentent mes quatre populations d'intérêts, ainsi que les valeurs médianes de l'intensité de fluorescence de la population triple positive « Nanog+Sox2+Oct4 » (figure n°29).

Compte tenu que mes préparations cellulaires sont homogènes et que la pureté moyenne de mes échantillons en cellules triple positives avoisine les 85%, il me suffit d'acquérir 20 000 évènements (17 000 cellules d'intérêt) pour être représentatif de l'échantillon analysé. Compte-tenu de l'action collaborative des facteurs NOS dans les cellules pluripotentes je souhaite quantifier leur expression dans les cellules qui les expriment tous les trois. Les résultats de mes analyses par cytométrie en flux sont composés des pourcentages des cellules simples positives et triples positives, et des valeurs médianes des intensités de fluorescence de la population triple positive pour chacun des marqueurs (figure n°29D).

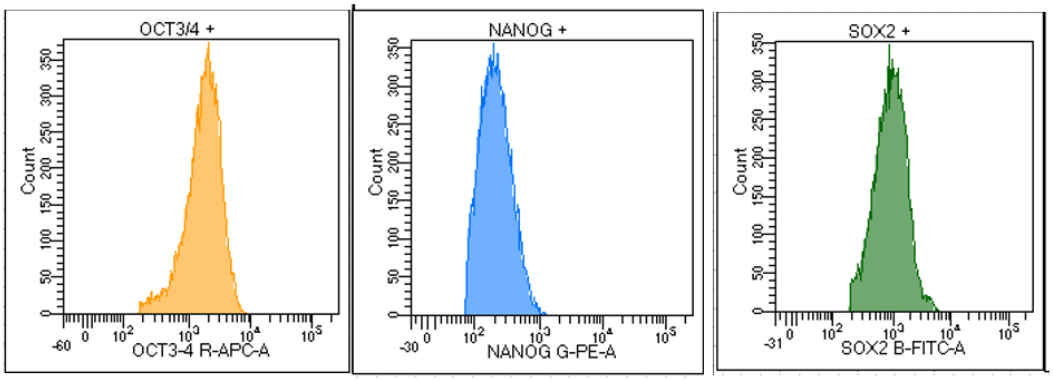
A

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	20,000	####	100.0
Size	16,585	82.9	82.9
Singlets FSC	15,764	95.0	78.8
singlets SSC	15,582	98.8	77.9
ES live singlet	14,036	90.1	70.2
OCT3/4 +	12,632	90.0	63.2
NANOG +	12,266	87.4	61.3
SOX2 +	12,488	89.0	62.4
OCT3/4 + AND NANOG + AND SOX2 +	11,837	84.3	59.2
ES dead	1,554	10.0	7.8

B



C



D

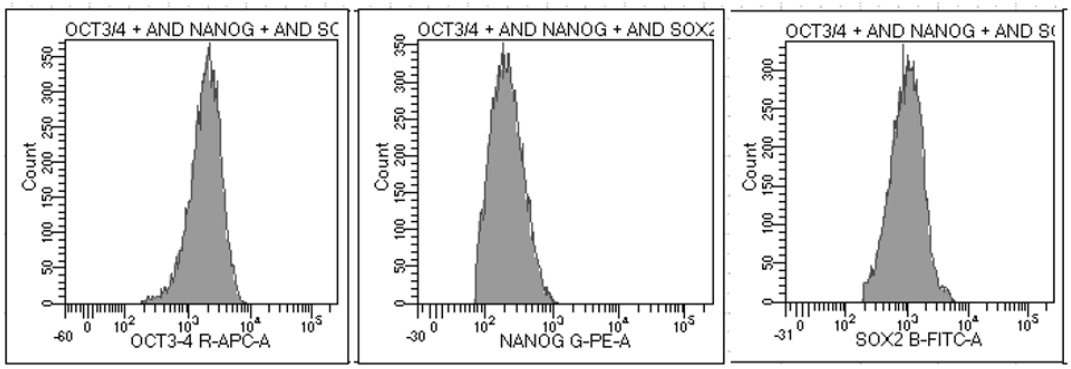


Figure n°29 : Les populations cellulaires analysées

Les populations analysées sont celles qui expriment individuellement les facteurs de transcription Oct4, Nanog, Sox2 et celles qui expriment simultanément ces trois facteurs.
A : Hiérarchie de la stratégie d'analyse. B : Les dotplot « FSC-A/marqueur analysé » me permettent de délimiter des zones notées « NANOG+ », OCT3/4+ » et « SOX2 + » pour identifier et quantifier les cellules marquées par les anticorps anti-Nanog, ant-Oct3/4 et anti-Sox2. Pour mieux visualiser les valeurs de fluorescence émise par les cellules marquées j'ai choisi de les afficher sous forme d'histogramme. C : Signaux de fluorescence émis par les cellules qui expriment

individuellement les trois facteurs NOS. D : Signaux de fluorescences de la population positive pour les trois marquages Oct4, Nanog et Sox2 : population « OCT3/4 + AND NANOG + AND SOX2 + ».

2.2.6.1 Production de souris chimères

Les cellules souches pluripotentes de qualité optimale sont capables de mener à terme un développement embryonnaire normal et génèrent donc des souris à chimérisme élevé, dans lesquelles tous les tissus y compris la lignée germinale ont pu être colonisés. Si les cellules souches ne sont pas parfaitement pluripotentes ou présentent des anomalies génétiques importantes, elles produiront des souris faiblement chimériques et peuvent réduire la viabilité des embryons dans lesquels elles sont introduites (De Los Angeles et al., 2015). Toutes les étapes techniques impliquées dans la micro-injection des cellules ES dans des blastocystes et à l'établissement de la lignée murine sont réalisées par le service MIZ de la plateforme GEMTis. La méthode d'obtention de souris chimères utilisée par le service MIZ est la plus communément utilisée : elle consiste à injecter entre 12 et 14 cellules ES par blastocyste.

Suite à l'obtention des souris chimériques, les mâles capables de transmission à la lignée germinale (Germ Line Transmission) pourront transmettre leur information génétique à la génération suivante. La GLT correspond à la colonisation de la lignée germinale de l'embryon par les cellules ES micro-injectées.

Les fonds génétiques des blastocystes hôtes dans lesquels sont micro-injectées les cellules ES, sont choisis en fonction de la compatibilité entre les ES exogènes et endogènes, mais aussi en fonction de la couleur du pelage afin que le niveau de chimérisme soit facilement observable à partir de la couleur du pelage des souris, mais aussi en fonction de propriété génétique propre à chaque fonds. Ainsi, dans notre cas, le fonds génétique de nos cellules ES donne un pelage noir et celui des blastocystes donne un pelage blanc. Le niveau de chimérisme de chaque animal est calculé par observation du pelage des animaux. La proportion du pelage qui est noire représente leur niveau de chimérisme, exprimé en pourcentage.

Bien que cette méthode d'évaluation du taux de chimérisme concerne uniquement le pelage, et donc l'épiderme issus du lignage embryonnaire de l'ectoderme qui est différent du feuillet embryonnaire qui forme les cellules germinales, une souris qui est chimérique à hauteur de 80% aura une probabilité plus importante de donner une GLT qu'une souris chimère de 20%. Nous savons par expérience que des souris chimériques à 50% permettent d'obtenir une GLT dans un délai convenable, nous utilisons donc les chimères mâles dont le chimérisme est compris entre 50 et 100%, en favorisant tout de même les souris les plus chimériques.

2.2.6.2 Utilisation des données

Tous les résultats qui comportent des barres d'erreurs représentent des expériences qui ont été réalisées entre 2 et 5 fois. Pour chaque résultat je présente la moyenne des valeurs obtenues accompagnée de son erreur standard aussi nommé « l'erreur type sur la moyenne » représentée par les barres d'erreurs. Il s'agit de la « déviation standard » ou « écart-type standard », qui évalue la variabilité des données, divisé par la racine carré du nombre de valeurs (Cumming et al., 2007). L'erreur standard prend en compte le nombre de valeur qui constitue la moyenne pour évaluer l'écart présent entre la moyenne calculée (qui est une estimation arithmétique) et la « vraie » moyenne. L'erreur standard représente donc la précision de la moyenne obtenue par rapport aux valeurs de la population en tenant compte de la dispersion des données.

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (X - M)^2}{n - 1}} \qquad SE = SD/\sqrt{n}$$

Figure n°30 : Formules de calcul de la deviation standard (SD) et de l'erreur standard (SE).

« X » représente les données, « M » est la moyenne de ces données et « n » est le nombre de données.
Source : Cumming, G., Fidler, F., Vaux, D.L., 2007. Error bars in experimental biology. J. Cell Biol. 177, 7–11. doi:10.1083/jcb.200611141 (table n°1)

Pour chaque résultat la probabilité « p » de l'hypothèse nulle est calculée par le test de student. La valeur de « p » représente la probabilité que la différence observée soit due au hasard et ne soit donc pas corrélée aux conditions expérimentales, il s'agit de « l'hypothèse nulle ». La différence observée est jugée significative si la probabilité « p » est inférieure à 0,05. L'hypothèse nulle est ainsi rejetée.

Résultats

3 Résultats

Pour trouver des pistes d'amélioration de nos procédures de culture j'ai analysé les effets de différents réactifs de culture cellulaire sur la morphologie, le taux de croissance, l'expression des PAL et des facteurs de transcription Nanog, Oct4 et Sox2. J'ai testé différents réactifs de dissociation cellulaire, des milieux sans sérum (DKO+KSR+LIF et 2i+LIF) et des nouvelles lignées de cellules ES.

3.1 Comparatif de réactifs de dissociation cellulaire

Nous avons constaté à plusieurs reprises des différences d'activité protéolytique entre plusieurs lots de trypsine. Certains lots plus actifs ont conduit à la différenciation de nos cellules ES et à une chute de leur croissance de manière ponctuelle. J'ai donc voulu comparer plusieurs réactifs de dissociation cellulaire pour évaluer leur impact sur nos cellules ES (tableau n°4).

Nom produit	Numéro Lot	Référence produit	Fabricant	fournisseur
0,05% Trypsin EDTA (1X)	lot1722774	25300-054	Gibco	Life technologies
0,05% Trypsin EDTA (1X)	lot1788056	25300-054	Gibco	Life technologies
StemPro Accutase	1796277	A11105-01	Gibco	Life technologies
TRYPLE EXPRESS W/ PHENOL RED	1797182	12605-010	gibco	Life technologies
Gentle Cell Dissociation Reagent	16D71059	07174	StemCell technologies	StemCell technologies

Tableau n°4 : Référence des réactifs de dissociation cellulaire testés

La trypsine est une enzyme pancréatique (celle-ci est porcine), l'Accutase est un mélange d'enzymes conçu pour dissocier les cellules sans endommager leurs récepteurs membranaires, la TrypLE est un réactif dérivé de la trypsine moins actif que celle-ci et le GCDR (Gentle Cell Dissociation Reagent) est un réactif non-enzymatique. La trypsine ou l'Accutase sont généralement utilisés en laboratoire.

3.1.1 Dosage des PAL

Compte tenu de la localisation extracellulaire des PAL (ancrées dans la membrane cytoplasmique par des GPI) et de leur forte représentation chez les cellules ES, je me suis demandé si l'activité protéolytique des réactifs de dissociation était observable par le dosage des PAL membranaires résiduelles (figure n°31). J'ai comparé différents réactifs de dissociation cellulaire afin de le déterminer (Tableau n°4). L'objectif de ce test est de choisir le réactif qui dissocie correctement nos cellules ES avec une activité protéolytique minimale.

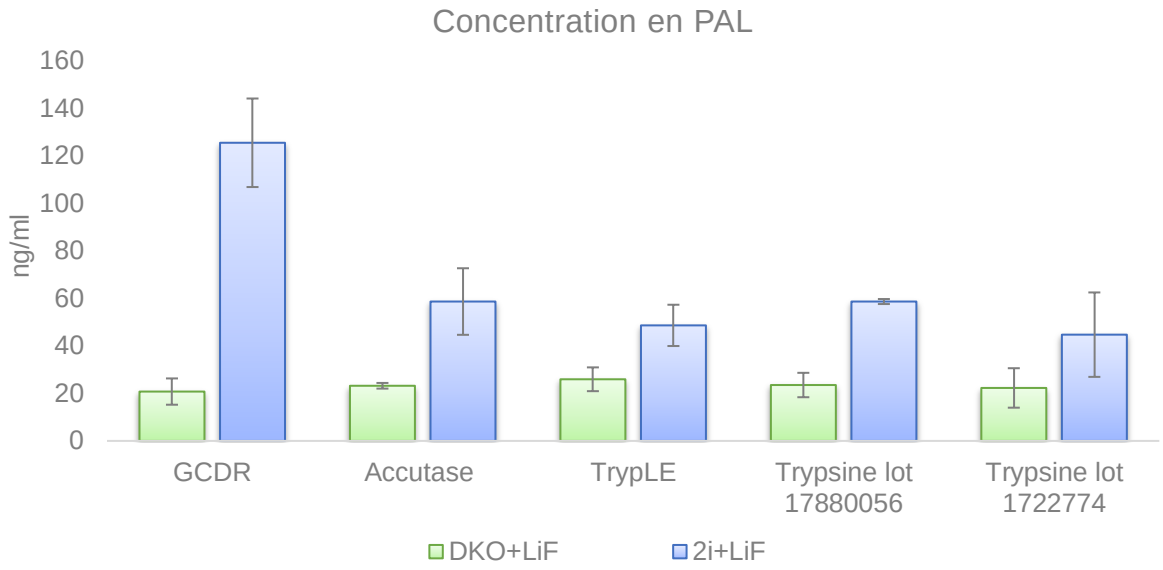


Figure n°31 : Détection des PAL après utilisation de différents réactifs de dissociation cellulaire

Les données présentées sont les moyennes de cinq dosages indépendants. Chaque dosage a été réalisé après culture des cellules ES de la lignée JM8.F6 pendant six jours en milieu DKO+LIF (n=3) et 2i+LIF (n=4). Pour chaque condition « n » représente le nombre de culture de cellules ES analysés. Chaque culture est indépendante.

Sur les cultures en DKO+LIF nous n'observons pas de différence, mais en milieu 2i+LIF lorsque les amas cellulaires sont dissociés avec le réactif sans enzyme (GCDR) la concentration en PAL est deux fois plus élevée (125,5 ng/mL) que celles obtenues avec les réactifs enzymatiques Accutase et trypsine n° 1788056 (58,7 ng/mL). Les différences observées entre le GCDR et les réactifs enzymatiques sont toutes significatives (p value comprises entre (0,05 > p > 0,009). Il n'y a pas de différence significative entre les quatre réactifs enzymatiques testés (p > 0,27).

Le GCDR n'a pas d'activité enzymatique et dénature donc moins les protéines membranaires dont celles d'adhésion cellulaire. Compte tenu de la forte adhérence des cellules ES entre elles, la dissociation est essentiellement mécanique, ce qui fait chuter la viabilité cellulaire de 40% par rapport à une dissociation enzymatique. Par conséquent nous ne pourrons pas utiliser ce réactif pour la culture des cellules ES. Les quatre réactifs enzymatiques testés laissent moins de PAL à la surface des cellules que le GCDR. Cela confirme que ces réactifs enzymatiques dégradent les PAL. Aucune différence significative n'étant observée entre les différents réactifs enzymatiques, ce dosage ne nous donne aucun indice sur l'activité protéolytique des réactifs de dissociation.

3.1.2 Taux de croissance

Nous avons constaté par nos observations morphologiques que l'Accutase et la trypsine du lot n°1788056 avaient moins d'impact sur la viabilité cellulaire que le lot de trypsine n° 1722774. J'ai quantifié cette différence en comparant les taux de croissance obtenus après utilisation de ces différents réactifs sur des cultures de la lignée JM8.F6 réalisées en milieu 2i+LIF.

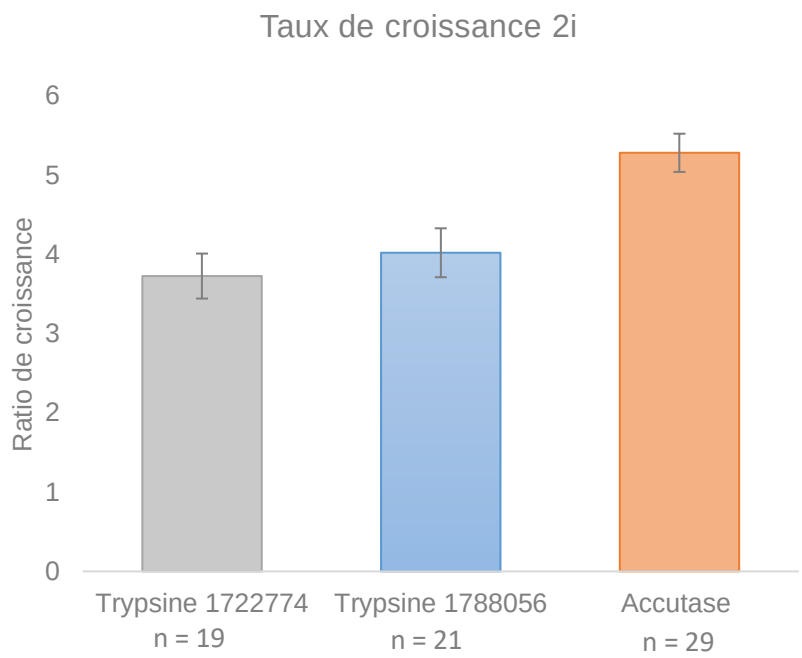


Figure n°32 : Taux de croissance obtenus après dissociation cellulaire

Les taux de croissance présentés correspondent à des cultures de cellules ES JM8.F6 cultivées en milieu 2i+LIF pendant 5 à 9 jours avant leur micro-injection. Pour chaque réactif « n » représente le nombre de clone de cellules ES analysés. La culture de chaque clone est indépendante.

Les cellules ES dissociées avec l'Accutase ont un taux de croissance moyen de 5,3, alors que ceux des cellules ES traitées avec les lots n°1788056 et 1722774 de trypsine sont respectivement de 4 et 3,7. Les différences de 30% observées entre l'Accutase et les deux lots de trypsine sont significatives (p « Accutase/T1722774 »=0,002 et p « Accutase/T1788056 »=0,0002), mais celle observée entre les deux lots de trypsine ne l'est pas (p=0,48). Cette différence est surement due à la spécificité de chaque réactif : la trypsine coupe toute les séquences peptidiques qui contiennent des résidus d'Arginine et de Lysine, alors que l'Accutase serait plus spécifique. L'Accutase est un mélange de plusieurs enzymes pourvues d'activités protéolytiques et collagénolytiques, dont la composition est protégée par un brevet. Ce mélange d'enzymes a été initialement créé pour obtenir des suspensions de cellules individualisées pour les besoins de la cytométrie en flux. Compte tenu de l'importance de conserver l'intégrité des molécules membranaires pour les immunomarquages, l'Accutase dégrade peut les molécules membranaires dont certains récepteurs impliqués dans différentes voie métaboliques tels que l'EGFR ou le FGFR. Cela pourrait expliquer pourquoi nous obtenons un taux de croissance supérieur en utilisant l'Accutase.

