

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire (IGBMC)
CNRS UMR 7104 - Inserm U 964

THÈSE

présentée par :

Marie-Charlotte MORIN

Soutenue publiquement le 22 Mars 2016

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : biologie cellulaire

**Mise en évidence de nouveaux acteurs de la
transdifférenciation naturelle : implication pour
le maintien de l'identité cellulaire et impact de
l'environnement.**

THÈSE dirigée par:

Mme Sophie Jarriault

IGBMC, Université de Strasbourg.

RAPPORTEURS :

Mme Francesca Palladino

Laboratoire de Biologie et de Modélisation de la Cellule,
École Normale Supérieure de Lyon.

M Vincent Bertrand

Institut de Biologie du Développement de Marseille,
Université d'Aix-Marseille.

AUTRES MEMBRES DU JURY :

M Gérard Gradwohl

IGBMC, Université de Strasbourg

M Lionel Pintard

Institut Jacques Monod, Université Paris Diderot.

REMERCIEMENTS

La thèse est loin d'être un travail solitaire, j'ai tellement de personnes à remercier, je vais essayer de ne pas en oublier (et de faire en sorte que ces remerciements ne dépassent pas le nombre de pages de mon introduction).

Un grand merci à Francesca Palladino, Vincent Bertrand, Gérard Gradwohl et Lionel Pintard de m'avoir fait l'honneur de composer mon jury de thèse. Doublement merci à Vincent Bertrand et Gérard Gradwohl de m'avoir également aiguillée durant mon comité de demi-thèse. Un troisième merci à Vincent Bertrand de m'avoir envoyé (et même ré-envoyé) des souches et un plasmide qui ont été très utiles (à moi et au laboratoire... d'ailleurs je vous dois toujours des chocolats). Merci également à Lionel Pintard de m'avoir initiée à l'extraction protéique pour essayer tant bien que mal de purifier cette fameuse protéine LIN-15A.

Un ami thésard m'a dit un jour « la relation doctorant-directeur de thèse, c'est un peu comme une pseudo relation de couple, faut faire des concessions, on n'est pas toujours d'accord mais quand on pense aux années passées ensemble, on sourit et on se dit que c'était pas mal quand même ». Merci à toi Sophie pour m'avoir fait confiance en fin de master, je n'étais pas la première de promo en M1 et tu as su réveiller en l'outsider que j'étais la future thésarde prête à décrocher une bourse MRT. J'ai eu le droit à une formation hors pair et un sujet de thèse passionnant. Merci pour le temps accordé à parler science mais pas seulement, merci pour le soutien quand les mois s'enchaînaient parfois sans résultat positif (sous forme de paroles bienveillantes et de chocolats dégainés de ton tiroir). Merci de m'avoir laissée (et même souvent encouragée) faire mes petites folies en marge de ma thèse (le monitorat très chronophage en 1^{ère} année, les fêtes de la science, le concours *ma thèse en 180 secondes*, un bébé en 4^{ème} année, etc). L'ERC en poche, les idées qui ne manquent pas, tu n'as plus rien à prouver et je ne me fais aucun souci pour l'avenir de ton laboratoire.

Merci à tout le labo Jarriault. Qu'est ce qu'on a pu rigoler dans le laboratoire 2073, tous les membres qui l'ont composé et que j'ai pu côtoyer durant ces années, vous

avez fait de mon environnement de travail un lieu où se marient parfaitement discussions scientifiques de qualité et fous rires anthologiques. Je vais vous remercier un par un (vous le méritez bien).

Merci à toi Nadine, notre ingénieure chérie et, comme disait Thomas Daniele, notre deuxième maman à tous. Tu es la bienveillance incarnée, toujours là pour rendre service et reconforter dans les durs moments de la vie d'une thésarde. Merci de m'avoir aidée au dernier moment à faire les dernières souches (et de les avoir toutes congelées, rien que pour ça tu garderas une place dans mon cœur à vie tellement je déteste les congélations). Tu es à « une thèse » du départ à la retraite, je me demande à quoi ressemblera le labo sans toi. Reste comme tu es, je ne te souhaite que de bonnes choses pour ces dernières années au sein de l'IGBMC.

Arnaud, la qualité de ton travail scientifique est inversement proportionnelle à ton sens du sérieux. Tu es un excellent post-doc, mais plus que tes innombrables qualités de biologiste/biochimiste, tu m'as toujours impressionnée par le débit vertigineux de débilités par minute que tu maintenais chaque jour au même niveau, tel un champion toutes catégories de la vanne, toujours au top du n'importe quoi. Merci pour tout ce que tu m'as appris à la paillasse, j'ai été formée par le roi du clonage. Mi malgache, mi manceaux, tu es unique Arnaud. Je doute fort que je retrouverai un jour un collègue aussi fou et capable de me faire éclater de rire après une journée où toutes mes expériences ont pu réduire à néant mes hypothèses scientifiques. Te voilà expatrié en Australie, profite bien du paysage (et du salaire de chercheur la bas, veinard, n'y prend pas trop goût si tu comptes revenir ici). J'espère qu'on se recroisera, tu vas me manquer.

Thomas, 1^{er} du nom, le thésard maudit, tu es l'exemple de l'abnégation dont doit faire preuve un doctorant : travail acharné et organisé, tu dis toujours que tu n'as pas eu beaucoup de chance dans tes projets, mais au final tu vas publier très prochainement (tu vois que tu n'avais pas *rien*). Quand tu es parti du labo, j'ai pris ta paillasse (ce qui n'a pas toujours été bon pour ma productivité vu qu'elle se situe en face de celle d'Arnaud), j'ai essayé de m'imprégner de tes ondes positives, de ta bonne humeur. On a bien rigolé, j'ai adopté définitivement et sans m'en rendre compte, certaines de tes fameuses punchlines (que je ne révélerai pas ici pour des raisons de bienséance). En plein post-

doctorat, j'espère que ton nouveau sujet te sourit. Bonne chance à toi pour la suite de ta carrière dans la recherche académique.

Steven, je pourrais être tentée de te remercier en français vu que tu as passé 6 ans à Strasbourg, mais je sais que tu es retourné en Australie et que tu as dû oublier l'énorme liste d'une dizaine de mots Français que, je dois bien avouer, tu savais maîtriser sur le bout des doigts à la fin. You are the definition of an hard worker, you were always at the lab before me and way more after I left, even when I came the Sunday, you were still here, working like hell every day ! You deserved to become a young PI, all the best for your new lab. Thanks for your patience and all the very high quality scientific discussions. Take care of Arnaud !

Christelle, ma prof de fac préférée, je ne t'ai jamais eu en cours (et c'est peut-être pour ça d'ailleurs que je t'apprécie, haha). Ton humour est sans limite, je sais que je peux oser les vannes les plus sordides avec toi sans honte ni crainte du jugement, et ça fait du bien. Tu es connue pour ta franchise, c'est ce que j'aime chez toi (même si tu as toujours été sympa avec moi en fait). Toujours de bonnes idées en labmeeting, une chercheuse comme on en fait plus beaucoup. Toi aussi tu as bravé la thèse en même temps que l'apprentissage de la maternité... sauf que toi tu as eu un *Nature* en prime (oui bon ça va), quelle classe. Merci pour tout !

Cécile, tu viens à bout de ta deuxième année de thèse, je sais que la pression monte et je te souhaite le meilleur pour finir ce doctorat en beauté. Merci pour ta bonne humeur (très funky :), ta disponibilité et les nombreux petits services rendus, ainsi que pour mon cholestérol très certainement monté en flèche depuis que tu es arrivée dans le labo avec tes gâteaux, chocolats et autres cochonneries toujours à disposition (PS : je t'ai piqué une boîte de chocolats avant de partir pour Vincent Bertrand).

Eria-Sarah, I have no doubt that you will continue to study my dear *lin-15A* with success. You are incredibly organised, naturally curious and always positive, it is a pleasure to work with you. It is always heart breaking when you finish your PhD without publishing your work, but I fully trust you to finish beautifully the story. Thanks for your patience, scientific and unscientific discussions, for your help to score blindly some

strains when I was in doubt about my results. All the best for the next years in the lab.

Merci à tous les nouveaux membres du labo (que je ne connais pas tous très bien). Bonne chance à toi nouveau Thomas, je crois déceler en toi un thésard très motivé (et digne successeur d'Arnaud sur bien des points :). Sarah, la technicienne qui ne compte pas ses heures, toujours la soif d'apprendre d'avantage, tu iras loin, merci pour toutes nos discussions (et pour les dernières injections). Merci aux étudiants avec qui j'ai pu travailler, Arnaud junior et Safak, je ne vous ai pas toujours ménagés mais vous avez su rester forts. Merci à Holy pour la qualité de ton travail, jamais une contamination dans tes boites ou tes milieux, quelle perle ! Merci aussi pour ton sourire, toujours de bonne humeur.

Merci aussi à nos anciens voisins *C. elegantistes*, l'équipe de Michel Labouesse avec qui nous partagions nos labmeeting et nos idées : Merci à Michel, Nael, Ambre, Sophie Q, David, Vincent, Thahn, Shashi, Saurabh, Xinyi, pour tout ce que vous avez pu m'apporter durant ma thèse.

Je remercie également l'état français, merci de m'avoir donné une bourse aux plus hauts échelons toute ma scolarité pour m'aider à accomplir ce doctorat. C'est une chance d'avoir la possibilité de faire de longues études sans commencer sa carrière endettée. Merci à la Fondation pour la recherche médicale qui m'a fait confiance et accordé les financements pour cette 4^{ème} année de doctorat.

Quand on fait une thèse, on a aussi besoin d'être épaulé en dehors du labo, et je dois dire que j'ai été bien entourée.

Merci à ma belle-famille, Noémie et Martin, Sylvain et Catherine pour avoir pris soin de ma douce progéniture quand il fallait que je termine la rédaction de ma thèse. Valérie et Etienne, merci pour votre soutien, d'être venus chez nous garder votre petit fils pendant que je montais chez vous écrire tranquillement au milieu des bois (sans réseau, sans bruit, j'avais l'impression d'être un écrivain maudit inspiré par la beauté du paysage).

Merci mille fois à ma mère pour son soutien sans faille depuis toujours. Tu m'as toujours encouragée dans tous mes choix, tu as toujours su trouver du temps pour m'entendre me plaindre de mes résultats de thèse. Tu es venue depuis tes contrées lointaines pour nous aider à prendre soin de ton petit fils dans les moments où la fatigue avait eu raison de Jo et moi mais qu'il fallait que je continue à écrire. Merci d'avoir relu ma thèse et pris le temps de corriger les fautes d'orthographe d'un manuscrit qui doit être incroyablement ennuyeux pour les non-initiés au jargon, tu assures, comme toujours. Tu as été la mère parfaite pour moi, si j'ai su croire assez en moi pour faire de la biologie après un bac en économie, c'est grâce à toi. Merci aussi à toi Norbert, entre deux vanes, tu m'as toujours fait part de tes encouragements, merci pour ta bienveillance (je sais que tu es une main de velours dans un gant de fer :)

Je n'aurais jamais les mots pour remercier à leur juste valeur mes grands-parents Lucette et Maurice, pour tout leur soutien (affectif et financier, faut bien le dire), grâce à vous, j'ai pu me concentrer sur mes études sans avoir à trop travailler en parallèle durant l'année universitaire. Quelle chance j'ai eu de vous avoir à mes côtés, j'espère que de là où vous êtes, vous êtes fiers de votre petite fille, cette thèse vous est dédiée.

Enfin, the last, but not least, comme on dit, un énorme MERCI à toi, mon cher Jonathan. Je t'ai rencontré la semaine où j'ai commencé ma thèse, tu as vécu avec moi toute cette aventure. Je sais que ce n'est pas toujours facile de vivre avec une thésarde stressée, et pourtant tu m'as épaulé à chaque coup dur, tu as toujours su me remonter le moral (si si) quand les expériences s'avéraient contrariantes. Merci d'avoir TOUT géré durant l'écriture de ma thèse, les courses, l'intendance, les couches, les biberons, je n'aurai jamais pu y arriver sans toi. Merci pour tout ce que tu es.

RÉSUMÉ

Le développement d'organismes multicellulaires est un processus complexe où la spécialisation des cellules est finement régulée par l'activation de programmes spécifiques, gérés par de nombreux acteurs de différenciation. Pendant longtemps les scientifiques ont pensé que l'état différencié des cellules était immuable. Un nombre considérable de travaux a démontré depuis que des cellules somatiques différenciées pouvaient être reprogrammées et adopter un destin cellulaire très différent (spécialisé ou pluripotent), ceci prouvant que l'état différencié n'est pas irréversible. Le programme d'identité cellulaire reste modulable et connaître les acteurs et mécanismes qui contrôlent le maintien de l'identité cellulaire et les processus de reprogrammation (un enjeu majeur pour la survie des organismes multicellulaires) est un objectif scientifique fascinant. De plus, les récents travaux sur la manipulation de l'identité cellulaire suscitent un fantastique espoir afin de pouvoir un jour remplacer nos cellules dégénérantes ou lésées.

Notre laboratoire étudie le changement d'identité (ou transdifférenciation, TD) naturel d'une cellule rectale (nommée Y) en motoneurone (nommé PDA) chez *Caenorhabditis elegans*. Ce ver offre un excellent modèle génétique pour étudier à l'échelle d'une cellule les processus de contrôle de cette TD 100% efficace et sûre pour l'organisme. Je me suis intéressée lors de ma thèse à des mutants qui favorisaient ou au contraire bloquaient ce changement d'identité. Mes résultats, via l'étude d'un facteur nécessaire pour l'initiation de la TD, m'ont conduite à faire le lien entre maintenance de l'identité cellulaire et influence de la nourriture chez le ver.

I) LIN-15A : une protéine nucléaire requise pour l'initiation de la reprogrammation de Y

J'ai cloné le mutant *lin-15A*, isolé dans un crible génétique du laboratoire, dans lequel la cellule Y n'initie pas sa reprogrammation et demeure une cellule rectale dans

environ 50% des vers mutés. LIN-15A, dont la fonction est inconnue, possède un domaine THAP conservé à doigt de zinc CC-CH. J'ai montré que LIN-15A est nucléaire et que le domaine THAP est nécessaire à son action. J'ai également montré que l'activité de *lin-15A* est nécessaire dans la cellule Y pour sa transdifférenciation. Finalement, nous avons découvert que LIN-15A lie l'ADN (collaboration avec R. Margueron, Paris). Il est donc possible que *lin-15A* module, directement ou non, la transcription.

L'activité de LIN-15A est indispensable au moment de l'initiation. La protéine LIN-15A n'est pas exprimée dans Y aux premiers moments de la vie de la cellule (Il y a bien une activation de la transcription de son promoteur, mais un mécanisme de régulation post transcriptionnel régule sa production). Son expression commence dans le noyau des cellules rectales juste avant l'éclosion du ver, et cette expression nucléaire perdure jusqu'à la reprogrammation de Y. Le défaut de transformation de Y en PDA dans le mutant *lin-15A* peut être sauvé suite à l'induction d'une expression de LIN-15A(+) ectopique au moment de l'initiation du processus. Une fois cette fenêtre de temps passée, la reprogrammation ne peut plus être relancée : ceci confirme le rôle déterminant de ce facteur dans le bon déroulement des premières étapes de la TD de Y en PDA et détermine la fenêtre de temps dans laquelle son activité est nécessaire, juste avant l'initiation de la transdifférenciation.

II) LIN-15A permet de lever un verrou pour initier la reprogrammation - ce verrou implique la voie du rétinoblastome (RB) et d'autres gènes essentiels pour le maintien de l'identité cellulaire.

lin-15A reste un gène méconnu : il y a peu d'études sur sa fonction et ses partenaires. *lin-15A* appartient à la famille des synMuv A. Cette classe de gènes joue un rôle dans la différenciation de la vulve chez *C. elegans*; son action est redondante avec un groupe de gènes appartenant à la famille des synMuv B. Seule l'inactivation d'un gène dans chacun des deux groupes entraîne un défaut de spécification des cellules progénitrices vulvaires (le ver présente alors plusieurs vulves).

Etant les seuls partenaires génétiques connus de *lin-15A*, nous avons donc testé l'action de ces gènes synMuv B dans la reprogrammation de Y en PDA. Une mutation

seule d'un gène synMuv B n'a aucun effet sur la TD de notre cellule rectale. Par contre, la mutation de certains synMuv B dans un fond génétique mutant pour *lin-15A* va réduire partiellement ou quasiment totalement le défaut de TD observé chez un mutant *lin-15A* seul, montrant une fonction antagoniste. Nos résultats suggèrent que ces gènes synMuv B bloquent la TD de Y en PDA. LIN-15A est nécessaire pour lever ce frein et assurer l'initiation de la TD; par contre, en l'absence de ce frein, LIN-15A devient dispensable.

Il est intéressant d'observer qu'une partie seulement des synMuv B a ce rôle « suppresseur de défaut » dans le mutant *lin-15A* : *lin-15B*, *lin-35/RB*, *lin-13*, *lin-9*, *hpl-2/HPL1*, *lin-37* et *lin-61*. Les gènes synMuv B ont des fonctions très diverses (modificateurs d'histone, remodeleurs de la chromatine, facteurs de transcription, voie de l'ubiquitine, voies des ARN interférents, etc.). Le point commun du petit groupe « suppresseur du défaut *lin-15A* » semble lié à la maintenance de l'identité cellulaire des cellules intestinales.

Les synMuv B les plus efficaces pour réduire la pénétrance du défaut de PDA dans le mutant *lin-15A* sont liés, plus ou moins directement, à la voie du rétinoblastome (RB) : *lin-35/RB*, *lin-13*, *lin-9* et *hpl-2/HPL1* et *lin-15B*.

Un rôle de la protéine RB comme un gardien de l'identité cellulaire pourrait être conservé. Par exemple, après avoir été endommagée, la régénération de la lentille chez la salamandre passe par une reprogrammation directe naturelle. Les cellules épithéliales pigmentées de l'iris vont proliférer, et se transdifférencier en cellules de la lentille. Si RB n'est pas inactivée, cette reprogrammation est très largement perturbée (TSONIS *et al.* 2004). L'inactivation de la voie RB (en association avec l'inactivation de la voie hippo) induit également la dédifférenciation de cellules spécialisées dans l'œil de la drosophile, les photorécepteurs ne parviennent pas à maintenir leur identité neuronale (NICOLAY *et al.* 2010). Ces études suggèrent que la voie RB joue un rôle dans le maintien de l'identité cellulaire, un verrou qu'il faut parfois contourner pour pouvoir reprogrammer une cellule adulte différenciée.

Dans la littérature, j'ai pu observer que tous les mutants suppresseurs de défaut de *lin-15A* présentaient une dérive de l'identité des cellules intestinales. En effet, dans les mutants *lin-15B*, *lin-35/RB*, *lin-13*, *lin-9*, *hpl-2/HPL1*, *lin-37* et *lin-61*, une expression

ectopique de gènes de la lignée germinale a pu être décrite dans l'intestin (PETRELLA *et al.* 2011; LUJAN *et al.* 2012). En condition de température élevée pour les vers (25°C), cette expression ectopique est accrue et perturbe tant l'identité des cellules intestinales que les vers ne parviennent plus à assimiler la nourriture: les vers entrent en diapause au 1er stade larvaire (L1) en conséquence de cet état de jeûne.

III/ Lien entre maintien de l'identité cellulaire et condition de jeûne entraînant une diapause chez *C. elegans*.

Il existe un lien entre absence de nourriture et reprogrammation de l'identité des cellules somatiques (notamment les cellules intestinales). Certains mutants de voies de réponse au jeûne chez le ver présentent également une perte du maintien de l'identité des cellules intestinales. Une mutation du gène *daf-2* mime une absence de nourriture et une entrée en diapause au stade appelé dauer (stade de résistance aux conditions défavorables après le 2ème stade larvaire). L'identité intestinale des cellules du tube digestif de ce mutant est perturbée de la même manière que dans les mutants SynMuv B décrits dans le paragraphe précédent : des gènes de la lignée germinale sont surexprimés (CURRAN *et al.* 2009). Il apparaît que dans les deux cas, le maintien de l'identité de cellules somatiques ne soit plus assuré.

De façon très intéressante, nous avons pu observer que les vers mutants *lin-15A* présentent une pénétrance du défaut de PDA bien plus faible une fois privés de nourriture. En effet, provoquer un état de jeûne à deux stades différents (L1 ou dauer) entraîne une réduction quasi totale du défaut de PDA observé dans le mutant *lin-15A* seul. La littérature nous laisse supposer que ces diapauses entraînent une perte du maintien de l'identité cellulaire, ce qui pourrait permettre à Y d'enclencher sa reprogrammation malgré l'absence de *lin-15A*, gène clé à la levée du verrou pour initier la TD.

Nous avons alors examiné la relation entre condition de jeûne, voie moléculaire sous-jacente et suppression du défaut de transdifférenciation de *lin-15A*. La première intuition a été de tester la voie de l'insuline (activé par le récepteur *daf-2*). En état de famine, le récepteur *daf-2* n'est plus couplé à l'insuline, et s'ensuit une cascade

moléculaire entraînant le passage de *daf-16*/FOXO dans le noyau. Cette translocation de *daf-16*/FOXO induit l'état de diapause, ainsi que l'expression d'un gène de différenciation germinale (*pie-1*) dans les cellules intestinales (CURRAN *et al.* 2009).

A notre grande surprise, *daf-16*/FOXO, le principal effecteur de la voie de l'insuline et de la réponse à l'absence de nourriture, ne joue pas de rôle dans la reprogrammation de Y en PDA. Forcer l'entrée en dauer ou priver les doubles mutants *lin-15A ; daf-16*/FOXO de nourriture en L1 entraîne la même réduction de défaut de PDA que dans les mutants *lin-15A* seuls. Ces résultats suggèrent que le signal permettant de relancer la TD de Y dans un mutant *lin-15A* ne passe pas par *daf-16*/FOXO.

De la même manière, un triple mutant *lin-15A, lin-13; daf-16*/FOXO présente la même suppression de défaut de PDA que dans le double mutant *lin-15A, lin-13*. Ce résultat nous confirme que la levée du maintien de l'identité cellulaire (soit par l'absence de nourriture, soit par la mutation de gènes SynMuv B suppresseurs du phénotype de *lin-15A*) ne passe pas par une action de *daf-16*/FOXO.

En résumé, mes résultats ont montré que la transdifférenciation d'une cellule dépendait d'une clé moléculaire, LIN-15A, nécessaire pour lever un verrou de maintien de l'identité cellulaire dans la cellule qui va changer d'identité, et ce précisément juste avant la conversion cellulaire de Y en PDA. De façon plus générale, mes travaux ouvrent la possibilité que l'état physiologique et métabolique du ver influe sur le maintien de l'identité cellulaire. Sur le long terme, il conviendra alors de déterminer par quel biais cet état est perçu, dans quelles cellules, et comment cette information est relayée ou captée par la cellule Y, pour finalement influencer sa plasticité.

SOMMAIRE

Liste des abréviations	p 16
Liste des figures et tableaux	p 18
<u>INTRODUCTION</u>	p 21
<u>I/ HISTORIQUE : les grandes découvertes liées à la plasticité cellulaire</u>	p 23
1) Définitions	p 23
2) Une cellule spécialisée est-elle définitivement figée dans son destin cellulaire ?	p 26
2.1) Des dogmes scientifiques discutés depuis plus d'un siècle	p 26
• La différenciation irréversible des cellules somatiques : une théorie longtemps prédominante	p 26
• Une vision très hiérarchisée du développement toujours en vigueur	p 28
2.2) Une cellule différenciée peut redevenir totipotente : la preuve par le transfert de noyaux de cellules somatiques	p 30
2.3) La fusion de cellules : les traits dominants	p 33
2.4) La 5'azacytidine : une drogue capable d'opérer un changement d'identité cellulaire direct	p 35
3) La découverte des acteurs de l'identité cellulaire	p 35
3.1) L'opéron lactose : la mise en évidence de la modulation de l'expression des gènes	p 35
3.2) Les facteurs de transcription : acteurs clés de la différenciation cellulaire	p 36
3.3) La structure de la chromatine : élément clé de l'expression différentielle des gènes	p 39
<u>II/ Les reprogrammations induites</u>	p 42
1) Les cellules Souches Pluripotentes Induites (IPS)	p 42
2) La controverse liée aux reprogrammations directes	p 45
3) Les reprogrammations directes induites chez l'homme et la souris	p 48
3.1) Les facteurs de reprogrammation	p 48
• Les facteurs remodeleurs de la chromatine	p 54
• Les microARNs	p 55
• Les petites molécules	p 56

3.2) Les outils utilisés pour l'expression des facteurs de reprogrammation	p 57
3.3) Évaluation de l'identité finale après reprogrammation induite	p 57
4) Les reprogrammations induites chez <i>Caenorhabditis elegans</i>	p 62
<u>III/ Les transdifférenciations naturelles</u>	p 64
1) Les transdifférenciations naturelles au cours du développement	p 65
2) Les transdifférenciations naturelles durant une régénération	p 69
3) Les transdifférenciations naturelles d'adaptation à l'environnement	p 71
<u>IV/ les mécanismes qui assurent la reprogrammation et le maintien de l'identité cellulaire</u>	p 72
1) Les mécanismes des reprogrammations induites	p 72
2) Le rôle des facteurs de transcription dans le maintien de l'identité cellulaire	p 75
2.1) Des modèles simples, mais instables	p 75
2.2) Les modèles stables : réseaux de facteurs de transcription complexes et redondance des facteurs de différenciation	p 77
3) Rôle des remodeleurs de la chromatine dans la robustesse de l'identité cellulaire	p 81
3.1) La répression, l'activation et le maintien des programmes d'identité par les modifications d'histones	p 82
3.2) Des remodeleurs de la chromatine jouent des rôles clés dans la décision pluripotente/ différenciation	p 83
3.3) L'état de la chromatine et la robustesse de l'identité cellulaire lors de changements environnementaux	p 84
4) Etudier les mécanismes de la reprogrammation cellulaire : les limites de certains modèles	p 86
<u>V/ Etude d'un modèle de reprogrammation naturelle chez <i>C. elegans</i></u>	p 87
1) <i>C. elegans</i> : un animal modèle présentant de nombreux avantages	p 87
2) La transdifférenciation naturelle épithélio-neurale chez <i>C. elegans</i>	p 89
2.1) Description du modèle	p 89
2.2) La découverte de facteurs clés de cette transdifférenciation	p 90
2.3) Un processus passant par plusieurs étapes discrètes	p 92
2.4) Objectifs initiaux de ma thèse : identifier de nouveaux facteurs impliqués dans la conversion de Y en PDA	p 94

<u>MATÉRIELS ET METHODES</u>	p 96
<u>I/ Nomenclature chez <i>C.elegans</i></u>	p 97
<u>II/ Maintenance de <i>C. elegans</i>, souches et allèles</u>	p 97
<u>III/ Construits (plasmides)</u>	p 100
<u>IV/ Préparations des souches pour séquençage haut débit</u>	p 101
• Stratégie du « Deep mapping »	p 101
• Stratégies de backcross	p 102
• Préparation d'ADN génomique	p 103
<u>V/ Identification du mutant <i>hlh-16(fp12)</i></u>	p 104
• Localisation de <i>E(fp12)</i> sur le chromosome I	p 104
• Cartographie des SNP sur le chromosome I	p 104
• Test de complémentation <i>ceh-6(mg60)/E(fp12)</i>	p 105
<u>VI/ ARNi</u>	p 105
<u>VII/ Expériences de chocs thermiques</u>	p 106
• Induction de l'expression de <i>lin-15A</i> au milieu de l'embryogénèse	p 106
• Induction de l'expression de <i>lin-15A</i> au stade L1 précoce	p 106
• Induction de l'expression de <i>lin-15A</i> au stade L2	p 107
• Induction de l'expression de <i>lin-15A</i> au stade L3	p 107
<u>VIII/ Immunolocalisations</u>	p 108
<u>IX/ Production des phéromones dauer</u>	p 108
• Culture liquide de vers dauer	p 108
• Extraction des phéromones	p 109
• Application des phéromones	p 109
<u>X) Co-immunoprécipitation de l'ADN (nu ou enroulé) avec LIN-15A</u>	p 109
<u>XI/ Observations microscopiques</u>	p 109
<u>RÉSULTATS</u>	p 110
<u>I/ Identification des mutants du crible EMS</u>	p 111
1) Caractéristiques des mutants	p 111