3.1.3 Les facteurs de transcription NOS

J'ai analysé par cytométrie en flux les expressions des facteurs de transcription Oct4 et Sox2 des cellules cultivées en 2i+LIF et dissociées avec la trypsine 1788056 ou avec l'Accutase pendant plusieurs jours.

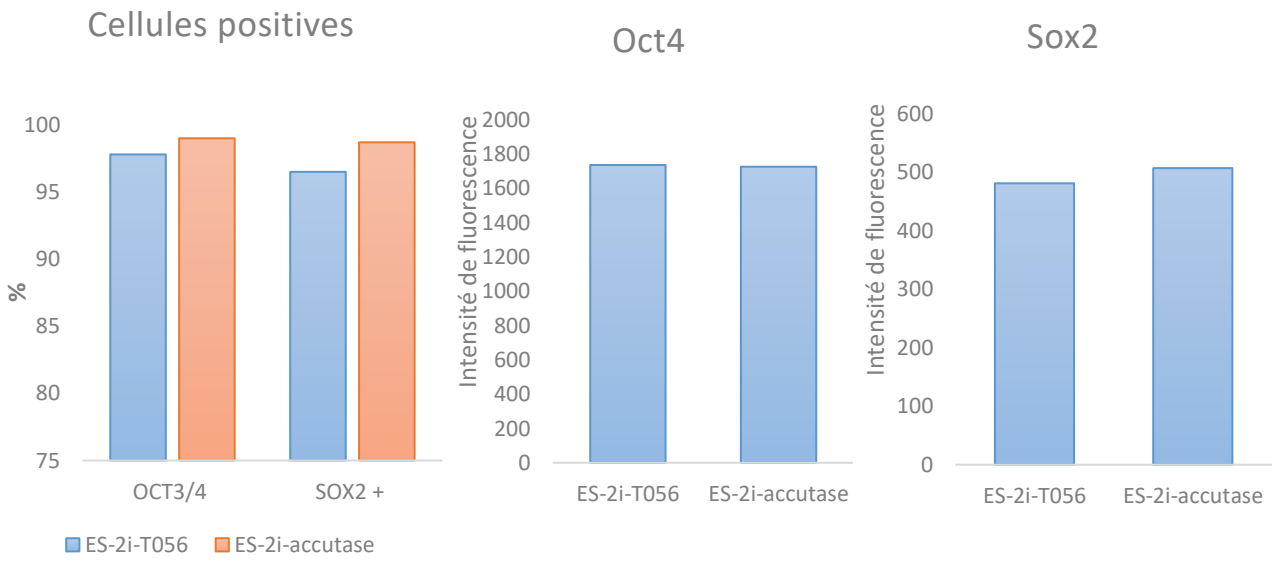


Figure n°33 : Analyse des expressions des facteurs de transcription Oct4 et Sox2

Cette expérience a été réalisée une seule fois (n=1), ces données ne présentent donc pas d'erreur standard. Répartition des populations des cellules ES qui sont positives pour les marquages Oct4 et Sox2. Valeurs médiane des intensités de fluorescence des marquage Oct4 et Sox2.

Aucune différence n'est observée autant dans les pourcentages de cellules positives que dans les niveaux d'expression.

Mes analyses ne m'ont pas permis de différencier les lots de trypsine 1722774 et 1788056. Par contre le calcul du taux de croissance confirme que l'Accutase endommage moins la membrane cellulaire, ce qui leur permet de conserver un taux de croissance supérieur à celui obtenu avec la trypsine.

3.2 Comparaison de SVF et de KSR

Afin de nous affranchir des variabilités de lot de sérum (SVF/FBS) dont la composition est empirique nous souhaitons remplacer le SVF par du KSR. J'ai analysé des cultures de cellules ES de la lignée JM8.F6 réalisées en milieu DKO + FBS ou KSR (tableau n°5).

Nom produit	Numéro Lot	Référence produit	Fabricant	Fournisseur
Fetal Bovine Serum Standard Quality	A30112-0137	A15-301	PAA	GE helthcare
Fetal Bovine Serum	42G3057K	10270	gibco	Life technologies
Knockout Serum Replacement	1568498	10828-028	gibco	Life technologies

Tableau n°5 : Référence des sérums de veau fétal et substitutif testés

Le KSR a été conçu pour la culture de cellules ES, je suppose donc qu'aucune molécule induisant la différenciation des cellules ES (telles que certains facteurs de croissance) n'est présente dans ce réactif à la différence du SVF.

3.2.1 Morphologie cellulaire

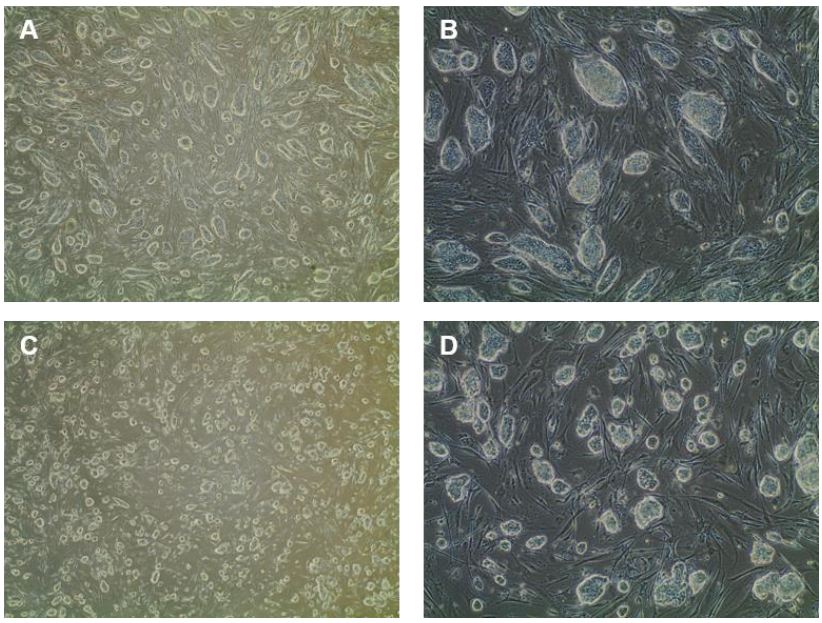


Figure n°34 : Comparaison morphologique entre culture avec FBS et avec KSR

A (x40) et B (x100) : culture des cellules JM8.F6 en DKO+SVF, seules les photos d'un des deux lots sont présentées car les cellules cultivées avec les deux lots de SVF ont la même morphologie (A et B).
C (x40) et D (x100) : culture des cellules JM8.F6 en DKO+KSR. Lorsque le sérum est remplacé par le KSR les cellules forment des amas plus petits et plus compacts (C et D).

Lorsque le sérum est remplacé par le KSR les cellules forment des amas moins plats, plus compacts et donc plus réfringents.

3.2.2 Taux de croissance

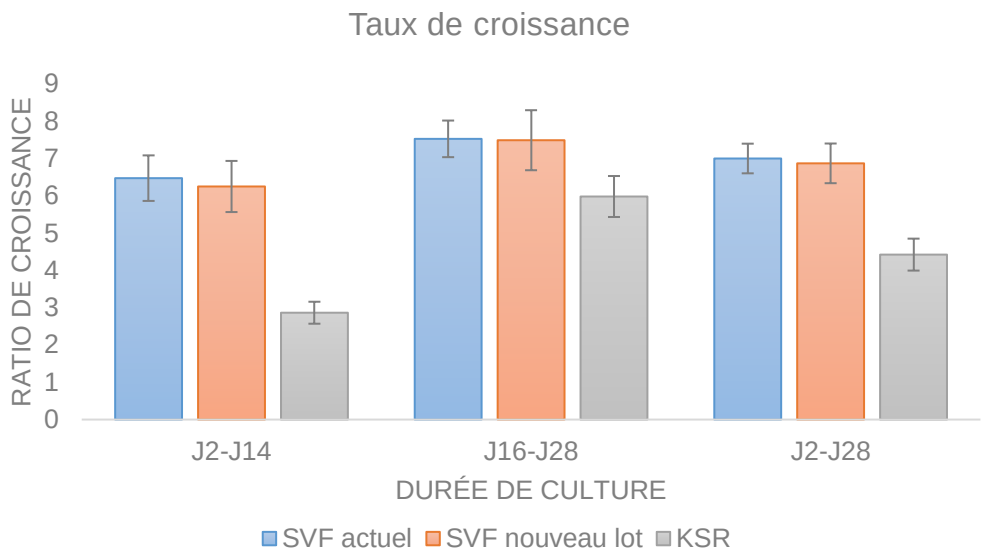


Figure n°35 : Evolution des taux de croissance

Les valeurs présentées sont les moyennes de deux cultures indépendantes comprenant chacune 14 mesures (pour chaque condition n=2). Les moyennes présentées sont celles des deux premières semaines de cultures (J2-J14) puis celles des deux dernières semaines de cultures (J16-J28) et celles de la totalité de la culture (J2-28).

Les milieux additionnés de SVF favorisent une croissance élevée, cela est sûrement lié aux facteurs de croissance contenus dans le sérum. Les cellules qui poussent en absence de sérum dans la condition KSR ont une croissance plus faible. Pendant les 14 premiers jours de culture la croissance obtenus en KSR est deux fois moins importante que celles des conditions SVF ($0{,}0001 > p >= 0{,}00001$), puis cette différence passe à 30% pendant les deux dernières semaines de culture ($0{,}13 > p > 0{,}04$). Sur l'ensemble de la culture ces différences restent significatives ($0{,}4 > p > 0{,}0007$). Les cellules JM8.F6 utilisées dans ces analyses sont issues de cultures réalisées en présence de SVF. Cela laisse supposer que la faible croissance observée pendant les deux premières semaines correspond à une phase d'adaptation au milieu sans sérum. Après cette phase d'adaptation les cellules retrouvent une croissance convenable sans toutefois égaler la croissance en présence de sérum. Pour éviter cette chute de croissance (J2-J14) il sera nécessaire de d'utiliser des milieux adaptatif SVF/KSR (75/25, 50/50 et 25/75) pour que les cellules ES s'adaptent plus rapidement au milieu contenant du KSR.

3.2.3 Dosage des PAL

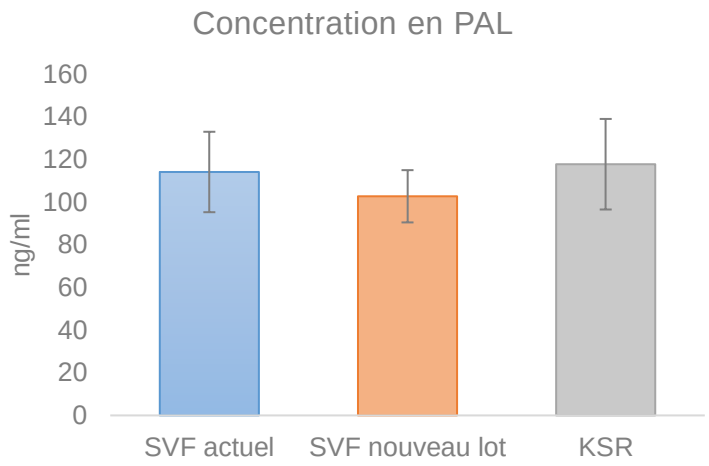


Figure n°36 : Production de PAL en absence de SVF

Les données présentées sont issues de quatre cultures et dosages indépendants (n=4).

Il n'y a pas de différence significative entre les différentes conditions testées ($p > 0,56$).

3.2.4 Les facteurs de transcription NOS

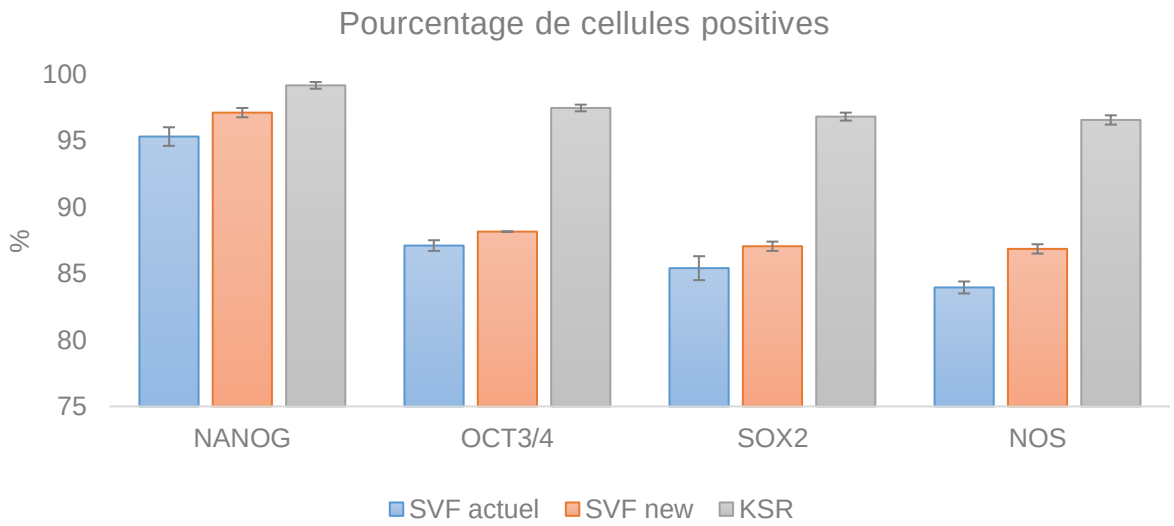


Figure n°37 : Populations positives pour les marquages Nanog, Oct4 et Sox2

Répartition des populations des cellules ES qui sont positives pour les marquages Nanog, Oct4, Sox2 et les trois simultanément. Pour Oct4 et Sox2 « n=4 », pour Nanog et NOS « n=2 ».

Hormis la différence dans la population qui exprime Nanog (p=0,04) il n'y a pas de différences significatives entre les deux sérums testés (p > 0,22). Bien que faible les différences observées dans l'expression de Nanog sont significatives (p=0,01). Le KSR permet d'accroitre de 10% la population de cellules ES qui expriment Oct4 et Sox2 (0,006> p >0,002).

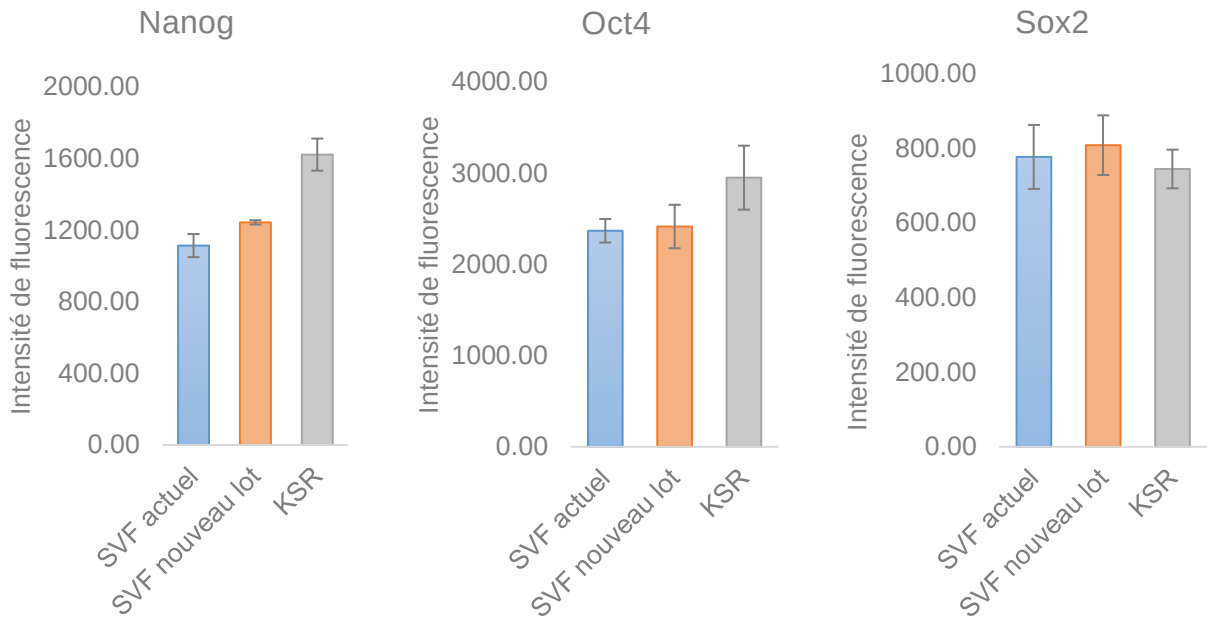


Figure n°38 : Expression des facteurs Nanog Oct4 et Sox2 de la population NOS positive

Les valeurs présentées sont les valeurs médianes de fluorescence de la population NOS positive (population triple positives Nanog, Oct4 et Sox2). Pour Oct4 et Sox2 « n=4 », pour Nanog « n=2 ».

Les cellules cultivées en KSR ont une expression de Nanog 25% plus élevée que les cellules qui se sont développées en présence de SVF (0,05 > p >0,04). Avec le KSR l'expression d'Oct4 est égale voire légèrement supérieure aux conditions contenant du SVF mais cela n'est pas significatif (p<0,17). Le niveau d'expression de Sox2 ne change pas entre les conditions FBS et KSR (p>0,52).

Le milieu sans sérum contenant du KSR permet d'augmenter l'expression de Nanog jusqu'au niveau requis pour l'activation de l'expression des facteurs Oct4 et Sox2 dans 10% des cellules ES qui n'exprimaient alors pas ces facteurs en présence de sérum. Malgré un taux de croissance plus faible il est intéressant d'utiliser le KSR pour obtenir une culture où 95% des cellules ES expriment les trois facteurs NOS.

3.3 Etablissements de nouvelles lignées de cellules ES

Suite à l'établissement de nouvelles lignées de cellules ES j'ai comparé leurs niveaux d'expressions des facteurs NOS à celui de notre lignée de cellules ES actuelle, la lignée JM8.F6.

3.3.1 Morphologie cellulaire

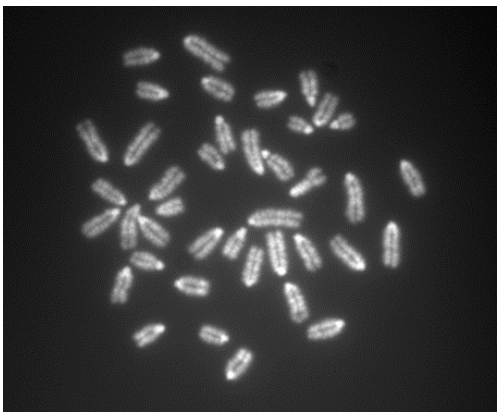
Cinq jours après la mise en culture des ICM de 98 blastocystes (figure n°18A) de fonds génétique C57Bl6/N seulement 18 cultures cellulaires ont été obtenues. Ces lignées nommées « ABI n°1 à 18 » ont été cultivées et observées pendant neuf jours. Au neuvième jour de culture *in vitro*, les huit cultures ABI n°1, 2, 3, 4, 5, 7, 9 et 11 présentaient une morphologie de cellules ES (figure n°18C).