2) Les premiers mutants rapidement identifiés (approches candidates)	p 112
3) Identification des mutants par la méthode du « deep mapping »	p 112
3.1) Principe	p 113
3.2) Résultats des séquençages et identification des gènes mutés	p 114
4) Identification du mutant <i>E</i> par l'ancienne méthode de cartographie des polymorphismes nucléotidiques (SNP)	p 117
<u>II/ LIN-15A</u>	p 119
1) Caractérisation du rôle de <i>lin-15A</i> dans la TD de Y en PDA	p 120
1.1) Y demeure épithéliale dans le mutant <i>lin-15A</i>	p 120
1.2) Expression de <i>lin-15A</i> dans Y	p 121
1.3) La fenêtre temporelle d'action de LIN-15A se situe autour de l'initiation de la transdifférenciation de Y	p 123
2) Fonction moléculaire de LIN-15A et importance du domaine THAP-like	p 124
2.1) Le doigt de zinc THAP-like : un domaine clé	p 124
2.2) LIN-15A lie l'ADN	p 125
3) Les partenaires de <i>lin-15A</i> dans la TD de Y en PDA	p 126
3.1) L'inactivation d'autres gènes synMuv A et B n'induit pas de défaut de TD de Y	p 126
3.2) Certains mutants de gènes synMuv B suppriment le défaut de reprogrammation de Y dans le mutant <i>lin-15A</i>	p 128
4) Influence de l'environnement sur la pénétrance du mutant <i>lin-15A</i>	p 131
4.1) L'état de diapause (en L1 ou en dauer) entraîne une suppression du défaut de TD de Y dans le mutant <i>lin-15A</i>	p 131
4.2) Les voies de signalisation activées par le jeûne : quel rôle dans la suppression du défaut de PDA dans le mutant <i>lin-15A</i> ?	p 133
<u>III/ HLH-16</u>	p 138
1) Une expression unique dans Y au sein du rectum	p 139
2) <i>hlh-16</i>, une cible de la voie Notch ?	p 141
3) La découverte de <i>hlh-16</i> fourni un nouvel outil pour isoler la cellule Y	p 142
<u>DISCUSSION</u>	p 145
<u>I/ La fonction de <i>lin-15A</i> dans la reprogrammation de Y</u>	p 146
1) La fonction moléculaire de LIN-15A	p 146

2) Les partenaires directs de LIN-15A	p 149
3) <i>lin-15A</i> : une régulation directe de gènes synMuv B ?	p 150
<u>II/ Le rôle des gènes synMuv B dans l'initiation de la TD</u>	p 151
1) La voie du rétinoblastome (RB) : rôle dans le maintien de l'identité cellulaire	p 151
2) Lien entre la voie RB et l'expression de programmes modulés par l'apport de nourriture	p 154
3) Les gènes synMuv B agissent-ils de façon cellule-autonome dans Y ?	p 157
<u>III/ Le jeûne : induction d'un état de diapause augmentant la plasticité cellulaire ou un stress cellulaire parmi d'autres ?</u>	p 158
<u>IV/ Pourquoi un processus de transdifférenciation complexe pour créer un nouveau neurone ?</u>	p 161
<u>V/ Conclusion</u>	p 163
<u>ANNEXES</u>	p 165
<u>I/ Revue Médecine Science</u>	p 166
<u>II/ Contribution (ZURYN <i>et al.</i> 2014)</u>	p 170
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	p 174

Liste des abréviations

- AC** : (*anchor cell*), cellule Ancre
- ADN** : Acide désoxyribonucléique.
- AMPc** : Adénosine MonoPhosphate cyclique
- ARNc** : Acide RiboNucléique codant
- ARNi** : Acide RiboNucléique interférence
- ARNnc** : Acide RiboNucléique non codant
- bHLH** : (*basic helix-loop-helix*), domaine basique-hélice-boucle-hélice
- C/EBP α** : (*CCAAT-enhancer-binding protein α*) protéine liant la séquence CCAAT, activateur d'expression, de type α
- Cellules NK** : (*Natural Killer Cells*) cellules « tueuses naturelles » de l'immunité innée
- Cellules EC** : (*Embryonic carcinoma*) cellules tératoCarcinome Embryonnaires
- Cellules ES** : (*Embryonic Stem cells*) cellules Souches Embryonnaires
- Cellules IPS** : (*Induced Pluripotent Stem cells*) cellules souches pluripotentes induites
- CM** : cellules mélangées (ou MC : *mixed cells*)
- CMP** : (*common myeloid progenitor*) progéniteur commun à la lignée myéloïde
- CLP** : (*common lymphoid progenitor*) progéniteur commun à la lignée lymphoïde
- DIC** : (*Differential interference contrast*), Microscope à contraste interférentiel différentiel
- Dpy** : Dumpy
- EMS** : ÉthylMéthane Sulfonate
- EPR** : Épithélium Pigmenté Rétinien
- ER** : (*estrogen receptor*), récepteur aux estrogènes
- ESC-iN** : Cellules obtenues après reprogrammation de cellules ES en iN
- ESC-iCM** : Cellules obtenues après reprogrammation de cellules ES en iCM
- FdT** : Facteurs de Transcription
- GATA** : (*GATA Binding Protein*) protéine liant les séquences 5' GATA 3'
- GMP** : (*granulocyte-monocyte progenitor*) progéniteur commun des granulocytes et monocytes
- HAT** : (*histone acetyltransferase*), Histone AcétylTransférase
- HC** : (Heat choc) choc thermique
- HDAC** : (*Histone deacetylases*), Histone DésAcétylases

HSP : (*Heat shock promoter*) promoteur de choc thermique

iCM : (*Induced CardioMyocyt*s), Cardiomyocytes induits

iHSC : (*Induced Haematopoietic Stem Cells*) Cellules Souches Hématopoïétiques induites

iN : (*Induced Neurons*) Neurones induits

iv-iCM : *in vivo* iCM : cardiomyocytes induits directement *in vivo*.

iv-iN : *in vivo* iN : neurones induits directement *in vivo*.

MEP : (*Megakaryocyte-Erythroid Progenitors*) progéniteur commun des mégacaryocytes et des érythrocytes

MicroARN : micro Acide RiboNucléique (=miARN)

NES : (*Nuclear Export Signal*) séquence d'exportation nucléaire

NLS : (*Nuclear Localization Sequence*) Séquence de localisation nucléaire

NuRD : (*Nucleosome Remodelling and Deacetylation*) complexe répresseur par remodelage des nucléosomes et désacétylation d'histones

NODE-like : (*Nanog and Oct4-associated deacetylase*), complexe désacétylases associées à Nanog et Oct4

Pb : Paire de base

qsp : quantité suffisante pour

RB : RétinoBlastome

SNP : (*Single-Nucleotide Polymorphism*) polymorphisme nucléotidique

synMuv : (*synthetic Multivulva*) multivulves synergiques.

TD : transdifférenciation

THAP : (*Thanatos associated protein*) protéines associées aux protéines thanatos

TNS : Transfert de Noyaux Somatiques

Unc : Uncoordinated

UPR : (*Unfolded Protein Response*) réponse au stress induit par l'accumulation de protéines mal repliées

UV : Ultraviolets

VPC : (*Vulva Precursor Cells*), Cellules Précurseurs de la Vulve chez *C.elegans*

WT : (*Wild Type*), phénotype sauvage

ZF : (*zinc finger*), domaine en doigt de zinc

Liste de figures et tableaux

- Figure 1** : Expériences pionnières liées à la plasticité cellulaire (p.28)
- Figure 2** : Une représentation révisée de la différenciation des cellules hématopoïétiques (p.29)
- Figure 3** : Expérience de transfert de noyau intestinal de têtard dans un ovocyte énucléé de xénope (p. 31)
- Figure 4** : Expérience de fusion cellulaire (p.34)
- Figure 5** : La découverte de MyoD (p.37)
- Figure 6** : Le paysage épigénétique de Waddington (p.39)
- Figure 7** : La chromatine décondensée visible sur les chromosomes polytènes (p.40)
- Figure 8** : Les cellules pluripotentes induites (IPS) (p.43)
- Figure 9** : Système CRE-ERT2, un outil de traçage cellulaire (p.47)
- Poster** : Conversions cellulaires directes induites chez la souris (p.53)
- Figure 10** : Analyse transcriptomique de conversions directes ou via des cellules ES (ESC) (p.61)
- Figure 11** : Etablissement du lignage cellulaire chez *C.elegans* durant l'embryogenèse précoce (p.63)
- Figure 12** : Transdifférenciation de cellules veineuses en cellules artérielles durant le développement de l'artère coronaire dans l'embryon de souris (p.66)
- Figure 13** : Reprogrammation directe des « cellules mélangées » (CM) aux frontières segmentaires lors de la fermeture dorsale chez l'embryon de drosophile (p.67)
- Figure 14** : Mécanismes sous-tendant la reprogrammation d'astrocytes en neurones (iN) (p.74)
- Figure 15** : Maintenance de l'identité cellulaire, les modèles simples de régulation par des facteurs de transcription (FdT) (p.76)
- Figure 16** : Maintenance de l'identité cellulaire, les modèles complexes et stables de régulation par des facteurs de transcription (FdT) (p.79)
- Figure 17** : Redondance des gènes *synMuv A* et *synMuv B* dans l'acquisition du destin vulvaire chez *C.elegans* (p.80)
- Figure 18** : Cycle de vie de *Caenorhabditis elegans* (p.88)
- Figure 19** : Transdifférenciation de Y en PDA chez *C.elegans* (p.90)

Figure 20 : Les différentes classes de mutants où la reprogrammation de Y n'a pas abouti (p.91)

Figure 21 : Les étapes de la TD de Y en PDA et les différents acteurs clés associés (p.94)

Figure 22 : Schéma illustrant le principe du deep mapping (p.113)

Figure 23 : Stratégies de Backcross (p.114)

Figure 24 : Localisation des mutations homozygotes après backcross des mutants *M* et *O* (p.115)

Figure 25 : Pénétrance du défaut de PDA dans les différents allèles de *lin-15A* (p.116)

Figure 26 : Cartographie par les SNP de la région contenant E(fp12) sur le chromosome I (p.117)

Figure 27: Immunolocalisation de la protéine AJM (marqueur épithélial) dans Y (p.120)

Figure 28 : Profils d'expression de LIN-15A à différents moments du processus de TD de Y (p.122)

Figure 29 : Expression ectopique de LIN-15A à différents moments du processus de TD de Y (p. 124)

Figure 30 : Des mutations dans le domaine THAP-like de LIN-15A entraînent un défaut de reprogrammation de Y (p.125)

Figure 31 : Co-immunoprécipitation de l'ADN (nu ou enroulé) avec LIN-15A. (p.126)

Figure 32 : Doubles mutants *lin-15A(n767)*, *synMuv A* ou *B*, *syIs63* : effet sur la pénétrance du défaut de PDA. (p128)

Figure 33 : Lien entre les *synMuv B* suppresseurs de défaut (p.130)

Figure 34 : Le passage par un état de diapause (dauer ou L1 prolongé) réduit fortement le défaut de reprogrammation de Y dans le mutant *lin-15A* (p.132)

Figure 35 : La mutation de *daf-16* ne modifie pas la suppression du défaut de PDA dans le mutant *lin-15A* via le jeûne (L1 ou dauer) ou via la mutation de gènes *synMuv B* (p.137)

Figure 36 : Expression des rapporteurs traductionnels et transcriptionnels de *hlh-16* (p.140)

Figure 37 : Expression de *hlh-16* avec le site lag-1 muté dans son promoteur (p.142)

Figure 38 : Stratégie d'isolement de la cellule Y par cytométrie de flux (p.144)

Figure 39 : Modèle (p.164)

Tableau 1 : Conversions cellulaires directes induites chez la souris (p.41)

Tableau 2 : Conversions cellulaires directes induites chez l'homme (p.51)

Tableau 3 : Souches utilisées (p.98)

Tableau 4 : Plasmides utilisés (partie résultats) (p. 100)

Tableau 5 : Constructions évoquées dans la discussion (p.100)

Tableau 6 : Caractéristiques phénotypiques des onze mutants du crible EMS (p.111)

Tableau 7 : Détails des mutations identifiées dans les onze mutants du crible EMS (p.119)

Tableau 8 : Inactivation des gènes synMuv A et synMuv B : influence sur la TD de Y en PDA (p.127)

INTRODUCTION

INTRODUCTION

L'année où je suis entrée en licence de biologie avec la ferme intention de tout savoir sur les cellules souches embryonnaires, Yamanaka et Takahashi démontraient qu'une cellule différenciée avait le potentiel de redevenir pluripotente par l'expression de seulement quatre facteurs (TAKAHASHI and YAMANAKA 2006). Comme bien des scientifiques depuis des siècles, j'étais fascinée par le fait qu'une seule cellule puisse être à l'origine des êtres complexes que nous sommes. Nous avons cette année-là la confirmation que le potentiel cellulaire est en réalité bien plus grand que nous ne l'imaginions, et que chacune de nos cellules possède une plasticité qu'il suffit de réveiller pour manipuler leurs destins, leurs identités. Il a fallu de nombreuses années de questionnements, d'hypothèses, d'expérimentations pour enfin obtenir cette affirmation : au cours du développement des organismes vivants (et de la régénération de leurs tissus), l'identité cellulaire ne se fige pas au rythme des divisions et différenciations, elle reste modulable.

Cette vision d'une identité cellulaire non figée n'était pourtant pas l'hypothèse la plus évidente au XX^{ème} siècle. La potentielle plasticité des cellules adultes est un fait scientifique aujourd'hui indiscutable mais longtemps débattue tout au long du siècle dernier. Dans cette première partie historique de l'introduction, je reviendrai sur les grandes questions, relatives à la plasticité cellulaire, résolues au fil de décennies d'expériences, de débats et de bouleversement de dogmes scientifiques.

La découverte des facteurs modulant l'identité cellulaire et des premiers facteurs de reprogrammation (dès la fin des années 80) a mené à la manipulation du destin des cellules. Nous reviendrons dans la partie II sur la découverte des facteurs de pluripotence de Yamanaka (et ses fameuses cellules souches pluripotentes induites), pour se pencher plus longuement sur les conversions cellulaires directes induites dans différents modèles animaux (*in vivo* et *in vitro*). Manipuler l'identité des cellules est naturellement source d'espoir en médecine régénérative. Pouvoir recréer des cellules, tissus ou organes lésés est une perspective prometteuse pour bon nombre de maladies dégénératives, de pathologies liées à la mort de nos cellules. Au delà de ces applications

prometteuses, comprendre les mécanismes qui régissent la différenciation cellulaire et le maintien de l'identité de nos cellules est en soi un objectif scientifique fascinant, d'un point de vue purement fondamental. Pour de potentielles futures applications thérapeutiques, manipuler l'identité de nos cellules nécessite leur conversion complète et sûre. Dans la partie III, nous nous pencherons sur des reprogrammations directes, stables, invariantes et extrêmement bien contrôlées *in vivo* puisque parfaites par de nombreuses années d'évolution : les conversions cellulaires directes naturelles.

Les nombreuses publications décrivant les cocktails de facteurs nécessaires pour induire une identité cellulaire n'étudient que trop peu souvent les détails des rouages de ces reprogrammations. Nous développerons dans la partie IV les mécanismes et acteurs moléculaires de certaines de ces reprogrammations induites et les mécanismes du maintien de l'identité cellulaire. Nous verrons aussi que certains modèles animaux présentent des limites techniques pour étudier ces mécanismes (*in vivo* comme *in vitro*) et que le nématode *Caenorhabditis elegans* est un modèle puissant pour l'étude de la plasticité cellulaire dans un contexte physiologique. La partie V décrira les nombreux avantages de ce petit nématode et introduira le modèle de transdifférenciation étudiée chez *C. elegans* au sein du laboratoire de Sophie Jarriault. Enfin, cette introduction se terminera sur les objectifs de ma thèse pour mieux comprendre ce processus fascinant.

[I/ HISTORIQUE : les grandes découvertes liées à la plasticité cellulaire](#)

1) Définitions

Nous verrons dans l'introduction que ce champ de recherche a connu des revirements de dogmes et de concepts. La terminologie décrivant les événements de plasticité cellulaire n'est pas absolument établie pour tous les termes et peut différer d'un expert à l'autre. Avant toutes choses, il est important de bien définir les termes utilisés dans ce manuscrit. Certaines définitions ci-dessous font l'objet de controverses, j'ai choisi d'utiliser les définitions les plus largement acceptées par la communauté scientifique, il se peut que certaines soient précisées ou modifiées dans le futur.

La plasticité d'une cellule est définie par sa capacité à changer d'identité. **Le potentiel cellulaire** correspond à la possibilité d'une cellule de pouvoir se différencier en un autre type cellulaire (peu importe quel type et par quels mécanismes). Une cellule peut subir une **reprogrammation cellulaire**, c'est à dire un changement d'expression des gènes d'un type cellulaire amenant à la transformation de la cellule en un autre type distinct (GURDON and MELTON 2008). Cette reprogrammation peut amener la cellule à se **dédifférencier**, c'est à dire revenir à un état moins différencié. Par exemple, la reprogrammation de cellules fibroblastiques en cellules souches pluripotentes induites (IPS, décrites plus tard dans l'introduction) est une dédifférenciation (TAKAHASHI and YAMANAKA 2006) (Attention, une dédifférenciation n'est pas forcément synonyme de gain de potentiel cellulaire). La **reprogrammation cellulaire directe** (ou **conversion directe**, ou **transdifférenciation**) décrit le changement d'identité d'une cellule déjà engagée dans un destin cellulaire (une cellule souche déjà engagée/un progéniteur ou une cellule spécialisée) en un autre type cellulaire distinct (lui aussi non pluripotent). Cette définition d'une reprogrammation décrite comme « directe » ne comporte pas de descriptif des mécanismes sous-tendant ce changement d'identité. Cette reprogrammation peut donc passer par des divisions cellulaires ou pas, ainsi que par des états intermédiaires différents (souvent inconnus) du type cellulaire initial ou final.

Le terme « **cellule souche** » apparaît au XIX^{ème} siècle, le biologiste Allemand German Haeckel (1834-1919) utilise ce terme pour désigner la première cellule œuf qui deviendra un organisme (HAECKEL 1873). William Sedgwick (1855-1921) désigne également comme cellules souches les parties de la plante qui peuvent se régénérer (SEDGWICK and WILSON 1886). Aujourd'hui, la cellule souche est définie comme une « cellule qui peut générer de manière continue des cellules filles invariablement identiques à elle-même et, en parallèle, génère d'autres cellules filles qui ont des propriétés différentes et plus restreintes. » (EUROSTEMCELL)

Durant le développement et la régénération de nos tissus, le degré de différenciation d'une cellule est classé en différentes catégories hiérarchisées (du moins spécialisé au plus différencié) :

Cellules totipotentes : ce sont les toutes premières cellules constituées après la formation de la cellule œuf (juste après la fécondation, chez les organismes pluricellulaires), elles sont par définition totalement indifférenciées puisqu'elles peuvent donner naissance aux annexes embryonnaires ainsi qu'aux cellules qui composeront l'organisme entier (par exemple, dans l'embryon de souris, les cellules de l'embryon sont totipotentes avant le stade 8 cellules)(SMITH 2006).

Cellules pluripotentes : cellules indifférenciées à l'origine de toutes les cellules d'un organisme (hors tissus extra-embryonnaires). Une cellule est dite pluripotente si elle peut donner naissance aux trois types de feuillet embryonnaires (endoderme, ectoderme et mésoderme) (RATAJCZAK *et al.* 2012), c'est le cas des cellules souches embryonnaires ainsi que des cellules IPS.

Cellules multipotentes : cellules pouvant produire plus d'un type de cellules spécialisées d'un organisme (mais pas tous les types) appartenant à un ou plusieurs types de tissus. Par exemple, les cellules souches mésenchymateuses peuvent permettre la régénération de plusieurs tissus, comme les os, le cartilage, les muscles, les ligaments ou les tendons (CHAMBERLAIN *et al.* 2007).

Cellules oligopotentes : cellules produisant plusieurs types cellulaires au sein d'un tissu particulier. Par exemple, lors de la différenciation hématopoïétique, les cellules CMP (*Common Myeloid Progenitor*) sont oligopotentes puisqu'elles sont à l'origine de tous les types de cellules myéloïdes (mégacaryocytes, érythrocytes, granulocytes, macrophages) (AKASHI *et al.* 2000)

Cellules unipotentes : ces cellules ne peuvent se différencier qu'en un seul type cellulaire. Les cellules satellites des muscles squelettiques ne se différencient qu'en cellules musculaires (COSTAMAGNA *et al.* 2015).

Cellules progénitrices : ces cellules peuvent se différencier en un seul ou plusieurs types cellulaires. La distinction de ce type cellulaire avec des cellules souches multipotentes, oligopotentes ou unipotentes, est parfois floue et la confusion est fréquente dans de nombreuses publications. Les cellules souches ont la capacité de s'auto-renouveler un nombre illimité de fois alors que les progéniteurs non pas cette capacité. Par exemple, chez la souris, dans la couche cellulaire sub-granulaire de l'hippocampe, deux types de progéniteurs existent : le premier génère exclusivement des cellules filles neuronales, l'autre des cellules filles gliales, ces deux progéniteurs possèdent une capacité d'auto-renouvellement quasiment nulle. Des cellules du tissu

sous-épendymaire autour de l'hippocampe ont été décrites pour donner naissance à des neurones, des astrocytes et des oligodendrocytes, ces cellules présentent une grande capacité d'auto-renouvellement et sont donc des cellules souches et non des progéniteurs (SEABERG and VAN DER KOOY 2003).

Cellules différenciées : cellules spécialisées assurant une fonction spécifique. Issues de cellules souches ou de progéniteurs (ou par transdifférenciation d'autres cellules différenciées), ces cellules sont au bout du processus de différenciation. Exemple : hématies, leucocytes, plaquettes, neurones, hépatocytes, etc.

On notera que la plupart de ces définitions possède des critères qui restent variables : le nombre de types cellulaires potentiels reste indéterminé chez les cellules multipotentes ou oligopotentes. Les étapes intermédiaires présentant un gain de potentiel durant certaines transdifférenciations posent parfois des problèmes quant au caractère « direct » de ces reprogrammations (C'est pourquoi nous considéreront comme transdifférenciation tous ces événements sans prendre en compte la plasticité des intermédiaires). Ceci explique en partie pourquoi il est difficile d'obtenir un consensus dans ce domaine.

2) Une cellule spécialisée est-elle définitivement figée dans son destin cellulaire ?

2.1) Des dogmes scientifiques discutés depuis plus d'un siècle

- **La différenciation irréversible des cellules somatiques : une théorie longtemps prédominante**

Les morphologies et les fonctions des cellules peuvent être extrêmement différentes. Dès le XIX^{ème} siècle il apparaissait plausible qu'elles n'aient pas en leurs seins les mêmes informations génétiques. Avant la compréhension des mécanismes épigénétiques et la découverte des facteurs modulant l'expression des gènes (qui viendront bien des décennies plus tard), comment expliquer que des cellules puissent se

différencier en types radicalement différents si elles possèdent des génomes identiques ?

Le très influent livre d'August Weismann (1834-1914) « *Le plasma germinatif: théorie sur l'hérédité* » (WEISMANN 1892) propose que, très tôt dans l'embryogenèse, deux types de cellules vont se différencier : le premier type donnera naissance aux cellules somatiques de l'organisme, le second les cellules germinales. Il décrit la spécialisation des cellules somatiques comme étant accompagnée très rapidement d'une perte progressive d'une partie du matériel génétique, ne laissant que les informations nécessaires à la spécialisation en une identité finale résolument figée (aucun retour en arrière possible). Seules les cellules germinales seraient détentrices de la totalité du matériel génétique pour assurer de nouveau le développement d'un organisme entier.

Pourtant, déjà à l'époque, certaines observations accessibles au moment où Weismann a énoncé cette théorie, allaient à l'encontre de ce modèle. En étudiant la larve de *Siphonophore*, Ernst Haeckel découvrit qu'un fragment de tissu amputé à l'embryon de ce cnidaire (au stade blastomère) pouvait régénérer une larve complète (HAECKEL 1869). Ici, des cellules embryonnaires capables de se différencier en cellules du soma ont montré que leur potentiel cellulaire n'était pas restreint (figure 1A).

Plus tard, Ethel Browne (1885-1965) greffa la bouche d'une hydre blanche sur le corps d'une hydre verte. Elle fut sûrement surprise de constater que non seulement le greffon s'intégrait au sein de l'organisme hôte, mais qu'il induisait également un signal qui forçait les cellules environnantes à produire les tentacules (verts) autour de la bouche greffée (BROWNE 1909). Ces cellules vertes avaient déjà acquis une spécialisation cellulaire puisqu'elles composaient le corps de l'hydre hôte (figure 1B). Cette nouvelle expérience démontre que des cellules différenciées peuvent changer d'identité et être redirigées vers une autre différenciation.

Si Browne et Haeckel ont démontré la plasticité des cellules d'organismes simples, Colucci et Wolff ont décrit à la fin du XIX^{ème} siècle la formidable capacité de reprogrammation de cellules somatiques adultes chez la salamandre (COLUCCI 1891; WOLFF 1895). Colucci observa que la salamandre pouvait régénérer sa lentille après son ablation totale, Wolff démontra que les cellules composant cette nouvelle lentille venaient de cellules de l'épithélium pigmenté de l'iris (reprogrammation développée dans la partie III.2 de l'introduction).

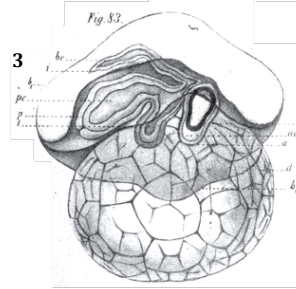
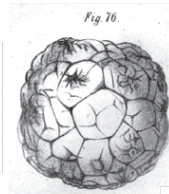
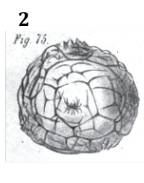
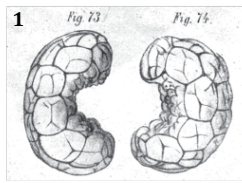
A**B**

Figure 1 : Expériences pionnières liées à la plasticité cellulaire. A) Illustrations des expériences de régénération de *Siphonophore* à partir de dissections d'embryons. 1) Division en deux de l'embryon au stade blastomère. 2) Les mêmes moitiés d'embryons quelques heures après la dissection. 3) Illustration du devenir d'un quart d'embryon après régénération en une larve complète (HAECKEL 1869). B) Illustration d'expériences de greffes entre deux hydres *Hydra viridissima* de différentes couleurs. La bouche d'une hydre blanche est greffée sur le corps d'une hydre verte. Des tentacules verts (issus de cellules du corps de l'hydre hôte après une reprogrammation) se développent autour du greffon (BROWNE 1909).

Bien des décennies plus tard, l'étude de certaines espèces d'hydrozoaires mettra en évidence l'incroyable capacité de ces organismes qui, une fois complètement adultes et fertiles, peuvent revenir à l'état larvaire. Cette réversion extrême du développement se produit en cas de conditions de stress thermiques, chimiques ou physiques chez *Turritopsis dohrnii*, *Turritopsis nutricula*, *Laodicea undulate* et *Podocoryne carnea* (PIRAINO *et al.* 1996; PAGLIARA *et al.* 2003; SCHMICH *et al.* 2007).

Il est intéressant de voir que très tôt, au moment où les dogmes de « la cellule irréversiblement différenciée » sont énoncés, des contre-exemples viennent mettre à mal cette théorie rigide, mais sont simplement ignorés.

- **Une vision très hiérarchisée du développement toujours en vigueur**

Historiquement, le développement des organismes a été décrit comme un processus très hiérarchisé. Les cellules au départ totipotentes perdent de leur plasticité au fil des divisions cellulaires, s'engageant dans des destins de plus en plus restreints : très vite, ces cellules se divisent en deux groupes : celles composant les annexes embryonnaires et les cellules pluripotentes. Puis les cellules deviennent successivement multipotentes et enfin spécialisées (avec un nombre très variable d'intermédiaires en fonction des tissus, comme des cellules oligopotentes ou progénitrices). La différenciation des cellules de la lignée hématopoïétique est un parfait exemple de

spécialisations cellulaires successives décrites depuis des décennies comme un processus suivant un profil très hiérarchisé. Chez l'homme adulte, 300 milliards de cellules sanguines sont produites chaque jour. Pour créer cette quantité colossale de cellules, des cellules souches sanguines vont se différencier en une série de progéniteurs multipotents et oligopotents, pour finir en cellules progénitrices unipotentes qui génèrent une dizaine de cellules sanguines différenciées différentes.

Ce modèle très bien organisé connaît récemment une remise en question. En effet, chez l'homme, selon les organes et les périodes du développement où peuvent être produits ces cellules sanguines (le foie embryonnaire, le cordon ombilical à la naissance et la moelle osseuse adulte), des intermédiaires manquent. Une analyse par cytométrie de flux révèle que des intermédiaires oligopotents présents dans l'extrait embryonnaire de foie sont quasiment indétectables parmi les cellules présentes dans la moelle osseuse adulte (NOTTA *et al.* 2016). Cette étude met en évidence le passage d'un état multipotent à un état unipotent sans toujours passer par tous les intermédiaires connus (la différenciation est parfois même directe du stade multipotent à unipotent, surtout chez l'adulte, voir figure 2).