3.3.2 Détection du chromosome Y

Sélectionner les lignées XY permet d'avoir une meilleure stabilité chromosomique, d'introduire une mutation ciblée sur un gène porté par le chromosome Y et d'augmenter le rendement de production de la première génération de souris (plusieurs accouplements possibles). Afin de sélectionner les lignées ES mâles nous avons détecté le chromosome Y par PCR. Parmi les huit lignées ES précédemment citées, les six lignées ABI n° 1, 2, 5, 7, 9 et 11 possèdent le chromosome Y.

3.3.3 Observation du caryotype

La vérification de l'euploïdie des cellules est essentielle pour assurer la transmission à la lignée germinale car les cellules aneuploïdes peuvent compromettre la colonisation de l'embryon ou être exclues du développement embryonnaire. Il est généralement admis que la probabilité de transmission germinale des cellules ES dont le score d'euploïdie est inférieur à 40% ne permettent pas d'obtenir une GLT (Suzuki et al., 1997), tandis que des cellules euploïdes à plus de 70% permettront l'obtention de la nouvelle lignée murine dès les premiers accouplements des souris chimériques. Le caryotype permet uniquement de compter les chromosomes et non de les identifier. Seule les monosomies et les trisomies sont observées, mais si ces deux cas se combinent alors il sera difficile de les identifier. L'observation du caryotype ne donne aucune information quant à la présence et la quantité des aberrations chromosomiques et des mutations génétiques fixées par la cellule au cours de sa culture *in vitro*.



Nom lignée ES	ABI1	ABI2	ABI5	ABI7	ABI9	ABI11
Nombrede cellules euploïdes	41/50	42/51	41/50	37/50	16/46	18/44
Pourcentage de cellules euploïdes	82%	82%	82%	74%	35%	41%

Figure n°39 : Numération chromosomique des lignées ABI

Photo d'un caryotype (x6000) d'une cellule euploïde et résultats des numérations chromosomiques.

Les observations du caryotype des cellules ES ont révélé que les lignées ABI9 et ABI11 étaient majoritairement aneuploïdes, elles comptaient respectivement 35% et 41% de cellules euploïdes. Ces deux lignées ont donc été écartées. Les lignées restantes ABI n° 1, 2, 5 et 7 représentent à ce stade 4% des blastocystes mis en cultures pour l'établissement de nouvelles lignées de cellules ES. J'ai comparé les lignées ES ABI1, ABI2, ABI5 et ABI7 avec la lignée que nous utilisons actuellement pour nos prestations, la lignée JM8.F6.

3.3.4 Taux de croissance

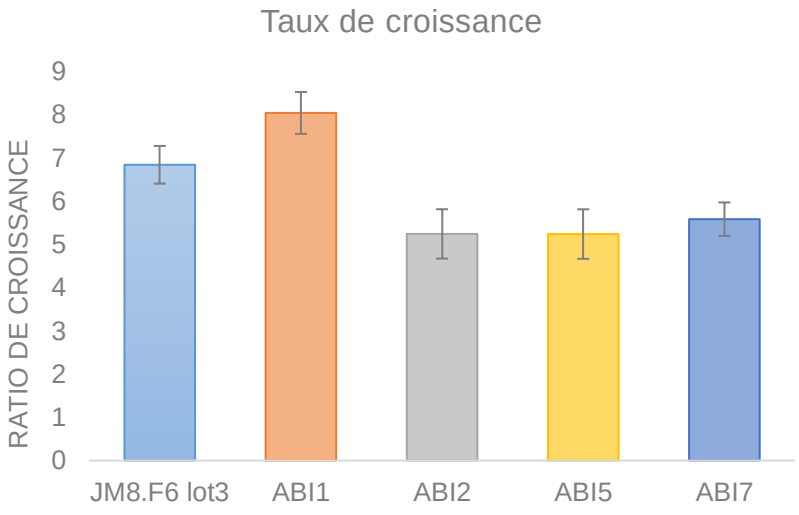


Figure n°40 : Evolution des taux de croissance

Les valeurs présentées sont les moyennes de trois cultures indépendantes comprenant chacune 12 mesures (pour chaque condition n=3).

La croissance de la lignée ABI1 est supérieure de 15% à celle de la lignée JM8.F6 (p=0,07) et de 35% à celle des autres lignées ABI (p<0,0006). La lignée JM8.F6 a une meilleure croissance que les lignées ABI2, 5 et 7 (p<0,04). Les lignées ABI2, 5 et 7 ont le même taux de croissance.

3.3.5 Dosage des PAL

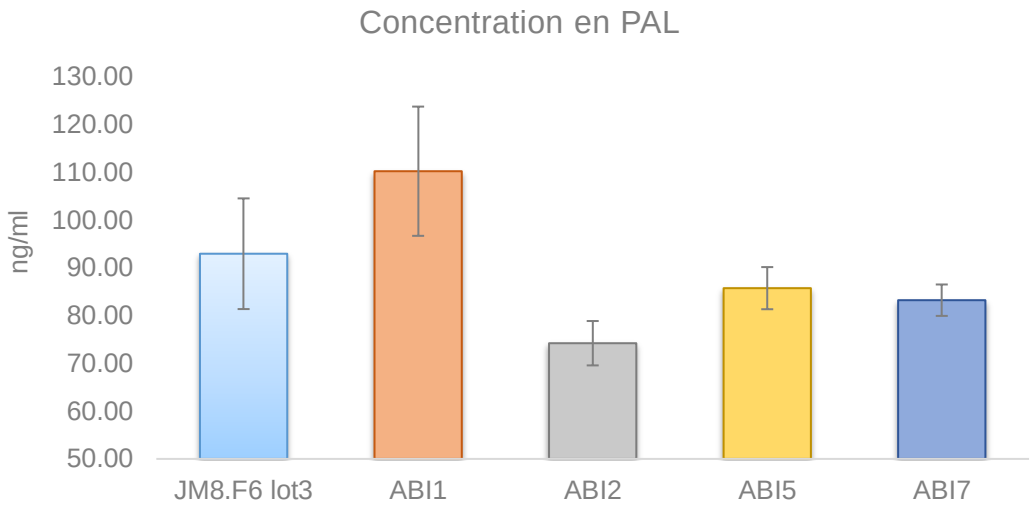


Figure n°41 : Concentration en PAL des lignées ES cultivées en DKO+LIF :

Les valeurs présentées sont les moyennes de deux cultures indépendantes (pour chaque condition n=2).

Aucunes des différences observées n'est significative, le test de student nous donne les valeurs suivantes : p=0,22 pour l'écart entre ABI1 et ABI5 ; et p=0,43 pour l'écart entre ABI1 et JM8.F6

3.3.6 Les facteurs de transcription NOS

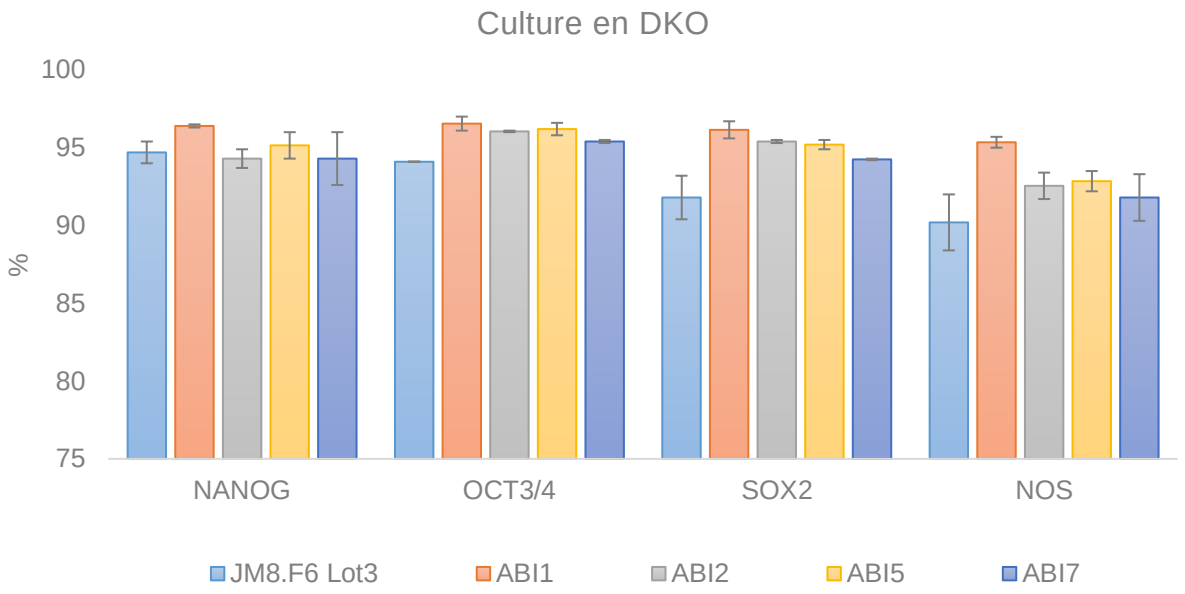


Figure n°42 : Population de cellules positives pour les marquages Nanog, Oct4, et Sox2

Les valeurs présentées sont les moyennes de deux analyses indépendantes (pour chaque condition n=2). Répartition des populations des cellules ES qui sont positives pour les marquages Nanog, Oct4, Sox2 et les trois simultanément.

La lignée JM8.F6 contient moins de cellules qui expriment les trois facteurs NOS que les lignées ABI, 90% comparé aux autres lignées ABI. La différence entre la lignée JM8.F6 et la lignée ABI1 n'est pas significative (p=0,1). Les proportions des populations de cellules triples positives des lignées ABI2, ABI5 et ABI7 sont similaires. La lignée ABI1 est la plus homogène dans l'expression des facteurs de transcription NOS, sa population triple positive dépasse les 95%.

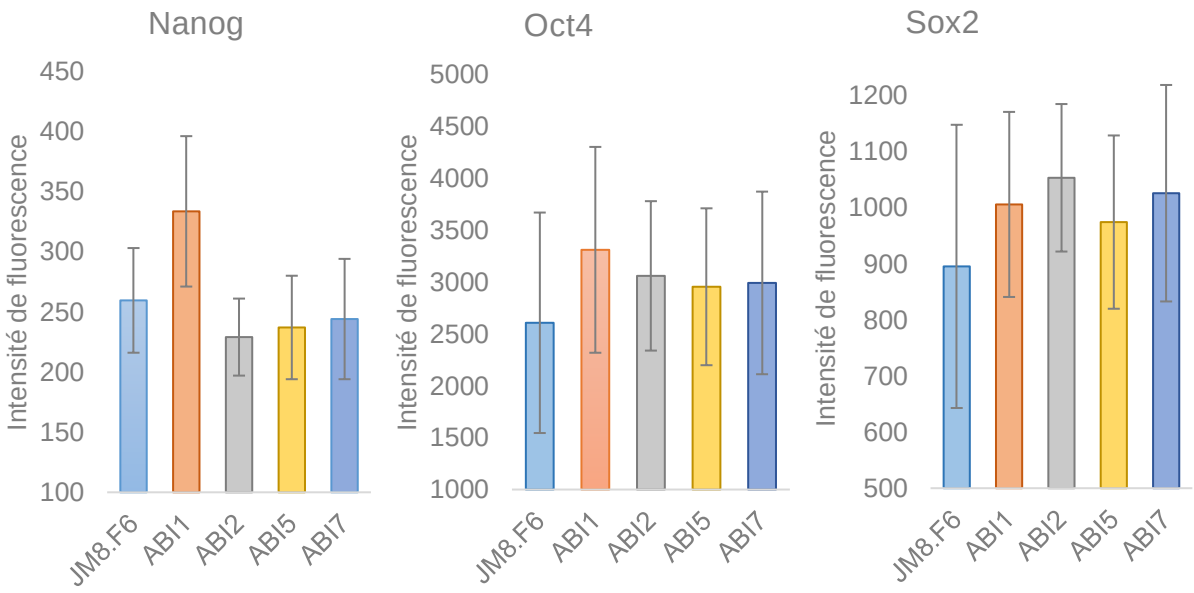


Figure n°43 : Intensités des expressions des facteurs NOS

Les valeurs présentées sont les valeurs médianes de fluorescence de la population NOS positive (population triple positives Nanog, Oct4 et Sox2). Ces résultats sont les moyennes de deux expérimentations indépendantes (pour chaque condition n=2).

La seule différence visible concerne l'expression de Nanog entre les lignées ABI1 et JM8.F6 mais celle-ci n'est pas significative (p=0,43). Les expressions d'Oct4 et Sox2 sont plus hétérogènes que celle de Nanog (erreur standard plus élevée.

Lors de chaque culture les cellules de la lignée ABI1 forment des amas plus compacts que ceux formés par les cellules JM8.F6. Malgré l'absence de résultats significatifs, mon expérience dans la culture des cellules ES me pousse à croire que la lignée ABI1 à une pluripotence supérieure à celle de la lignée JM8.F6.

3.4 Utilisation du milieu 2i+LIF

Pendant la phase de micro-injection des cellules ES recombinées dans les blastocystes nous décongelons et cultivons les cellules pendant une à deux semaines avant de les transférer au service de micro-injection. Le service MIZ micro-injecte chaque clone de cellules ES sur 4 jours, du mardi au vendredi de chaque semaine d'injection, il y a donc un écart de 3 jours entre le 1er jour et le dernier jour d'injection. Initialement les cellules étaient cultivées en milieu DKO+LIF pendant 2 à 5 jours avant leur micro-injection, puis nous avons remplacé le milieu DKO+LIF par du 2i+LIF pour augmenter la pluripotence de nos cellules ES sans changer la durée de culture. Dans le but d'adapter le délai de la culture en milieu 2i+LIF à l'obtention de cellules ES dont la pluripotence est optimale, j'ai effectué des mesures cinétiques sur des cultures en milieu DKO+LIF et en milieu 2i+LIF. Mon objectif est de déterminer le délai de culture minimal en milieu 2i+LIF qui favorise l'expression des deux allèles du facteur de transcription Nanog. (Miyanari and Torres-Padilla, 2012)

3.4.1 Morphologie cellulaire

En inhibant les voies de différenciation GSK3β (CHIR99021) et ERK (PD0325901), le milieu 2i permet de maintenir les cellules ES dans l'état naïf de la pluripotence (Miyanari and Torres-Padilla, 2012). Cet état naïf est corrélé avec une morphologie plus compacte des amas cellulaires qui forment des demi-sphères. L'augmentation de la réfringence (figure n°43B) indique une épaisseur plus importante des amas cellulaires.

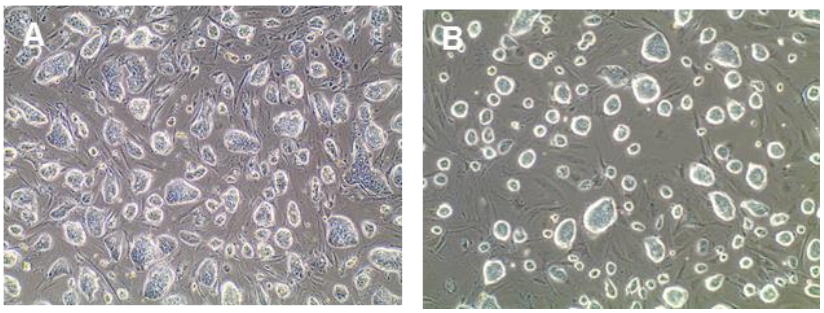


Figure n°44 : Impact morphologique du milieu 2i+LIF

Photo en contraste de phase : A : Cellules ES pluripotentes de la lignée JM8.F6 cultivées en milieu DKO+LIF (x40). B : Cellules ES pluripotentes de la lignée JM8.F6 cultivées en milieu 2i+LIF (x40).

3.4.2 Taux de croissance

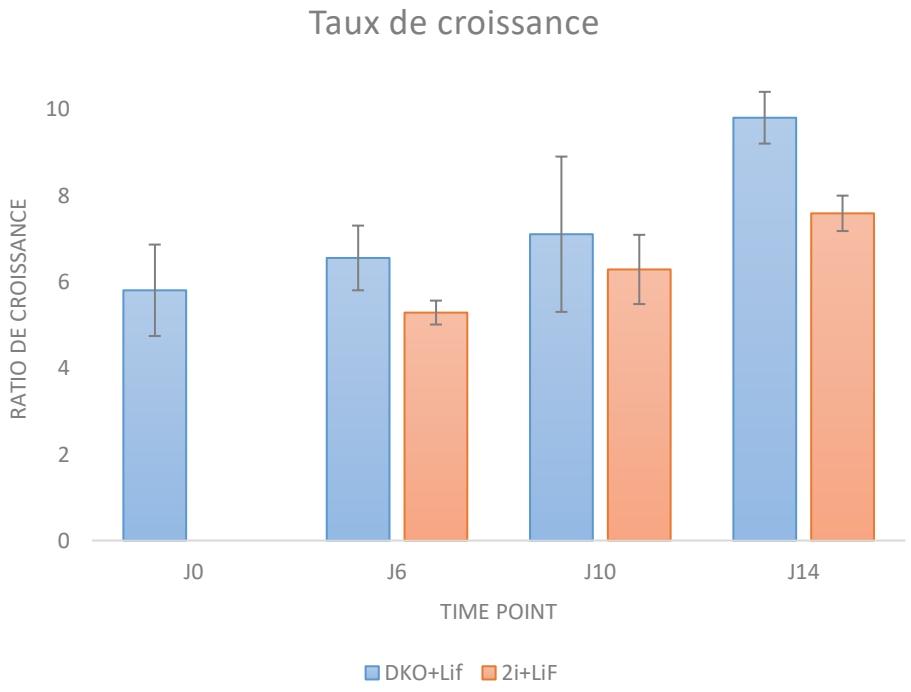


Figure n°45 : Effet du milieu 2i+LIF sur la croissance cellulaire

Les valeurs présentées sont les moyennes de trois cultures indépendantes (pour chaque condition n=3).

En milieu 2i+LIF le taux de croissance des cellules ES est légèrement inférieur à celui obtenu en milieu DKO+LIF, cette différence est significative uniquement à J14 (p=0,04).

3.4.3 Dosage des PAL

En milieu DKO+LIF l'expression des PAL est constante au cours de la culture (figure n°46). En milieu 2i+LIF les cellules expriment entre 1,6 et 2,5 fois plus de PAL qu'en milieux DKO+LIF. Ces différences sont significatives à J6 (p=0,04) et J14 (p=0,01) mais moins à J10 (p=0,14).

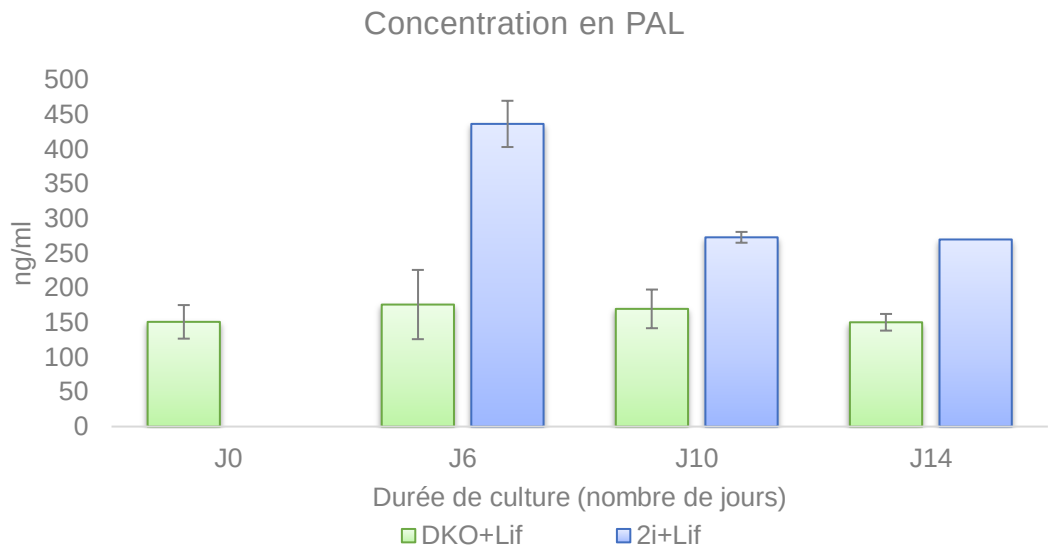
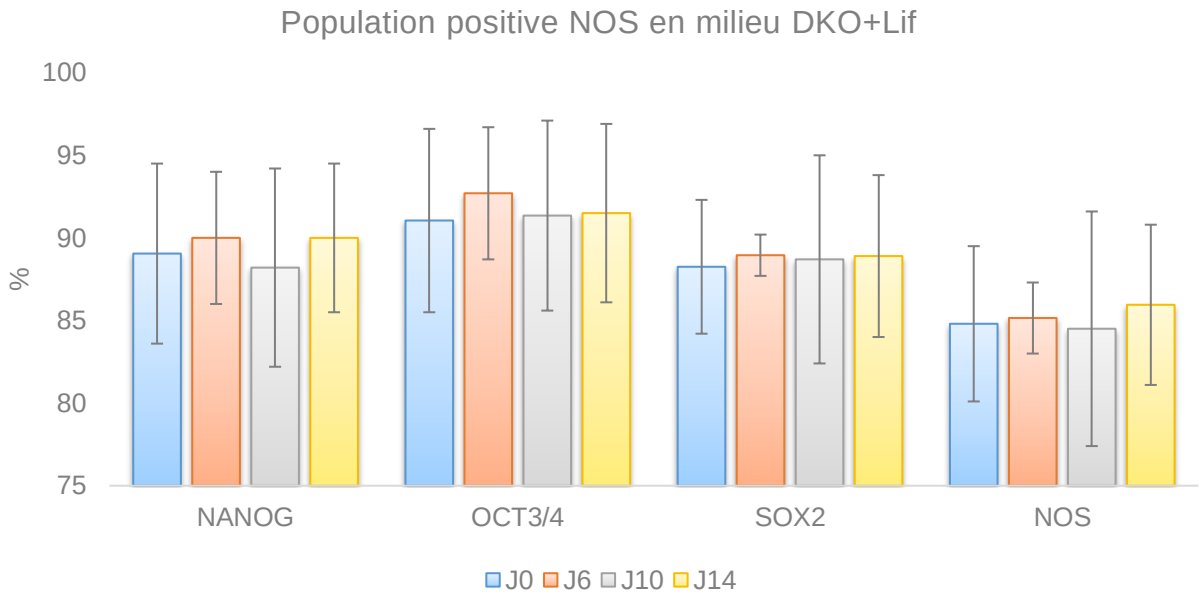


Figure n°46 : Evolution de l'expression des PAL de la lignée JM8.F6 pendant la culture

Les valeurs présentées sont les moyennes de deux dosages indépendants (pour chaque condition n=2).
Dosage des PAL exprimées par les cellules ES JM8.F6 cultivées en parallèles dans les milieux DKO+LIF et 2i+LIF. Les résultats sont présentés en ng/mL.

3.4.4 Quantification des facteurs NOS



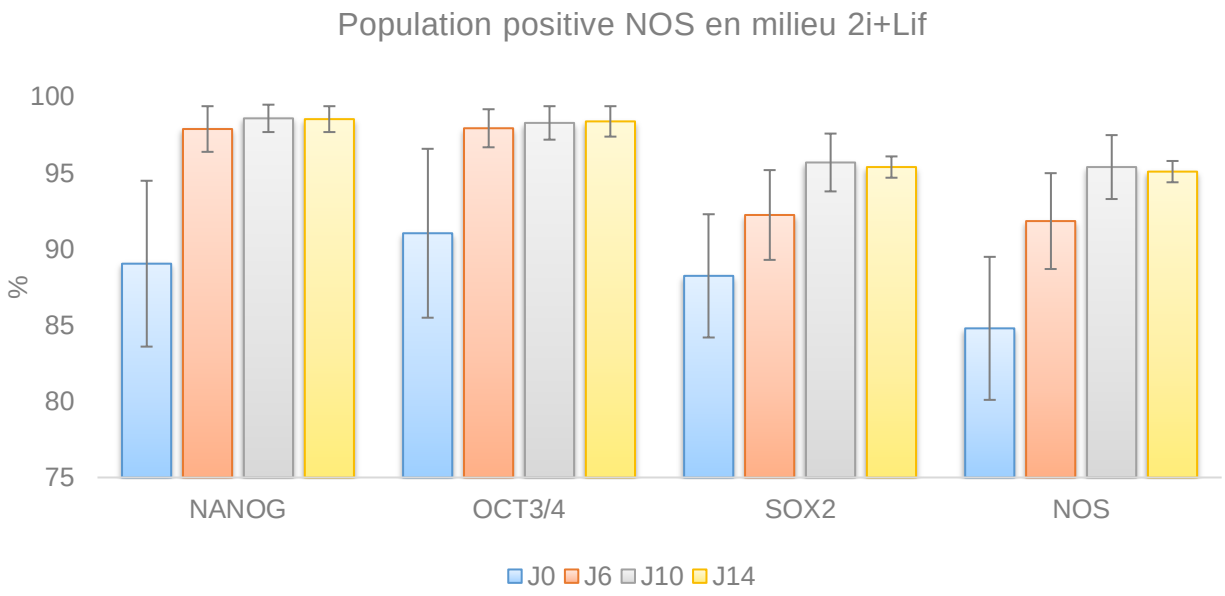


Figure n°47 : Pourcentage de cellules qui expriment de manière individuelle puis simultanée les facteurs de transcription Nanog, Oct4, Sox2

Les valeurs présentées sont les moyennes de deux analyses indépendantes (pour chaque condition n=2).
Répartition des populations des cellules ES qui sont positives pour les marquages Nanog, Oct4, Sox2 et les trois simultanément.

Lors de la culture en milieu DKO+LIF, aucune différence n'est observée sur la proportion de cellules positives au marqueur Nanog, Oct4 et Sox2. La proportion de cellules qui expriment les trois facteurs NOS en milieu DKO+LIF est d'environ 85%, alors qu'en milieu 2i+LIF nous observons que ce pourcentage est proche de 95%.

Dès le 6 ème jour de culture en milieu 2i+LIF l'expression des facteurs Nanog et Oct4 s'homogénéise et avoisine les 98%. Compte tenu que les populations positives NOS et Sox2 sont très similaires nous pouvons déduire que l'expression du facteur Sox2 est limitante. Les populations de cellules qui expriment les facteurs Nanog et Oct4 passent respectivement de 90 et 91% à 98% au bout de 6 jours de culture en milieu 2i+LIF, alors que l'expression de Sox2 passe de 88% à 92% pendant les 6 premiers jours de culture en 2i+LIF, puis augmente encore de 4% lors de la culture de J6 à J10. Aucune différence sur la quantité de cellules positives aux trois facteurs NOS n'est observée entre les 10 ème et 14 ème jours de culture en milieu 2i+LIF, mais la population positive du facteur Sox2 semble s'homogénéiser. Cela indique qu'une culture de 10 jours en milieu 2i+LIF est suffisante pour augmenter le nombre de cellules positives pour les facteurs NOS jusqu'à son maximum.

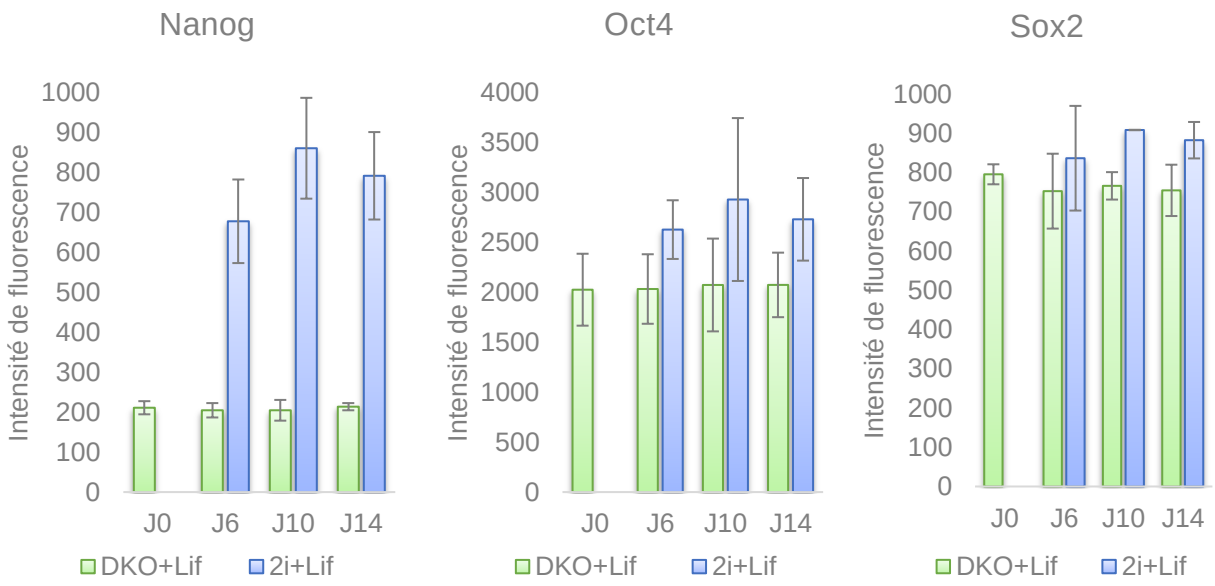


Figure n°48 : Intensité des expressions des facteurs NOS de la population triple positive

Les valeurs présentées sont les valeurs médianes de fluorescence de la population NOS positive (population triple positives Nanog, Oct4 et Sox2). Ces résultats sont les moyennes de deux analyses indépendantes (pour chaque condition n=2).

L'expression de Nanog est triplée au bout de six jours de culture en milieu 2i+LIF (p=0,09), quadruplée si la culture se prolonge jusqu'à 10 jours (p=0,09), et n'augmente plus jusqu'à J14 (p=0,04). L'expression d'Oct4 semblent augmenter un peu, mais ces changements ne sont pas significatifs (p>0,3). L'expression de Sox2 augmente un peu à partir de J10 (p=0,05). Ces données confirment que l'expression des facteurs Oct4 et Sox2 en milieu DKO+LIF sont déjà à leur niveau maximum (figure n°13).

Ainsi, une culture en milieu 2i+LIF de 7 à 10 jours permet à la fois une augmentation et une homogénéisation de la population cellulaire exprimant les trois facteurs de transcription Nanog, Oct4 et Sox2 mais aussi une augmentation de l'expression de ces facteurs jusqu'à leur maximum. Parmi ces trois facteurs de transcription Sox2 réagit le plus tardivement à l'inhibition des voies de signalisations GSK3β et ERK/MEK. Nanog est le plus résolutif grâce à son expression qui varie d'un allèle à deux allèles en fonction de l'état de pluripotence contrairement aux facteurs Oct4 et Sox2 pour lesquels les deux allèles sont constamment exprimés. Avant leur injection dans les blastocystes les cellules ne sont pas choisies en fonction de leur niveau d'expression des facteurs NOS, il est donc important que la population cellulaire ait une expression homogène et optimale. Pour cela il sera utile de prolonger la culture des ES en milieu 2i+LIF de 4 jours avant de réaliser les micro-injections.

3.5 Résultats fonctionnels

Suite à l'obtention de mes résultats, nous avons temporairement modifié de nombreux points dans nos instructions de travail. Chacun de ces points d'amélioration est évalué par le test fonctionnel de génération d'animaux chimériques avant d'être définitivement intégrés dans nos modes opératoires.

Après micro-injection dans des blastocystes les cellules souches dotées d'une pluripotence « naïve » sont capables de mener à terme un développement embryonnaire normal, elles produisent donc des souris à chimérisme élevé dans lesquelles tous les tissus y compris la lignée germinale ont pu être colonisés. Par contre si les cellules souches sont passées de leur état « naïf » à l'état « programmé » elles ne seront plus capables de participer au développement embryonnaire (De Los Angeles et al., 2015). La formation d'individus chimériques par micro-injection de cellules ES dans des blastocystes est la dernière étape de nos prestations, je vais donc utiliser les données générées par le service de micro-injection pour évaluer la pluripotence fonctionnelle de nos cellules ES.

Les pourcentages de souris chimériques et leur niveau de chimérisme (exprimé en pourcentage de la surface corporelle) seront les résultats fonctionnels qui reflèteront l'impact des modifications apportées à nos procédures. Parmi les analyses présentées dans ce rapport l'utilisation du milieu 2i+LIF et de l'Accutase ont été évaluées et appliquées à nos procédures, j'ai donc pu analyser les résultats fonctionnels de ces deux modifications. Les résultats fonctionnels des cellules cultivées en KSR ainsi que la lignée ABI1 ne sont pas disponible car les tests sont en cours, je ne les présenterai donc pas ici.

3.5.1 Utilisation du milieu 2i+LIF

Pour déterminer les bénéfices obtenus sur l'obtention de souris chimérique avec l'utilisation du milieu 2i+LIF j'ai analysé les taux de production de chimères lorsque la lignée JM8.F6 est cultivée en DKO+LIF de J2 à J5, puis en milieu 2i+LIF de J2 à J5 et enfin en milieu 2i+LIF de J6 à J9 avant la micro-injection.

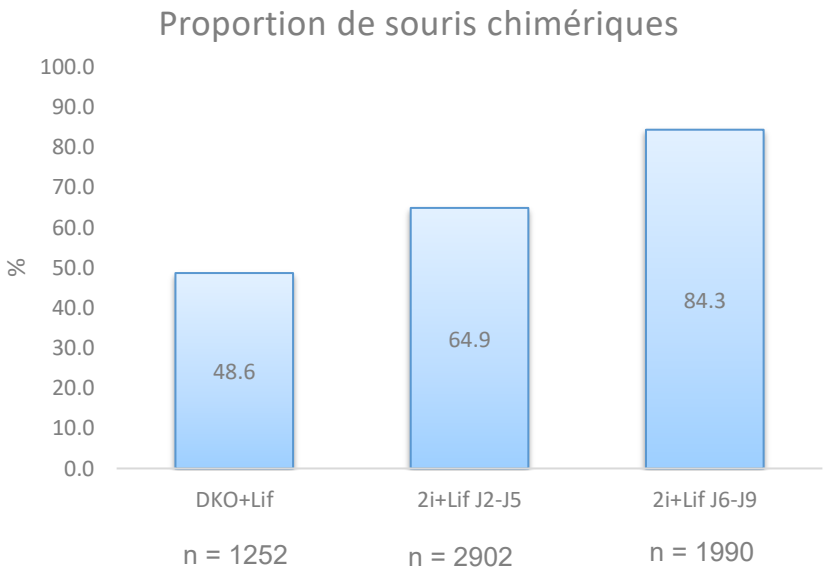


Figure n°49 : Pourcentage de souris chimériques obtenues avec la lignée JM8.F6

Ces histogrammes représentent la somme des souris chimériques mâles et femelles par rapport aux naissances totales obtenues. « n » correspond au nombre de souris analysées. Ces résultats prennent en compte les chimères obtenues lors des 4 jours de chaque session de micro-injection. Toutes les données analysées sont issues de micro-injections pour lesquelles les cellules étaient dissociées avec de la trypsine.

Lorsque les cellules sont cultivées en DKO+LIF, nous obtenons 49% d'individus chimériques. Quand le milieu 2i+LIF est utilisé ce pourcentage augmente jusqu'à 65%, cette augmentation coïncide avec celle observée pour la PAL et les facteurs NOS au 6ème jour de culture entre les milieux DKO+LIF et 2i+LIF (figure n°46 à 48). Lorsque la durée de culture dans ce même milieu est prolongée, le nombre de souris chimériques atteint 84% des naissances, cette nouvelle augmentation est concomitante à celle de l'expression des facteurs NOS entre le 6ème jour et le 10ème jour de culture en milieu 2i+LIF (figure n°47 et 48).

L'augmentation dans l'expression des PAL et des facteurs de transcription Nanog, Oct4 et Sox2 observée lors des cultures en milieu 2i+LIF est corrélée avec l'accroissement du nombre de chimères. Cette augmentation est associée avec l'homogénéisation de la population de cellules ES qui expriment les trois facteurs NOS (figure n°47). Ainsi, les conditions DKO+LIF, 2i+LIF « J2-J5 » et 2i+LIF « J6-J9 » qui contiennent respectivement 85%, 90% et 95% de cellules qui expriment les NOS produisent respectivement environ 50%, 65% et 84% de chimères.

Obtenir d'avantage d'animaux à chimérisme élevé est intéressant mais accroître le nombre de souris faiblement chimériques ne nous sera d'aucune utilité. Pour évaluer le gain éventuel de la prolongation des cultures en 2i+LIF de 4 jours j'ai analysé le pourcentage de chimérisme de chaque chimère obtenue avec ces deux conditions de cultures.