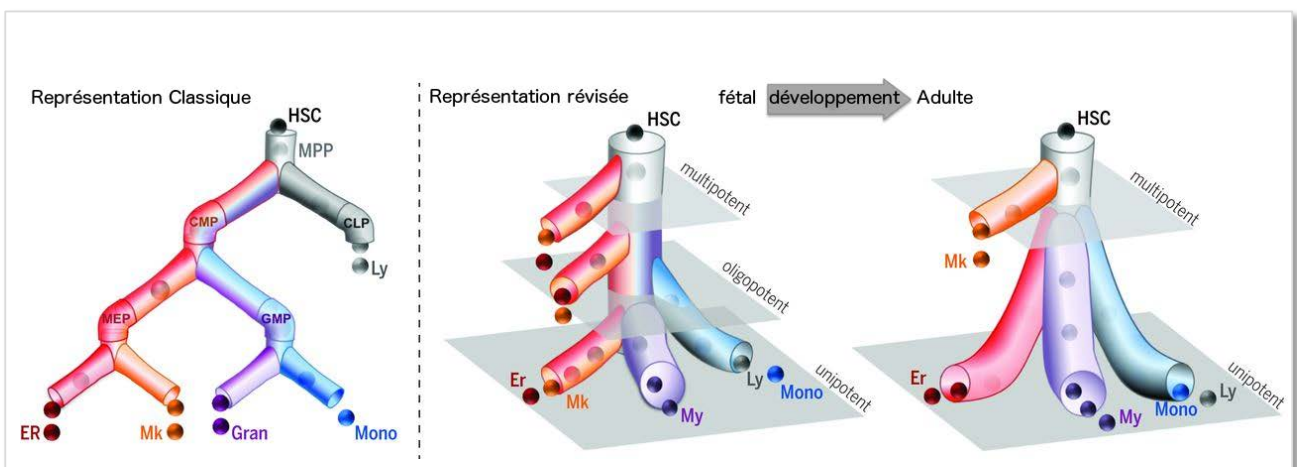


Figure 2 : Une représentation révisée de la différenciation des cellules hématopoïétiques. A gauche, la description classique et très hiérarchisée de la différenciation des cellules hématopoïétiques. Ici, les cellules souches hématopoïétiques (HSC) produisent des progéniteurs multipotents (MPP) qui vont donner naissance à deux types de cellules oligopotentes : le progéniteur de la lignée myéloïde (CMP) et le progéniteur la lignée lymphoïde (CLP). Les CMP se divisent en deux types de précurseurs : le progéniteur commun MEP des mégacaryocytes (Mk) et des érythrocytes (ER) et le progéniteur commun GMP des granulocytes (Gran) et monocytes (Mono). A droite, le modèle révisé par Notta *et al.* (2016). Un changement dans la composition et la nature des progéniteurs s'opère entre le fœtus (ou les progéniteurs sont multipotents) et l'adulte (ou les cellules souches gardent leur caractère multipotent mais des progéniteurs oligopotents disparaissent pour laisser la place à des progéniteurs très majoritairement unipotents). Les plans grisés représentent des paliers de différenciation (NOTTA *et al.* 2016).

Dans le partie III de l'introduction, je décrirai comment, de façon naturelle au cours du développement, d'une régénération ou de changement environnementaux, certaines cellules spécialisées sont issues non pas de progéniteurs ou cellules souches, mais de la transdifférenciation de cellules déjà engagées (voir complètement différenciées) dans un destin cellulaire très différent.

Ces exemples remettent en question les modèles de différenciations irréversibles et d'un développement cellulaire strictement hiérarchisé, ceci allant à l'encontre de dogmes scientifiques qui ont longtemps entravés la reconnaissance de travaux faisant état de reprogrammation de cellules différenciées.

2.2) Une cellule différenciée peut redevenir totipotente : la preuve par le transfert de noyaux de cellules somatiques

Les études de Browne, Haeckel et Colucci ont été longtemps ignorées. Dans l'esprit des scientifiques attachés à cette conception d'une différenciation irréversible des cellules somatiques, il était déjà gênant d'accepter que des cellules engagées dans un destin cellulaire précis puissent adopter une identité alternative, mais il était impensable qu'une cellule spécialisée puisse revenir à un état totipotent.

Pourtant, plusieurs études historiques ont mis à mal ces croyances dès le milieu du XXème siècle. En 1958, Frederick Steward (1904-1993) isola des cellules de racines de carotte dans un milieu nutritif (du lait de noix de coco) et réussit, à partir de ces cellules différenciées, à régénérer un organisme entier (STEWART *et al.* 1964). Ce lait apporte un milieu nutritif riche mais également des phytohormones et facteurs qui ont pu aider à la reprogrammation de ces cellules. Chez les animaux, de 1958 à 1962, grâce aux nouvelles méthodes de transfert de noyaux somatiques (TNS), c'est John Gurdon qui démontra qu'une cellule animale spécialisée garde ce potentiel totipotent (GURDON *et al.* 1958). Un noyau somatique intestinal de têtard transféré dans un œuf de xénope énucléé parvient à régénérer une grenouille viable et fertile (figure 3) (GURDON 1962).

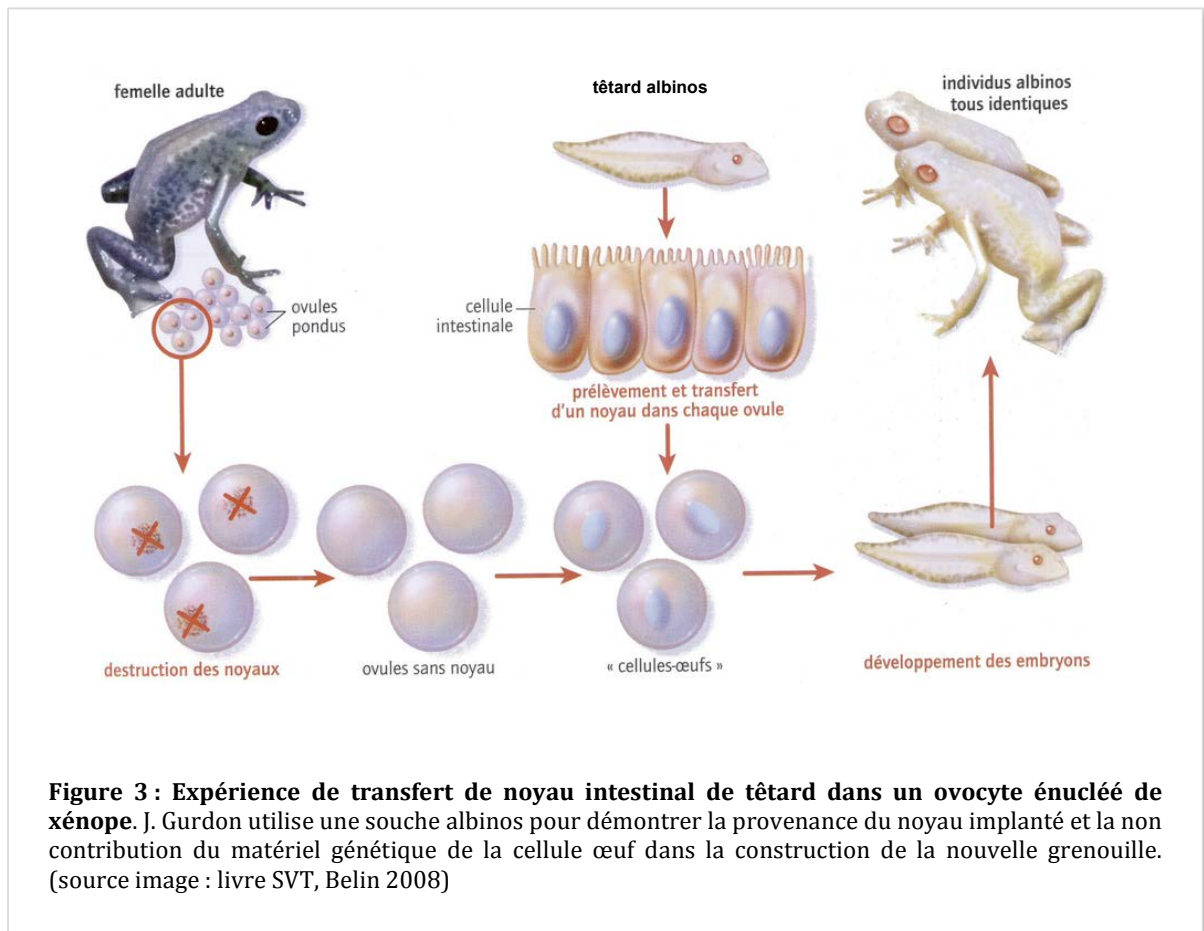


Figure 3 : Expérience de transfert de noyau intestinal de têtard dans un ovocyte énucléé de xénope. J. Gurdon utilise une souche albinos pour démontrer la provenance du noyau implanté et la non contribution du matériel génétique de la cellule œuf dans la construction de la nouvelle grenouille. (source image : livre SVT, Belin 2008)

La difficulté et le faible taux de réussite du clonage entretiennent le scepticisme d’une partie de la communauté scientifique. De plus, d’autres scientifiques avaient postulé que des cellules indifférenciées pouvaient résider dans l’intestin des têtards et que J. Gurdon avait pu prélever une de ces cellules (et non une cellule intestinale différenciée).

J. Gurdon répètera l’expérience avec des noyaux somatiques de muscle squelettique, de peau, de poumon et de rein (LASKEY and GURDON 1970; GURDON *et al.* 1984) et prouva que plusieurs types de noyaux provenant de cellules différenciées radicalement différentes (d’origine endo-, meso-et ectodermique) peuvent achever ce retour en arrière à un stade totipotent. Malgré ces conclusions convaincantes, il n’est pas aisé de changer de paradigme, même en science.

En 1984, une tentative de clonage de souris échoue : à partir de noyaux d’embryons au stade quatre-cellules, les ovocytes implantés ne se développaient pas après le stade blastocyste. Les auteurs en concluent qu’après le stade deux-cellules, les

cellules embryonnaires perdent de leur totipotence (MCGRATH and SOLTER 1984). Cette conclusion rappelle celle de R. Briggs & T.J. King dans les années 50 (BRIGGS and KING 1952). Après avoir développé la méthode de transfert de noyaux dans des ovocytes énucléés de grenouille en utilisant des cellules embryonnaires très précoces, ils échouent à reprogrammer des noyaux issus de cellules plus tardives dans le développement de l'embryon. Il a fallu 10 ans pour que J. Gurdon prouve le contraire dans une autre espèce de grenouille. Pour les mammifères, il faudra attendre 1997 pour voir l'avènement d'un clonage réussi : la brebis Dolly (WILMUT *et al.* 1997). Les auteurs utilisent des noyaux de cellules embryonnaires, mais surtout de cellules différenciées de fibroblaste fœtal et d'épithélium mammaire provenant de brebis adultes, et parviennent à donner naissance à des agneaux viables. Finalement, les premières souris clonées viendront les années suivantes (WAKAYAMA *et al.* 1998; HOCHEDLINGER and JAENISCH 2002), et de nombreux autres animaux seront clonés à partir de cellules différenciées (cochon (POLEJAEVA *et al.* 2000), lapin (CHESNE *et al.* 2002), chat (SHIN *et al.* 2002), rat (ZHOU *et al.* 2003), etc.). Les premières tentatives de clonage de souris dans les années 80 utilisaient probablement des zygotes fertilisés en interphase (les facteurs nucléaires étaient potentiellement retenus dans le noyau), alors que les autres études qui ont réussi le clonage de mammifères utilisaient des ovocytes en métaphase II durant la méiose (l'enveloppe nucléaire est rompue durant cette phase et les facteurs nucléaires sont relâchés) (EGLI *et al.* 2007).

Des suspicions perduraient encore sur l'origine des cellules prélevées : étaient-elles réellement différenciées ou pouvait-il s'agir de contaminations venant de cellules indifférenciées potentiellement présentes dans les tissus où les noyaux somatiques ont été prélevés ?

En 2004, K. Eggan et ses collègues vont démontrer sans ambiguïté qu'une cellule hautement spécialisée tel qu'un neurone olfactif peut être cloné par TNS. Le tissu épithélial olfactif contient un enchevêtrement de neurones olfactifs matures, de cellules souches et de progéniteurs neuronaux. Pour être certains de prélever uniquement des neurones matures, les auteurs ont utilisé un marquage précis : les cellules exprimant un marqueur spécifique, uniquement présent dans les neurones olfactifs différenciés, ont été soigneusement sélectionnées (EGGAN *et al.* 2004).

Des noyaux différenciés sont donc capables d'être reprogrammés, la spécialisation n'est définitivement pas liée à une perte d'information génétique. Ces expériences lèvent de nouvelles interrogations : quels sont les facteurs présents dans le cytoplasme des ovocytes capables de remodeler ces noyaux spécialisés ? Il apparaît que des molécules contenues dans le cytoplasme de cellules germinales sont capables de remodeler un noyau déjà différencié, elles prennent le dessus sur l'identité nucléaire et impose un programme de totipotence.

De tels facteurs existent-ils dans des cellules spécialisées ? Un noyau, peu importe son origine, sera-t-il toujours modulable en fonction des molécules présentes dans le cytoplasme ? Les expériences de fusion cellulaire permettront de répondre en partie à ces questions.

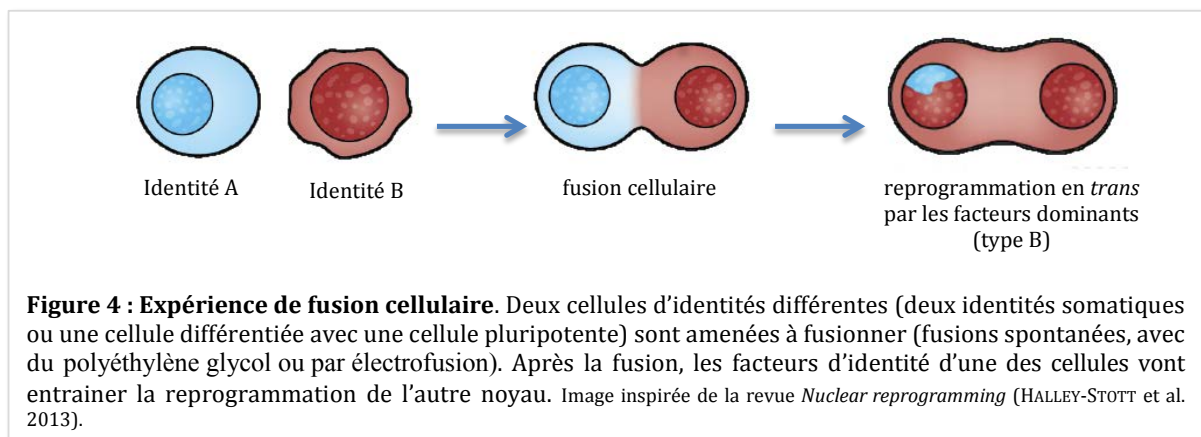
2.3) La fusion de cellules : les traits dominants

Dans les années 70, la possibilité de fusionner deux cellules d'identités différentes a permis d'étudier la dominance de certains traits (figure 4). Les premières approches ont consisté à fusionner des cellules pluripotentes issues de cellules de tératoCarcinome Embryonnaires (EC) et des cellules différenciées. L'hétérocaryon obtenu était ensuite analysé pour déterminer quelles identités cellulaires étaient dominantes/récessives. En fonction de l'identité de la cellule somatique, les résultats étaient très différents. Dans certains cas le caractère pluripotent était dominant, dans d'autres l'identité de la cellule différenciée l'emportait. Des identités hybrides avec marqueurs des deux types cellulaires ont aussi été observées. Le biais de ces études est l'utilisation de cellules EC, ces cellules ont l'avantage d'être facilement manipulables et présentent de nombreuses similitudes avec les cellules ES, mais elles contiennent aussi très souvent des altérations chromosomiques (perte du chromosome Y, trisomie, délétions, translocations), le ratio entre les chromosomes parentaux étant certainement inégaux (SEROV *et al.* 2011).

Les études de fusions cellulaires réalisées plus tard dans les années 90 et 2000 utilisent des cellules ES (noyaux diploïdes normaux et plus haut degrés de pluripotence) et obtiennent des résultats plus stables et reproductibles. Tous les hybrides obtenus entre cellules ES et cellules différenciées (splénocytes, thymocytes, progéniteurs

neuronaux, cellules de la moelle épinière immature, cellules du cumulus, fibroblastes, ostéoblastes, précurseurs myéloïdes, hépatocytes, etc.) ont un phénotype similaire aux cellules ES (morphologie, croissance, marqueurs de pluripotence). Une augmentation de la taille des télomères du noyau somatique a même été décrite dans les hétérocaryons hybrides cellules ES-fibroblastes (SUMER *et al.* 2010). Les facteurs de pluripotence semblent donc prendre le pas sur les traits somatiques.

Des fusions de deux cellules différenciées ont été réalisées avec des cellules parentales d'espèces différentes, de cette manière il est possible de suivre l'expression de marqueurs spécifiques de chaque espèce, et de voir l'influence de la fusion sur chacun des noyaux. La fusion de cellules musculaires de souris avec différents types cellulaires humains (fibroblastes fœtaux et adultes de différents organes, cellules neuronales, kératinocytes, lymphocytes B ou hépatocytes) révèle la dominance des traits musculaires. Pour chacune de ces fusions, les facteurs de l'identité musculaire de souris ont activé l'expression de gènes musculaires humains (BLAU *et al.* 1985). Ce changement d'identité rapide (quelques jours) et sans division cellulaire révèle l'efficacité de ces facteurs pour induire une reprogrammation de noyaux somatiques en un autre type cellulaire différencié très différent.



Les TNS et les expériences de fusion cellulaire nous apprennent que les facteurs de pluripotence sont dominants par rapport aux facteurs établissant l'identité différenciée, et que certains régulateurs d'identité somatiques peuvent induire une reprogrammation de noyaux engagés dans un destin cellulaire très différent. Néanmoins, ces facteurs restent mystérieux et les mécanismes qui régissent ces reprogrammations nucléaires demeurent inconnus.

2.4) La 5-azacytidine : une drogue capable d'opérer un changement d'identité cellulaire direct

Les expériences de TNS et de fusion cellulaire reprogrammaient des noyaux somatiques en utilisant les facteurs présents dans une autre cellule (l'ovocyte pour les TNS, les facteurs cellulaires dominants pour les fusions). Une dizaine d'année après les premiers clonages de J. Gurdon, une transdifférenciation allait être induite par la seule composition du milieu de culture, réactivant des facteurs de reprogrammation intrinsèques aux cellules.

Au début de sa carrière dans les années 1970, le chercheur Peter Jones travaillait sur l'étude de composés chimiques utilisés dans des chimiothérapies. L'effet de nouvelles drogues était testé sur des fibroblastes de souris durant plusieurs semaines. Un jour, un nouveau composé, la 5-azacytidine (5azaC), provoqua un résultat inattendu : les fibroblastes avaient fusionnées et formaient des syncytiums de cellules musculaires (JONES 2011). P. Jones démontra que la 5azaC était également capable de transformer des lignées cellulaires de fibroblastes (10T1/2) en adipocytes et en chondrocytes. Cette incroyable découverte démontrait clairement qu'une cellule différenciée peut être convertie directement en un autre type cellulaire. P. Jones démontra que la 5azaC agissait sur la méthylation de l'ADN (JONES and TAYLOR 1980), mais tout comme les expériences de TNS et de fusion cellulaire, les mécanismes et facteurs impliqués dans la conversion de fibroblastes en muscles demeuraient mystérieux.

3) La découverte des acteurs de l'identité cellulaire

3.1) L'opéron lactose : la mise en évidence de la modulation de l'expression des gènes

En 1961, la découverte de l'opéron lactose a bouleversé la conception que les scientifiques se faisaient d'une cellule : il existe des molécules (ici le lactose) qui peuvent induire l'expression de gènes (la β -galactosidase)(JACOB and MONOD 1961). Une bactérie en présence ou non de lactose possède le même génome, et pourtant la production d'une protéine change en fonction de conditions environnementales capables de moduler

l'expression d'un gène jusqu'alors inactif. J. Monod propose alors que ce modèle bactérien de type opéron pourrait bien exister dans les cellules d'organismes pluricellulaires complexes, ce qui expliquerait pourquoi un même génome peut exprimer certaines informations et pas d'autres. Alors que les généticiens et les embryologistes appartenaient à des disciplines rigoureusement séparées dans la première partie du XXème siècle, les recherches fondamentales sur l'enzymologie adaptative des bactéries allaient unir les deux domaines. La différence d'expression des gènes et la différenciation cellulaire sont intimement liées. Pour comprendre la différenciation, il convient d'identifier les facteurs responsables de l'activation/la répression de gènes clés dans la spécialisation des cellules.

3.2) Les facteurs de transcription : acteurs clés de la différenciation cellulaire

Un facteur de transcription (FdT) est une protéine liant une séquence spécifique de l'ADN proche d'un gène afin de réguler son expression. Il peut induire ou réprimer l'expression génique via des interactions directes ou indirectes avec la machinerie de transcription basale. Alors que l'ADN renferme les informations pour créer chacune des protéines (ou ARNnc) de notre organisme, les FdT permettent de moduler l'expression de ces gènes dans le temps et l'espace.

La différenciation cellulaire au cours du développement est dictée par de nombreux FdT responsables de l'activation d'un programme spécifique à chaque type cellulaire. Un des exemples les plus documentés est le développement embryonnaire de la drosophile où plusieurs facteurs de transcription ont été découverts par l'analyse de mutants (LEWIS 1978). Ces FdT, appelés gènes homéotiques, définissent l'identité de segments de l'embryon de drosophile. Par exemple, le FdT Antennapedia lie des gènes cibles permettant la formation des pattes dans les segments thoraciques de la drosophile. Une surexpression de Antennapedia dans le segment de la tête entraîne une formation de pattes à la place des antennes. Ultrabithorax est un FdT qui réprime la formation des ailes. Une inactivation d'Ultrabithorax aura pour conséquence une formation ectopique d'une deuxième paire d'aile.

Grâce aux avancées des techniques en génie génétique et en biochimie, d'autres approches que l'analyse de mutants ont permis la découverte de FdT capables de reprogrammer des cellules somatiques.

Après l'incroyable découverte de P. Jones et des reprogrammations imputables à la drogue 5azaC (qu'il appelait sa pierre philosophale de la biologie du développement), Davis, Lassar et Weintraub se sont intéressés aux locis cibles déméthylés, et donc probablement exprimés, par la 5azaC. Pour identifier les facteurs responsables de cette transdifférenciation, ils ont réalisé des banques d'ADNc de fibroblastes 10T1/2 convertis en myoblastes via l'action de la 5azaC (appelés myo-azac), de cellules de lignées myogéniques C2C12 (myo-C2C12) et de fibroblastes 10T1/2. Les auteurs ont voulu éliminer tous les ARNc communs entre fibroblastes et cellules myogéniques (les ARNc cibles n'étant exprimés que dans les cellules musculaires). Les ADNc myo-azac ont été hybridés aux ADNc de fibroblastes et seuls les ADNc non hybridés simple brin ont été sélectionnés par chromatographie hydroxyapatite (ici les ADNc non spécifiques des cellules myogéniques n'ont pas été retenus, figure 5). Ensuite, les ADNc communs entre les cellules musculaires C2C12 et induites par la 5azac ont été sélectionnés, clonés, et certains ont été testés pour leur capacité à convertir des fibroblastes en cellules musculaires. C'est par cette méthode que les auteurs ont pu identifier MyoD, un FdT qui à lui seul peut induire une reprogrammation directe d'un fibroblaste en cellule musculaire (figure 5).

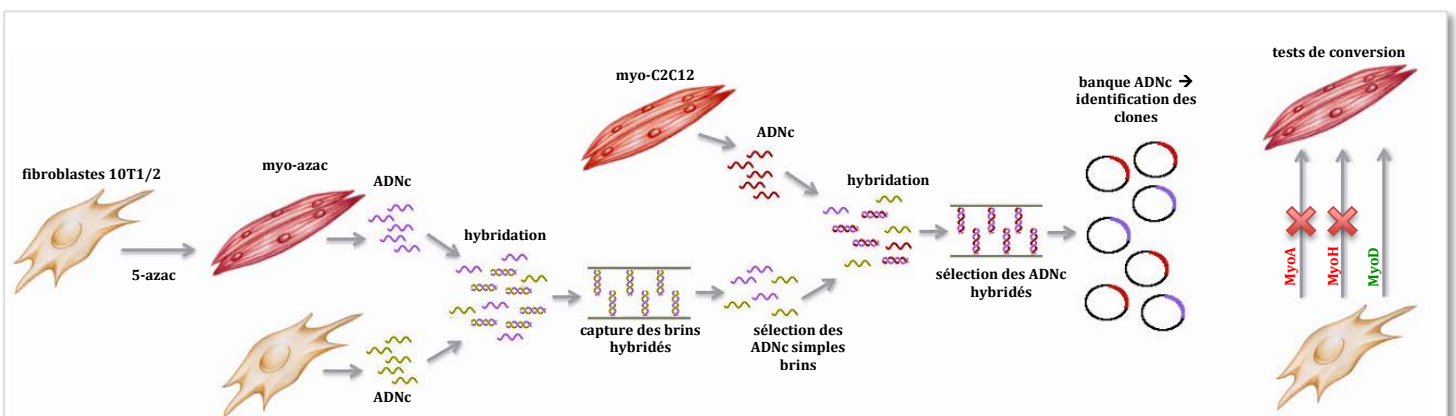


Figure 5 : La découverte de MyoD. Davis *et al.* éliminent les ADNc communs entre les myo-azac et les fibroblastes 10T1/2, pour sélectionner les ADNc simples brins spécifiques des cellules myo-azac. Ils hybrident ensuite ces ADNc simples brins aux ADNc de cellules myo-C2C12 et sélectionnent de ce fait les ADNc communs aux deux types de cellules myogéniques. Ces ADNc sont clonés dans des vecteurs d'expression, séquencés, identifiés et certains sont testés pour leur capacité à transformer des fibroblastes en cellules musculaires.

Cette étude incroyablement avant-gardiste présente tous les éléments retrouvés dans les études de reprogrammations induites réalisées bien des années plus tard : les facteurs spécifiques d'un type cellulaire donné sont identifiés (soit par l'expérimentation, soit par recherche bibliographique), puis surexprimés dans une cellule d'identité différente (souvent un fibroblaste), jusqu'à trouver le/les facteurs capable(s) d'opérer la reprogrammation en un type cellulaire cible (voir chapitre II).

Après le succès de la conversion de fibroblastes en cellules musculaires, et à la lumière des expériences de fusions cellulaires où certains facteurs musculaires dominant sur les traits des autres cellules somatiques fusionnées (voir chapitre I.2.3) (BLAU *et al.* 1985), l'induction de MyoD a été testée dans plusieurs types cellulaires. Des chondrocytes immatures, des cellules de muscle lisse et cellules de la rétine ont pu être reprogrammés en myoblastes (CHOI *et al.* 1990). Par contre, MyoD n'est pas parvenu à convertir tous les types cellulaires, comme les hépatocytes (SCHAFER *et al.* 1990).

Peu de temps après, T. Graf pris le pari de surexprimer un FdT clé de la différenciation des certaines cellules hématopoïétiques dans des myéloblastes aviaires. Après l'induction de GATA1, ces précurseurs de monocytes ont été reprogrammés en érythrocytes, éosinophiles et mégacaryocytes. Un second facteur de reprogrammation induite venait d'être découvert (GRAF *et al.* 1992). L'équipe de Graf décrira 12 ans plus tard une nouvelle reprogrammation cellulaire directe : C/EBP α converti 100% de cellules pro- et pre-B, et 35% de lymphocytes B matures (producteurs d'anticorps) en macrophages fonctionnels (XIE *et al.* 2004; DI TULLIO *et al.* 2011).