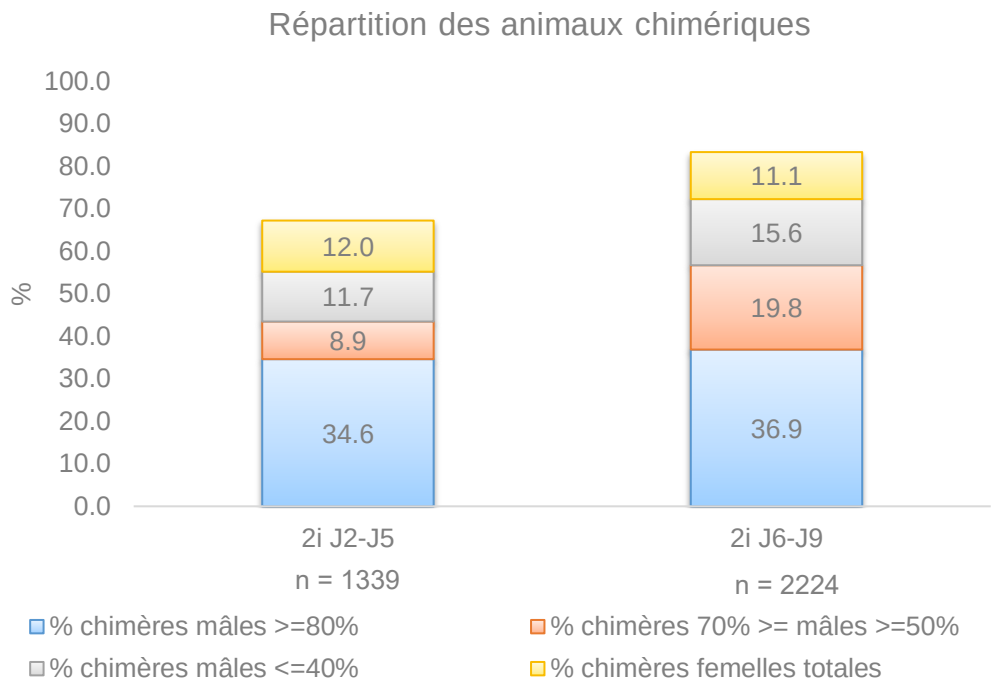


Figure n°50 : Répartition des souris chimères par catégorie de sexe et de niveau de chimérisme

Pour les données présentées « n » est le nombre d'animaux analysés. Ces animaux sont tous issus de cellules ES de la lignée JM8.F6 cultivées en milieu 2i+LIF et dissociées avec de la trypsine. La catégorie des souris chimères femelles comprend toutes les chimères quel que soit leur niveau de chimérisme (catégorie jaune). Les chimères mâles sont classées en trois catégories : les chimères de chimérisme compris entre 10 et 40% (catégorie grise), celles dont le chimérisme est compris entre 50 et 70% (catégorie rouge) et celles de chimérisme élevé, compris entre 80 et 100% de chimérisme (catégorie bleue).

Lorsque la culture en milieu 2i est prolongée de 4 jours le nombre de chimères mâles obtenues augmente d'environ 20% (figure n°49) alors que la proportion de chimères mâles de chimérisme supérieur ou égal à 80% augmente seulement de 2%, le nombre de chimères mâles dont le chimérisme est compris entre 50 et 70% passe de 9% à 20%, et le nombre de chimères mâles inférieurs à 40% évolue de 12% à 16%.

La prolongation de la sélection en milieu 2i+LIF, a permis d'une part d'augmenter la proportion de souris chimériques en augmentant le nombre de cellules ES qui expriment Sox2, et donc les trois facteurs NOS (figure n°47), et d'autre part de doubler le nombre d'animaux dont le chimérisme est compris entre 50 et 70%, sans augmenter la proportion de souris hautement chimériques. Malgré l'augmentation de la pluripotence moléculaire de la population totale des cellules ES il n'y a pas plus de chimères à 80, 90 et 100%. Cela signifie, soit que nous sommes au maximum du niveau de colonisation permis par nos procédures (lignée JM8.F6 cultivée en 2i+LIF et dissociée avec de la trypsine), soit que le délai J6-J9 de culture en 2i+LIF n'est pas suffisant à ce que toutes les cellules ES aient une expression bi-allélique stable des trois facteurs NOS. La seule différence visible dans la transition J10 à J14 en milieu 2i+LIF est l'homogénéisation de l'expression de

Sox2 (figure n°47 et 48). Ce facteur de transcription à l'inverse de Nanog et Oct4 a nécessité 10 jours de culture en 2i pour atteindre ses valeurs maximales. Il serait également possible que l'homogénéisation d'expression observée avec Nanog et Oct4 à J10 soit atteinte plus tard avec Sox2, à J14 par exemple. Ne souhaitant pas trop prolonger la culture *in vitro* de nos cellules ES, nous avons limité la culture à 10 jours car le gain obtenu par la transition J2-J5 à J6-J9 est suffisant à l'obtention de GLT dans les meilleurs délais. Notre procédure a été définitivement modifiée pour assurer une durée de culture en milieu 2i+LIF de 5 à 9 jours avant la micro-injection.

3.5.2 Comparatif de réactifs de dissociation cellulaire

Suite à l'utilisation séquentielle des lots de trypsine n°1722774 puis 1788056 et de l'Accutase dans notre procédure de préparation des cellules ES pour leur micro-injection, j'ai analysé les niveaux de chimérisme des souris obtenues.

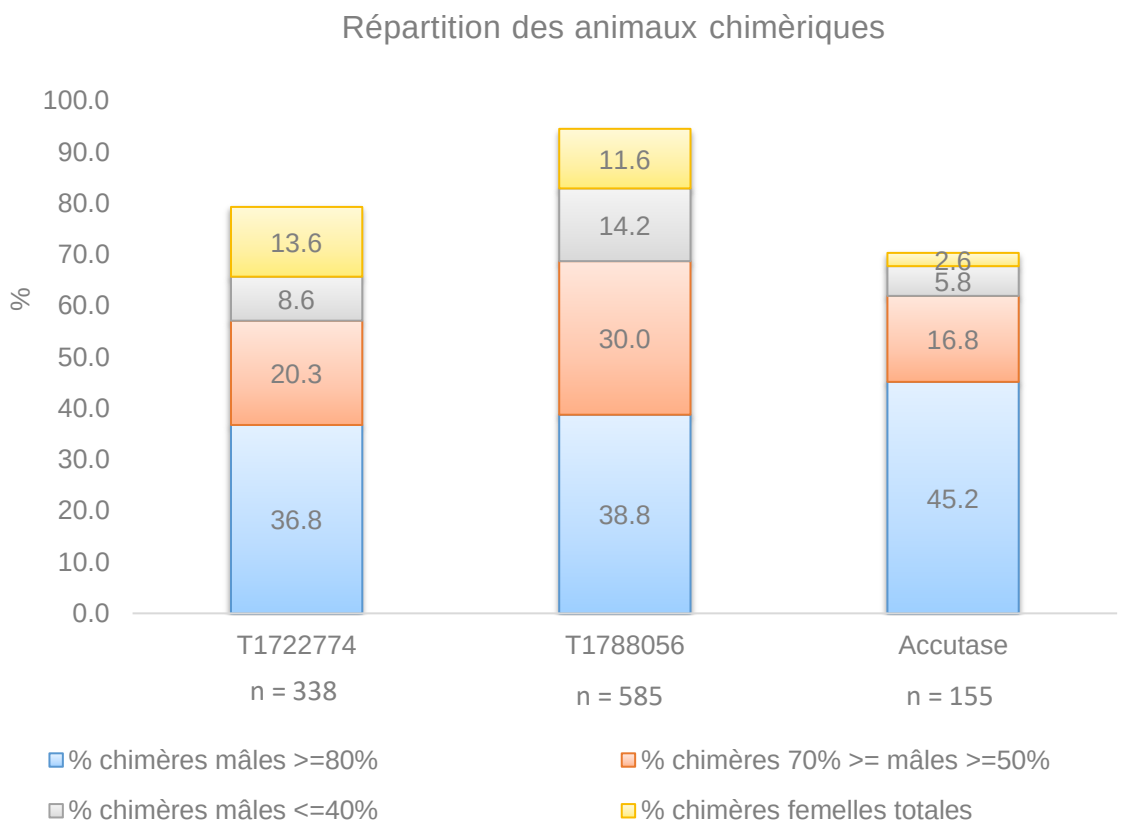


Figure n°51 : Répartition des souris chimères par catégorie selon les réactifs utilisés

Pour les données présentées « n » est le nombre d'animaux analysés. Ces animaux chimériques ont été obtenus par micro-injection de cellules ES de lignée JM8.F6 cultivées en milieu 2i+LIF de J5 à J9. La catégorie des chimères femelles comprend toutes les souris chimères femelles quel que soit leur niveau de chimérisme (catégorie jaune). J'ai classé les chimères mâles en trois catégories : les chimères de chimérisme compris entre 10 et 40% (catégorie grise), celles dont le chimérisme est compris entre 50 et 70% (catégorie rouge) et celles de chimérisme élevé, compris entre 80 et 100% (catégorie bleue).

Par comparaison avec la trypsine n°1722774, la trypsine n°1788056 (qui semble moins fragiliser nos cellules) a augmenté de 10% la proportion de chimères mâles dont le chimérisme est compris entre 50 et 70% et de 6% la proportion de mâles avec un chimérisme inférieur à 40%. La proportion de chimères femelles a un peu diminué au profit de la population de chimères mâles. Lorsque l'on compare les souris obtenues entre la trypsine n° 1788056 et l'Accutase nous constatons que la proportion totale d'animaux chimériques a diminué mais qu'il y a davantage d'individus à chimérisme élevé : la proportion de chimères à 80, 90 et 100% est plus importante de 6% par rapport à la trypsine n° 1788056. Ces résultats indiquent aussi que les cellules traitées avec l'Accutase produisent moins de souris chimériques femelles : avec l'Accutase 3,6% des chimères sont des femelles alors qu'il s'agit de 12% pour la trypsine 1788056. Proportionnellement, avec l'Accutase 67% des chimères mâles obtenues sont de chimérisme élevé (entre 80 et 100%) contre 47% avec la trypsine n°1788056. Cela signifie que les cellules dissociées avec l'Accutase colonisent mieux les blastocystes hôtes et déterminent donc plus fréquemment le sexe des animaux. Suivant cette hypothèse, ces chimères devraient donner des GLT plus rapidement que celles obtenues avec la trypsine.

Ces résultats nous indiquent que les agents de dissociation cellulaire ont un impact sur la capacité de colonisation des cellules ES. Une action moins agressive de ces réactifs enzymatiques sur la membrane cellulaire permet d'obtenir davantage d'individus d'intérêts (mâles de 50 à 100% de chimérisme). La différence observée entre les deux lots de trypsine testés confirme mes observations et montre que la colonisation de l'embryon n'est pas limitée par le niveau de pluripotence des cellules ES mais par les paramètres de viabilité et de prolifération cellulaire. Selon ce raisonnement un réactif moins délétère pour les cellules ES comme l'Accutase favoriserait encore une meilleure colonisation. Effectivement le ratio de chimères mâles de 80 à 100% par rapport à ceux de 50 à 70% est respectivement de 55% et 45% avec la trypsine 1788056 alors qu'il passe respectivement à 75% et 25% avec l'Accutase.

L'Accutase par son action plus spécifique perturbe moins les membranes cellulaires permettant ainsi aux cellules de conserver un taux d'auto renouvellement plus important que celui obtenu avec la trypsine. Nos observations sur les capacités d'adhérence des cellules traitées avec l'Accutase (observation du service de micro-injection) indiquent que leurs protéines membranaires sont moins dégradées, augmentant ainsi leur intégration et contribution à la morphogénèse de l'embryon, puis à l'organogénèse.

Des alertes sur la viabilité embryonnaire ont été émises lors de l'utilisation de l'Accutase dans la préparation des micro-injection. Afin d'identifier si l'utilisation de l'Accutase diminue réellement la viabilité des embryons et par conséquent le pourcentage des naissances j'ai comparé les taux de naissance obtenus après utilisation des réactifs de dissociation précédemment testées : trypsine n°1722774, trypsine n°1788056, et Accutase.

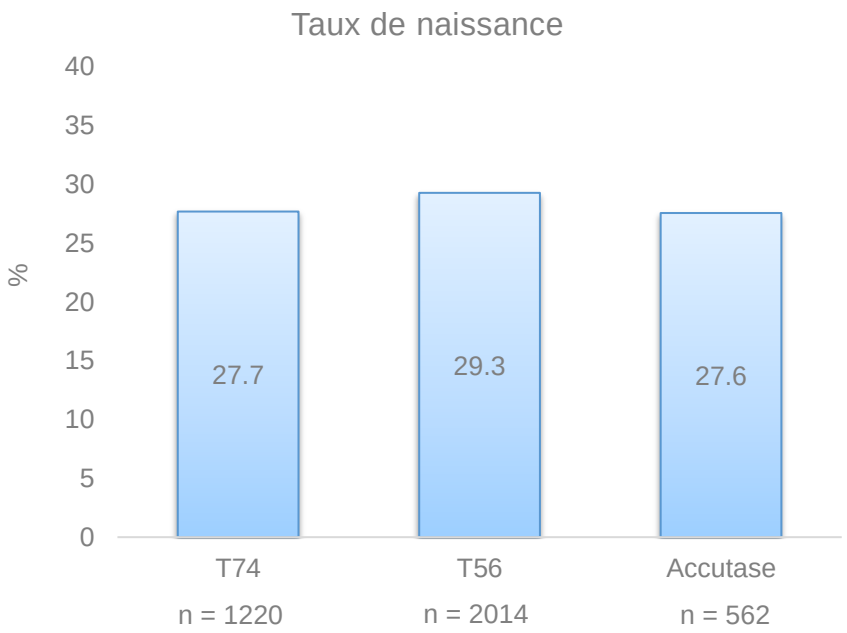


Figure n°52 : Pourcentage de naissance obtenue en fonction des réactifs de dissociation utilisés

Pour les données présentées « n » correspond au nombre d'embryons micro-injectés puis réimplantés dans les souris pseudo-gestantes. Ces résultats ont été obtenus en faisant le rapport du nombre de souris nées (souris sauvages et chimériques) sur le nombre d'embryons micro-injectés et réimplantés. T74 = trypsine n°1722774. T56 = trypsine n°1788056.

Il n'y a pas de différence dans les taux de naissance obtenus avec les différents réactifs. Les cellules dissociées avec l'Accutase ne semblent pas affecter la viabilité des embryons. Par conséquent nous avons de nouveau modifié notre mode opératoire de préparation des cellules ES pour utiliser l'Accutase lors de nos dissociations cellulaires. L'Accutase étant un réactif enzymatique comme la trypsine il sera nécessaire de contrôler l'efficacité des différents lots d'Accutase avant de les utiliser.

Discussion

4 Discussion et perspectives

4.1 Evaluations de réactif et de lignée cellulaire

4.1.1 Utilisation du milieu 2i+LIF

D'après mes résultats, par comparaison avec une culture en milieu avec sérum une culture en milieu 2i permet d'augmenter les expressions des PAL, de Nanog et d'Oct4 puis de Sox2 (figure n°46, 47 et 48).

De nombreuses études ont démontré que des cellules pluripotentes cultivées en milieu 2i, ont une augmentation de leur expression du facteur de transcription Nanog (Abranches et al., 2014 figure n°1 et 2 ; Wang et al., 2017 figure n°3 ; Faunes et al., 2013 figure n°6 ; Muñoz Descalzo et al., 2012 figure n°1). L'inhibiteur PD0325901 dirigé contre la voie MEK/ERK, contenu dans le milieu 2i diminue l'hétérogénéité de l'expression de Nanog d'une part en favorisant son expression par toutes les cellules ES et d'autre part en rendant cette expression bi-allélique (Abranches et al., 2014 figure n°3, Wray et al., 2010 figure n°3 ; Miyanari and Torres-Padilla, 2012 figure n°2 ; Faddah et al., 2013 figure n°1 et 2).

L'augmentation des expressions des PAL (Sim et al., 2017 figure n°1 ; Faunes et al., 2013 figure n°2) et des facteurs de transcription Oct4 et Sox2 ont également été reportés (Alexandrova et al., 2016 figure n°1, Muñoz Descalzo et al., 2012 figure n°1). Les expressions d'Oct4 et Sox2 augmentent moins avec le milieu 2i car leur expression est déjà bi-allélique en milieu contenant du sérum (Miyanari and Torres-Padilla, 2012 figure n°2 ; Faddah et al., 2013 figure n°2).

J'ai constaté que l'expression des facteurs NOS est plus hétérogène dans une culture en milieu contenant du sérum que dans une culture en milieu 2i (figure n°48). Cette hétérogénéité, également morphologique, est plus importante en milieu DKO+LIF qu'en milieu 2i+LIF (données non présentées). Cela est connu pour les cellules ES cultivées en milieu avec sérum mais aussi, à moindre mesure, pour les cellules cultivées en milieu 2i+LIF où cette hétérogénéité naturelle est limité par différent inhibiteur mais reste visible.

Le milieu 2i permet un accroissement du nombre de chimères (figure n°49 et 50) car les niveaux d'expression des facteurs NOS sont moins hétérogènes et plus proches de l'état naïf de la pluripotence. Les cellules qui expriment faiblement Nanog seraient plus susceptibles de s'engager dans la différenciation contrairement à dont l'expression est élevée, qui se trouvent dans l'état naïf de la pluripotence.
Une étude a démontré que les réarrangements cellulaires qui ont lieu dans l'embryon entre les stades 2,5 dpc et 4,5 dpc (figure n°1) excluent les cellules micro-injectées qui ne sont pas au stade naïf de la pluripotence (Alexandrova et al., 2016). Par rapport à des cellules ES cultivées en milieu 2i, les cellules ES cultivées en milieu avec sérum seraient davantage écartées du développement embryonnaire par l'embryon hôte. Bien

que cette étude ait été réalisée sur des embryons au stade 8 cellules (2,5dpc) dans lesquels les cellules ES introduites subissent trois phases de « tri » jusqu'au stade blastocyste (figure n°1), dans nos conditions les ESC sont micro-injectées dans des blastocystes à 3,5 dpc où la troisième phase de réarrangement à lieu. Suite à la micro-injection, les cellules ES exogènes réintègrent l'ICM où les ES endogènes laissent passer les cellules dont la pluripotence est dite « naïve ». Ces cellules exogènes restent alors dans l'ICM et participent au développement de l'embryon en colonisant les lignages précurseurs (endoderme, ectoderme, mésoderme). Selon cette hypothèse les différences de taux de chimérisme observées entre les conditions « DKO », « 2i J2 à J5 » et « 2i J5 à J9 » (figure n°49 et 50) reflètent cette étape d'exclusion des ES micro-injectées par les cellules de l'ICM lors de cette troisième phase de « tri ». Par leurs niveaux d'expression des facteur NOS, les cellules ES cultivées en milieu 2i+LIF seraient plus proches des cellules de l'ICM que le seraient des cellules ES cultivées en milieu DKO+LIF.

4.1.2 Les réactifs de dissociation cellulaire

J'ai observé que la croissance des cellules traitées avec la trypsine était plus faible que celle des cellules traitées avec l'Accutase (figure n°32). Différentes études sur des cellules souches neuronales et sur des hESC ont également montré qu'après dissociation la viabilité et la prolifération des cellules traitées avec la trypsine sont moins importantes que celles des cellules traitées avec l'Accutase (Wachs et al., 2003 figure n°1; Jager et al., 2016 figure n°3).

Les cellules ES humaines sont plus impactées par la trypsine que les mESC. La viabilité des hESC diminue rapidement après dissociation par action de la trypsine et leur prolifération est très faible contrairement aux cellules traitées avec de l'Accutase (Bajpai et al., 2008; figure n°1). De plus, l'Accutase n'induit chez les hESC ni perte d'expression des marqueurs de la pluripotence NANOG, OCT4, SOX2 et SSEA4 (Bajpai et al., 2008; figure n°5) ni perte de leur capacité de différenciation, (Bajpai et al., 2008; figure n°7). L'Accutase permet donc la dissociation des hESC sans affecter leur viabilité, leur prolifération, ni leur pluripotence. Chaque technique de dissociation cellulaire dégrade différents type de molécules transmembranaires dont font parties les récepteurs membranaires et les molécules d'adhésion. La dégradation des récepteurs de facteurs de croissance pourra impacter la survie cellulaire et la prolifération cellulaire tandis que la dégradation des molécules d'adhésion aura un effet sur l'adhésion et la migration cellulaire. Si l'Accutase dégrade moins de récepteurs membranaires que la trypsine, la prolifération des cellules sera plus importante. Si les molécules d'adhésion sont moins dégradées, l'adressage des ES micro-injectées jusqu'au centre de l'ICM pourrait être facilité. Comme c'est le cas pour les hESC, les mESC traitées avec l'Accutase prolifèrent mieux que celles traitées avec la trypsine, cela est en accord avec une colonisation plus rapide de l'ICM du blastocyste après micro-injection, qui se traduit par des taux de chimérismes plus élevés (figure n°51).

4.1.3 Comparaison de SVF et de KSR

Par comparaison avec un milieu contenant du sérum, le KSR est connu pour faciliter l'établissement de lignées de cellules ES (Lee et al., 2006, table n°1; Cheng et al., 2004, table n°1). Comme les ESC cultivées en présence de sérum, les cellules cultivées en KSR conservent leur pluripotence fonctionnelle (Liu et al., 2014, figure n°4 ;. Cheng et al., 2004, table n°2). J'ai constaté qu'en remplaçant le sérum par du KSR dans notre milieu de culture, les cellules ES ont des expressions de Nanog et Oct4 plus importantes (figure n°37 et 38). Ces observations sont en accord avec l'absence d'inducteurs de la différenciation cellulaire tels que certains facteurs de croissance (Liu et al., 2014; figure n°1). L'un d'eux, le βFGF (FGF-2, FGF-B) active la voie de signalisation MAPK/ERK qui réprime l'expression de Nanog (Liu et al., 2014; figure n°6). L'utilisation du KSR dépourvu de facteurs de croissance favorise donc le système d'autorégulation de la pluripotence des cellules ES. Ce réactif est actuellement utilisé dans la culture de nos cellules souches afin de réaliser des tests de formation de chimères et d'obtention de GLT. Si les résultats fonctionnels sont au moins identiques à ceux obtenus avec des culture en sérum, nous utiliserons le KSR pour réaliser nos prestations dans le but de mieux maitriser la composition de nos milieux de cultures et par conséquent l'état cellulaire de nos mESC.

4.1.4 Etablissement de nouvelles lignées de cellules ES

La lignée ABI1 a un taux de croissance plus important que les autres lignées testées (figure n°40) et présente la meilleure morphologie en culture. Malgré ces observations mes analyses moléculaires n'ont révélé aucune différence significative. Les tests fonctionnels de formation de chimères sont en cours et nous permettrons de conclure sur l'utilisation de cette lignée dans nos prestations. La lignée ABI1, tout comme les autres lignées ABI, a une durée de culture in vitro plus courte que celles des JM8.F6 donc moins de probabilité d'avoir dérivé de leur état natif. Dans le cas de résultat fonctionnel identique à ceux obtenus avec la lignée JM8.F6 utiliser la lignée ABI1 permettrait une meilleure maîtrise de l'état de culture en limitant les risques de différenciation cellulaire et de dérive génétique.

4.2 Impact de nos procédures de biologie cellulaire

4.2.1 Bilan sur l'optimisation de nos procédures

Depuis 2011, au cours de l'optimisation progressive de nos procédures de biologie cellulaire, qui ont permis d'augmenter séquentiellement la proportion de souris chimériques, nous constatons une diminution du nombre de naissance. J'ai analysé les taux de naissances annuels de 2011 à 2016 en les reliant à la proportion annuelle de souris chimères pour rechercher un éventuel lien entre le taux de naissance et la capacité de colonisation de l'embryon.

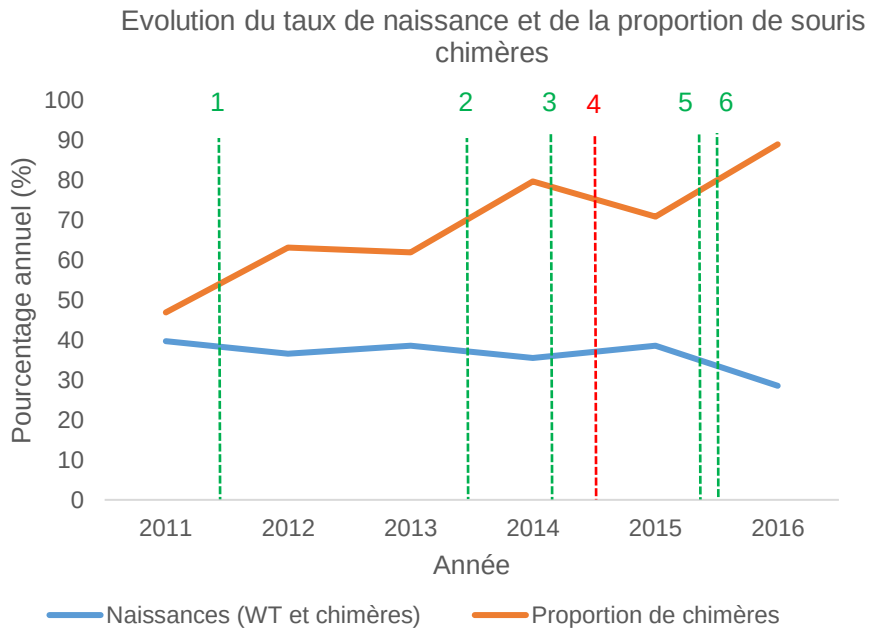


Figure n°53 : Relation entre le taux de naissance et la colonisation des embryons

Les valeurs présentées sont les taux annuels de chimérisme et de naissance. Ces résultats ont été obtenus en faisant le rapport du nombre total de souris nées dans l'année (souris wild-type et chimériques) sur le nombre total d'embryons micro-injectés et réimplantés dans l'année. Pour les années 2011 à 2016 le nombre « n » d'embryons analysés est compris entre 2680 et 4781.
Les lignes en pointillés représentent les modifications apportées à nos procédures de biologies cellulaires :

- Ligne 1 (Avril 2012) : utilisation du milieu 2i +LIF pendant 2 à 5 jours avant la micro-injection des cellules ES
- Ligne 2 (Juillet 2014) : utilisation du milieu 2i +LIF pendant 6 à 9 jours avant la micro-injection des cellules ES
- Ligne 3 (Janvier 2015) : remplacement des SNL à 30 000/cm² par des PMEF à 40 000/cm²
- Ligne 4 (courant 2015) : diminution de la densité des PMEF de 40 000/cm² à 20 000/cm²
- Ligne 5 (Juin 2016) : augmentation de la densité des PMEF de 20 000/cm² à 40 000/cm²
- Ligne 6 (Septembre 2016) : remplacement de la Trypsine 0,05% par l'Accutase pour la dissociation cellulaire

A chaque fois que la proportion de chimères augmente, le taux de naissance diminue et inversement. La viabilité des embryons hôtes semble dépendante du niveau de colonisation des cellules ES exogènes.

Des études sur la colonisation des embryons de souris par des cellules ES (Alexandrova et al., 2016; Wang and Jaenisch, 2004) ont montrées que les souris chimériques capables de GLT, obtenues à partir de cellules ES cultivées en présence de sérum et dissociées avec de la trypsine, sont issues d'embryons colonisés par seulement 1 à 3 cellules ES parmi les 10-15 cellules utilisées (micro-injection ou agrégation). Le fonds génétique de nos blastocystes hôtes (Balb/c) a été choisi en 2008 en fonction de sa compatibilité avec notre lignée de cellule ES de fonds génétique C57Bl6/N. Dans nos conditions expérimentales, les blastocystes Balb/c étaient assez permissif pour que la micro-injection de 12 cellules ES de fonds génétique C57Bl6/N cultivées en DKO+LIF et traitées avec la trypsine colonisent suffisamment l'ICM puis l'embryon pour donner naissance à une souris chimère capable de GLT.

En considérant cela, les souris chimériques de la condition DKO+LIF (figure n°49) seraient issues de seulement 1 à 3 cellules ES parmi les 12 cellules micro-injectées. Depuis l'utilisation du milieu 2i+LIF en 2012 (ligne 1) puis de la prolongation de la sélection en 2i en 2014 (ligne 2) le taux de chimère augmente alors que

le taux de naissance diminue. Cela indiquerait que davantage de cellules colonisent l'embryon car elles sont dans l'état « naïf » de la pluripotence (Alexandrova et al., 2016).

Le bénéfice du remplacement des SNL par des PMEF à 40 000/cm² en 2015 (ligne 3) n'est pas visible car la densité d'ensemencement des PMEF a été diminuer de moitié au cours de la même année (ligne 4). Cette dernière modification a fait chuter la viabilité et la pluripotence des cellules ES (données non présentées) et par conséquent le taux de chimérisme annuel. La colonisation des ES étant moins importante, la viabilité des embryons hôtes était un peu plus élevée qu'en 2014, effet visible sur le taux de naissance annuel.

L'utilisation de PMEF à une densité de 40K/cm² et d'Accutase pour la dissociation cellulaire permettent indépendamment d'augmenter la prolifération des cellules ES (données non présentées). Nous avons respectivement appliqué ces conditions dans nos procédures de culture en juin 2016 et septembre 2016 (ligne 5 et 6), les données présentées pour l'année 2016 sont donc la résultante de ces deux changements. Dans ces nouvelles conditions de culture, les cellules qui sont entrées dans l'ICM se propageraient plus rapidement dans les différents lignages cellulaires. La conséquence est une augmentation du taux de chimérisme annuel (données 2016), accompagné d'une chute du taux de naissance.

De 2011 à 2014 nous avons enrichi nos cultures en cellules ES dites « naïves » et donc le nombre de cellules ES capable de rester dans l'ICM, puis de 2015 à 2016 nous avons favorisé la prolifération de ces cellules ES. Suite à ces changements le taux de souris chimères et le taux de naissance sont respectivement passés de 47% et 40% en 2011, à 80% et 36% en 2014 puis à 89% et 28% en 2016.

4.2.2 Différences entre les cellules *in vitro et in vivo*

Tout au long de leur culture les cellules peuvent subir une modification dans l'expression de leurs gènes qui peut conduire à perturber leur capacité développementale. Nous savons que la grande majorité des lignées de cellules ES murines ne sont pas capables de produire tous les lignages embryonnaires. Seule de très rare lignée de mESC, telle que la « R1 », sont capables de générer un embryon sans aide des cellules ES d'un blastocyste hôte par le test d'agrégation des cellules ES avec des blastomères tétraploïdes. Dans ce test, des blastomères sont fusionnés pour être tétraploïdes et les rendre incapable de participer à un développement embryonnaire, par agrégation avec des cellules ES, ils contribuent seulement aux annexes embryonnaires alors que les cellules ES génèrent la totalité de l'embryon.

Une étude des profils d'expression d'embryon aux stades blastocyste expose qu'après mise en culture l'ICM et le trophectoderme *in vitro* ont des profils d'expression très différents de ceux observés chez leur homologue *in vivo*. Après une culture *in vitro* les profils d'expression de l'ICM et du trophectoderme sont très proches avec seulement 53 gènes dont l'expression est différente alors que dans l'embryon *in vivo* il s'agit de 764 gènes. La comparaison entre les cellules *in vivo* et celles mise en culture *(in vitro)* révèle que 310 gènes pour le compartiment de l'ICM et 108 gènes pour le trophectoderme ont des régulations différentes (Giritharan et al., 2012). L'incapacité des cellules ES cultivées *in vitro* à générer tous les lignages d'un embryon a surement

plusieurs causes, notamment cette différence entre le profil d'expression des cellules ES cultivées *in vitro* et celui des cellules de l'ICM (cellules ES *in vivo*).

4.2.3 Equilibre entre les cellules ES exogène et endogène

Comme toute culture cellulaire *in vitro* les cellules ES micro-injectées seront toujours conditionnées par leur culture. Malgré toutes les améliorations que nous mettrons en place dans nos procédures de biologie cellulaire, tant que les mécanismes cellulaires qui régissent l'expression des gènes ne pourront être reproduits en culture *in vitro*, les cellules ES cultivées en laboratoire s'adapteront à leur nouvel environnement. Ces cellules auront donc un profil d'expression différent de leur homologue *in vivo* et nécessiteront l'aide de cellules *in vivo* pour mener à terme un développement embryonnaire normal (Fernández-González et al., 2009; Rinaudo and Schultz, 2004).

Après micro-injection des cellules ES dans les blastocystes, un certain équilibre s'établi dans l'ICM entre les ES endogènes et les ES exogènes qui permet aux cellules endogènes d'adapter leur programme de différenciation en fonction des « défauts » développementaux des ES injectées. Lorsqu'une faible quantité de cellules ES « anormales » (altérations génétiques ou chromosomiques, profil d'expression anormal…) sont micro-injectées dans un blastocyste, les ES endogènes sont capables, selon les altérations présentes chez les ES micro-injectées, de palier aux défauts des cellules micro-injectées afin que celles-ci soit capables de participer à un développement normal (Brinster, 1974; Illmensee and Mintz, 1976). Les chutes des taux de naissances seraient dans ce cas causées par une colonisation excessive des ES exogènes. Nous aurions fait basculer l'équilibre *exogène/endogène,* nécessaire à l'obtention d'animaux viables, en faveur de nos cellules ES leur permettant de prendre l'ascendant sur les ES endogènes du blastocyste hôte. Celles-ci ne seraient alors plus capables de « contenir » les ES exogènes micro-injectées ou de garder leur propre place dans le développement embryonnaire. Cela signifierai que les différentes améliorations que nous avons appliquées à nos procédures ont rendues les cellules ES trop performantes dans leur rôle colonisateur.

Pour conserver un bon équilibre entre le taux de naissance et un chimérisme élevé il est donc important d'utiliser des cellules ES dont la période de culture in vitro est la plus courte possible pour limiter les effets de la culture *in vitro* et de micro-injecter une quantité de cellules ES optimale dans le blastocyste hôte. Comme nous l'avons vu, le nombre optimal de cellules ES micro-injectées doit être déterminer en fonction de la compatibilité entre les fonds génétiques des cellules ES et celui de l'embryon et en fonction du niveau de pluripotence des cellules ES micro-injectées.

4.3 Morphologie et pluripotence : les cadhérines E

J'ai observé qu'une morphologie compacte des amas cellulaires est corrélée à une forte expression des PAL et des facteurs de transcription Nanog et Oct4 (figure n°. 34, 37, 38 et 44, 46, 47, 48). Les études de la pluripotence réalisées sur des cultures en milieu avec et sans sérum présentent les mêmes observations (Wang et al., 2017 figure n°2 ; Alexandrova et al., 2016 figure n°1).

En fonction de l'état cellulaire les cellules ES forment des amas plus ou moins compacts qui s'étalent progressivement sur les PMEF au cours de leur différenciation. Mes observations confirment que l'utilisation de milieu de culture dépourvues de facteur de croissance (milieu contenant du KSR) et contenant plusieurs inhibiteurs de différenciation (milieu 2i+LIF) maintiennent une compaction élevée des amas de cellules ES. D'après mes résultats cette compaction est, dans une certaine mesure, proportionnelle aux niveaux d'expressions des facteurs de transcriptions NOS. Le milieu 2i qui favorise une expression maximale des facteurs de transcription NOS maintient une forte compaction des amas de cellules ES. Il a été reporté que le milieu 2i, favorise également une forte expression des cadhérines E (Chou et al., 2008). Lorsque l'expression des cadhérines E est diminuée, les cellules ES forment des amas qui perdent leur morphologie sphérique pour adopter la morphologie des FAB-SC et des EpiSC plus plates (figure n°16).

Les cadhérines sont des protéines d'adhésion présentes dans les jonctions intercellulaires. Ce sont des protéines transmembranaires codées par le gène Cdh1, dont les extrémités N-terminale et C-terminale sont respectivement extracellulaire et cytosolique. La famille des cadhérines est composée de sept membres nommés d'après les tissus dans lesquels ils sont exprimés, la cadhérine E est très représentée dans les structures épithéliales, d'où son nom « Epithelial Cadhérin ».

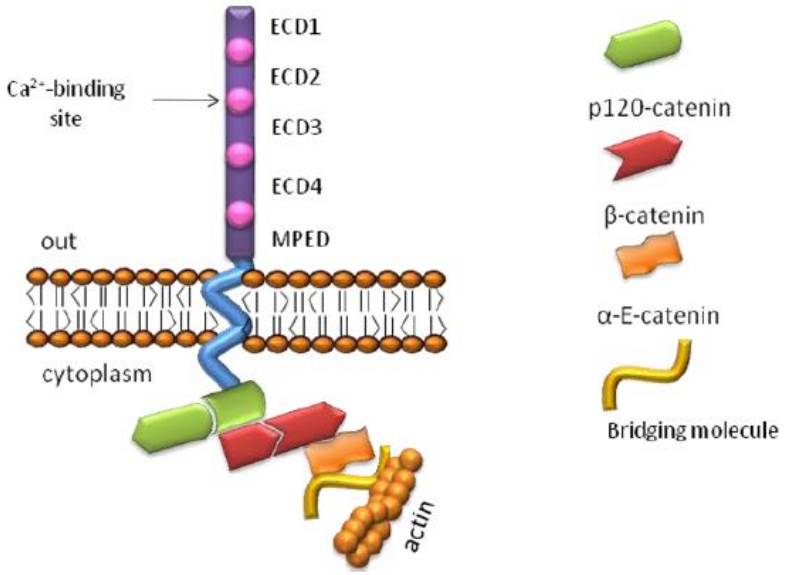


Figure n° 54 : La cadhérine E

Les cadhérines E sont composées de cinq domaines extracellulaires (Extra Cellular Domain) et d'un domaine intracellulaire qui est lié au cytosquelette. Les domaines extracellulaires permettent aux cadhérines, en présence d'ions calcium dans le milieu extra cellulaire, de se lier entres elles pour former une structure multicellulaire. Deux types de caténines, p120-

catenin et β-caténine, sont liées sur le domaine intracellulaire. Les β-caténines permettent l'accrochage du complexe protéique caténine/actine qui assure la continuité entre les cadhérines et le cytosquelette. Dans ce complexe la β-caténine est liée à de l'α-caténine elle-même liée aux protéines d'actines qui composent le cytosquelette ainsi qu'à d'autres protéines telles que la Vaculin, la Formin-1 et l'α-Actinin. Source : Soncin, F., Ward, C.M., 2011. The function of e-cadherin in stem cell pluripotency and self renewal. Genes 2, 229–259. doi:10.3390/genes2010229.