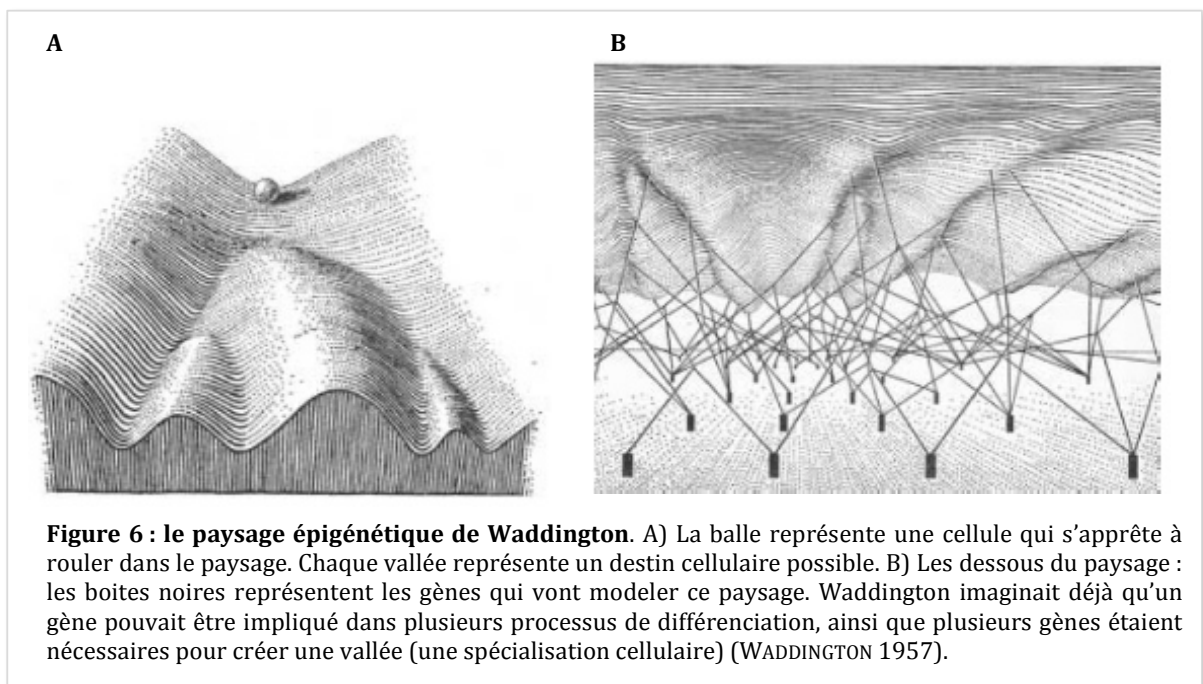
A la fin des années 90s, l'équipe de M. Busslinger découvrit que la délétion du gène Pax-5 permettait la reprogrammation de cellules pro-B de souris en macrophages fonctionnels, ostéoclastes, cellules dendritiques, granulocytes et cellules NK selon les conditions de culture et les cytokines utilisées (NUTT *et al.* 1999). Une fois transplantées dans des souris immunodéficientes, ces cellules pro-B Pax5(-/-) peuvent également être converties en lymphocytes T *in vivo* (ROLINK *et al.* 1999).

Les mécanismes par lesquels les FdT influent sur l'identité cellulaire seront développés dans la partie IV. Bien sûr, l'autre pendant de la différenciation et de la reprogrammation cellulaire est l'état de la chromatine et l'accessibilité des gènes de

spécialisation cellulaire. Ces mécanismes permettant le remodelage de la chromatine ont été découverts tout au long de la deuxième moitié du XXème siècle.

3.3) La structure de la chromatine : élément clé de l'expression différentielle des gènes.

D'un point de vue historique, le mot épigénétique était utilisé pour décrire les événements qui ne pouvaient pas être expliqués par les principes connus de la génétique. Dès les années 50, Conrad Waddington (1905-1975) définissait l'épigénétique comme une branche de la biologie qui étudiait les processus de contrôle des gènes et de leurs produits, ceci menant aux caractères observables. En 1957, il décrivait un paysage épigénétique où des facteurs influençaient le chemin pris par une cellule vers des spécialisations différentes (figure 6). Il imagine déjà qu'une différence d'expression des gènes est à l'origine de la différenciation des cellules (WADDINGTON 1957). Aujourd'hui, on peut définir l'épigénétique comme des mécanismes qui régulent l'expression des gènes et sont définis par un code distinct des séquences génomiques (modifications post-traductionnelles des histones, méthylation de l'ADN, échange d'histone et de variants d'histone, petites molécules ARN non codants et voies de dégradations ciblant des gènes clés régulateurs d'expression) (GAN *et al.* 2007; DU *et al.* 2015).



En 1952, W. Beermann sera le premier chercheur à faire le lien entre expression génique et différence de structure de la chromatine. Certaines structures des diptères offraient la possibilité d'observer avec une grande précision des chromosomes au microscope photonique. Au cours du développement larvaire, certains tissus présentent des chromosomes polytènes. Ces chromosomes se répliquent en l'absence de mitose et un agrégat d'un grand nombre de copies des chromatides se forme (jusqu'à 1 024). Ces copies restent soudées entre elles, les régions homologues juxtaposées, c'est pourquoi il est facile d'observer des bandes plus ou moins sombres présentes sur ces chromosomes polytènes. Dès 1952, W. Beermann constata que les tailles, les emplacements et l'ordre dans lequel apparaissent les bandes présentes sur ces chromosomes polytènes restent toujours les mêmes d'un tissu à l'autre, mais qu'il existait des renflements, appelés « puffs », à différents endroits en fonction de la nature du tissu observé (figure 7A). La quantité d'ADN reste donc la même dans différents tissus, mais la structure de la chromatine est différente (BEERMANN 1952).

W. Beermann étudiait deux espèces proches de diptère *Chironomus*. L'une produisait en grande quantité une protéine de salive, l'autre très peu. En observant les chromosomes polytènes de chacune de ces espèces, il put constater la présence de renflements de la chromatine dans la région BR2 du chromosome 4 chez l'espèce la plus productrice (BEERMANN 1961). Il s'agissait de décondensation de la chromatine autour du locus du gène de cette protéine. Cette observation sous-entend l'existence de facteurs qui décompactent la chromatine à des locis précis pour la rendre accessible et permettre sa transcription (figure 7 B et C).

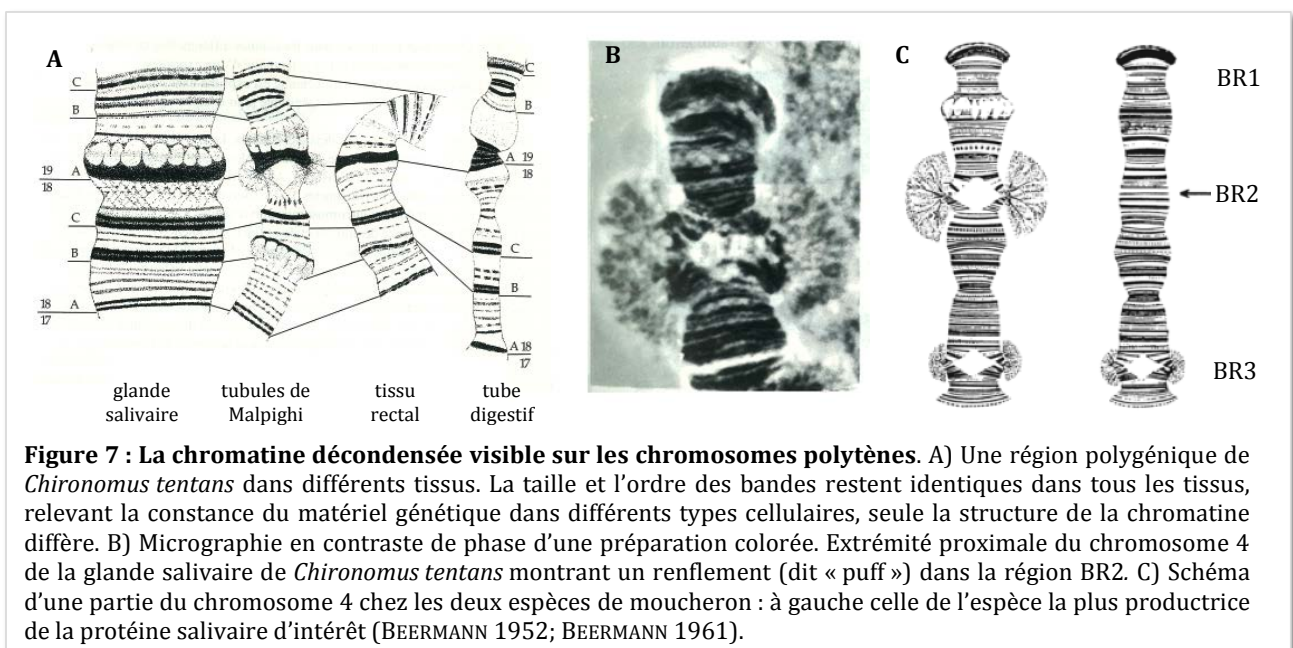


Figure 7 : La chromatine décondensée visible sur les chromosomes polytènes. A) Une région polygénique de *Chironomus tentans* dans différents tissus. La taille et l'ordre des bandes restent identiques dans tous les tissus, relevant la constance du matériel génétique dans différents types cellulaires, seule la structure de la chromatine diffère. B) Micrographie en contraste de phase d'une préparation colorée. Extrémité proximale du chromosome 4 de la glande salivaire de *Chironomus tentans* montrant un renflement (dit « puff ») dans la région BR2. C) Schéma d'une partie du chromosome 4 chez les deux espèces de moucheron : à gauche celle de l'espèce la plus productrice de la protéine salivaire d'intérêt (BEERMANN 1952; BEERMANN 1961).

Dans les années 60s, d'autres chercheurs constatèrent que la compaction de la chromatine était probablement liée à une inaccessibilité des gènes. Des régions inertes d'un point de vue transcriptionnel étaient visiblement condensées (sous forme d'hétérochromatine) dans des noyaux en interphase, comme le corps de Barr, qui est le chromosome X inactif dans les cellules de mammifères femelles (BROWN 1966).

Les études faisant le lien entre méthylation de l'ADN et répression de la transcription posent les premières pierres de la compréhension des mécanismes épigénétiques (JONES and TAYLOR 1980; BUSSLINGER *et al.* 1983). M. Busslinger et ses collègues démontrent que la méthylation de la région 5' de la gamma-globine réprime son expression. Une fois transfecté dans des cellules B de souris, le construit méthylé n'induit plus l'expression de la gamma-globine, contrairement au construit non méthylé.

Viendra ensuite la description du rôle des histones dans la modulation de l'expression des gènes. Vincent Allfrey (1921-2002) était un scientifique particulièrement visionnaire dans les années 60s. Alors que les histones étaient le plus souvent décrites comme de simples pelotes permettant de compacter l'ADN dans le noyau, V. Allfrey postula qu'elles joueraient potentiellement un rôle sur l'accessibilité des gènes. Il s'intéressa de près aux modifications que pouvait porter les histones (acétylation, méthylation, et phosphorylation). En 1968, grâce aux excellentes qualités de biochimiste de V. Allfrey, son équipe purifia des histones de cellules de thymus, les sépara et les analysa par chromatographie. Ils découvrirent que les histones H3 et H4 avaient un haut degré de résidus de lysines acétylés. Sans pouvoir le prouver, ils postulèrent que ces groupements acétylés pourraient neutraliser la charge positive des histones et donc perturber l'interaction avec le brin d'ADN chargé négativement, ce qui et faciliterait l'ouverture de la chromatine et donc la transcription de l'ADN (VIDALI *et al.* 1968).

A la fin des années 80s, l'équipe de M. Grunstein tente de découvrir pourquoi la délétion de la partie N-terminale de l'Histone 4 (H4) entraîne une létalité et bloque la ségrégation des chromosomes dans les cellules eucaryotiques. En tronquant certaines petites parties de ce segment extrêmement conservé, la létalité est levée, mais pas seulement : les auteurs découvrent avec surprise que ces délétions entraînent la dérégulation de certains locis (KAYNE *et al.* 1988).

Depuis une vingtaine d'années, les études se succèdent pour comprendre le code des histones, le rôle de chacune de leurs modifications post-traductionnelles ainsi que l'implication des variants d'histones dans la modulation de l'expression des gènes.

De la cellule totipotente aux cellules spécialisées, la progressive différenciation des cellules est un processus qui semble graduellement accompagné par le dépôt de marques répressives et d'une augmentation de la compaction de la chromatine (GIFFORD *et al.* 2013; XIE *et al.* 2013; ZHU *et al.* 2013). Durant la différenciation en un type cellulaire spécialisé, les gènes des programmes d'identité différents seraient peu à peu réprimés.

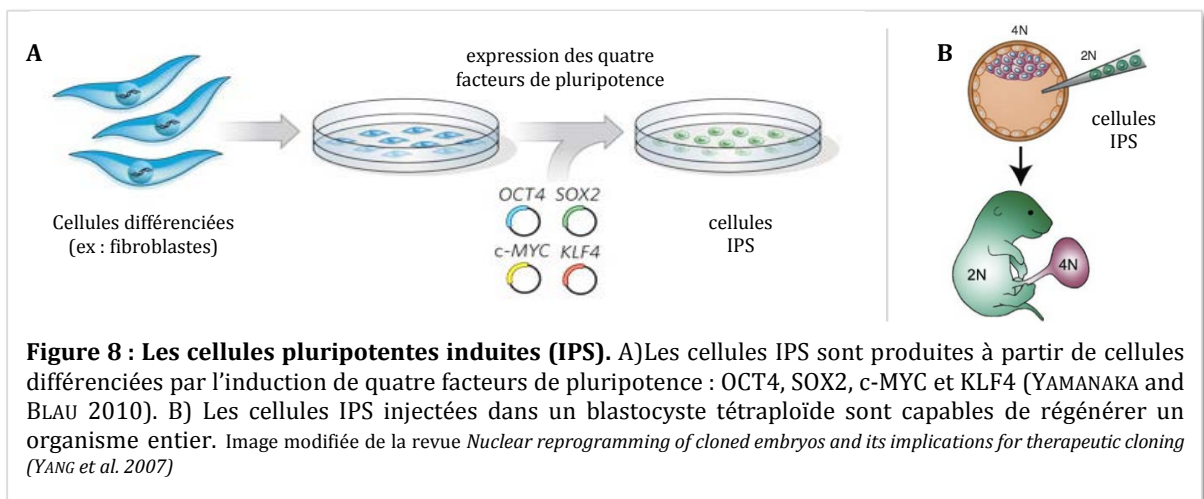
Toutes ces découvertes nous apprennent que maîtriser la manipulation de l'identité cellulaire demande de manipuler des FdT clés pour exprimer un programme spécialisé. Durant la conversion, il est probable que la chromatine sera remodelée plus ou moins profondément en fonction de l'éloignement des identités initiales et finales. Nous verrons aussi dans les chapitres suivant qu'il est postulé que l'accès de ces FdT clés à leurs gènes cibles dépend de leur capacité à lier l'ADN en fonction de l'état de la chromatine. Après de nombreuses études principalement centrées sur l'identification des FdT clés capables d'induire une reprogrammation cellulaire précise, les remodeleurs de la chromatine se sont avérés être des acteurs de plus en plus utilisés pour améliorer l'efficacité des reprogrammations cellulaires (chapitre II). Dans le chapitre IV, nous reviendrons sur les mécanismes responsables du maintien de l'identité cellulaire ainsi que le rôle des FdT et des remodeleurs de la chromatine dans la stabilisation de l'état différencié.

[II/ Les reprogrammations induites](#)

1) Les cellules Souches Pluripotentes Induites (IPS)

Les expériences de transfert de noyaux somatiques ainsi que les fusions cellulaires confirment qu'il existe des facteurs capables de reprogrammer des noyaux différenciés. Certainement inspirés par les études pionnières de reprogrammations de cellules différenciées, Yamanaka et Takahashi décidèrent de mener l'enquête, à la

recherche des facteurs responsables de cette dédifférenciation à un stade pluripotent. Entre 1998 et 2005, plusieurs études avaient défini des FdT importants pour la maintenance de la pluripotence dans les embryons précoces et dans les cellules ES : Oct3/4 (NICHOLS *et al.* 1998; NIWA *et al.* 2000), Sox2 (AVILION *et al.* 2003), Nanog (CHAMBERS *et al.* 2003; MITSUI *et al.* 2003). D'autres FdT ont été décrits pour leurs rôles dans la maintenance de la pluripotence à long-terme et la rapide prolifération des cellules ES en culture (facteurs surexprimés dans plusieurs types de cancers) : Klf4 (LI *et al.* 2005), c-Myc (CARTWRIGHT *et al.* 2005), Stat3 (NIWA *et al.* 1998; MATSUDA *et al.* 1999), E-Ras (TAKAHASHI *et al.* 2003) et la β -caténine (KIELMAN *et al.* 2002). 24 gènes de pluripotence seront sélectionnés, combinés en différents cocktails et exprimés dans des cellules de fibroblastes dans l'espoir d'induire une dédifférenciation en cellules pluripotentes. Au final, seuls quatre facteurs s'avèrent essentiels à l'induction d'un état pluripotent : Oct4, Sox2, Klf4 et C-Myc (figure 8A).



Ces cellules pluripotentes induites (IPS) ont démontré leur totale pluripotence en permettant de régénérer un organisme entier. Des cellules IPS implantées dans un blastocyste tétraploïde se développent pour donner naissance à une souris viable et fertile (seules les cellules IPS 2N ont contribué à la formation de l'embryon, les cellules 4N ne pouvant que se différencier en annexes embryonnaires, figure 8B) (KANG *et al.* 2009; ZHAO *et al.* 2009).

Conceptuellement, cette démonstration amène un tournant capital dans le domaine de la plasticité cellulaire. Les changements les plus importants observés après les transferts de noyaux somatiques, ce passage d'un état différencié à pluripotent, peut être reproduit en culture avec la seule induction de quatre facteurs.

L'avènement des cellules IPS sonne également comme une révolution pour contourner les points négatifs des cellules ES. D'un point de vue des potentielles applications médicales en médecine régénérative, reconstruire des cellules/tissus à partir de cellules ES embryonnaires impliquait des problèmes de compatibilité immunologique (les cellules embryonnaires ne pouvant pas provenir d'un patient adulte) et surtout des problèmes éthiques liés à l'utilisation d'embryons humains (de nombreux pays interdisent toujours leur utilisation en recherche). Les premières cellules IPS à partir de cellules humaines sont créées l'année (Yu *et al.* 2007).

D'autres laboratoires ont emboîté le pas et trouvé des cocktails de facteurs alternatifs pour induire l'état de pluripotence, comme l'équipe de J.A. Thomson qui propose Sox2, Oct4, Lin28 et Nanog (Yu *et al.* 2007).

Les études améliorant l'efficacité de la reprogrammation ont rapidement suivi (seulement $\approx 0.067\%$ d'efficacité de conversion dans la 1^{ère} publication chez la souris) : l'utilisation d'autres FdT, de petites molécules, de microARN, la suppression de certains gènes et des conditions de cultures améliorées ont permis d'augmenter considérablement l'efficacité de reprogrammation et la qualité des cellules IPS obtenues (BROUWER *et al.* 2015). En 2013, Rais *et al.* parviennent à induire 100% de fibroblastes (humain ou murins) en cellules IPS après 7 jours grâce à la déplétion du gène Mbd3, un membre clé du complexe Mbd3/NuRD (Nucleosome Remodelling and Deacetylation), un complexe répresseur (RAIS *et al.* 2013). Ce complexe restreint potentiellement la réactivation des cibles de Oct4, Sox2, Klf4 et C-Myc. Cette étude montre encore une fois l'importance de la combinaison entre activation de FdT clés et accessibilité de la chromatine pour reprogrammer une cellule.

Après 2006, il y eu une explosion des publications décrivant les facteurs/conditions de cultures nécessaires à la différenciation des cellules IPS en plusieurs types cellulaires. Ce champ de recherche connaît toujours un formidable essor

et les mécanismes responsables de cette reprogrammation sont encore à l'étude pour mieux comprendre les rouages qui permettraient une conversion plus efficace.

En ce qui concerne les applications thérapeutiques, des obstacles restent encore à franchir. Les cellules pluripotentes, ES et IPS, sont très proches des cellules cancéreuses. Il n'est pas surprenant que certains facteurs de reprogrammation de cellules IPS soit des oncogènes (exemple : C-Myc ou klf4). Induire la surexpression de ce type de gènes dans des cellules destinées à être réimplantées dans un patient dans un but thérapeutique est préoccupante.

L'efficacité de reprogrammation reste faible, sauf si une délétion de certains gènes est réalisée de concert avec l'introduction des facteurs de reprogrammation. p53, P21, p16, P19, Mdb3 : tous ces gènes une fois mutés augmentent l'efficacité de reprogrammation des cellules IPS (BANITO *et al.* 2009; KAWAMURA *et al.* 2009; RAIS *et al.* 2013), mais l'altération de leurs expressions est hautement associée à de nombreux cancers (PONTES *et al.* 2014; KIM *et al.* 2015b). De plus, le grand nombre de divisions cellulaires nécessaires à la production de ces cellules peut également entraîner une accumulation des aberrations génétiques (MAYSHAR *et al.* 2010).

Recréer des cellules somatiques en passant par une étape pluripotente comporte donc des risques. En effet, il n'est pas toujours possible d'attester de la complète reprogrammation et de la stabilité de la nouvelle identité des cellules converties. Une autre approche permet de contourner cette étape pluripotente potentiellement dangereuses : la reprogrammation directe.

2) La controverse liée aux reprogrammations directes

Quand j'ai commencé ma thèse dans le laboratoire de Sophie Jarriault en 2011, ma bibliographie concernant les reprogrammations cellulaires directes induites (juste chez la souris et l'homme) ne dépassait pas un petit tas d'une vingtaine de publications. Au moment où j'écris ces lignes, j'ai référencé plus d'une centaine de publications qui étaient parvenues à convertir des cellules somatiques en un autre type cellulaire avec un cocktail de facteurs original (voir tableau 1 et 2 page 49). En entrant en master de biologie du développement, le terme « transdifférenciation » était tout juste réhabilité, les conversions cellulaires directes par surexpression de facteurs n'étaient enfin plus

considérées comme des « artéfacts » (GRAF 2011) et étaient désormais reconnues. Ce champ de recherche peut remercier Yamanaka d'avoir repopulariser l'idée que l'expression de facteurs pouvait réellement reprogrammer une cellule différenciée, 29 ans après MyoD.

Comme pour les expériences de TNS de J. Gurdon, la suspicion concernant la véracité des événements de transdifférenciation (induits ou même naturels) était nourrie par des problèmes de traçabilité de l'identité cellulaire (initiale et finale). A la fin des années 90 et au début des années 2000, plusieurs publications ont clamé avoir mis en évidence des transdifférenciations, majoritairement *in vivo*, sans qu'un traçage très rigoureux n'ait été mis en place. Par exemple, plusieurs études ont montré que les cellules souches hématopoïétiques (HSC) pouvaient produire plusieurs types cellulaires, différents des cellules sanguines, et se différencier en cellules de foie (PETERSEN *et al.* 1999; LAGASSE *et al.* 2000; THEISE *et al.* 2000), de muscle squelettique (FERRARI *et al.* 1998), en cellules épithéliales de poumon et de peau (KRAUSE *et al.* 2001) ou en cellules neuronales (BRAZELTON *et al.* 2000; MEZEY *et al.* 2000). Ces études transplantent des HSC dans des souris irradiées et démontrent leur contribution à la production d'autres types cellulaires. Certaines affirment qu'il s'agit de transdifférenciation sur la base de l'existence d'un chromosome Y (du donneur mâle dont sont issues les cellules hématopoïétiques implantées dans la souris femelle) ou sur l'expression de gènes spécifiques des cellules hématopoïétiques dans ces nouvelles cellules reprogrammées.

En 2002, Terada et ses collègues ont démontré que des cellules hématopoïétiques pouvaient fusionner spontanément avec des cellules ES dans certaines conditions de culture, et que les cellules résultantes de cette fusion adoptaient un destin pluripotent (TERADA *et al.* 2002). Ces conclusions amèneront la communauté scientifique à penser que les HSC pourraient non pas se transdifférencier, mais fusionner avec des cellules somatiques et adopter leur destin cellulaire. Les méthodes de traçages utilisées par les premières études ne peuvent pas discriminer les deux scénarii. Lagasse *et al.*, (2000) avaient affirmé que les HSC pouvaient se transdifférencier en hépatocytes, mais X. Wang et ses collègues affirment trois ans plus tard que ces hépatocytes dérivés de cellules hématopoïétiques sont issus de fusion (par l'analyse de gènes hétérozygotes chez les hépatocytes alors que les cellules du donneur et du receveur sont homozygotes) (WANG *et al.* 2003). L'année suivante, Jang *et al.*, (2004) affirment que les HSC peuvent produire

in vitro des hépatocytes sans fusion cellulaire (en co-cultivant des HSC avec des cellules de foie séparées par une barrière)(JANG *et al.* 2004). Encore aujourd’hui, certaines études affirment que les HSC ne contribuent pas à la formation de certaines cellules du foie (PAREDES *et al.* 2012).

Ces querelles d’experts ont entretenu la controverse autour de la reprogrammation cellulaire directe. Ces études mettent en lumière combien le traçage cellulaire est un élément clé dans la démonstration, sans ambiguïté, de l’existence de reprogrammations directes.

La mise en évidence de reprogrammations directes chez les organismes complexes relève du challenge. Qu’elles soient naturelles ou induites, les transdifférenciations ne peuvent être confirmées que par l’utilisation d’outils de traçage cellulaire permettant de suivre le destin des cellules reprogrammées. Le système CRE-lox ERT2 offre la possibilité de suivre un groupe de cellules clonales (figure 9). Par exemple, un codon stop entre deux séquences Lox est placé avant un gène rapporteur (protéine fluorescente ou β -galactosidase). La CRE-ERT2 sous le contrôle d’un promoteur spécifique pourra être exprimée de façon transitoire (par induction au tamoxifène) et exciser le codon stop : les cellules cibles seront désormais marquées et traçables (un système similaire est utilisé chez la drosophile avec le système flipase-FRT).

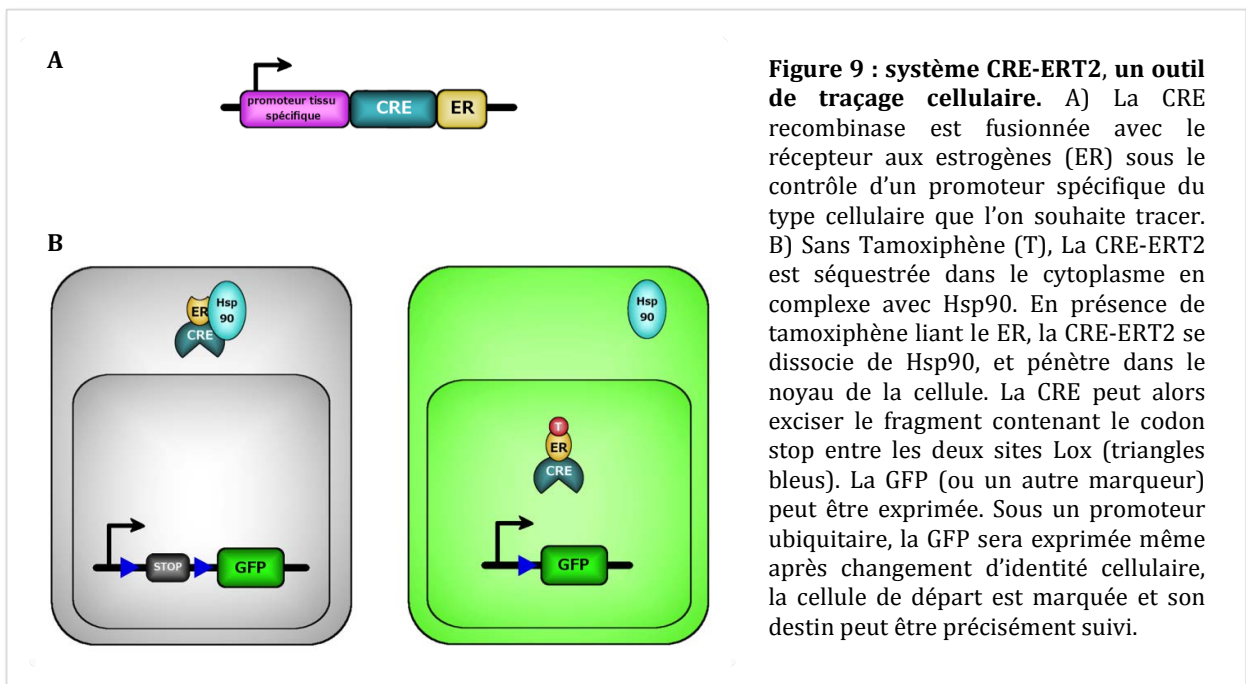


Figure 9 : système CRE-ERT2, un outil de traçage cellulaire. A) La CRE recombinase est fusionnée avec le récepteur aux estrogènes (ER) sous le contrôle d’un promoteur spécifique du type cellulaire que l’on souhaite tracer. B) Sans Tamoxiphène (T), La CRE-ERT2 est séquestrée dans le cytoplasme en complexe avec Hsp90. En présence de tamoxiphène liant le ER, la CRE-ERT2 se dissocie de Hsp90, et pénètre dans le noyau de la cellule. La CRE peut alors exciser le fragment contenant le codon stop entre les deux sites Lox (triangles bleus). La GFP (ou un autre marqueur) peut être exprimée. Sous un promoteur ubiquitaire, la GFP sera exprimée même après changement d’identité cellulaire, la cellule de départ est marquée et son destin peut être précisément suivi.

Cependant, cette méthode de traçage largement utilisée dans de nombreuses publications de reprogrammations directes induites ne permet pas d'exclure les évènements de fusion cellulaire si il n'existe pas de moyen de tracer également les cellules natives de l'identité cible.

3) Les reprogrammations directes induites chez l'homme et la souris

Je ne détaillerai pas ici tous les types de conversions et les facteurs utilisés pour y parvenir (pour plus de détails voir tableau 1 et 2 et poster des pages suivantes).

J'aborderai les différentes méthodes d'expression des facteurs de reprogrammations et la nature de ces facteurs, les méthodes utilisées pour s'assurer de l'efficacité et de la qualité de la conversion directe. J'aborderai aussi les avantages et limites de ces approches pour de potentielles futures applications thérapeutiques.

3.1) Les facteurs de reprogrammations

La surexpression de FdT pour induire la conversion d'un type cellulaire en un autre a été très largement utilisée dans la grande majorité des études. Ces facteurs sont clés pour cibler et induire l'expression de gènes impliqués dans l'expression d'un programme lié à une identité précise. Les FdT de reprogrammations utilisés sont souvent des acteurs clés de la différenciation de certains tissus durant le développement (voir partie IV.2 de l'introduction qui détaille le rôle de FdT dans l'induction et le maintien de l'identité cellulaire).

Il existe d'autres types de facteurs utilisés désormais : des microARNs, des facteurs de régulation épigénétiques ou des petites molécules.

table 1 : conversions cellulaires directes induites chez la souris.

Origine théorique des cellules : mésodermique (jaune), endodermique (rouge), ectodermique (bleu), et annexes embryonnaires (gris)

Identité cellulaire cible (finale)	Identité cellulaire initiale	Facteurs de reprogrammation	<i>in vivo/in vitro</i>	Références
Myotubes	Fibroblastes	MyoD	<i>In vitro</i>	Davis <i>et al.</i> , 1987
Myotubes	Adipocytes	MyoD	<i>In vitro</i>	Weintraub <i>et al.</i> , 1989
Myotubes	Cellules pigmentées de la rétine	MyoD	<i>In vitro</i>	Choi <i>et al.</i> , 1990
Myotubes	Cellules de muscle lisse	MyoD	<i>In vitro</i>	Choi <i>et al.</i> , 1990
Myotubes	Chondroblastes	MyoD	<i>In vitro</i>	Choi <i>et al.</i> , 1990
Adipocytes (graisse brune)	Fibroblastes	Prdm16, C/EBPβ	<i>In vitro</i>	Kajimura <i>et al.</i> , 2009
Cardiomyocytes	Fibroblastes	Gata4, Hand2, Mef2c, Tbx5	<i>In vitro et in vivo</i>	Song <i>et al.</i> , 2012
Cardiomyocytes	Fibroblastes	miR-1, miR-133, miR-208, miR-499, JAK inhibiteur I	<i>In vitro et in vivo</i>	Jayawardena <i>et al.</i> , 2012
Cardiomyocytes	Fibroblastes	Gata4, Mef2c, Tbx5	<i>In vitro</i>	Ieda <i>et al.</i> , 2010
Cardiomyocytes	Fibroblastes	Hand2, Nkx2.5, Gata4, Mef2c, Tbx5	<i>In vitro</i>	Addis <i>et al.</i> , 2013
Cardiomyocytes	Fibroblastes	Mef2c, Myocd, Tbx5	<i>In vitro</i>	Protze <i>et al.</i> , 2012
Cardiomyocytes	Fibroblastes	Myocd, Srf, Mesp1, Gata4, Tbx5, Mef2C, Smarcd3	<i>In vitro</i>	Christoforou <i>et al.</i> , 2013
Cardiomyocytes	Fibroblastes	Gata4, Mef2c, Tbx5	<i>In vivo</i>	Qian <i>et al.</i> , 2012
Cardiomyocytes	Fibroblastes	Gata4, Mef2c, Tbx5	<i>In vivo</i>	Inagawa <i>et al.</i> , 2012
Cardiomyocytes	Fibroblastes	CHIR99021, RepSox, Forskolin, VPA, Parnate, TTNPB, Dznep	<i>In vitro</i>	Fu <i>et al.</i> , 2015
Cellules progénitrices hématopoïétiques	Fibroblastes	Erg, Gata2, Lmo2, Runx1c, Scl, p53(-/-)	<i>In vitro</i>	Batta <i>et al.</i> , 2014
Macrophages	Fibroblastes	PU.1, C/EBPα ou C/EBPβ	<i>In vitro</i>	Feng <i>et al.</i> , 2008
Macrophages	Lymphocytes B, cellules pro et pré-B	C/EBPα	<i>In vitro</i>	Bussmann <i>et al.</i> , 2009
Erythrocytes, éosinophiles et mégacaryocytes	Cellules pro-B	Gata1	<i>In vitro</i>	Graf <i>et al.</i> , 1992
Macrophages, ostéoclastes, cellules dendritiques, granulocytes et cellules NK	Cellules pro-B	Pax5 (-/-) + cytokines	<i>In vitro</i>	Nutt <i>et al.</i> , 1999
Monocytes	Cellules souches neuronales	PU.1	<i>In vitro</i>	Forsberg <i>et al.</i> , 2010
Cellules Natural Killer	lymphocytes T	Bcl11b (-/-)	<i>In vivo</i>	Li <i>et al.</i> , 2010
Cellules de sertoli	Fibroblastes	Nr5a1, Wt1, Dmrt1, Gata4, Sox9	<i>In vitro</i>	Buganim <i>et al.</i> , 2012
Cellules de sertoli	Cellules de la granulosa	Foxl2 (-/-)	<i>In vivo</i>	Uhlenhaut <i>et al.</i> , 2009
Chondrocytes	Fibroblastes	Sox9, Klf4, c-Myc	<i>In vitro</i>	Hiramatsu <i>et al.</i> , 2011
Progéniteurs endothéliales hémogéniques	Fibroblastes	Gata2, Gfi1b, cFos, Etv6	<i>In vitro</i>	Pereira <i>et al.</i> , 2013
Cellules Endothéliales	Fibroblastes	Foxo1, Er71, Klf2, Tal1, Lmo2	<i>In vitro</i>	Han <i>et al.</i> , 2014
Astrocytes	Fibroblastes	Nfia, Nfib, Sox9	<i>In vitro</i>	Caiazzo <i>et al.</i> , 2014
Neuroblastes	Fibroblastes	Brn2, Sox2, FoxG1	<i>In vitro</i>	Lujan <i>et al.</i> , 2012

Identité cellulaire cible (finale)	Identité cellulaire initiale	Facteurs de reprogrammation	<i>in vivo/in vitro</i>	Références
Neuroblastes	Fibroblastes	VPA, CHIR99021, RepSox (616452) sous hypoxie	<i>In vitro</i>	Cheng <i>et al.</i> , 2014
Neuroblastes	Astrocytes	miR-302/367 + VPA (inhibiteur d'histones déacetylases)	<i>In vitro et in vivo</i>	Ghasemi-Kasman <i>et al.</i> , 2015
Neuroblastes	Astrocytes	Sox2	<i>In vivo</i>	Niu <i>et al.</i> , 2013
Cellules souches neuronales	Fibroblastes	Brn4, Sox2, Klf4, c-Myc, E47	<i>In vitro</i>	Han <i>et al.</i> , 2012
Cellules souches neuronales	Fibroblastes	Sox2, Klf4,c-Myc + Oct4 (exprimé les cinq 1ers jours seulement)	<i>In vitro</i>	Thier <i>et al.</i> , 2012
Cellules souches neuronales	Fibroblastes	Sox2	<i>In vitro</i>	Ring <i>et al.</i> , 2012
Cellules souches neuronales	Cellules de Sertoli	Ascl1, Ngn2, Hes1, Id1, Pax6, Brn2, Sox2, c-Myc, Klf4	<i>In vitro</i>	Sheng <i>et al.</i> , 2012b
Neurones	Hépatocytes	Ascl1, Brn2, Myt1l	<i>In vitro</i>	Marro <i>et al.</i> , 2011
Neurones	Fibroblastes	répression de PTB	<i>In vitro</i>	Xue <i>et al.</i> , 2013
Neurones	Fibroblastes	Ascl1	<i>In vitro</i>	Chanda <i>et al.</i> , 2014
Neurones	Fibroblastes	Forskolin, CHIR99021, ISX9, I-BET151	<i>In vitro</i>	Li <i>et al.</i> , 2015
Neurones	Astrocytes	Ascl1, Brn2, Myt1l	<i>In vivo</i>	Torper <i>et al.</i> , 2013
Précurseurs neuronaux (dopaminergiques)	Fibroblastes	Brn2, Sox2, Foxa2	<i>In vitro</i>	Tian <i>et al.</i> , 2015
Neurones (dopaminergiques)	Fibroblastes	Ascl1, Pitx3, Lmx1a, Nurr1, Foxa2, EN1	<i>In vitro</i>	Kim <i>et al.</i> , 2011b
Neurones (dopaminergiques)	Fibroblastes	Ascl1, Lmx1a, Nurr1	<i>In vitro</i>	Caiazzo <i>et al.</i> , 2011
Neurones (dopaminergiques)	Fibroblastes	Lmx1a, Foxa2, Ascl1, Brn2 ou Lmx1b, Otx2, Nurr1, Ascl1, Brn2	<i>In vitro</i>	Sheng <i>et al.</i> , 2012a
Neurones (GABAergiques)	Fibroblastes	Foxg1, Sox2, Ascl1, Dlx5, Lhx6	<i>In vitro et in vivo</i>	Colasante <i>et al.</i> , 2015
Neurones (GABAergiques)	Astrocytes	Ascl1, Dlx2	<i>In vitro</i>	Heinrich <i>et al.</i> , 2010
Neurones (glutaminergiques et GABAergiques)	Progéniteurs oligodendrocyte (NG2)	NeuroD1	<i>In vivo</i>	Guo <i>et al.</i> , 2014
Neurones (glutaminergiques)	Astrocytes	NeuroD1	<i>In vivo</i>	Guo <i>et al.</i> , 2014
Neurones (glutaminergiques)	Fibroblastes	Ascl1, Brn2, Myt1l	<i>In vitro</i>	Vierbuchen <i>et al.</i> , 2010
Neurones (glutaminergiques)	Astrocytes	Ngn2	<i>In vitro</i>	Heinrich <i>et al.</i> , 2010
Neurones moteurs spinaux	Fibroblastes	Brn2, Ascl1, Myt1l, Lhx3, Hb9, Isl1, Ngn2	<i>In vitro</i>	Son <i>et al.</i> , 2011
Neurones à projection corticofugal (couche V/VI du cortex cérébral)	Neurones à projection calosale (couche II/III du callosum)	Fezf2	<i>In vivo</i>	Rouaux et Arlotta, 2013
Neurones striataux	Fibroblastes	Bcl11B, Dlx1, Dlx2, Myt1l, miR9/9*,miR124	<i>In vitro</i>	Victor <i>et al.</i> , 2014
Neurones de ganglion de la rétine	Fibroblastes	Ascl1, Brn2, Ngn2	<i>In vitro</i>	Meng <i>et al.</i> , 2013
Progéniteurs oligodendrocytes	Fibroblastes	Olig1, Olig2, Nkx2.2, Nkx6.2, Sox10, ST18, Gm98, Myt1	<i>In vitro</i>	Najm <i>et al.</i> , 2013
Oligodendrocytes	Fibroblastes	Sox10, Olig2, Zfp536	<i>In vitro</i>	Yang <i>et al.</i> , 2013

Identité cellulaire cible (finale)	Identité cellulaire initiale	Facteurs de reprogrammation	<i>in vivo/in vitro</i>	Références
Cellules cônes	Bâtonnets photorecepteurs	Nrl (-/-)	<i>In vivo</i>	Montana <i>et al.</i> , 2013
Mélanocytes	Fibroblastes	Mitf, Sox10, Pax3	<i>In vitro</i>	Yang <i>et al.</i> , 2014
Cellules pancréatiques des îlot de Langerhans	Progéniteurs hépatiques	Ngn3	<i>In vivo</i>	Yehoor <i>et al.</i> , 2013
Cellules α pancréatiques	Cellules β pancréatiques	suppression de Dnmt1	<i>In vivo</i>	Dhawan <i>et al.</i> , 2011
Cellules α pancréatiques	Cellules acineuses pancréatiques	Ngn3, MafA	<i>In vivo</i>	Li <i>et al.</i> , 2014b
Cellules β pancréatiques	Cellules acineuses pancréatiques	Ngn3, Pdx1, MafA	<i>In vivo</i>	Zhou <i>et al.</i> , 2008
Cellules δ pancréatiques	Cellules acineuses pancréatiques	Ngn3	<i>In vivo</i>	Li <i>et al.</i> , 2014b
Cellules épithéliales Thymiques	Fibroblastes	Foxn1	<i>In vitro</i>	Bredenkamp <i>et al.</i> , 2014
Cellules souches hépatiques	Fibroblastes	Hnf1b, Foxa3	<i>In vitro</i>	Yu <i>et al.</i> , 2013
Hépatocytes	Fibroblastes	Gata4, Hnf1a, Foxa3, P19ARF(-/-)	<i>In vitro</i>	Huang <i>et al.</i> , 2011
Hépatocytes	Fibroblastes	Hnf4a + Foxa1, Foxa2 ou Foxa3	<i>In vitro</i>	Sekiya et Suzuki, 2011
Cellules souches du trophoblaste	Fibroblastes	Gata3, Eomes, TFap2c	<i>In vitro</i>	Benchetrit <i>et al.</i> , 2015

table 2 : conversions cellulaires directes induites chez l'homme.

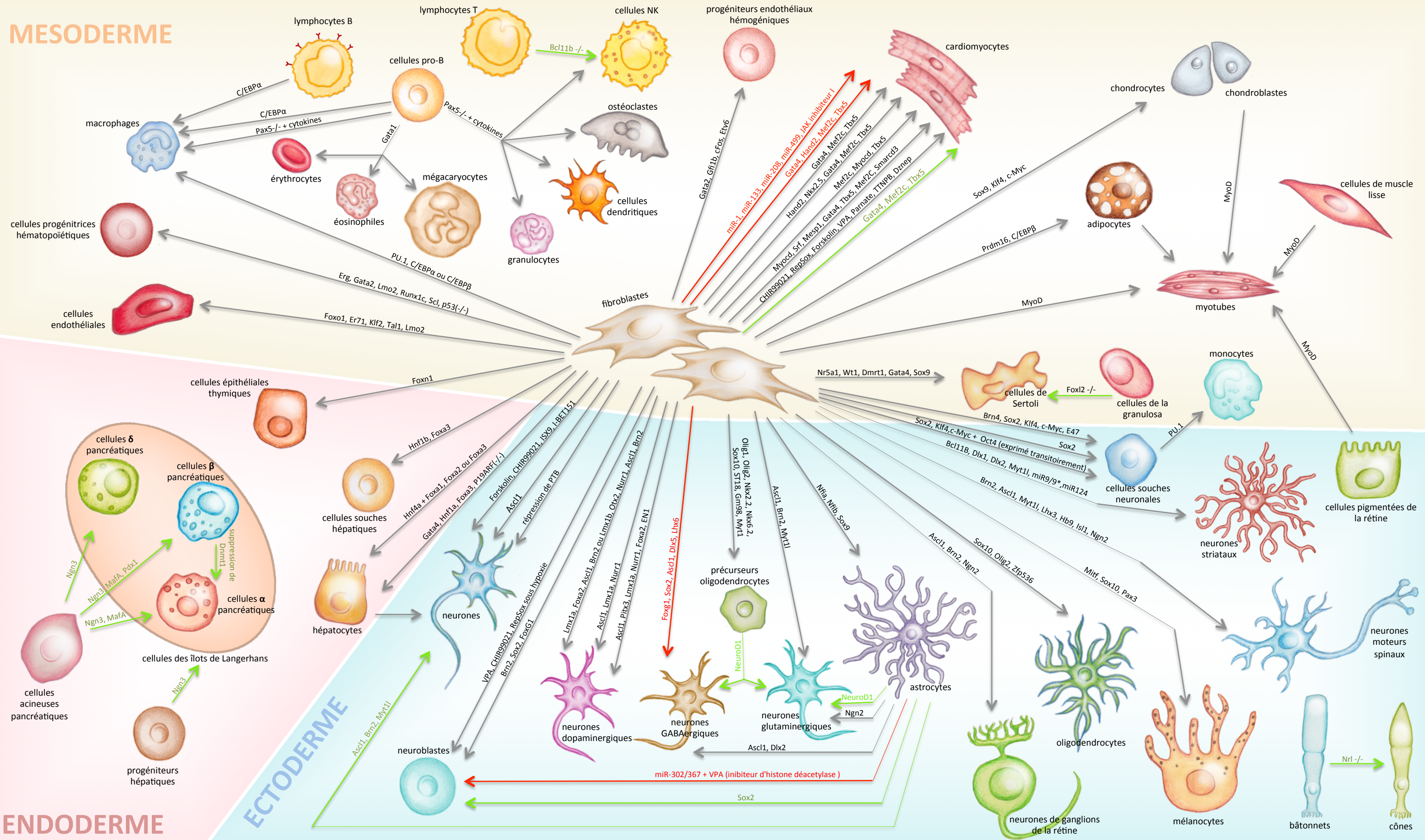
Origine théorique des cellules : mésodermique (jaune), endodermique (rouge), ectodermique (bleu), et annexes embryonnaires (gris)

Identité cellulaire cible (finale)	Identité cellulaire initiale	Facteurs de reprogrammation	<i>in vivo/in vitro</i>	Références
Adipocytes (graisse brune)	Fibroblastes	PRDM16, C/EBPβ	<i>In vitro</i>	Kajimura <i>et al.</i> , 2009
Progéniteurs multipotents haematopoïétiques	Cellules endothéliales	FOSB, GFI1, RUNX1, SPI1	<i>In vitro</i>	Sandler <i>et al.</i> , 2014
Progéniteurs haematopoïétiques	Fibroblastes	OCT4	<i>In vitro</i>	Szabo <i>et al.</i> , 2010
Progéniteurs cardiaques	Fibroblastes	ETS2, MESP1	<i>In vitro</i>	Islas <i>et al.</i> , 2012
Cardiomyocytes	Fibroblastes	GATA4, HAND2, MYOCD, TBX5, miR-1, miR-133	<i>In vitro</i>	Nam <i>et al.</i> , 2013
Cardiomyocytes	Fibroblastes	GATA4, MEF2C, TBX5, MYOCD, MESP1	<i>In vitro</i>	Wada <i>et al.</i> , 2013
Cardiomyocytes	Fibroblastes	GATA4, MEF2C, TBX5, ESRRG, MESP1, Myocardin, ZFPM2	<i>In vitro</i>	Fu <i>et al.</i> , 2013
Progéniteurs de monocyte	Fibroblastes	SOX2, miR-125b	<i>In vitro</i>	Pulecio <i>et al.</i> , 2014
Progéniteurs néphrétiques	Lignée cellulaire du tube proximal reinal (HK2)	SIX1, SIX2, OSR1, EYA1, HOXA11, SNAI2	<i>In vitro</i>	Hendry <i>et al.</i> , 2013
Ostéoblastes	Fibroblastes	OCT9, C-MYC	<i>In vitro</i>	Mizoshiri <i>et al.</i> , 2015
Astrocytes (immature)	Fibroblastes	NFIA, NFIB, SOX9	<i>In vitro</i>	Caiazza <i>et al.</i> , 2014
Cellules souches limbales de la cornée	cellules souches épithéliales de peau	PAX6	<i>In vitro</i>	Ouyang <i>et al.</i> , 2014
Mélanocytes	Fibroblastes	MITF, SOX10, PAX3	<i>In vitro</i>	Yang <i>et al.</i> , 2014
Cellules de la crête neurale	Fibroblastes	SOX10	<i>In vitro</i>	Kim <i>et al.</i> , 2014
Cellules souches neuronales	Fibroblastes	SOX2	<i>In vitro</i>	Ring <i>et al.</i> , 2012
Neuroblastes	Astrocystes	miR-302/367	<i>In vitro</i>	Ghasemi-Kasman <i>et al.</i> , 2015

Identité cellulaire cible (finale)	Identité cellulaire initiale	Facteurs de reprogrammation	<i>in vivo/in vitro</i>	Références
Neurones	Fibroblastes	ASCL1, NGN2, CHIR99021, SB431542	<i>In vitro</i>	Ladewig <i>et al.</i> , 2012
Neurones immatures	Fibroblastes	ASCL1	<i>In vitro</i>	Chanda <i>et al.</i> , 2014
Neurones	Fibroblastes	miRNA-302/367, miRNA-9/9*, miRNA-124	<i>In vitro</i>	Zhou <i>et al.</i> , 2015
Neurones	Péricytes	SOX2, ASCL1	<i>In vitro</i>	Karow <i>et al.</i> , 2012
Neurones (dopaminergique)	Fibroblastes	ASCL1, BRN2, MYT1L, LMX1A, FOXA2	<i>In vitro</i>	Pfisterer <i>et al.</i> , 2011
Neurones (dopaminergique)	Fibroblastes	ASCL1, LMX1A, NURRL	<i>In vitro</i>	Caiazza <i>et al.</i> , 2011
Neurones (dopaminergique)	Fibroblastes	MASH1, NGN2, SOX2, NURR1, PITX3	<i>In vitro</i>	Liu <i>et al.</i> , 2012
Neurones (glutaminergiques)	Fibroblastes	ASCL1, BRN2, MYT1L, NEUROD1	<i>In vitro</i>	Pang <i>et al.</i> , 2011
Neurones (glutaminergiques)	Fibroblastes	BRN2, MYT1L, miR-124	<i>In vitro</i>	Ambasudhan <i>et al.</i> , 2011
Neurones (glutaminergiques)	Fibroblastes	Forskolin, Dorsomorphin (NGN2 ?)	<i>In vitro</i>	Liu <i>et al.</i> , 2013
Neurones (glutaminergiques et GABAergiques)	Fibroblastes	ASCL1, MYT1L, NEUROD2, miR-9/9*, miR-124	<i>In vitro</i>	Yoo <i>et al.</i> , 2011
Neurones moteurs	Fibroblastes	BRN2, ASCL1, MYT1L, LHX3, HB9, ISL1, NGN2	<i>In vitro</i>	Son <i>et al.</i> , 2011
Neurones striataux	Fibroblastes	BCL11B, DLX1, DLX2, MYT1L, miR9/9*,miR124	<i>In vitro</i>	Victor <i>et al.</i> , 2014
Cellules épithéliales pigmentaires de la rétine	Fibroblastes	PAX6, RAX, CRX, MITF-A, OTX2, NRL, KLF4, C-MYC, Activine A ou RA + traitement Shh aux stades	<i>In vitro</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2014
Cellules de glande sudoripare	Fibroblastes	NF-κB, LEF1	<i>In vitro</i>	Lemper <i>et al.</i> , 2015
Cellules β pancréatiques	Hépatocytes	PDX1, NGN3, MAFA	<i>In vitro</i>	Iu <i>et al.</i> , 2014
Cellules β pancréatiques	Hépatocytes	miRNA-302	<i>In vitro</i>	Iu <i>et al.</i> , 2014
Cellules β pancréatiques	Cellules acineuses pancréatiques	MAPK activée, STAT3	<i>In vitro</i>	Lemper <i>et al.</i> , 2014
Cellules endothéliales	Fibroblastes	FOXA3, GATA4, HNF1A	<i>In vitro</i>	Li <i>et al.</i> , 2013
Cellules endothéliales	Fibroblastes	Poly I:C + conditions de culture (FGF, VEGF, protéine BMP-4 + 8-Br-cAMP)	<i>In vitro</i>	Sayed <i>et al.</i> , 2015
Cellules endothéliales	Cellules amniotiques	ETV2, FLI1, ERG1 (+ inhibition de TGFβ)	<i>In vitro</i>	Ginsberg <i>et al.</i> , 2012
Hépatocytes	Fibroblastes	HNF1A, HNF4A, HNF6, CEBPA, ATF5, PROX1, C-MYC (+ inhibition de p53)	<i>In vitro</i>	Du <i>et al.</i> , 2014
Hépatocytes	Fibroblastes	HNF1A, HNF4A, FOXA3, SV40, antigène T	<i>In vitro</i>	Huang <i>et al.</i> , 2014

Conversions cellulaires directes induites réalisées chez la souris

MESODERME



POSTER : Reprogrammations directes induites chez la souris, réalisées *in vitro* (flèches grises), directement *in vivo* (flèches vertes, conversions *in vivo* et non transplantations post-reprogrammation *in vitro*), ou les deux (flèches rouges). Les facteurs, microARN, petites molécules ou délétions de gènes nécessaires à la conversion d'un type cellulaire en un autre sont indiqués sur chaque flèche. L'origine théorique des cellules est indiquée par un fond jaune pour les cellules d'origine mésodermique, un fond bleu pour les cellules d'origine ectodermique et un fond rose pour les cellules d'origine endodermique. Pour plus d'informations (références bibliographiques), voir le tableau 1.

- **Les facteurs remodelleurs de la chromatine**

Comme nous avons pu le voir dans les parties précédentes, la spécialisation d'une cellule dépend de l'expression de FdT spécifiques mais également du remodelage de la chromatine. Déjà identifiés pour améliorer l'efficacité de transformation en cellules IPS (voir partie II.1), les modificateurs de la chromatine jouent également un rôle important dans les reprogrammations directes. Le changement d'identité implique également des transitions entre différents états de la chromatine. Certaines études ont mis en lumière des FdT essentiels pour la conversion en un type cellulaire cible, mais cette reprogrammation est facilitée en activant ou supprimant l'expression de remodelleurs de la chromatine.

Chez la souris, durant la différenciation cardiaque, le complexe modificateur de la chromatine BAF est enrichi dans le mésoderme pré-cardiaque. Une équipe américaine a postulé que ce complexe faciliterait l'accès aux séquences cibles des FdT de spécification (TAKEUCHI and BRUNEAU 2009). En forçant l'expression des FdT cardiaques *Tbx5*, *Nkx2-5* et *Gata4* ainsi que *Baf60c* (membre du complexe BAF) durant l'embryogenèse et la formation du cœur, le marqueur de différenciation cardiaque *Actc* est détecté précocement dans le tissu précardiaque. Plus surprenant, des cellules mésodermiques non-cardiaques expriment désormais le marqueur *Actc*. Mobiliser le complexe BAF pourrait permettre aux FdT un accès rapide à leurs gènes cibles dans les cellules déjà engagées dans le destin cardiaque, mais aussi dans des cellules destinées à une tout autre spécification.

Il est même possible d'induire une conversion cellulaire directe en modulant seulement l'expression d'un facteur épigénétique. Les identités de certains types cellulaires proches peuvent être interverties par la suppression/l'activation d'un seul facteur (voir partie mécanismes IV). Le FdT *Arx* est garant du maintien de l'identité des cellules pancréatiques Alpha. La seule suppression de *Dnmt1* (une ADN

méthyltransférase) dans les cellules pancréatiques Beta permet une réexpression de Arx et induit la conversion en type Alpha (DHAWAN *et al.* 2011).

- **Les microARNs**

Les microARNs sont depuis quelques années de nouveaux acteurs clés de la reprogrammation directe. L'inhibition du régulateur de microARNs PTB peut à elle seule générer la conversion de fibroblastes en neurones induits (iN) fonctionnels. Ici, la mutation de PTB permet la dérégulation de gènes neuronaux régulés par des microARNs (XUE *et al.* 2013).

La surexpression de microARNs peut également induire des reprogrammations directes. Les microARNs peuvent potentiellement cibler plusieurs voies de signalisation simultanément. miR-9/9* et miR-124 contrôlent une multitude de gènes régulateurs de la différenciation neuronale. La seule expression de miR-9/9* et miR-124 peut induire la conversion de fibroblastes humains en iN, un processus facilité par l'expression conjointe de NEUROD2. Ces iN restent cependant immatures, l'expression de FdT supplémentaires (*ASCL1* et *MYT1L*) assure une plus grande efficacité de conversion et une maturation plus poussée (Yoo *et al.* 2011). Ici le rôle de ces microARNs semble lié au contrôle d'un remodelleur de la chromatine : miR-9* et miR-124 opèrent un changement de composition du complexe BAF, un processus important pour la différenciation neuronale. miR-124 régule également directement l'expression de Ezh2, une H3 Lys-27 histone méthyltransférase, ce qui facilite l'expression de gènes neuronaux cibles (NEO *et al.* 2014).

La reprogrammation de fibroblastes en cardiomyocytes induits (iC) peut être induite par l'expression d'un seul microARN : miR-1 (JAYAWARDENA *et al.* 2012). L'addition de miR-133, miR-208, et miR-499 augmente significativement l'efficacité de la reprogrammation et assure une conversion cellulaire *in vitro* et *in vivo*. Ces microARNs ont été sélectionnés pour leurs implications dans le développement et la différenciation du muscle cardiaque, mais leurs cibles et les mécanismes impliqués restent inconnus.

En ciblant des transcrits spécifiques, la surexpression de microARNs pourrait participer à éteindre certains programmes d'identité cellulaire. miR-124a est un

microARNs spécifique des cellules neuronales, il abaisse le niveau de centaines de transcrits non neuronaux lorsque qu'il est exprimé dans des cellules non neuronales (LIM *et al.* 2005). Les gènes neuronaux clés pourraient alors prendre le dessus et convertir la cellule en iN.