Les cadhérines E, préalablement nommées « uvomorulin », ont fait l'objet de nombreuses études visant à comprendre la morphogénèse embryonnaire (Damsky et al., 1983; Shirayoshi et al., 1983; Hyafil et al., 1980). Dans ce contexte, la cadhérine E a été identifiée sur les cellules totipotentes (Johnson et al., 1986) et pluripotentes.

La Cadhérine E est fonctionnellement responsable de la compaction des blastomères puis des cellules embryonnaire jusqu'à la formation des premiers tissus embryonnaires que sont le trophoblaste et l'ICM du blastocyste précoce (Ekblom et al., 1986; Vestweber and Kemler, 1984). Les cadhérines E, par formation de liaisons intercellulaires de type homophilique permettrait le réarrangement cellulaire des cellules de la morula qui aboutit à la séparation des cellules exprimant la cadhérine E (ICM) des cellules exprimant la cadhérine N (trophoblaste). Au niveau morphologique, lorsque cette protéine d'adhésion est fortement exprimée, il y a formation d'amas cellulaires très compacts. La chute d'expression de cette protéine chez les cellules cancéreuses provoque une perte d'adhérence qui conduit à leur libération dans l'organisme et à l'apparition de métastases au cours d'un évènement de transition mésenchymateuse « EMT » (Epithelial-Mesenchymal Transition). Il s'agit d'une transition entre les expressions des cadhérine E responsables de l'adhésion vers les cadhérine N liées à la migration qui initie la morphogénèse.

La cadhérine E favorise l'activation des voies de signalisation caractéristique de la pluripotence que sont les voies LIF (del Valle et al., 2013; Soncin et al., 2009), Bmp, Wnt (Moon et al., 2002) et PI3K (Woodfield et al., 2001) qui aboutissent à l'augmentation des expressions des facteurs de transcriptions Nanog et Oct4 (Faunes et al., 2013; Hawkins et al., 2012 ; Redmer et al., 2011). Au niveau moléculaire, l'expression des cadhérines E dans des conditions de culture en présence de LIF et de BMP4 induit une capture des β -caténines présentes dans le cytoplasme, qui se fixe alors à la partie intracellulaire de la cadhérine E. La formation de ce complexe permet la phosphorylation de la molécule STAT3 et ainsi l'activation de la voie de signalisation LIF/gp130 (del Valle et al., 2013). En milieu 2i+LIF le complexe E-cadhérine/β-caténine fixerait les protéines Oct4 cytosolique qui ne sont alors plus disponibles pour des interactions avec des facteurs de transcription qui conduiraient à l'activation de voies de différenciation (Faunes et al., 2013).

Les cadhérine E me permettent donc de relier le niveau de compaction des amas cellulaire aux niveaux d'expressions des facteurs de transcription Nanog et Oct4 (Faunes et al., 2013; Hawkins et al., 2012; Redmer et al., 2011). Cela éclaircit le lien bien connu des biologistes cellulaire entre la morphologie des cellules ES et leur état d'indifférenciation.

L'observation morphologique des mESC est donc une vision directe de leur état de pluripotence mais son appréciation reste subjective car dépendante de l'expérience de l'observateur. Pour obtenir une évaluation objective de la pluripotence des mESC nous pourrions donc quantifier les cadhérines E exprimées par les

cellules ES. Compte tenu de la localisation et du rôle des cadhérines E il ne sera pas possible de les quantifier après dissociation cellulaire qu'elle soit enzymatique ou seulement mécanique. Nous pourrions quantifier l'expression du gène Cdh1 par détection intra cellulaire ou utiliser des cellules ES exprimant un rapporteur du gène Cdh1 comme un Knock-In Cdh1-p2A-GFP. Ces cellules nous permettraient de relier rapidement leur niveau d'expression de la GFP à leur niveau de pluripotence.

Conclusion

5 Conclusion

L'objectif de mon projet était de mettre en place différentes analyses de la pluripotence pour évaluer nos réactifs de culture cellulaire ainsi que nos lignées de cellules ES dans le but d'identifier les conditions optimales pour la production de cellules ES capable de GLT à une haute fréquence.

Un des tests fréquemment utilisé pour évaluer la pluripotence des cellules ES est la détection des PAL par coloration de type « Fast Red ». J'ai mis au point un dosage des PAL par colorimétrie en me basant sur un kit commercial. Les PAL sont des protéines transmembranaires et j'ai identifié plusieurs sites de coupures de la trypsine dans sa séquence extra cellulaire, j'ai donc testé d'autres réactifs de dissociation cellulaire pour trouver celui qui dégraderait le moins possibles les PAL. Tous les réactifs qui dissocient correctement les amas cellulaire dégradent les PAL (figure n°30), j'ai donc choisi par défaut l'Accutase dont l'action protéolytique est la plus faible. Bien que l'Accutase dégrade une partie des PAL j'ai rapidement détecté que des cellules ES cultivées en milieu 2i+LIF expriment plus de PAL que des cellules ES cultivées en DKO+LIF. Au cours de mes autres analyses (comparatif de KSR et de SVF, de lignées de cellules ES) je n'ai trouvé aucune différence significative. Cette absence de différence indique que les conditions testées ne modifient pas l'expression des PAL ou que la dégradation des PAL lors de la dissociation cellulaire a supprimé ces différences. Dans ce cas les différents niveaux d'expression des PAL ne sont pas assez élevés pour « survivre » à la dissociation enzymatique. Seules les cellules qui expriment très fortement les PAL auront suffisamment de PAL à leur surface après la dissociation pour que le dosage soit résolutif. La deuxième limitation technique à ce dosage est le comptage cellulaire car aucun compteur de cellule n'est fiable à 100% et leur variabilité se répercutera sur le dosage. Comme je l'ai présenté dans l'introduction, les cellules ES expriment les TNAP et fortement les EAP jusqu'à l'implantation du blastocyste puis l'expression des EAP diminue fortement au cours des différenciations cellulaire qui suivent l'implantation. Nous pourrions détecter les PAL en quantifiant l'expression des EAP codées par le gène Akp5.

Le dosage des PAL m'a permis d'observer que la morphologie compacte obtenue en milieu 2i+LIF était liée à une forte expression des PAL. J'ai ensuite approfondie ce résultat en détectant les facteurs de transcriptions NOS par cytométrie en flux. Mon premier objectif était d'identifier le délai minimal de culture en milieu 2i+LIF nécessaire à l'obtention d'une population cellulaire homogène et enrichie en cellules ES dont la pluripotence est dite « naïve », cellules dont l'expression de Nanog est bi allélique. Parmi les trois facteurs de transcription que j'ai analysé Nanog est le plus résolutif car son expression fluctue de mono allélique à bi allélique en fonction du niveau de pluripotence de la cellule. En supplément de la quantification des facteurs de transcription NOS, les analyses de cytométrie en flux m'ont été utiles dans chacune de mes expérimentations pour connaitre les niveaux d'hétérogénéité de la population cellulaire dans l'expression de ces facteurs ainsi que dans la morphologie cellulaire (taille et structure). Ces données m'ont permis d'identifier les conditions de culture optimale pour l'obtention d'une population de cellules pluripotentes la plus homogène possible.

A l'inverse de la détection des PAL et des facteurs NOS qui nous donne une image précise à un instant « T » de l'état cellulaire, les analyses du taux de croissance et de la morphologie des cellules ES nous permettent

d'estimer en continu au cours de leur culture leur capacité d'auto renouvellement et leur état d'indifférenciation. Les analyses macroscopiques du taux de croissance et de la morphologie sont utiles pour surveiller en continu nos cultures et détecter l'apparition de dysfonctionnement alors que la précision des analyses par cytométrie en flux est indispensable pour évaluer nos réactifs de culture et nos lignées de cellules ES.

A l'heure actuelle nous pouvons donc mettre en place une procédure d'évaluation de la pluripotence qui s'appuie sur des analyses morphologiques, moléculaires et fonctionnelles. La qualité des cellules ES doit être déterminée par une surveillance continu de l'état morphologique et du taux de croissance puis par la quantification des facteurs NOS par cytométrie en flux et enfin par la génération d'individus chimériques capables de GLT.

Pour compléter notre panel de tests il serait intéressant de mettre en place un test de différenciation *in vitro* des cellules ES en CEB pour limiter les tests fonctionnels de micro-injection aux conditions les plus pertinentes. La composition cellulaire du CEB étant similaire à l'embryon au stade post-implantatoire (Martin, 1975), suite à la différenciation des cellules ES en CEB, nous pourrons évaluer leur pluripotence fonctionnelle. Cette technique de différenciation in vitro consiste à observer la formation spontanée d'agrégats cellulaires puis de corps embryoïdes par les cellules souches en condition non-adhérente puis de suivre leur développement. En formant ces agrégats sphériques de nombreuses interactions moléculaires se mettent en place et déclenchent les cascades de différenciations embryonnaires. Les cellules initient ainsi leur programme de différenciation pour former les structures germinales de l'embryon, l'ectoderme, l'endoderme, et le mésoderme que nous pourrons identifier par cytométrie en flux.

Concernant nos pistes d'améliorations, la viabilité des cellules ES pourrait être améliorée par l'utilisation de la molécule Y27632 (Zhang et al., 2012) qui limite l'apoptose dû à la dissociation cellulaire en inhibant la kinase Rho. L'utilisation de cet inhibiteur dans nos conditions actuelles, se traduirait par un nombre de cellules ES viables plus élevé et donc, un impact plus important des ES exogènes dans l'ICM conduisant à une baisse accentuée du taux de naissance. Pour éviter cela il sera nécessaire en premier lieu de diminuer le nombre de cellules ES micro-injectées.

Mon travail m'a permis d'optimiser nos procédures de culture cellulaire en augmentant séquentiellement notre compréhension et notre maitrise de l'état pluripotent. A l'échelle de notre service, la qualité moyenne des cellules ES que nous produisons est plus élevé et plus stable. Au niveau de la plateforme, le taux de chimérisme annuel moyen est plus élevé, favorisant l'obtention de GLT dès les premiers accouplements de souris chimériques. En fonction de la stratégie globale appliquée à nos prestations, les niveaux de priorité donnés au taux de chimérisme et au taux de naissance seront différents. Ceux-ci définiront les prochains axes d'amélioration du processus de production de souris transgéniques de la plateforme GEMTis qui seront désormais appliqués aux procédures de micro-injection.

Références bibliographiques

6 Références bibliographiques

Abranches, E., Guedes, A.M.V., Moravec, M., Maamar, H., Svoboda, P., Raj, A., Henrique, D., 2014. Stochastic NANOG fluctuations allow mouse embryonic stem cells to explore pluripotency. Dev. Camb. Engl. 141, 2770–2779. doi:10.1242/dev.108910

Alexandrova, S., Kalkan, T., Humphreys, P., Riddell, A., Scognamiglio, R., Trumpp, A., Nichols, J., 2016. Selection and dynamics of embryonic stem cell integration into early mouse embryos. Dev. Camb. Engl. 143, 24–34. doi:10.1242/dev.124602

Auerbach, C., 1949. Chemical mutagenesis. Biol. Rev. Camb. Philos. Soc. 24, 355–391.

Avilion, A.A., Nicolis, S.K., Pevny, L.H., Perez, L., Vivian, N., Lovell-Badge, R., 2003. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. Genes Dev. 17, 126–140. doi:10.1101/gad.224503

Bajpai, R., Lesperance, J., Kim, M., Terskikh, A.V., 2008. Efficient propagation of single cells Accutase-dissociated human embryonic stem cells. Mol. Reprod. Dev. 75, 818–827. doi:10.1002/mrd.20809

Batlle-Morera, L., Smith, A., Nichols, J., 2008. Parameters influencing derivation of embryonic stem cells from murine embryos. Genes. N. Y. N 2000 46, 758–767. doi:10.1002/dvg.20442

Beddington, R.S., Robertson, E.J., 1989. An assessment of the developmental potential of embryonic stem cells in the midgestation mouse embryo. Dev. Camb. Engl. 105, 733–737.

Belizário, J.E., Akamini, P., Wolf, P., Strauss, B., Xavier-Neto, J., 2012. New routes for transgenesis of the mouse. J. Appl. Genet. 53, 295–315. doi:10.1007/s13353-012-0096-y

Berstine, E.G., Hooper, M.L., Grandchamp, S., Ephrussi, B., 1973. Alkaline phosphatase activity in mouse teratoma. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 70, 3899–3903.

Bolean, M., Simão, A.M.S., Kiffer-Moreira, T., Hoylaerts, M.F., Millán, J.L., Itri, R., Ciancaglini, P., 2015. Proteoliposomes with the ability to transport Ca(2+) into the vesicles and hydrolyze phosphosubstrates on their surface. Arch. Biochem. Biophys. 584, 79–89. doi:10.1016/j.abb.2015.08.018

Boyer, L.A., Mathur, D., Jaenisch, R., 2006. Molecular control of pluripotency. Curr. Opin. Genet. Dev. 16, 455–462. doi:10.1016/j.gde.2006.08.009

Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M.H., Robertson, E., 1984. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. Nature 309, 255–256.

Brinster, R.L., 1974. The effect of cells transferred into the mouse blastocyst on subsequent development. J. Exp. Med. 140, 1049–1056.

Bronson, S.K., Smithies, O., 1994. Altering mice by homologous recombination using embryonic stem cells. J. Biol. Chem. 269, 27155–27158.

Brook, F.A., Gardner, R.L., 1997. The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94, 5709–5712.

Bucci, M., Murphy, C.R., 1995. Alkaline phosphatase distribution in the plasma membrane of uterine epithelial cells is markedly altered during early pregnancy in the rat. Cell Biol. Int. 19, 921–928. doi:10.1006/cbir.1995.1030

Camolezi, F.L., Daghastanli, K.R.P., Magalhães, P.P., Pizauro, J.M., Ciancaglini, P., 2002. Construction of an alkaline phosphatase-liposome system: a tool for biomineralization study. Int. J. Biochem. Cell Biol. 34, 1091–1101.

Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., Smith, A., 2003. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. Cell 113, 643–655.

Chambers, I., Smith, A., 2004. Self-renewal of teratocarcinoma and embryonic stem cells. Oncogene 23, 7150–7160. doi:10.1038/sj.onc.1207930

Cheng, J., Dutra, A., Takesono, A., Garrett-Beal, L., Schwartzberg, P.L., 2004. Improved generation of C57BL/6J mouse embryonic stem cells in a defined serum-free media. Genes. N. Y. N 2000 39, 100–104. doi:10.1002/gene.20031

Chou, Y.-F., Chen, H.-H., Eijpe, M., Yabuuchi, A., Chenoweth, J.G., Tesar, P., Lu, J., McKay, R.D.G., Geijsen, N., 2008. The growth factor environment defines distinct pluripotent ground states in novel blastocyst-derived stem cells. Cell 135, 449–461. doi:10.1016/j.cell.2008.08.035

Ciancaglini, P., Pizauro, J.M., Leone, F.A., 1997. Dependence of divalent metal ions on phosphotransferase activity of osseous plate alkaline phosphatase. J. Inorg. Biochem. 66, 51–55.

Cumming, G., Fidler, F., Vaux, D.L., 2007. Error bars in experimental biology. J. Cell Biol. 177, 7–11. doi:10.1083/jcb.200611141

Damsky, C.H., Richa, J., Solter, D., Knudsen, K., Buck, C.A., 1983. Identification and purification of a cell surface glycoprotein mediating intercellular adhesion in embryonic and adult tissue. Cell 34, 455–466.

Dehghani, H., Narisawa, S., Millán, J.L., Hahnel, A.C., 2000. Effects of disruption of the embryonic alkaline phosphatase gene on preimplantation development of the mouse. Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat. 217, 440–448. doi:10.1002/(SICI)1097-0177(200004)217:4<440::AID-DVDY11>3.0.CO;2-1

De Los Angeles, A., Ferrari, F., Xi, R., Fujiwara, Y., Benvenisty, N., Deng, H., Hochedlinger, K., Jaenisch, R., Lee, S., Leitch, H.G., Lensch, M.W., Lujan, E., Pei, D., Rossant, J., Wernig, M., Park, P.J., Daley, G.Q., 2015. Hallmarks of pluripotency. Nature 525, 469–478. doi:10.1038/nature15515

del Valle, I., Rudloff, S., Carles, A., Li, Y., Liszewska, E., Vogt, R., Kemler, R., 2013. E-cadherin is required for the proper activation of the Lifr/Gp130 signaling pathway in mouse embryonic stem cells. Dev. Camb. Engl. 140, 1684–1692. doi:10.1242/dev.088690

Diwan, S.B., Stevens, L.C., 1976. Development of teratomas from the ectoderm of mouse egg cylinders. J. Natl. Cancer Inst. 57, 937–942.

Doetschman, T.C., Eistetter, H., Katz, M., Schmidt, W., Kemler, R., 1985. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. J. Embryol. Exp. Morphol. 87, 27–45.

Ekblom, P., Vestweber, D., Kemler, R., 1986. Cell-Matrix Interactions and Cell Adhesion During Development. Annu. Rev. Cell Biol. 2, 27–47. doi:10.1146/annurev.cb.02.110186.000331

Evans, M.J., Kaufman, M.H., 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature 292, 154–156.

Faddah, D.A., Wang, H., Cheng, A.W., Katz, Y., Buganim, Y., Jaenisch, R., 2013. Single-cell analysis reveals that expression of nanog is biallelic and equally variable as that of other pluripotency factors in mouse ESCs. Cell Stem Cell 13, 23–29. doi:10.1016/j.stem.2013.04.019

Faunes, F., Hayward, P., Descalzo, S.M., Chatterjee, S.S., Balayo, T., Trott, J., Christoforou, A., Ferrer-Vaquer, A., Hadjantonakis, A.-K., Dasgupta, R., Arias, A.M., 2013. A membrane-associated β-catenin/Oct4 complex correlates with ground-state pluripotency in mouse embryonic stem cells. Dev. Camb. Engl. 140, 1171–1183. doi:10.1242/dev.085654

Fernández-González, R., de Dios Hourcade, J., López-Vidriero, I., Benguría, A., De Fonseca, F.R., Gutiérrez-Adán, A., 2009. Analysis of gene transcription alterations at the blastocyst stage related to the long-term consequences of in vitro culture in mice. Reprod. Camb. Engl. 137, 271–283. doi:10.1530/REP-08-0265

Finch, B.W., Ephrussi, B., 1967. RETENTION OF MULTIPLE DEVELOPMENTAL POTENTIALITIES BY CELLS OF A MOUSE TESTICULAR TERATOCARCINOMA DURING PROLONGED CULTURE in vitro AND THEIR EXTINCTION UPON HYBRIDIZATION WITH CELLS OF PERMANENT LINES. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 57, 615–621.

Finn, C.A., Hinchliffe, J.R., 1964. REACTION OF THE MOUSE UTERUS DURING IMPLANTATION AND DECIDUOMA FORMATION AS DEMONSTRATED BY CHANGES IN THE DISTRIBUTION OF ALKALINE PHOSPHATASE. J. Reprod. Fertil. 8, 331–338.