- **Les petites molécules**

Les petites molécules ont été largement utilisées pour la reprogrammation en cellules IPS (LI *et al.* 2013b). Il est même possible d'utiliser uniquement des petites molécules pour induire la conversion (HOU *et al.* 2013). Ces dernières années, des reprogrammations directes ont été possibles avec l'utilisation de petites molécules associées avec des FdT ou seules avec des conditions de culture particulières.

L'expression de ASL1 et de NGN2 associés aux molécules CHIR99021 et SB431542 reprogramme des fibroblastes humains en neurones (LADEWIG *et al.* 2012). La combinaison de plusieurs petites molécules (VPA, RepSox (616452), CHIR99021) en condition d'hypoxie permet la conversion de fibroblastes murins en progéniteurs neuronaux (CHENG *et al.* 2014). En essayant de reproduire l'induction de cellules IPS avec les petites molécules utilisées dans la publication de Hou *et al.*, (2013), une équipe chinoise eut la surprise de reprogrammer des fibroblastes en iCM avec le même cocktail (CHIR99021, RepSox, Forskolin, VPA, Parnate, TTNPB, Dznep) (FU *et al.* 2015).

Les mécanismes impliqués dans ces reprogrammations restent mystérieux. Ces composés sont connus pour agir sur certaines voies de signalisation : RepSox inhibe la voie TGF β , CHIR99021 est un inhibiteur de GSK3 et induit l'activation de la voie Wnt. L'inhibition de la voie TGF β et l'activation de la voie Wnt jouent un rôle important dans la reprogrammation et la différenciation en cardiomyocytes. D'autres molécules jouent un rôle moins spécifique en agissant sur la production d'AMPc intracellulaire (Forskolin, Rolipram et Cilomilast).

3.2) Les outils utilisés pour l'expression des facteurs de reprogrammation.

L'expression des FdT se fait le plus souvent via des vecteurs rétroviraux qui s'intègrent dans le génome de la cellule hôte. Cette intégration aléatoire dans le génome pose problème en cas d'insertion dans un oncogène. Aucun risque ne peut être pris concernant la production de cellules destinées à être implantées dans un patient (où même d'induire la reprogrammation directement *in vivo* par le biais de ces vecteurs)

Certaines études reproduisent des conversions cellulaires directes en utilisant des vecteurs non intégratifs comme des adénovirus (CAVELTI-WEDER *et al.* 2014; KIM *et al.* 2015a) ou des plasmides (LU *et al.* 2014). D'autres injectent les protéines directement dans le cytoplasme des cellules (BICHSEL *et al.* 2013). Chez la souris, des travaux récents ont décrit l'induction d'une transdifférenciation de cellules de Clara (cellules épithéliales sécrétrices de mucus dans les voies aériennes) en cellules ciliées, ceci directement *in vivo* en utilisant des anticorps antagonistes de la voie Notch (LAFKAS *et al.* 2015).

Les microARNs peuvent être délivrés sous forme modifiée par injection intraveineuse (ELMEN *et al.* 2008). Selon leurs natures, les petites molécules peuvent pénétrer les membranes cellulaires. Elles présentent une solution à moindre coût, facile à synthétiser et standardisées. Leur administration ne dépend pas d'un promoteur, elles peuvent être délivrées facilement à un moment précis (XU *et al.* 2015), c'est pourquoi un nombre croissant de nouvelles études s'intéressent à leurs propriétés pour convertir nos cellules.

3.3) Évaluation de l'identité finale après reprogrammation induite

La plupart de ces études présentent leurs reprogrammations directes comme complètes. Cependant, certaines publications soumettent des analyses incomplètes pour réellement affirmer que la transformation en cellules cibles est comparable en tout point avec les cellules natives de même identité.

Toutes les études de reprogrammation directes répertoriées dans le tableau 1 identifient les cellules induites par l'expression de gènes spécialisés, clés pour attester précisément de l'identité cible (via marqueur d'expression, immunomarquage, QRT-PCR

et/ou analyses FACS). L'absence d'expression de gènes spécifiques de l'identité originelle est également confirmée par les mêmes méthodes. La vérification de ce non-mélange des deux identités initiales et finales manque à la publication sur MyoD (DAVIS *et al.* 1987) qui n'a pas évalué l'éventuelle persistance de marqueurs fibroblastiques. On pardonnera à H. Weintraub cet oubli au vu de l'aspect novateur de cette première reprogrammation directe induite, par contre on sera moins clément avec l'étude de Bichsel et ses collaborateurs, qui ne prennent pas la peine de mesurer l'expression de gènes fibroblastiques dans les myoblastes induits obtenus (BICHSEL *et al.* 2013).

Les études les plus probantes ne se fient pas seulement à des marqueurs ou des ressemblances morphologiques, elles réalisent des tests fonctionnels poussés sur les cellules induites. Les iN les plus matures subissent une série d'examen attestant d'un potentiel d'action, de la compétence des synapses et de la libération de certains neurotransmetteurs précis (VIERBUCHEN *et al.* 2010; KIM *et al.* 2011; COLASANTE *et al.* 2015). Les iCM sont également testés pour leur potentiel d'action, les flux de Ca⁺ aux seins des cellules, leurs battements spontanés (IEDA *et al.* 2010; SONG *et al.* 2012; ADDIS *et al.* 2013). Les macrophages induits sont évalués pour leur capacité à phagocyter des bactéries et leurs réponses inflammatoires (FENG *et al.* 2008; BUSSMANN *et al.* 2009). Les cellules endocrines pancréatiques induites seront considérées comme fonctionnelles avec la production d'insuline (Cellules β), de glucagon (Cellules α) ou de somatostatine (Cellules δ) (ZHOU *et al.* 2008; DHAWAN *et al.* 2011; LI *et al.* 2014). Les mélanocytes induits produisent du pigment et le transfèrent aux kératinocytes environnant (YANG *et al.* 2014b).

Dans l'optique d'une application thérapeutique, des publications testent la fonctionnalité des cellules reprogrammées soit par transplantation des cellules induites, soit par conversion directement *in vivo* chez la souris. Par exemple, Ieda *et al.* transplantent les iCM *in vivo* et observent leur bonne intégration au muscle cardiaque, la persistance de marqueurs cardiaques et la présence de sarcomères (IEDA *et al.* 2010). Qian *et al.* convertissent *in vivo* directement des fibroblastes cardiaques en iCM. Après purification de ces iv-iCM, ils mesurent un potentiel d'action comparable à celui des cardiomyocytes natifs. Les iv-iCM semblent fonctionnels car ils se contractent *in vivo*. Dans cette étude, les potentielles applications en médecine régénérative sont

probantes : la reprogrammation se fait à la suite d'une simulation d'infarctus (mimée par la ligature de l'artère coronaire), le volume de sang passant dans le ventricule blessé augmente significativement après la reprogrammation des fibroblastes cardiaques en iCM (QIAN *et al.* 2012).

À la suite de lésions cérébrales et dans un modèle animal de la maladie d'Alzheimer, la conversion directement *in vivo* de cellules gliales en neurones est possible par l'induction de l'expression d'un seul facteur : NeuroD1. Les astrocytes exprimant NeuroD1 sont reprogrammés en neurones glutamatergiques, les progéniteurs d'oligodendrocytes (NG2) exprimant NeuroD1 sont reprogrammés en neurones glutamatergiques et GABAergiques. Ces iv-iN présentent des réponses synaptiques laissant penser que ces neurones pourraient être intégrés au circuit neuronal local (GUO *et al.* 2014).

Les études *in vivo* et *in situ* sont indispensables pour confirmer que les cocktails de facteurs utilisés ne sont pas seulement capables d'activer quelques marqueurs, mais de produire des cellules fonctionnelles. J. Riddell et ses collègues ont même élaboré une méthode de criblage *in vivo* pour générer des Cellules Souches Hématopoïétiques induites (iHSC) fonctionnelles : les auteurs transplantent des cellules exprimant différents facteurs clés hématopoïétiques directement dans des souris irradiées et testent leurs efficacités de reprogrammation en analysant la capacité de ces iHSC à produire tous les types de cellules sanguines différenciées. Au final, cette étude démontre que 6 FdT (Hlf, Runx1t1, Pbx1, Lmo2, Zfp37, et Prdm5) sont nécessaires pour générer des iHSC capables de reconstituer le spectre entier des cellules sanguines *in vivo* (RIDDELL *et al.* 2014).

Ces études de reprogrammation directes *in vivo* ou par transplantation ne suivent malheureusement pas sur le long terme le devenir de ces cellules induites. Après les conversions *in vitro* certaines études vérifient la non expression de quelques facteurs de pluripotence (JAYAWARDENA *et al.* 2012; FU *et al.* 2015) ou de marqueurs d'autres identités (PROTZE *et al.* 2012), mais rien n'assure de la stabilité de ces cellules sur le long terme. Evaluer l'expression des quelques marqueurs discrets est d'ailleurs insuffisant pour pouvoir attester d'une complète reprogrammation et d'une totale extinction du programme initial. Un nombre croissant de publications réalisent des transcriptomes

(par micropuces) des cellules induites, comparés aux cellules natives de l'identité ciblée et aux cellules de départ. Il est important de noter qu'il s'agit de transcriptomes réalisés sur des populations de cellules, il est donc impossible de déceler un faible pourcentage de cellules qui auraient pu échapper à une complète conversion, ni même d'attester de l'homogénéité des cellules obtenues. Les analyses au niveau une cellule s'avèrent beaucoup plus précises mais ne sont utilisées que dans peu de publications (MARRO *et al.* 2011; RIDDELL *et al.* 2014).

Ces études attestent de fortes similitudes entre cellules induites et cellules natives et décrivent la forte baisse d'expression des gènes de l'identité initiale. Une étude indépendante a étudié et comparé des transcriptomes et autres données disponibles de certaines de ces études de reprogrammations directes. Cahan *et al.* ont développé un logiciel appelé CellNet qui compare et évalue la fiabilité de ces cellules reprogrammées (CAHAN *et al.* 2014). L'étude analyse la conversion de fibroblastes en iN *in vitro* (CAIAZZO *et al.* 2011) et iCM *in vitro* et après transplantation (IEDA *et al.* 2010). En ce qui concerne l'induction de iN, le logiciel met en lumière une expression des gènes fibroblastiques résiduelle encore bien présente dans ces neurones, malgré leur haut degré de fonctionnalité (figure 10A). Plus surprenant, certains réseaux de gènes cardiaques et pancréatiques seraient également anormalement surexprimés dans ces iN. Les FdT utilisés pour l'induction pourraient cibler d'autres programmes d'identité cellulaire. L'expression simultanée de plusieurs types cellulaires a été observée dans divers cancers (ZHANG *et al.* 2010) et n'est donc pas un fait à ignorer, elle se doit d'être corrigée avant toutes applications sur l'homme.

La conversion directe *in vitro* de iCM présente un autre problème : le programme fibroblastique semble correctement éteint mais certains réseaux de gènes cardiaques ne sont pas exprimés (figure 10B). Le logiciel propose certains FdT clés utiles à ajouter au cocktail pour induire l'expression de ces réseaux (comme Phb, Ankrd1 et Lrp1rc). Les iCM transplantés *in vivo* ont ensuite été purifiés et analysés. CellNet révèle que cette conversion *in situ* est nettement plus efficace : le programme fibroblastique est éteint et les réseaux de gènes cardiaques sont correctement activés (figure 10C). Ce résultat démontre que certains facteurs présents *in vivo* et l'interaction avec l'environnement permet une conversion plus complète.

CellNet décrit un fait surprenant : les reprogrammations de cellules ES en iN (ESC-iN) (ARNOLD *et al.* 2013) ou iCM (ESC-iCM) (CHRISTOFOROU *et al.* 2008) semblent activer plus efficacement le programme cardiaque (pour les ESC-iCM) ou neuronal (pour les ESC-iN) que les conversions cellulaires directes (figure 10D et E). Il est possible d'imaginer qu'une cellule pluripotente présente un état de la chromatine plus accessible pour ces FdT et assure un meilleur accès aux séquences cibles. Cette étude montre que ce n'est pas toujours le cas, certains FdT pionniers (voir chapitre IV) peuvent lier leurs séquences cibles malgré une accessibilité plus faible de la chromatine dans les fibroblastes. Cependant, les ESC-iN présentent une activation du programme glial après la conversion, démontrant que la différenciation à partir de ESC n'est pas parfaite non plus.

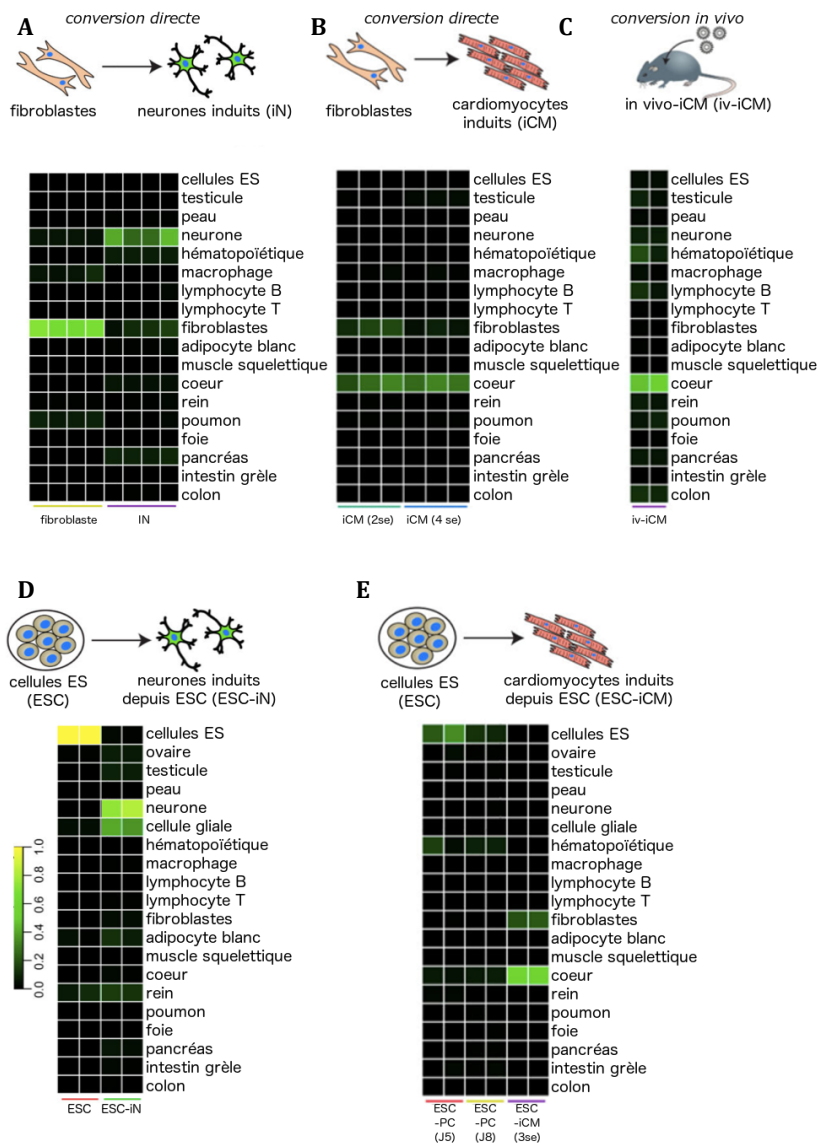


Figure 10 :
Analyse transcriptomique de conversions directes ou via des cellules ES (ESC). Analyse CellNet: cartes d'identité via l'analyse des gènes exprimés. A) Comparaison des programmes cellulaires activés dans les fibroblastes de départ puis dans les iN. Un programme fibroblastique demeure faiblement exprimé dans les iN. Un programme pancréatique s'active faiblement dans les iN B) Comparaison des programmes activés après 2 et 4 semaines d'induction en iCM. Le programme cardiaque s'allume, mais reste en dessous du niveau normal d'un cardiomyocyte natif. C) La transplantation des iCM *in vivo* (les convertissant en iv-iCM) active plus efficacement le programme cardiaque que la simple conversion directe *in vitro*. D) La différenciation en iN à partir de ESC active efficacement le programme neuronal. Cependant, un programme glial reste fortement exprimé. E) La différenciation en iCM à partir de ESC permet une activation efficace du programme cardiaque. Étrangement, le programme fibroblastique est également faiblement exprimé. (CAHAN *et al.* 2014)

Une autre étude compare des iN issus de reprogrammations directes ou via une étape pluripotente IPS (YANG *et al.* 2015). Ici les deux méthodes sont réalisées à partir des mêmes fibroblastes (issus de la queue de souris d'un an), par les mêmes expérimentateurs. L'observation des transcriptomes mène aux mêmes conclusions: la reprogrammation directe ne permet pas un total effacement de l'identité fibroblastique originelle. Les iN via une étape IPS présentent une plus grande similitude avec les neurones natifs. Cependant, des gènes impliqués dans la réponse au stress et aux dommages de l'ADN sont exprimés à un plus haut niveau dans les iN via IPS que dans les iN directement induits.

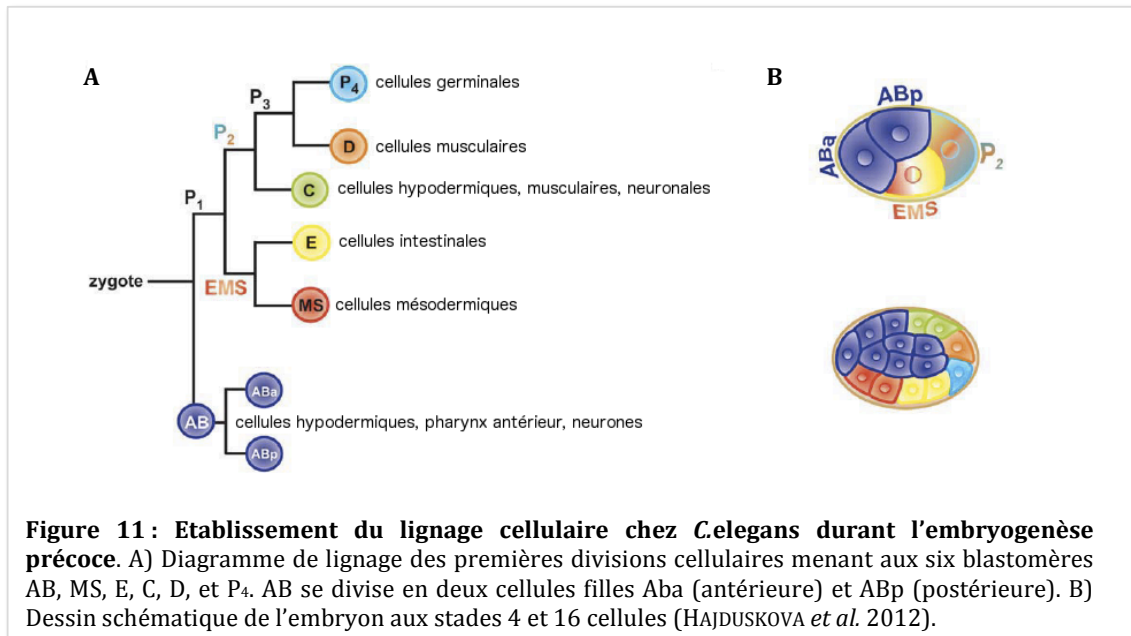
Les reprogrammations directes semblent plus sûres pour esquiver l'état pluripotent des cellules souches ES et IPS, mais les cellules induites avec les méthodes actuelles présentent des niveaux de reprogrammation incomplets, même dans les études les mieux réalisées, avec des tests fonctionnels très convaincants. Si un petit nombre de facteurs (ou petites molécules) permettent d'induire un changement d'identité, le cocktail suffisant pour induire une conversion cellulaire complète n'a pas encore été découvert. Une compréhension et une maîtrise des mécanismes semblent également essentielles pour imaginer un jour produire des cellules saines pour la médecine régénérative.

4) Les reprogrammations induites chez *Caenorhabditis elegans*

Ce petit nématode est un modèle facilement manipulable pour l'induction de reprogrammations directes *in vivo*, c'est pourquoi il a été utilisé dans l'étude de changements d'identité cellulaire dans un contexte physiologique.

C. elegans présentant un lignage cellulaire essentiellement invariant, les blastomères de l'embryon du ver sont déjà engagés dans des lignages cellulaires distincts après les premières divisions embryonnaires (GONCZY and ROSE 2005). Cinq divisions asymétriques génèrent six cellules fondatrices : AB, MS, E, C, D et P₄. Chacune de ces cellules suit un programme précis qui lui est propre pour assurer la formation des différents types cellulaires (figure 11). La plasticité de ces blastomères était considérée

comme très restreinte, mais plusieurs études ont réussi à démontrer qu'ils pouvaient être reprogrammés et changer complètement de programme de développement.



Le blastomère E (Endoderme) est le progéniteur clonale de tout l'intestin, cette identité est marquée par l'expression du gène déterminant *end-1* (un facteur GATA). Sous contrôle d'un promoteur « heat shock » (activé par un choc thermique) l'expression de ce facteur clé dans les blastomères AB, P et MS (blastomères qui ne produisent pas de cellules de l'endoderme) induit leur transformation en cellules endodermiques. L'expression ectopique de *end-1* parvient même à convertir des descendants de ces blastomères au stade 20-50 cellules, c'est à dire dans des cellules dont le destin était déjà fortement engagé. Par contre, la reprogrammation n'opère plus au-delà du stade 200 cellules (ZHU *et al.* 1998).

L'expression de gènes clés dans la différenciation de différents types cellulaires sera reproduite à différents stades du développement (grâce au contrôle par promoteur de chocs thermiques). Le FdT *hlf-1/MyoD* ou de *pal-1* peut convertir presque toutes les cellules de l'embryon au stade 100 cellules en cellules musculaires. Son induction dans les descendants de la lignée E exprimant déjà des marqueurs endodermiques les convertis en cellules musculaires (tout en éteignant le programme intestinal) (FUKUSHIGE and KRAUSE 2005). De la même façon, l'expression ectopique des facteurs GATA *elt-1* et *elt-3* induisent la conversion des blastomères en cellules épidermiques (GILLEARD and

MCGHEE 2001), et l'expression des facteurs GATA *med-1* et *med-2* est suffisante pour reprogrammer les blastomères non-EMS en cellules mésodermiques (MADURO *et al.* 2001). La conversion de blastomères en cellule de pharynx et en cellules épithéliales est induite par l'expression de *pha-4* et de *lin-26*, respectivement (HORNER *et al.* 1998; QUINTIN *et al.* 2001).

Dans toutes ces études, il est intéressant de noter que la reprogrammation par l'expression de facteurs clés est possible dans les blastomères et des progéniteurs durant l'embryogenèse, mais n'opère plus dans les stades embryonnaires plus tardifs et chez la larve. La plasticité des cellules de *C.elegans* est donc très rapidement limitée au cours du développement. L'équipe de J.H. Rothman est tout de même parvenue à reprogrammer des cellules différenciées adultes. En effet, la brève expression du facteur GATA *elt-7* peut convertir les cellules non endodermiques du pharynx en cellules intestinales complètement différenciées (RIDDLE *et al.* 2013).

D'autres études sont parvenues à redifférencier les cellules germinales en neurones ou cellules musculaires via l'expression ectopique de facteurs, mais uniquement en supprimant certains remodeleurs de la chromatine (études développées dans la partie IV.3).

III/ Les transdifférenciations naturelles

Nous avons vu que la manipulation artificielle de l'identité des cellules nécessite une meilleure compréhension des rouages moléculaires permettant d'opérer une conversion complète.

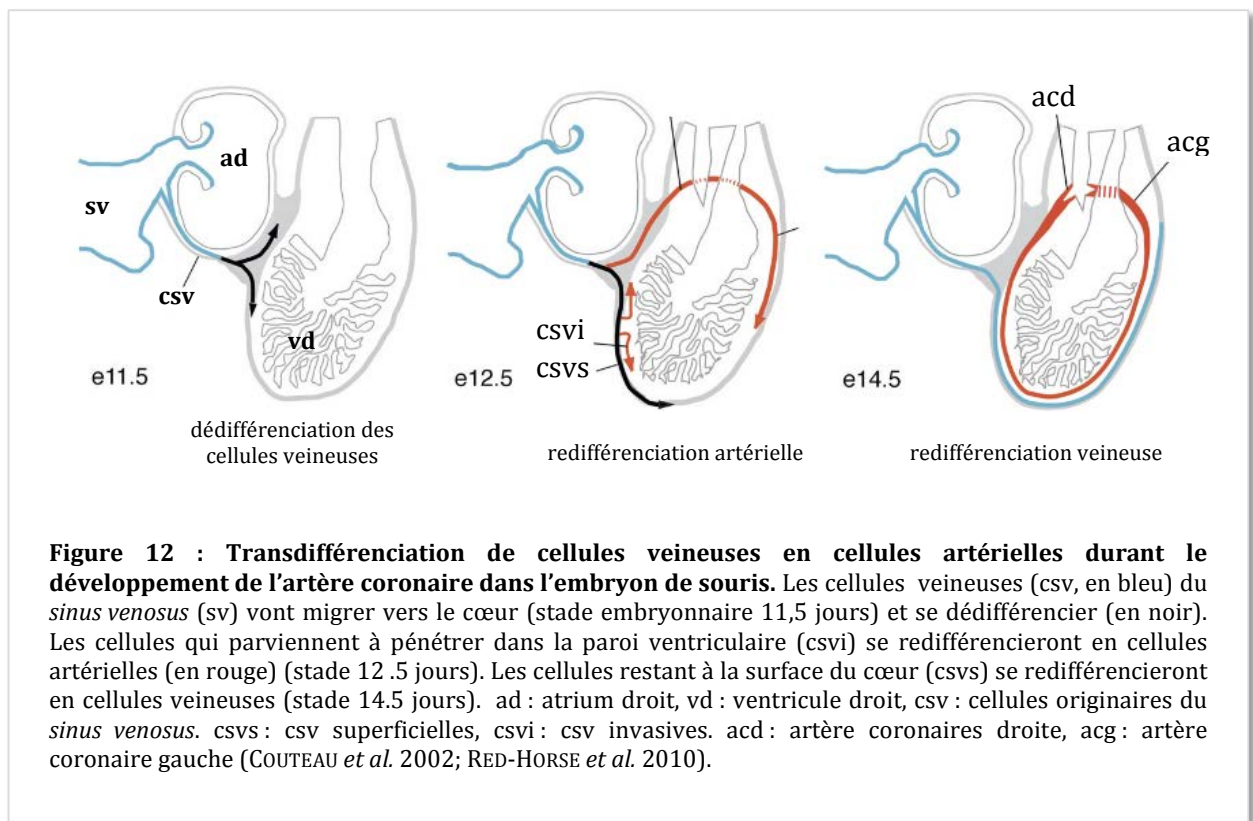
Les événements naturels de TD sont des processus très bien contrôlés par les organismes. Comme nous le verrons à la fin du chapitre suivant (IV, 3.3) et dans le chapitre V.2, la reprogrammation naturelle de la cellule épithéliale Y en motoneurone PDA chez *C. elegans* est un processus stable et soumis à de nombreux verrous pour assurer une reprogrammation sans faille, dans tous les vers sauvages. Quoi de mieux que des milliers d'années d'évolution pour parfaire des reprogrammations cellulaires parfaitement calibrées ? Ces reprogrammations directes naturelles sont invariantes,

reproductibles et sécurisées. Elles constituent d'excellents modèles d'étude pour élucider en détails les mécanismes de reprogrammations cellulaires directes.

Il existe peu d'exemples de TD naturelles référencés. Certaines TD se déroulent au cours du développement et de la différenciation des tissus (certaines cellules déjà spécialisées vont changer d'identité et participer à la construction d'un tissu différent), d'autres reprogrammations directes surviennent uniquement en cas de blessure (des cellules différenciées vont changer d'identité pour remplacer des cellules détruites), et enfin certaines TD s'opèrent pour répondre à un changement environnemental et fournir un nouveau type de tissus à partir de la transformation de cellules adultes d'identités différentes.

1) Les transdifférenciations naturelles au cours du développement

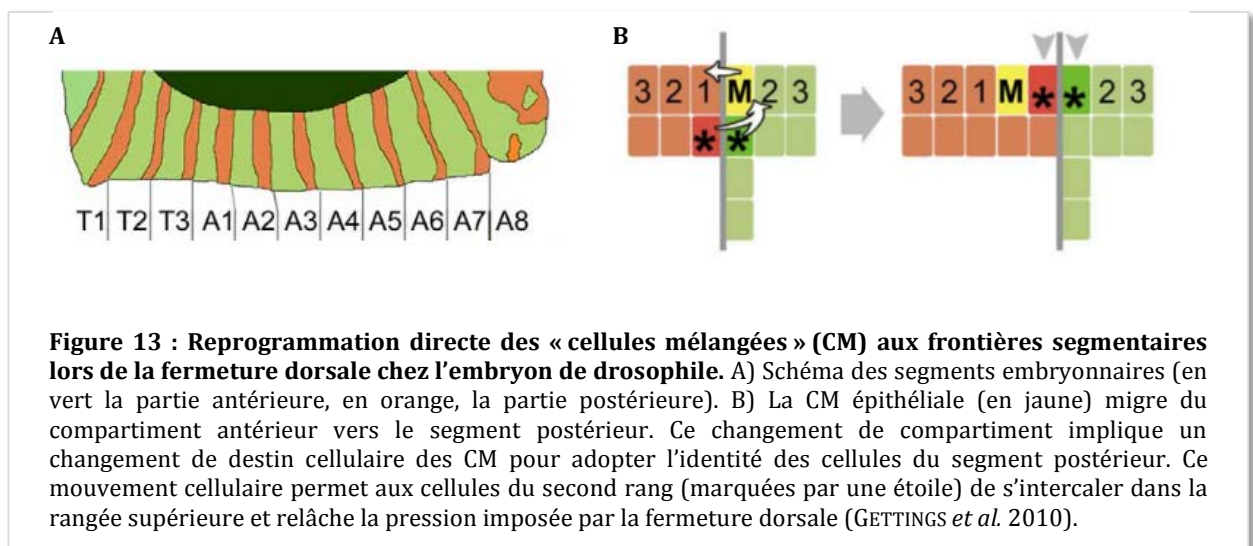
Rares sont les TD décrites chez les mammifères. Il existe cependant une reprogrammation directe prenant place au cours de la formation de capillaires cardiaques chez la souris. Les artères coronaires (assurant l'irrigation du muscle cardiaque) dérivent de la TD de cellules veineuses du *sinus venosus* (la veine principale qui ramène le sang circulant dans le cœur de l'embryon de souris). Cet événement a pu être décrit grâce au traçage cellulaire minutieux opéré via le système CRE-Lox. Les cellules endothéliales du *sinus venosus* se dédifférencient, migrent et envahissent les ventricules cardiaques. Les cellules qui pénétreront dans le muscle cardiaque seront reprogrammées en cellules artérielles (figure 12). Celles restant la surface des ventricules se redifférencieront en cellules veineuses (RED-HORSE *et al.* 2010). Il apparaît donc que certaines zones du cœur induisent une redifférenciation différente (en artère ou en veine). Cette migration cellulaire est fortement conditionnée par le facteur de croissance endothélial VEGF-C, mais les facteurs induisant la redifférenciation en cellules artérielles restent inconnus (CHEN *et al.* 2014).



Dans l'œil de la drosophile, une TD a été décrite dans une petite structure de l'œil impliquée dans le rythme circadien. Au stade adulte, cet organe photosensible est composé de quatre photorécepteurs exprimant une rhodopsine (un pigment protéique photosensible) sensible à la lumière verte (Rh6). Il a été montré que durant la métamorphose de la mouche, ces quatre cellules étaient issues de la conversion directe de cellules photoréceptrices à rhodopsine sensibles à la lumière bleue (Rh5). L'hormone ecdysone est indispensable à ce changement d'identité. Les mutants du récepteur à l'ecdysone n'opèrent pas le changement d'expression de rhodopsine (SPRECHER and DESPLAN 2008). Indépendamment d'ecdysone, Le FdT Sens joue également un rôle dans l'initiation de l'expression de Rh6 (MISHRA *et al.* 2013). Malgré ces quelques éléments, les mécanismes moléculaires impliqués dans cette reprogrammation restent obscurs.

Durant le développement embryonnaire de la drosophile, les cellules sont organisées en compartiments destinés à devenir des structures spécifiques chez l'adulte. Chaque compartiment détient un programme et un destin précis, les cellules de ces

compartiments étaient connues pour ne jamais se mélanger. Pourtant, durant la fermeture dorsale de l'embryon, certaines cellules épithéliales vont changer de compartiment et de destin cellulaire. Chaque compartiment contient des « cellules mélangées » (CM) qui vont migrer du compartiment antérieur vers le compartiment postérieur. Ces CM adoptent en premier lieu l'identité postérieure du fragment (sous l'action de l'activation du facteur *engrailed*) pour ensuite franchir la frontière vers son nouveau compartiment. L'expression *de novo* de *engrailed* dans les CM est activée par la voie JNK. Cette reprogrammation permet des mouvements cellulaires particuliers pour permettre à la CM de rejoindre son nouveau compartiment. Ces intercalations de cellules entre chaque segment permettent de relâcher les tissus soumis à de très fortes tensions durant la fermeture dorsale (figure 13). Ce processus s'avère capital pour le développement embryonnaire de la drosophile (GETTINGS *et al.* 2010).



Cette plasticité des cellules engagées dans un destin propre à chaque segment n'est pas seulement présente dans les CM, mais reste dormante dans les autres cellules du segment. En cas de destruction massive de la partie postérieure ou dorsale du compartiment destiné à devenir les ailes, les frontières avec les segments voisins sont abolies transitoirement. La reconstruction de ses frontières nécessite le recrutement de cellules qui peuvent changer d'identité, passant d'un destin segmentaire à un autre. Ici aussi, les mêmes acteurs moléculaires sont en jeu : l'expression de *engrailed* et la voie JNK contrôlent ce changement d'identité. Les auteurs montrent que les cellules

exprimant *engrailed* induisaient l'expression d'*engrailed* dans les cellules proches (HERRERA and MORATA 2014).

Tous ces événements de TD ont été découverts par hasard lors d'études précises sur l'origine des cellules formant certains tissus. *C. elegans* présente un lignage cellulaire invariant (voir partie V.1). La réalisation des cartes détaillant précisément le lignage de ce nématode a permis de mettre en lumière certains destins cellulaires atypiques. Un événement de reprogrammation direct a été identifié dans le tube rectal et une potentielle TD dans le canal excrétoire a été décrite.

Le système excrétoire de *C. elegans* est composé de trois cellules : une cellule du canal (excrétrice), une cellule formant le conduit excrétoire et une autre le pore excrétoire appelée G1. Durant le stade embryonnaire, G1 est une cellule épithéliale complètement différenciée qui forme des jonctions adhérentes avec les cellules hypodermiques environnantes. Après l'éclosion, G1 va complètement changer d'identité et devenir un neuroblaste sans division cellulaire. C'est alors une autre cellule appelée G2 qui va remplacer G1 pour assurer la fonctionnalité du système excrétoire (vital pour le ver). La différenciation en G1 ou en cellule du conduit excrétoire est définie par l'activation de deux voies : Notch et Ras. Dans les mutants *lin-12/Notch* et *lin-60/Ras*, la cellule du conduit devient une cellule de pore, mais l'étude ne dit pas si cette extra-G1 subit la même reprogrammation (ABDUS-SABOOR *et al.* 2011). L'expression de la voie *lin-60/Ras* dans la cellule du conduit excrétoire joue également un rôle dans la perte des jonctions adhérentes avec la cellule du pore, permettant à G1 de migrer hors de l'organe excrétoire pour ensuite se reprogrammer (PARRY and SUNDARAM 2014). Cependant, les mécanismes permettant la reprogrammation de G1 restent inconnus.

Dans un autre organe tubulaire, un événement de reprogrammation directe prend place : la conversion d'une cellule rectale épithéliale en motoneurone sans division cellulaire. Cette TD est étudiée dans le laboratoire de Sophie Jarriault et sera développée dans le chapitre V.2

Malgré l'étude méticuleuse du lignage de *C. elegans*, deux cellules présentes uniquement chez le mâle avaient échappé à Sulston : deux neurones nés d'une transdifférenciation putative. Durant la maturation sexuelle, les cellules gliales AMso vont se diviser pour donner naissance à deux cellules filles d'identités différentes : une gardera son identité gliale, l'autre se reprogrammera en cellule neuronale. Ce neurone est impliqué dans un changement de comportement spécifique des mâles. Les vers hermaphrodites apprennent à reconnaître des conditions défavorables (l'absence de nourriture via des indices chimiques) et vont fuir les zones associées à ces mauvaises conditions. Les mâles ont la capacité de contourner cette répulsion si les conditions défavorables ont été associées à la possibilité de trouver un partenaire sexuel. Ces neurones sont donc primordiaux pour l'apprentissage de la priorisation de la reproduction sur la nourriture chez le mâle. Cette potentielle TD est assurée par le FdT *tra-1*, le régulateur terminal de la spécialisation mâle (SAMMUT *et al.* 2015). Les mécanismes sous tendant ce nouvel événement de reprogrammation demeurent flous.

2) Les transdifférenciations naturelles durant une régénération

Un des plus célèbres exemples de reprogrammation consécutive à une blessure est certainement la régénération de la lentille chez la salamandre. Au XIXe siècle Colucci et Wolff avaient déjà décrit la régénération complète de ce tissu après l'ablation totale de la lentille. La régénération se fait à partir de cellules de l'épithélium pigmenté de l'iris qui vont dans un premier temps se dédifférencier, proliférer et ensuite se redifférencier en cellules de la lentille. Ce processus de régénération parfaitement orchestré est extrêmement reproductible : une équipe japonaise a pratiqué 18 fois l'ablation des lentilles des mêmes animaux sur 16 années. Les deux derniers échantillons de lentilles régénérés présentaient un profil d'expression semblable à de jeunes lentilles n'ayant jamais connues d'épisode de régénération. Cette étude démontre que des régénérations répétées ne deviennent pas moins efficaces avec le temps et le nombre de répétitions (EGUCHI *et al.* 2011).

Une grenouille (*Xenopus genus*) peut également régénérer sa lentille via une TD des cellules de la cornée. Le même processus induit la dédifférenciation, la prolifération et la différenciation en différents types cellulaires de la rétine (YOSHII *et al.* 2007).

Xenopus genus ainsi que d'autres amphibiens parviennent à régénérer la neurorétine (un tissu composé de six types de cellules neuronales) par la reprogrammation directe de cellules de l'épithélium pigmenté rétinien (EPR) (FILONI 2009). Cette capacité de régénération de la rétine via TD de l'EPR est d'ailleurs conservée chez le poulet et la souris, mais uniquement au stade embryonnaire (PARK and HOLLENBERG 1989; ZHAO *et al.* 1995). Ces différentes TD de régénération de la lentille et de la neurorétine chez les amphibiens sont toutes sous contrôle de FGF. Chez la salamandre, les voies FGF et BMP induisent l'expression de facteurs clés (comme *Pax-6*, *Sox-2*, *Six-3*, *MafB*) dans certaines cellules de l'iris et induisent la reprogrammation (HAYASHI *et al.* 2004; GROGG *et al.* 2006).

Chez le poisson zèbre, un événement de reprogrammation direct prend place au niveau du cœur. Le muscle cardiaque est composé de deux chambres (un atrium et un ventricule) qui sont composées de deux catégories distinctes de cardiomyocytes. Une blessure du ventricule peut être en partie régénérée par la migration et la reprogrammation de cellules de l'atrium (ZHANG *et al.* 2013; KIKUCHI 2015). Les dommages induisent une expression ectopique de Notch dans le cœur. Seules les cellules de l'atrium vont répondre à cette stimulation de Notch pour induire la reprogrammation. Les facteurs activés par la voie Notch pour induire cette TD restent à découvrir.

Chez les mammifères, certaines cellules peuvent également se transdifférencier pour répondre à un dommage. L'épithélium tapissant les poumons est en contact permanent avec les agressions extérieures et doit répondre rapidement et efficacement aux dommages cellulaires. En plus de la différenciation des cellules souches, la régénération de cet épithélium peut se faire par transdifférenciation : après un dommage, les cellules ciliées vont se reprogrammer en cellules épithéliales d'autres types (cubiques, cylindriques ou squameuses) pour réparer l'épithélium endommagé (PARK *et al.* 2006). Des FdT impliqués dans la différenciation du poumon durant l'embryogenèse sont ici ré-exprimés : β -caténine, *Foxa2*, *Foxj1*, *Sox17* et *Sox2*.

3) Les transdifférenciations naturelles d'adaptation à l'environnement

Chez les mammifères, les adipocytes présentent une plasticité remarquable. Les adipocytes blancs ont pour fonction de stocker/relarguer de l'énergie sous forme de lipide (pour produire de l'énergie entre les repas, les périodes de jeûne prolongées). Les adipocytes bruns sont des cellules productrices de chaleur, régulées par le système nerveux sympathique pour maintenir la température corporelle. Dans des conditions physiologiques spécifiques (exposition chronique au froid), les adipocytes blancs se transforment en adipocytes bruns pour faire face aux basses températures (SMORLESI *et al.* 2012). Plusieurs facteurs jouent un rôle clé dans cette conversion cellulaire : PPAR γ , PGC1 α , C/EBP β et PRDM16 (KAJIMURA *et al.* 2010).

Plus surprenant, durant la grossesse de la souris, les adipocytes blancs présents dans les glandes mammaires ont la capacité de se reprogrammer directement en des cellules épithéliales sécrétrices qui composent les glandes alvéolaires productrices de lait. Elf5 est un des facteurs clé de cette TD en induisant la production de composants du lait dans les adipocytes (PROKESCH *et al.* 2014).

Nous l'avons évoqué dans la première partie de l'introduction, certaines conditions environnementales défavorables chez certaines méduses induisent un retour des adultes matures et fertiles au stade de polype. Durant ce retour en arrière dans le développement, certaines études suggèrent qu'il pourrait y avoir des transdifférenciations cellulaires (PIRAINO *et al.* 1996). Cette étude, essentiellement descriptive, utilise des prélèvements de certaines parties de la méduse *Turritopsis nutricula* et étudie leur changement d'identité en culture. L'épiderme de l'ombrelle de la méduse peut se reprogrammer en cellules sécrétrices du périscarc (exosquelette chitineux qui entoure le polype) et les cellules qui tapissent le canal radiaire (qui ne contiennent pas de cellules intestinales) se transdifférencient en cellules endodermiques. Les auteurs suggèrent que ces conversions cellulaires directes pourraient également avoir lieu lors de la réversion de la méduse en polype.

IV/ les mécanismes qui assurent la reprogrammation et le maintien de l'identité cellulaire

1) Les mécanismes des reprogrammations induites

Comme nous avons pu le voir dans le chapitre précédent, les études décrivant les reprogrammations directes induites n'ont pas souvent pour vocation de mettre en lumière les mécanismes précis permettant ce changement d'identité.

Il est pourtant essentiel de comprendre comment quelques facteurs exogènes parviennent à réaliser cette conversion au niveau moléculaire. L'identité initiale et finale étant parfois radicalement différentes, les états de la chromatine sont fatalement très peu semblables : les gènes clés de la régulation de l'identité cible finale sont réprimés dans les cellules initiales. Alors comment ces facteurs réussissent-ils à réactiver ces réseaux de gènes spécifiques de l'identité cible ?

Le laboratoire de M. Wernig s'est attaché à décrypter les mécanismes par lesquels les facteurs Brn2, Ascl1, et Myt1l induisent la transformation de fibroblastes en iN (WAPINSKI *et al.* 2013). Ce processus est décrit comme une cascade de FdT assurant l'initiation de la conversion : Ascl1 est le premier FdT à agir car il peut accéder à ses séquences cibles malgré un état compacté de la chromatine. Cette faculté de lier l'ADN réprimé est appelée une activité de facteur pionnier « on target » (sur la cible).

Durant la reprogrammation en cellule IPS, on a attribué également cette particularité de gènes pionniers aux gènes Oct4, Sox2 et Klf4 en raison de leurs rôles clé dans l'activation de gènes de pluripotence. En réalité (malgré c-Myc qui jouerait un rôle de facilitateur d'accès à la chromatine pour Oct4, Sox-2 et Klf4), contrairement à Ascl1, ces trois gènes sont mal localisés et ne lient pas leurs séquences cibles sur la chromatine, (SOUFI *et al.* 2012) (ce qui pourrait en partie expliquer le faible taux de conversion en cellules IPS de ces facteurs sans l'aide de facteurs clés pour un large remodelage de la chromatine). Durant la reprogrammation des iN, Ascl1 lie directement ces authentiques gènes neuronaux cibles à travers le génome des fibroblastes. Les auteurs proposent que

l'affinité de liaison du domaine bHLH de Ascl1 serait plus forte que celle des histones, permettant l'ouverture de la chromatine en empêchant l'enroulement de l'ADN autour des histones. Brn2 et Myt1l ne possèdent pas cette activité pionnière « on target » et opèrent majoritairement sur une chromatine ouverte, leurs rôles dans les premiers instants de la reprogrammation en iN semblent donc moins importants, ils seront actifs ensuite pour activer des gènes de la différenciation neuronale.

Cette capacité de Ascl1 de lier ses séquences cibles malgré la compaction de la chromatine n'est pas partagée par tous les FdT qui semblent pourtant très efficaces pour reprogrammer de nombreux types cellulaires. Par exemple, l'expression ectopique de MyoD n'est pas parvenue à induire une identité musculaire complète dans des cellules ectodermiques (après l'induction de MyoD dans des neurones, les deux programmes nerveux et musculaires coexistent) et endodermiques (MyoD échoue à reprogrammer des hépatocytes) (WEINTRAUB *et al.* 1989; SCHAFER *et al.* 1990). Des années après la publication de Davis *et al.*, (1987), des études ont révélé que MyoD induisait l'expression de la myogénine via la coopération avec Pbx, un FdT constitutivement lié aux cibles de MyoD dans certains types cellulaires, comme les fibroblastes, et ce avant même l'expression de MyoD (BERKES *et al.* 2004).

Masserdotti *et al.* ont étudié les différents processus permettant de reprogrammer des astrocytes en deux types de neurones : soit en neurones GABAergiques avec l'induction de Ascl1, soit glutamatergiques avec Neurog2 (MASSERDOTTI *et al.* 2015). Après l'induction de Ascl1 ou Neurog2 dans des astrocytes (provenant de jeunes souris, juste après la naissance), deux programmes neuronaux sont activés avec des acteurs communs. En induisant l'expression de certains de ces FdT communs (Insm1, NeuroD4, Prox1, et Sox11 = INPS), il est possible de produire des iN immatures à partir de ces astrocytes postnataux. Ces jeunes astrocytes présentent une grande plasticité. En utilisant des astrocytes maintenus plusieurs jours en culture (mimant leurs maturations post natale), l'efficacité de conversion par Ascl1 ou Neurog2 est nettement réduite, la cellule devenant moins permissive. De façon surprenante, induire l'expression des gènes INPS (en aval de Neurog2 et Ascl1) permet de contourner cette barrière épigénétique et de reprogrammer les astrocytes mature en iN.

Il apparaît que l'induction de Neurog2 réduit l'activité du complexe REST (responsable de la répression de gènes neuronaux dans les cellules non neuronales) uniquement dans les jeunes astrocytes, mais pas dans les astrocytes matures. REST lie des gènes neuronaux cibles (comme NeuroD4) et les réprime dans les jeunes astrocytes. Une fois les astrocytes matures, d'autres acteurs assurent la répression de ces gènes cibles, des facteurs répresseurs qui ne peuvent pas être inhibés par Neurog2. C'est pourquoi Neurog2 peut induire la dérégulation de l'expression de gènes neuronaux dans les astrocytes jeunes mais pas dans les astrocytes matures, où seule l'expression exogène des gènes cibles INPS permet de contourner cette répression de leurs versions endogènes (figure 14).

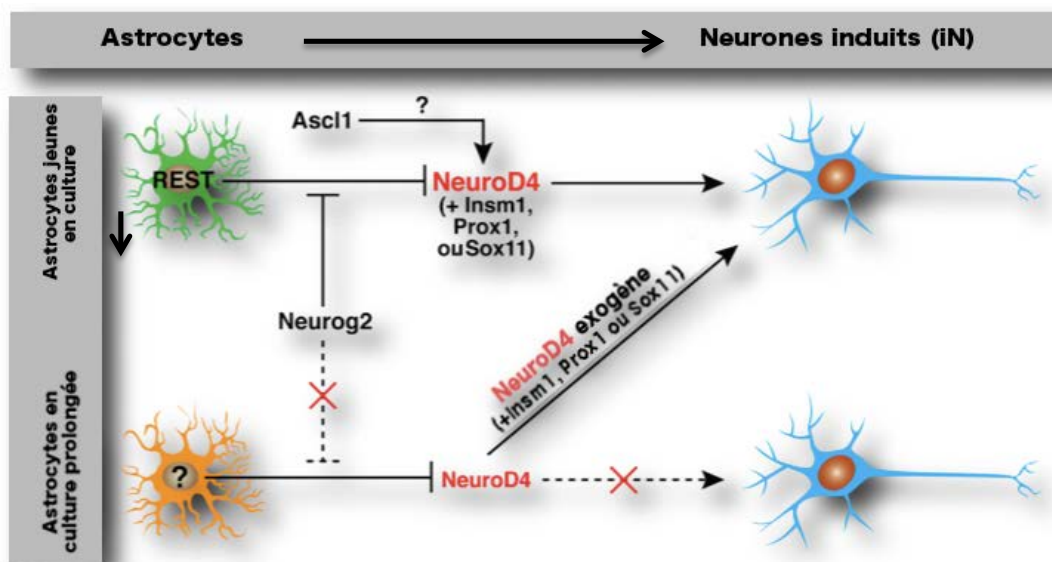


Figure 14: mécanismes sous-tendant la reprogrammation d'astrocytes en neurones (iN). Dans les astrocytes jeunes tout juste mis en culture, REST lie le locus de NeuroD4 et réprime son expression. Exprimé de façon ectopique, Neurog2 va entrer en compétition avec REST et liera directement le locus de NeuroD4, induisant son expression (ainsi que celle des autres facteurs tel que Insm1, Prox1 ou Sox11) et entraînant la conversion des astrocytes en iN. En culture prolongée, les modifications de la chromatine et des facteurs inconnus répriment l'expression de NeuroD4. Neurog2 ne peut pas réprimer l'action de ces facteurs (contrairement au REST), la reprogrammation n'a pas lieu. Cependant, l'expression exogène de NeuroD4 (et les autres facteurs proneuraux) permet de contourner ce blocage et de convertir les astrocytes matures en iN (WANG *et al.* 2015).

La première étude met en lumière certains mécanismes moléculaires impliqués dans des reprogrammations de cellules d'identités très éloignées : des fibroblastes (d'origine mésodermique) convertis en neurones (ectodermiques). Plusieurs FdT aux activités complémentaires sont indispensables pour induire ce grand écart de destin cellulaire : un permettant de cibler précisément une chromatine fermée (Asl1) pour permettre son accessibilité aux autres facteurs de différenciation. La dernière étude décrit les rouages d'une reprogrammation de cellules d'identités proches : un astrocyte peut être converti en neurone grâce à l'induction de seulement un FdT. D'autres études décrivent comment l'altération/la surexpression d'un seul FdT (ou d'hétérodimère) peut déstabiliser l'état différencié d'une cellule et induire une dédifférenciation, voir même intervertir l'identité de deux types cellulaires proches, nous en parlerons dans le chapitre suivant.

2) Le rôle des facteurs de transcription dans le maintien de l'identité cellulaire

2.1) Des modèles simples, mais instables

Le maintien de l'identité cellulaire passe par la constante expression de facteurs durant toute la vie de la cellule mature. La perte de ces gènes terminaux entraîne une déstabilisation de l'état différencié. *C.elegans* a été un excellent modèle pour étudier la propriété de gènes garant de l'identité neuronale. L'identité du neurone sensorielle ASE est maintenue par CHE-1, un FdT qui lie le motif spécifique des gènes de la cellule ASE (CHANG *et al.* 2003; UCHIDA *et al.* 2003; ETCHBERGER *et al.* 2007). Lorsque *che-1* est muté, les caractéristiques de ASE sont perdues, mais les traits pan neuronaux sont sauvegardés (sans pour autant induire l'acquisition d'un nouveau destin, pas même d'un programme neuronal alternatif). L'interneurone AIY suit le même modèle : son identité terminale dépend exclusivement de la constante expression de l'hétérodimère TTX-3/ CEH-10. Les neurones mécanosenseurs dépendent eux de l'hétérodimère MEC-3/UNC-86, les motoneurones cholinergiques de UNC-3 (DUGGAN *et al.* 1998; ALTUN-GULTEKIN *et al.* 2001; WENICK and HOBERT 2004) (figure 15A). L'identité des neurones de *C.elegans* est majoritairement maintenue par une simple régulation dépendante de l'activité en continue de quelques FdT, spécifiquement exprimés dans différents neurones.

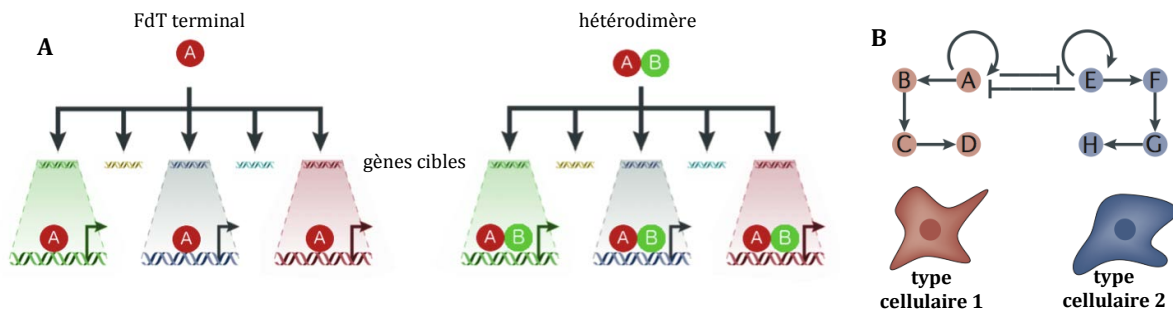


Figure 15 : maintenance de l'identité cellulaire, les modèles simples de régulation par des facteurs de transcription (FdT). A) Les FdT terminaux jouent un rôle clé dans la différenciation des neurones chez *C.elegans*. La figure A représente l'activation directe par un FdT terminal (ou un hétérodimère) de gènes cibles spécifiques d'un programme cellulaire précis. B) Modèle de réseau de FdT pouvant réguler la stabilité d'une cellule. Dans certains types cellulaires (comme les lymphocytes B et leurs progéniteurs ou les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins) la suppression d'un FdT entraîne la redifférenciation en une identité différente. Même dans des cellules matures du type 1, la suppression du facteur A entraîne la perte de l'identité 1 et l'acquisition de l'identité 2. Inspiré et modifié de la revue *Maintaining differentiated cellular identity* (LITOVCHICK et al. 2007; HOLMBERG and PERLMANN 2012)

La simplicité du modèle pourrait à première vue être peu transposable aux organismes plus complexes, mais l'ablation de certains FdT dans des cellules différenciées de mammifères conduit également à une perte du phénotype d'origine.

La suppression du FdT Pax5 dans un lymphocyte B induit une dédifférenciation en un progéniteur « pro-B ». Ce progéniteur n'est en réalité plus seulement capable de se différencier en cellules B, mais peut par la suite se différencier en d'autres cellules hématopoïétiques pour lesquels il n'était pas programmé. Ici, Pax5 assure le maintien de l'identité des lymphocytes B, ce FdT est essentiel pour induire la direction de la différenciation du progéniteur pro-B vers un destin de type B. Il est intéressant de noter que dans cet exemple, la suppression du gène terminal Pax5 entraîne l'adoption d'un destin alternatif des cellules « pro-B », qui deviennent des progéniteurs de macrophage, ostéoclastes, cellules dendritiques, granulocytes et cellule NK (NUTT *et al.* 1999; ROLINK *et al.* 1999; MIKKOLA *et al.* 2002).

D'autres études ont révélé un fonctionnement similaire où la suppression d'un FdT peut entraîner une perte de l'identité initiale accompagnée par l'acquisition de destins alternatifs. Toujours chez la souris, l'ablation du FdT Prox1 transforme rapidement et directement les cellules endothéliales lymphatiques en cellules endothéliales sanguines (JOHNSON *et al.* 2008). Ici, la perte d'un seul facteur transforme les vaisseaux lymphatiques en vaisseaux sanguins sans passer par un intermédiaire dédifférencié.

Le même type de reprogrammation directe se déroule après l'ablation du FdT Foxl2 dans des ovaires de souris : les cellules de la granulosa et de la thèque ovarienne

se transforment directement en cellules de Sertoli et de Leydig fonctionnelles, produisant de la testostérone (UHLENHAUT *et al.* 2009). L'analyse transcriptomique des gonades de ces souris après trois semaines révèle un profil d'expression similaire à des gonades mâles. Chez les souris mâles, le gène Sox9 est activé par le FdT déterminant de l'identité mâle : Sry. Foxl2 va directement réprimer l'expression du gène Sox9 en l'absence de Sry, et donc éteindre le programme masculin. L'expression en continu de Foxl2 est donc essentielle pour le maintien des caractéristiques femelles des gonades (figure 15B).

Il existe donc des FdT qui sécurisent l'identité cellulaire et qui doivent être continuellement exprimés pour assurer le maintien d'un destin. Cependant ces modèles de régulation du maintien de l'identité simple (un facteur terminal) sont très labiles (figure 15B). La perturbation de l'expression de ce facteur clé abolit l'identité finale des cellules. Il existe des modes de maintien de l'état différencié plus stable, mais aussi nettement plus complexe.