Gan, Q., Yoshida, T., McDonald, O.G., Owens, G.K., 2007. Concise review: epigenetic mechanisms contribute to pluripotency and cell lineage determination of embryonic stem cells. Stem Cells Dayt. Ohio 25, 2–9. doi:10.1634/stemcells.2006-0383

Giritharan, G., Delle Piane, L., Donjacour, A., Esteban, F.J., Horcajadas, J.A., Maltepe, E., Rinaudo, P., 2012. In vitro culture of mouse embryos reduces differential gene expression between inner cell mass and trophectoderm. Reprod. Sci. Thousand Oaks Calif 19, 243–252. doi:10.1177/1933719111428522

Gordon, J.W., Scangos, G.A., Plotkin, D.J., Barbosa, J.A., Ruddle, F.H., 1980. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 77, 7380–7384.

Gossler, A., Doetschman, T., Korn, R., Serfling, E., Kemler, R., 1986. Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell lines. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 83, 9065–9069.

Hahnel, A.C., Rappolee, D.A., Millan, J.L., Manes, T., Ziomek, C.A., Theodosiou, N.G., Werb, Z., Pedersen, R.A., Schultz, G.A., 1990. Two alkaline phosphatase genes are expressed during early development in the mouse embryo. Dev. Camb. Engl. 110, 555–564.

Hart, A.H., Hartley, L., Ibrahim, M., Robb, L., 2004. Identification, cloning and expression analysis of the pluripotency promoting Nanog genes in mouse and human. Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat. 230, 187–198. doi:10.1002/dvdy.20034

Hawkins, K., Mohamet, L., Ritson, S., Merry, C.L.R., Ward, C.M., 2012. E-cadherin and, in its absence, N-cadherin promotes Nanog expression in mouse embryonic stem cells via STAT3 phosphorylation. Stem Cells Dayt. Ohio 30, 1842–1851. doi:10.1002/stem.1148

Heard, E., 2004. Recent advances in X-chromosome inactivation. Curr. Opin. Cell Biol. 16, 247–255. doi:10.1016/j.ceb.2004.03.005

Hooke, R. 1635-1703, 2005. Micrographia Some Physiological Descriptions of Minute Bodies Made by Magnifying Glasses with Observations and Inquiries Thereupon.

Hyafil, F., Morello, D., Babinet, C., Jacob, F., 1980. A cell surface glycoprotein involved in the compaction of embryonal carcinoma cells and cleavage stage embryos. Cell 21, 927–934.

Iijima, S., Tanimoto, Y., Mizuno, S., Daitoku, Y., Kunita, S., Sugiyama, F., Yagami, K., 2010. Effect of different culture conditions on establishment of embryonic stem cells from BALB/cAJ and NZB/BINJ mice. Cell. Reprogramming 12, 679–688. doi:10.1089/cell.2010.0018

Illmensee, K., Mintz, B., 1976. Totipotency and normal differentiation of single teratocarcinoma cells cloned by injection into blastocysts. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 73, 549–553.

Jaenisch, R., Mintz, B., 1974. Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 71, 1250–1254.

Jaenisch, R., Young, R., 2008. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. Cell 132, 567–582. doi:10.1016/j.cell.2008.01.015

Jager, L.D., Canda, C.-M.A., Hall, C.A., Heilingoetter, C.L., Huynh, J., Kwok, S.S., Kwon, J.H., Richie, J.R., Jensen, M.B., 2016. Effect of enzymatic and mechanical methods of dissociation on neural progenitor cells derived from induced pluripotent stem cells. Adv. Med. Sci. 61, 78–84. doi:10.1016/j.advms.2015.09.005

Johnson, L.V., Calarco, P.G., Siebert, M.L., 1977. Alkaline phosphatase activity in the preimplantation mouse embryo. J. Embryol. Exp. Morphol. 40, 83–89.

Johnson, M.H., Maro, B., Takeichi, M., 1986. The role of cell adhesion in the synchronization and orientation of polarization in 8-cell mouse blastomeres. J. Embryol. Exp. Morphol. 93, 239–255.

Kelly, S.J., 1977. Studies of the developmental potential of 4- and 8-cell stage mouse blastomeres. J. Exp. Zool. 200, 365–376. doi:10.1002/jez.1402000307

Kim, Y.-J., Lee, M.-H., Wozney, J.M., Cho, J.-Y., Ryoo, H.-M., 2004. Bone morphogenetic protein-2-induced alkaline phosphatase expression is stimulated by Dlx5 and repressed by Msx2. J. Biol. Chem. 279, 50773–50780. doi:10.1074/jbc.M404145200

Kleinsmith, L.J., Pierce, G.B., 1964. MULTIPOTENTIALITY OF SINGLE EMBRYONAL CARCINOMA CELLS. Cancer Res. 24, 1544–1551.

Koyama, I., Matsunaga, T., Harada, T., Hokari, S., Komoda, T., 2002. Alkaline phosphatases reduce toxicity of lipopolysaccharides in vivo and in vitro through dephosphorylation. Clin. Biochem. 35, 455–461.

Lee, K.-H., Chuang, C.-K., Guo, S.-F., Tu, C.-F., 2012. Simple and efficient derivation of mouse embryonic stem cell lines using differentiation inhibitors or proliferation stimulators. Stem Cells Dev. 21, 373–383. doi:10.1089/scd.2011.0021

Lee, K.Y., Jeong, J.-W., Wang, J., Ma, L., Martin, J.F., Tsai, S.Y., Lydon, J.P., DeMayo, F.J., 2007. Bmp2 is critical for the murine uterine decidual response. Mol. Cell. Biol. 27, 5468–5478. doi:10.1128/MCB.00342-07

Lee, S.T., Oh, S.W., Kim, D.Y., Han, J.Y., Moon, S.Y., Lim, J.M., 2006. Serum replacement with a growth factor-free synthetic substance in culture medium contributes to effective establishment of mouse embryonic stem cells of various origins. Fertil. Steril. 86, 1137–1145. doi:10.1016/j.fertnstert.2006.01.056

Lei, W., Nguyen, H., Brown, N., Ni, H., Kiffer-Moreira, T., Reese, J., Millán, J.L., Paria, B.C., 2013. Alkaline phosphatases contribute to uterine receptivity, implantation, decidualization, and defense against bacterial endotoxin in hamsters. Reprod. Camb. Engl. 146, 419–432. doi:10.1530/REP-13-0153

Liu, K., Wang, F., Ye, X., Wang, L., Yang, J., Zhang, J., Liu, L., 2014. KSR-based medium improves the generation of high-quality mouse iPS cells. PloS One 9, e105309. doi:10.1371/journal.pone.0105309

Loh, Y.-H., Wu, Q., Chew, J.-L., Vega, V.B., Zhang, W., Chen, X., Bourque, G., George, J., Leong, B., Liu, J., Wong, K.-Y., Sung, K.W., Lee, C.W.H., Zhao, X.-D., Chiu, K.-P., Lipovich, L., Kuznetsov, V.A., Robson, P., Stanton, L.W., Wei, C.-L., Ruan, Y., Lim, B., Ng, H.-H., 2006. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. Nat. Genet. 38, 431–440. doi:10.1038/ng1760

Martin, G.R., 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 78, 7634–7638.

Martin, G.R., 1975. Teratocarcinomas as a model system for the study of embryogenesis and neoplasia. Cell 5, 229–243.

Martin, G.R., Evans, M.J., 1975. Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 72, 1441–1445.

Masui, S., Nakatake, Y., Toyooka, Y., Shimosato, D., Yagi, R., Takahashi, K., Okochi, H., Okuda, A., Matoba, R., Sharov, A.A., Ko, M.S.H., Niwa, H., 2007. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. Nat. Cell Biol. 9, 625–635. doi:10.1038/ncb1589

Millán, J.L., 2006. Alkaline Phosphatases : Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes. Purinergic Signal. 2, 335–341. doi:10.1007/s11302-005-5435-6

Miyanari, Y., Torres-Padilla, M.-E., 2012. Control of ground-state pluripotency by allelic regulation of Nanog. Nature 483, 470–473. doi:10.1038/nature10807

Moon, R.T., Bowerman, B., Boutros, M., Perrimon, N., 2002. The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin. Science 296, 1644–1646. doi:10.1126/science.1071549

Mulnard, J., Huygens, R., 1978. Ultrastructural localization of non-specific alkaline phosphatase during cleavage and blastocyst formation in the mouse. J. Embryol. Exp. Morphol. 44, 121–131.

Muñoz Descalzo, S., Rué, P., Garcia-Ojalvo, J., Martinez Arias, A., 2012. Correlations between the levels of Oct4 and Nanog as a signature for naïve pluripotency in mouse embryonic stem cells. Stem Cells Dayt. Ohio 30, 2683–2691. doi:10.1002/stem.1230

Murdoch, R.N., Kay, D.J., Cross, M., 1978. Activity and subcellular distribution of mouse uterine alkaline phosphatase during pregnancy and pseudopregnancy. J. Reprod. Fertil. 54, 293–300.

Nagy, A., Gócza, E., Diaz, E.M., Prideaux, V.R., Iványi, E., Markkula, M., Rossant, J., 1990. Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse. Dev. Camb. Engl. 110, 815–821.

Nakano, Y., Beertsen, W., van den Bos, T., Kawamoto, T., Oda, K., Takano, Y., 2004. Site-specific localization of two distinct phosphatases along the osteoblast plasma membrane: tissue non-specific alkaline phosphatase and plasma membrane calcium ATPase. Bone 35, 1077–1085. doi:10.1016/j.bone.2004.07.009

Nichols, J., Smith, A., 2009. Naive and primed pluripotent states. Cell Stem Cell 4, 487–492. doi:10.1016/j.stem.2009.05.015

Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Schöler, H., Smith, A., 1998. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. Cell 95, 379–391.

Okita, K., Yamanaka, S., 2006. Intracellular signaling pathways regulating pluripotency of embryonic stem cells. Curr. Stem Cell Res. Ther. 1, 103–111.

Pan, G., Thomson, J.A., 2007. Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. Cell Res. 17, 42–49. doi:10.1038/sj.cr.7310125

Pierce, G.B., Dixon, F.J., 1959. Testicular teratomas. I. Demonstration of teratogenesis by metamorphosis of multipotential cells. Cancer 12, 573–583.

Poelstra, K., Bakker, W.W., Klok, P.A., Kamps, J.A., Hardonk, M.J., Meijer, D.K., 1997. Dephosphorylation of endotoxin by alkaline phosphatase in vivo. Am. J. Pathol. 151, 1163–1169.

Quan, Y., Yan, Y., Wang, X., Fu, Q., Wang, W., Wu, J., Yang, G., Ren, J., Wang, Y., 2013. Impact of cell dissociation on identification of breast cancer stem cells. Cancer Biomark. 12, 125–133. doi:10.3233/CBM-130300

Redmer, T., Diecke, S., Grigoryan, T., Quiroga-Negreira, A., Birchmeier, W., Besser, D., 2011. E-cadherin is crucial for embryonic stem cell pluripotency and can replace OCT4 during somatic cell reprogramming. EMBO Rep. 12, 720–726. doi:10.1038/embor.2011.88

Rinaudo, P., Schultz, R.M., 2004. Effects of embryo culture on global pattern of gene expression in preimplantation mouse embryos. Reprod. Camb. Engl. 128, 301–311. doi:10.1530/rep.1.00297

Shirayoshi, Y., Okada, T.S., Takeichi, M., 1983. The calcium-dependent cell-cell adhesion system regulates inner cell mass formation and cell surface polarization in early mouse development. Cell 35, 631–638.

Smith, A.G., Heath, J.K., Donaldson, D.D., Wong, G.G., Moreau, J., Stahl, M., Rogers, D., 1988. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. Nature 336, 688–690. doi:10.1038/336688a0

Smith, A.G., Hooper, M.L., 1987. Buffalo rat liver cells produce a diffusible activity which inhibits the differentiation of murine embryonal carcinoma and embryonic stem cells. Dev. Biol. 121, 1–9.

Smithies, O., Gregg, R.G., Boggs, S.S., Koralewski, M.A., Kucherlapati, R.S., 1985. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. Nature 317, 230–234.

Solter, D., 2006. From teratocarcinomas to embryonic stem cells and beyond: a history of embryonic stem cell research. Nat. Rev. Genet. 7, 319–327. doi:10.1038/nrg1827

Soncin, F., Mohamet, L., Eckardt, D., Ritson, S., Eastham, A.M., Bobola, N., Russell, A., Davies, S., Kemler, R., Merry, C.L.R., Ward, C.M., 2009. Abrogation of E-cadherin-mediated cell-cell contact in mouse embryonic stem cells results in reversible LIF-independent self-renewal. Stem Cells Dayt. Ohio 27, 2069–2080. doi:10.1002/stem.134

Stevens, L.C., 1970. The development of transplantable teratocarcinomas from intratesticular grafts of pre- and postimplantation mouse embryos. Dev. Biol. 21, 364–382.

Stewart, C.L., Vanek, M., Wagner, E.F., 1985. Expression of foreign genes from retroviral vectors in mouse teratocarcinoma chimaeras. EMBO J. 4, 3701–3709.

Surani, M.A., Hayashi, K., Hajkova, P., 2007. Genetic and epigenetic regulators of pluripotency. Cell 128, 747–762. doi:10.1016/j.cell.2007.02.010

Thomas, K.R., Capecchi, M.R., 1987. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. Cell 51, 503–512.

Turner, W. (William) Sir, 1832-1916., 1890. The cell theory, past and present : being the inaugural address delivered November 1, 1889, to the Scottish Microscopical Society / by Sir William Turner.

Vestweber, D., Kemler, R., 1984. Rabbit antiserum against a purified surface glycoprotein decompacts mouse preimplantation embryos and reacts with specific adult tissues. Exp. Cell Res. 152, 169–178.

Wachs, F.P., Couillard Despres, S., Engelhardt, M., Wilhelm, D., Ploetz, S., Vroemen, M., Kaesbauer, J., Uyanik, G., Klucken, J., Karl, C., Tebbing, J., Svendsen, C., Weidner, N., Kuhn, H.G., Winkler, J., Aigner, L., 2003. High efficacy of clonal growth and expansion of adult neural stem cells [WWW Document]. Lab. Invest. URL https://eurekamag.com/research/010/749/010749067.php (accessed 5.28.17).

Wang, D., Sang, H., Zhang, K., Nie, Y., Zhao, S., Zhang, Y., He, N., Wang, Y., Xu, Y., Xie, X., Li, Z., Liu, N., 2017. Stat3 phosphorylation is required for embryonic stem cells ground state maintenance in 2i culture media. Oncotarget 8, 31227–31237. doi:10.18632/oncotarget.16112

Wang, Z., Jaenisch, R., 2004. At most three ES cells contribute to the somatic lineages of chimeric mice and of mice produced by ES-tetraploid complementation. Dev. Biol. 275, 192–201. doi:10.1016/j.ydbio.2004.06.026

Watanabe, S., Umehara, H., Murayama, K., Okabe, M., Kimura, T., Nakano, T., 2006. Activation of Akt signaling is sufficient to maintain pluripotency in mouse and primate embryonic stem cells. Oncogene 25, 2697–2707. doi:10.1038/sj.onc.1209307

Wells, D.N., McWhir, J., Hooper, M.L., Wilmut, I., 1991. Factors influencing the isolation of murine embryonic stem cells. Theriogenology 35, 293. doi:10.1016/0093-691X(91)90269-J

Whyte, M.P., Landt, M., Ryan, L.M., Mulivor, R.A., Henthorn, P.S., Fedde, K.N., Mahuren, J.D., Coburn, S.P., 1995. Alkaline phosphatase: placental and tissue-nonspecific isoenzymes hydrolyze phosphoethanolamine, inorganic pyrophosphate, and pyridoxal 5'-phosphate. Substrate accumulation in carriers of hypophosphatasia corrects during pregnancy. J. Clin. Invest. 95, 1440–1445. doi:10.1172/JCI117814

Woodfield, R.J., Hodgkin, M.N., Akhtar, N., Morse, M.A., Fuller, K.J., Saqib, K., Thompson, N.T., Wakelam, M.J., 2001. The p85 subunit of phosphoinositide 3-kinase is associated with beta-catenin in the cadherin-based adhesion complex. Biochem. J. 360, 335–344.

Wray, J., Kalkan, T., Smith, A.G., 2010. The ground state of pluripotency. Biochem. Soc. Trans. 38, 1027–1032. doi:10.1042/BST0381027

Yeo, J.-C., Ng, H.-H., 2013. The transcriptional regulation of pluripotency. Cell Res. 23, 20–32. doi:10.1038/cr.2012.172

Ying, Q.-L., Wray, J., Nichols, J., Batlle-Morera, L., Doble, B., Woodgett, J., Cohen, P., Smith, A., 2008. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. Nature 453, 519–523. doi:10.1038/nature06968

Yoshimi, K., Kunihiro, Y., Kaneko, T., Nagahora, H., Voigt, B., Mashimo, T., 2016. ssODN-mediated knock-in with CRISPR-Cas for large genomic regions in zygotes. Nat. Commun. 7, ncomms10431. doi:10.1038/ncomms10431

Zhang, P., Wu, X., Hu, C., Wang, P., Li, X., 2012. Rho kinase inhibitor Y-27632 and Accutase dramatically increase mouse embryonic stem cell derivation. In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim. 48, 30–36. doi:10.1007/s11626-011-9471-y

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE

Recherche d'optimisation dans la production de cellules souches embryonnaires murines

Estebe Bruno

Soutenu le 15 novembre 2017

RÉSUMÉ

Une cellule souche embryonnaire (ES cells) est définie par deux caractéristiques : la pluripotence, qui représente le potentiel d'une cellule à se différencier dans tous les types cellulaires de l'organisme, et l'auto renouvellement, qui lui permet de se diviser indéfiniment sans différenciation. La modification génique de cellules souches embryonnaires de souris par recombinaison homologue permet la création de modèles murins complexes. En culture *in vitro* il est important de pouvoir maitriser leur qualité car le maintien de la pluripotence des cellules ES est primordial pour l'obtention de la lignée murine porteuse de la mutation.

Mon objectif a été de mettre en place une procédure de contrôle de l'état de pluripotence cellulaire. Une telle procédure est indispensable pour surveiller nos cultures et détecter l'apparition de dysfonctionnement mais aussi pour évaluer nos procédures et les optimiser. J'ai recherché un lien entre nos observations de culture cellulaire (morphologie et taux de croissance), la quantification de certains marqueurs moléculaires de la pluripotence (dosage enzymatique des phosphatases alcalines et quantification des facteurs de transcription Nanog, Oct4 et Sox2 par cytométrie en flux) et l'analyse fonctionnelle de nos cellules ES (génération d'individu chimérique).

Ces analyses m'ont permis d'identifier et de mettre en place certaines améliorations dans nos procédures de culture qui ont augmenté le niveau de pluripotence de nos cellules ES.

MOTS-CLÉS : production de modèle murin (KO/KI), biologie cellulaire, cellules souches embryonnaires murines, pluripotence