2.2) Les modèles stables : réseaux de facteurs de transcription complexes et redondance des facteurs de différenciation

Certains FdT sont capitaux lors de l'établissement de la différenciation cellulaire, mais s'avèrent moins cruciaux une fois l'identité cellulaire complètement acquise. Pet1 et Lmx1 β sont deux FdT clés dans la différenciation et la survie des neurones sérotoninergiques (5-HT) chez la souris durant le développement embryonnaire. En effet, la suppression de Lmx1 β entraîne une perte de tous les neurones 5-HT et l'ablation de Pet1 ne permet la survie que d'une petite partie d'entre eux. Bien que continuellement exprimés par la suite dans ces neurones, une fois adulte, l'ablation de ces deux gènes induit un phénotype nettement moins dramatique : certains marqueurs de l'identité 5-HT sont perdus mais les cellules maintiennent leur identité fonctionnelle (morphologiquement semblables, elles produisent toujours de la sérotonine, mais en moins grande quantité) (LIU *et al.* 2010; SONG *et al.* 2011). Certains gènes cibles de Pet1 et Lmx1 β continuent d'être exprimés malgré leur ablation, laissant supposer qu'une fois l'identité 5-HT acquise et maintenue jusqu'au stade adulte, certaines cibles de facteurs

clés peuvent maintenir leurs expressions par d'autres moyens, ce qui verrouille en partie cette différenciation, même en l'absence des gènes clés *Pet1* et *Lmx1β*. *Pet1* est lui-même un gène cible de *Lmx1β*. Son expression est conditionnée par l'action de *Lmx1β* dans les stades les plus précoces, mais une fois adulte, l'ablation de *Lmx1β* n'entraîne plus la suppression de l'expression de *Pet1*, l'identité est en quelque sorte « sécurisée ».

Le même scénario est observé pour le FdT *Nurr1* essentiel pour le développement des neurones dopaminergiques chez la souris. Sa suppression durant le développement embryonnaire conduit à l'absence totale de ces neurones, alors que l'ablation une fois adulte conduit à une baisse d'expression de certains marqueurs spécifiques, mais les cellules parviennent à maintenir leur identité dopaminergique et sont maintenues en vie à moyen ou long-terme selon les zones du cerveau (KADKHODAEI *et al.* 2009).

Les neurones ne sont pas les seules cellules à présenter ce type de régulation chez la souris. La suppression du FdT *Hnf4α* durant le développement embryonnaire entraîne des perturbations profondes de la différenciation des hépatocytes. L'ablation de *Hnf4α* à l'âge adulte altère l'expression d'une partie des gènes hépatiques, mais l'identité de ces hépatocytes n'est pas totalement perdue (HAYHURST *et al.* 2001). Le FdT hépatique clé *Foxa2* présente le même phénotype : sa suppression conditionnelle dans un foie adulte entraîne une perte d'expression de gènes cibles de l'identité hépatique bien moins importante que durant l'embryogenèse.

L'établissement de l'identité hépatique nécessite la mise en place d'un réseau de FdT de plus en plus complexe au fil du développement de l'organe. Au début de la différenciation des cellules du foie, l'induction de FdT en cascade semble établir l'expression d'une multitude de FdT impliqués dans la différenciation hépatique. Ces facteurs vont peu à peu s'interconnecter en un réseau élaboré de FdT (HOLMBERG and PERLMANN 2012). L'ablation de *Hnf4α* dans le foie adulte affecte peu l'expression de FdT sous contrôle d'autres gènes clés de la spécialisation hépatique, alors que sa suppression dès les premiers stades du développement perturbe bien plus le jeune réseau de FdT alors peu interconnecté (KYRMIZI *et al.* 2006). Ce réseau complexe permet d'assurer une stabilité de l'état différencié. La perte d'un facteur clé d'une identité cellulaire perturbe alors nettement moins l'expression de FdT en aval car ils sont alors activés par d'autres FdT du réseau (figure 16A).

L'expression d'un gène clé d'une identité cellulaire peut être assurée grâce à l'action de plusieurs FdT, de la sorte son expression est stabilisée. Par exemple, *shh* (Sonic HedgeHog) est un FdT impliqué dans la différenciation de tissus nerveux ventraux de la plaque du plancher (un groupe de cellules du tube neural) ainsi que dans la différenciation des membres chez la souris. Dans l'embryon, la transcription de *shh* est robuste dans la plaque du plancher (deux facteurs assurent sa transcription en se liant en amont du gène) alors qu'elle est bien plus sporadique dans les membres (où un seul élément assure l'expression du gène) (JEONG *et al.* 2006; AMANO *et al.* 2009).

Ces quelques exemples illustrent la complexité de certains réseaux de FdT (figure 15A). Le maintien de l'identité cellulaire est ici orchestré par plusieurs groupes de facteurs interconnectés. Un autre moyen d'assurer la stabilité de l'état différencié est l'utilisation de facteurs/voies redondantes pour assurer la même fonction durant le développement (figure 16B).

C.elegans est un bon modèle pour illustrer la redondance de groupe de gènes impliqués dans la différenciation de la vulve.

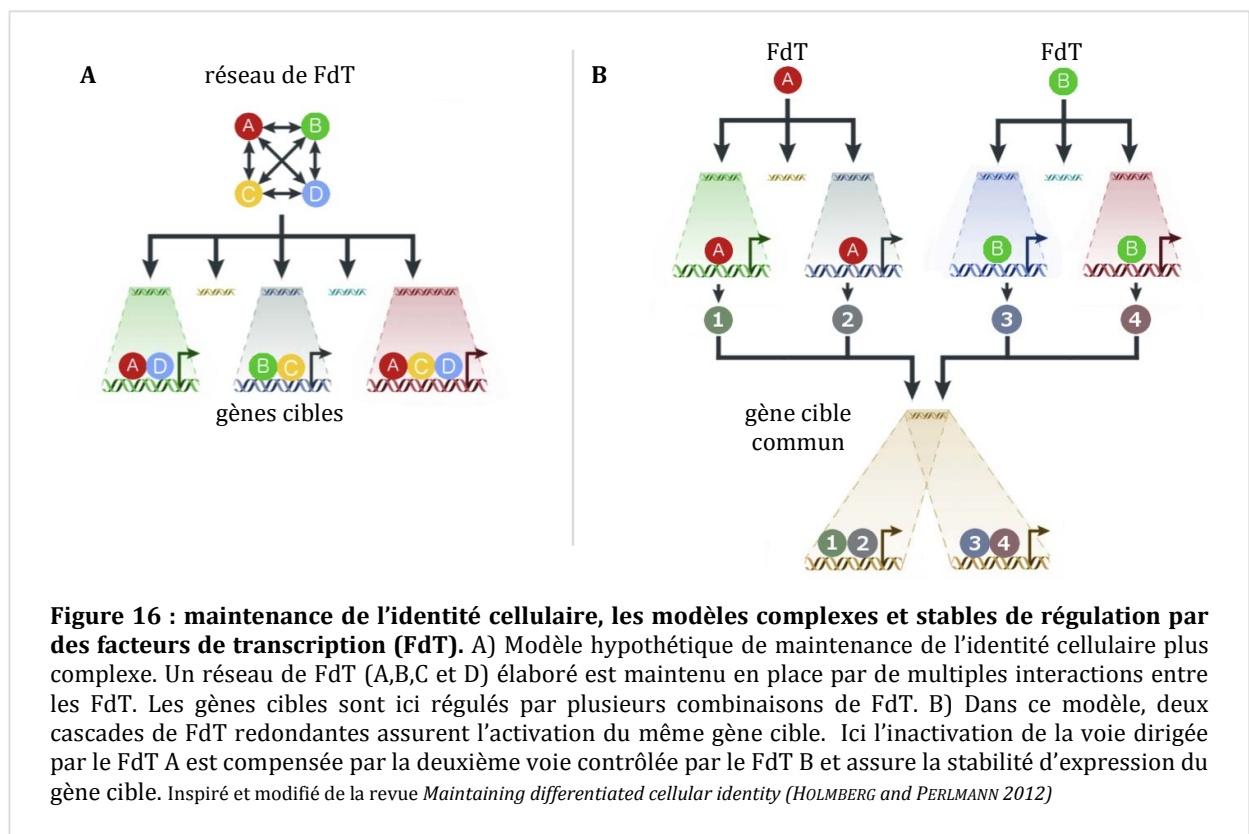


Figure 16 : maintenance de l'identité cellulaire, les modèles complexes et stables de régulation par des facteurs de transcription (FdT). A) Modèle hypothétique de maintenance de l'identité cellulaire plus complexe. Un réseau de FdT (A,B,C et D) élaboré est maintenu en place par de multiples interactions entre les FdT. Les gènes cibles sont ici régulés par plusieurs combinaisons de FdT. B) Dans ce modèle, deux cascades de FdT redondantes assurent l'activation du même gène cible. Ici l'inactivation de la voie dirigée par le FdT A est compensée par la deuxième voie contrôlée par le FdT B et assure la stabilité d'expression du gène cible. Inspiré et modifié de la revue *Maintaining differentiated cellular identity* (HOLMBERG and PERLMANN 2012)

Durant le développement larvaire de *C. elegans*, six Cellules Précurseurs de la Vulve (VPC) appelées P3.p, P4.p, P5.p, P6.p, P7.p, et P8.p vont adopter des destins différents. Seules les trois cellules P5.p, P6.p, P7.p participeront à la formation de la vulve, P3.p, P4.p, et P8.p adopteront un destin hypodermique par défaut. La Cellule Ancre (AC), située juste au-dessus de P6.p, dicte cette induction en cellules vulvaires par l'expression de LIN-3/EGF sous forme d'un gradient. Les cellules les plus proches du signal LIN-3/EGF sont induites en cellules de la vulve (figure 17A).

Deux groupes de gènes redondants appelés synMuv A et synMuv B répriment la production de LIN-3/EGF par les autres cellules environnantes. La mutation d'un membre de ces groupes (ou de plusieurs membres du même groupe) n'induit aucun effet sur la différenciation de la vulve. Par contre, la mutation d'un membre de chacun des deux groupes lève l'inhibition de la production de LIN-3/EGF dans les autres cellules proches des VPC, entraînant une induction du destin vulvaire chez toutes les VPC : plusieurs vulves seront présentes le long du ver (figure 17B) (FAY and YOCHER 2007).

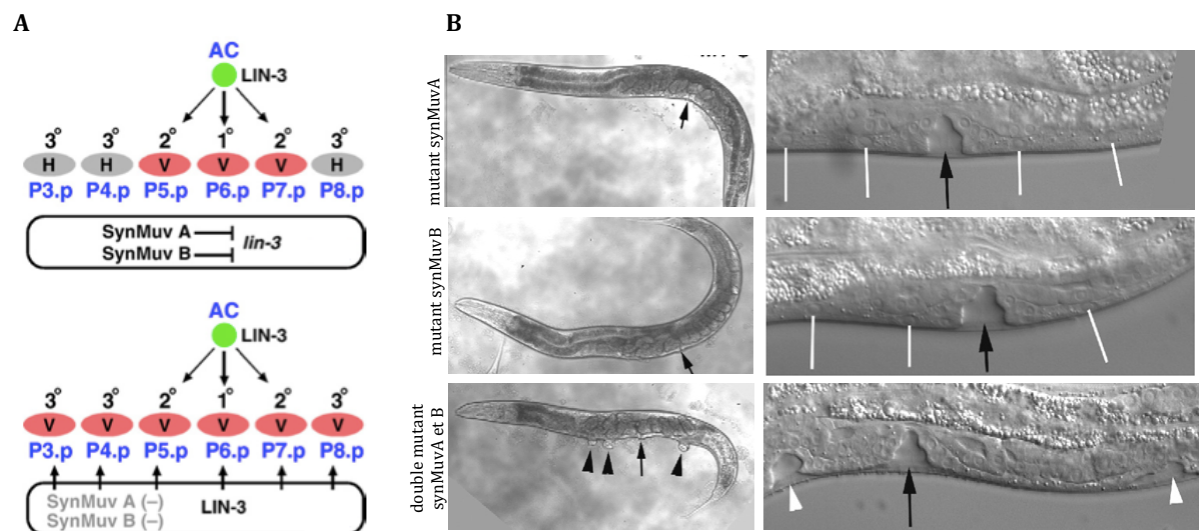


Figure 17 : redondance des gènes synMuv A et synMuv B dans l'acquisition du destin vulvaire chez *C.elegans*. A) Le schéma du haut présente la différenciation de la vulve dans un ver sauvage. La Cellule Ancre (AC) émet un signal LIN-3 qui dictera l'identité vulvaire aux Cellules Précurseurs de la Vulve (VPC) les plus proches (P5.p, P6.p et P7.p). Les autres VPC fusionneront avec le syncytium hypodermique hyp7. Les gènes des groupes synMuvA et B répriment de façon redondante l'expression de *lin-3* dans hyp7, dans les VPC elles-mêmes et les autres cellules environnantes. Le schéma du bas représente les conséquences d'une mutation dans un gène de chacun des groupes synMuv A et B. Les VPC reçoivent toutes un signal LIN-3 et expriment un programme vulvaire. B) Photographie au microscope photonique (DIC) de simples mutants de gènes synMuvA ou B (une seule vulve se forme (flèche noire), le ver a un phénotype sauvage) et d'un double mutant pour un gène de chaque groupe synMuvA et B, on peut observer le développement de plusieurs vulves supplémentaires (flèches noires à gauche, blanches à droite) (FAY and YOCHER 2007)

Dans chacun des groupes synMuv A et B se trouvent des FdT, mais également des gènes remodeleurs de la chromatine.

3) Rôle des remodeleurs de la chromatine dans la robustesse de l'identité cellulaire

Les expériences de reprogrammation de cellules somatiques ont montré que les mêmes cocktails de FdT n'induisaient pas toujours l'induction de l'identité ciblée en fonction de la nature de la cellule de départ. Dans une cellule différenciée, la compaction de la chromatine pourrait rendre inaccessibles certains autres programmes. Cet état de la chromatine sécuriserait donc l'identité des cellules.

Nous avons vu que les FdT pionniers ont la capacité de lier l'ADN nucléosomique. Cependant, même certains facteurs pionniers très bien caractérisés (comme les facteurs FoxA, impliqués dans la différenciation des cellules de différents organes) lient différents groupes de gènes cibles en fonction du contexte cellulaire et de l'état de la chromatine (ZARET and CARROLL 2011). Warpinski et ses collègues ont démontré que le facteur pionnier Ascl1 avait besoin d'un contexte chromatinien favorable à la liaison de Ascl1 à ses gènes cibles. Durant l'induction de iN à partir de fibroblastes, les sites de liaison de Ascl1 dans le génome fibroblastiques sont fortement enrichis en modification d'histones H3K27ac, et H3K9me3 (des marques actives) et un enrichissement moyen de la marque répressive H3K4me1 (Cette conformation est appelée état trivalent de la chromatine). Les auteurs tentent de prédire par la suite la présence plus ou moins importante de cet état trivalent de la chromatine dans différents types cellulaires. Ils établissent une forte corrélation entre la faible présence de cet état chromatinien et la mauvaise localisation de Ascl1 hors de ces sites cibles. Certains types cellulaires présentent très peu cet état trivalent de la chromatine et de par ce fait ont une propension plus faible (voire nulle) à pouvoir être reprogrammés via l'induction de Ascl1 (WAPINSKI *et al.* 2013).

L'état chromatinien de départ conditionne donc l'accessibilité des FdT à leurs séquences cibles. Il a été montré que supprimer des remodeleurs de la chromatine peut faciliter des reprogrammations induites : nous avons vu au chapitre II.1 que l'efficacité de reprogrammation de fibroblastes en cellules IPS passait à 100% avec l'inactivation d'un membre du complexe remodeleur de la chromatine Mbd3/NuRD (RAIS *et al.* 2013).

Au chapitre II.2, nous avons pu constater qu'un nombre croissant de reprogrammations directes induites passent par la surexpression ou l'inactivation de tels facteurs.

3.1) La répression, l'activation et le maintien des programmes d'identité par les modifications d'histones

C. elegans est également un bon modèle pour observer le rôle des modificateurs d'histones dans la différenciation et la reprogrammation cellulaire. L'expression du facteur terminal *che-1* de neurone ASE dans le ver ne parvient pas à reprogrammer les cellules germinales. Par contre, la suppression de *lin-53/RbAp48* via ARNi (un composant de plusieurs complexes modificateurs d'histones) conjuguée à l'expression ectopique de *che-1* entraîne la conversion des cellules germinales en neurones différenciés glutamatergiques (TURSUN *et al.* 2011). La délétion de *lin-53* permet également l'induction en neurones cholinergiques ou GABAergiques via l'expression de *unc-3* et *unc-30*, respectivement. Par contre, aucune induction en muscle n'a pu être réalisée dans les mêmes conditions via l'expression de *hlh-1/MyoD*. *lin-53* semble restreindre uniquement la différenciation en cellule neuronale.

L'année suivante, la même équipe observe les mêmes inductions en iN (avec les mêmes facteurs) dans les cellules germinales via la suppression de *Prc2* via ARNi (le complexe répresseur polycomb, connu pour déacétyler les histones) et de la H3K36 méthyltransférase *mes-4*. Cette fois-ci, l'ablation de *Prc2* permet également la conversion en cellules musculaires via l'induction de *hlh-1/MyoD*. PRC2 protège donc la lignée germinale d'une exécution aberrante de différents programmes de différenciation (PATEL *et al.* 2012).

L'équipe de Oliver Hobert s'est focalisée sur des répresseurs de la chromatine qui maintiendraient inaccessibles des groupes de gènes sans lien avec l'identité des cellules germinales. Il existe également des marques activatrices qui permettent d'assurer le maintien de l'identité cellulaire. Toujours chez *C. elegans*, Shibata et ses collègues ont observé que dans la majorité des vers mutants *bet-1* (une protéine liant les histones acétylés), certaines cellules ayant acquis correctement leurs identités ne parvenaient pas à la maintenir (SHIBATA *et al.* 2010). Une faible partie de ces mutants présentait également des cellules où la spécialisation avait été impactée. Les auteurs proposent que

le rôle de BET-1 consisterait à stabiliser un destin cellulaire tout juste acquis. Une courte expression de *bet-1* durant l'acquisition d'identité de certaines cellules n'est pas suffisante pour l'établissement d'un destin stable. La suppression de l'Histone AcétylTransférase (HAT) MYST délocalise BET-1 hors du noyau et reproduit le même phénotype que le mutant *bet-1*. Les auteurs suggèrent que durant l'acquisition d'un destin cellulaire, des régulateurs d'une identité vont recruter des HAT pour induire l'expression de gènes d'un programme spécifique via l'acétylation des nucléosomes proches. Ensuite seulement BET-1 en complexe avec MYST serait recruté en liant ces histones acétylés pour créer une plus vaste région acétylée de façon stable, pour une période plus longue. BET-1 pourrait protéger les histones acétylées d'éventuelles Histone Désacétylases (HDAC) et maintenir l'expression de gènes clés dans la spécialisation en un type cellulaire donné.

3.2) Des remodeleurs de la chromatine jouent des rôles clés dans la décision pluripotente/ différenciation

Toujours chez *C. elegans*, *let-418* (homologue de Mi-2/CHD3) est un composant du complexe remodeleur de la chromatine NuRD indispensable à la répression du programme germinale dans les cellules somatiques (en association avec le régulateur post-transcriptionnel MEP-1). Les mutants *mep-1* ou *let-418* présentent une expression ectopique des gènes de cellules germinales (*plg-1*, *glh-2*, *glh-3* dans les cellules hypodermiques et intestinales, entraînant une mal-fonction de ces cellules et un arrêt du développement au premier stade larvaire (L1). Ces cellules pourtant complètement différenciées vont changer de morphologie, et exprimer des gènes germinaux, sans pour autant complètement perdre leurs identités initiales (*jam-1* et *pes-10* sont normalement exprimés dans les cellules hypodermiques et intestinales malgré la mutation de *mep-1* ou *let-418*) (UNHAVAITHAYA *et al.* 2002).

Durant le développement, l'expression de la protéine PIE-1 se restreint aux seules cellules germinales. Le mutant *pie-1* présente un phénotype inverse de celui de *mep-1* et *let-418* : une différenciation des cellules germinales. Les auteurs ont démontré que PIE-1 liait directement MEP-1 et LET-418 et inhiberait ces facteurs de différenciation pour maintenir la pluripotente des cellules germinales. Plus tard dans le

développement du ver, *mep-1* et *let-418* agissent de concert pour induire la différenciation et réprimer des gènes germinaux.

L'homologue de *let-418* chez *Arabidopsis*, *pkl*, est requis pour la suppression des caractères embryonnaires des cellules de racine. Dans les mutants *pkl*, les cellules de racine se dédifférencient et peuvent spontanément régénérer un organisme entier. Ici, *pkl* semble également réprimer des facteurs de totipotences (OGAS *et al.* 1997).

Certains remodeleurs de la chromatine préserveraient l'état différencié des cellules spécialisées en empêchant l'expression d'un programme de pluripotence.

3.3) L'état de la chromatine et la robustesse de l'identité cellulaire lors de changements environnementaux

Les facteurs épigénétiques sont également des facteurs clés dans le remodelage de la chromatine d'une cellule changeant d'identité naturellement chez *C. elegans*.

Dans le laboratoire de Sophie Jarriault, nous étudions la reprogrammation naturelle d'une cellule épithéliale rectale (appelée Y) en motoneurone (nommé PDA) sans division cellulaire (voir chapitre V). L'histone déméthylase H3K27me2/3 Jmjd3.1 et le complexe SET-1 méthyltransférase H3K4 participent séquentiellement au contrôle de cette reprogrammation. La première phase de dédifférenciation de Y est contrôlée par l'action conjointe du complexe NODE-like (*Nanog and Oct4-associated deacetylase*) et du complexe SET-1. Le complexe NODE-like lierait les gènes cibles et recruterait le complexe SET-1 pour induire l'extinction du programme épithélial. Ensuite, une fois la cellule dédifférenciée, le FdT UNC-3 lierait JMJD3.1 et le complexe SET-1 pour induire la redifférenciation en neurone. Ici les FdT présents dans le complexe NODE-like (comme SEM-4) et UNC-3 conduisent différentes étapes de la reprogrammation de Y en PDA. Alors que la mutation de ces FdT entraîne un très fort défaut de dédifférenciation (dans 100% des vers mutants *sem-4*, Y ne parvient pas à passer l'étape de dédifférenciation) ou de reprogrammation (la majorité des vers mutants pour *unc-3* présentent une redifférenciation neuronale incomplète), les mutants du remodeleur chromatinien JMJD3.1 et des membres du complexe SET-1 sont bien plus faiblement impactés. Ici, les remodeleurs de la chromatines contribuent à la robustesse de la transdifférenciation de Y en PDA.

Zuryn *et al.*, ont démontré que les modifications d'histones dépendantes du complexe SET-1 et de *jmjd-3.1* confèrent une protection contre les variations et les stress provoqués par l'environnement du ver. En cas de stress environnementaux, les mutants des membres du complexe SET-1 ou *jmjd.3* présentent une pénétrance du défaut bien plus importante. Ces remodeleurs de la chromatine assurent ici une reprogrammation invariante de Y en PDA dans le ver sauvage, malgré des conditions environnementales non optimales (stress oxydatifs, radiations aux ultraviolets, DMSO, hautes températures).

Les températures extrêmes peuvent influencer l'état de la chromatine chez *C. elegans*. Certains mutants (pour les gènes *lin-35/RB*, *lin-37*, *hpl-2/HP1*, *lin-13*, etc.) présentent une expression ectopique de gène de la lignée germinale dans les cellules intestinales mais restent capables de se développer jusqu'au stade adulte. L'équipe de Susan Strome montre que soumis à de hautes températures, l'expression des gènes germinaux est renforcée. Cette expression d'un programme aberrant entraîne l'arrêt du développement en L1. Petrella et ses collègues suggèrent que les hautes températures réduisent la formation de l'hétérochromatine. La mutation de ses facteurs répresseurs entraîne une ouverture modérée de la chromatine à basse température et l'expression ectopique de certains gènes. A haute température, l'hétérochromatine serait moins stable et la suppression de ses facteurs entrainerait une ouverture encore plus ample de la chromatine et augmenterait l'expression de programmes aberrants (PETRELLA *et al.* 2011).

L'identité cellulaire est donc maintenue par la combinaison de l'expression continue de FdT clés (ou d'un réseau actif de FdT) et par un état chromatinien précis, spécifique de chaque type cellulaire (réprimant les programmes alternatifs et gardant actif le programme cible). Les remodeleurs de la chromatine peuvent également sécuriser des processus de reprogrammation ou de maintien de l'identité cellulaire face aux variations environnementales rencontrées par la cellule.

4) Etudier les mécanismes de la reprogrammation cellulaire : les limites de certains modèles

Comprendre et étudier en détail la reprogrammation cellulaire demande un traçage extrêmement précis des cellules changeant d'identité. Malgré les outils à disposition, l'étude de reprogrammations *in vivo* dans des organismes complexes reste difficile : la nécessité de faire des coupes (et de sacrifier l'animal) pour observer les cellules d'intérêt au sein des tissus ne permet pas de suivre toutes les étapes par lesquelles passent ces cellules. Peu d'études mettent en évidence ces étapes intermédiaires de reprogrammations directes. Certaines publications, tentant de comprendre les mécanismes et étapes empruntés lors de conversions directes, utilisent des cultures cellulaires. Par exemple, la transdifférenciation induite *in vitro* de fibroblastes en cellules progénitrices hématopoïétiques (voir tableau 1) passe par un stade intermédiaire où les cellules expriment des gènes endothéliaux (Cdh5, Tie2, Icam1; Pecam1, Vwf). Des analyses du transcriptome de ces cellules intermédiaires par micropuce révèle un profil rappelant celui des cellules hémogéniques, ces cellules à l'origine des cellules souches hématopoïétiques (BATA *et al.* 2014). Les auteurs montrent aussi qu'aucun marqueur de pluripotence n'est exprimé. Il apparaît donc que certaines reprogrammations directes passent par des étapes multipotentes (mais non pluripotentes) où il y a gain de potentiel cellulaire. Dans ces études *in vitro* sur cellules en culture, les analyses pour révéler l'état de différenciation des intermédiaires sont réalisées sur des populations de cellules. Une partie de ces cellules intermédiaires hémogéniques décrites ci-dessus présentent aussi une expression de gènes normalement exprimés dans des HSC et des progéniteurs hématopoïétiques. Il est difficile de conclure s'il y a un mélange des deux identités au sein des mêmes cellules ou si deux populations cohabitent. Souvent dans les études de reprogrammations directes *in vitro*, l'efficacité de reprogrammation est faible et il est donc difficile de suivre le destin précis d'une cellule qui sera assurément, complètement reprogrammée.

Depuis plusieurs années, un modèle animal a su démontrer son efficacité pour permettre l'étude de la reprogrammation cellulaire en contournant beaucoup de ces limites : *Caenorhabditis elegans*. Tous les avantages de ce modèle sont décrits dans le chapitre suivant : lignage invariant dans le ver sauvage, possibilité de traçage cellulaire

très efficace, dynamique des changements d'identités cellulaires *in vivo* observables du vivant de l'animal et existence d'événements de reprogrammations directes naturels.

V/ Etude d'un modèle de reprogrammation naturelle chez *C. elegans*

1) *C. elegans* : un animal modèle présentant de nombreux avantages

Dans les années 70, Sydney Brenner est le premier chercheur à utiliser *C.elegans* comme modèle animal (BRENNER 1974). Après éclosion de l'œuf, ce petit nématode passe par quatre stades larvaires avant d'atteindre le stade adulte. Il survit environ trois semaines en conditions normales, mais présente d'impressionnantes capacités de résistance aux conditions environnementales défavorables et peut survivre plusieurs mois sans nourriture. En effet, en l'absence de nourriture les vers peuvent rester bloqués au stade L1 (en cas de privation de nourriture après l'éclosion) ou passer par un stade de résistance spécifique appelé *dauer* (si la nourriture vient à manquer au stade L2, en cas de températures extrêmes ou de surpopulation. C'est cet état de diapause en *dauer* qui permet à *C.elegans* d'augmenter considérablement sa longévité) (figure 18).

Ce petit nématode offre de nombreux avantages : il est petit (1mm) et demande peu d'équipements (il grandit dans des boîtes de pétri et se nourrit de bactéries *Escherichia coli*) et peut être maintenu entre 15 et 25 °C. Il est complètement transparent tout au long de sa vie, un microscope optique permet d'observer chaque cellule de son organisme en le maintenant en vie. C'est un formidable modèle pour les études génétiques : son cycle de vie est de trois jours de l'œuf à l'adulte et chaque ver hermaphrodite peut s'autoféconder et donner naissance à plus de 300 vers. Des mâles existent naturellement (avec une fréquence d'apparition spontanée assez faible : 0,05-0,1% de la population) et peuvent être utilisés pour des croisements génétiques. Les souches de *C. elegans* peuvent être congelées et stockées à -80°C, puis décongelées après plusieurs années et reprendre vie.

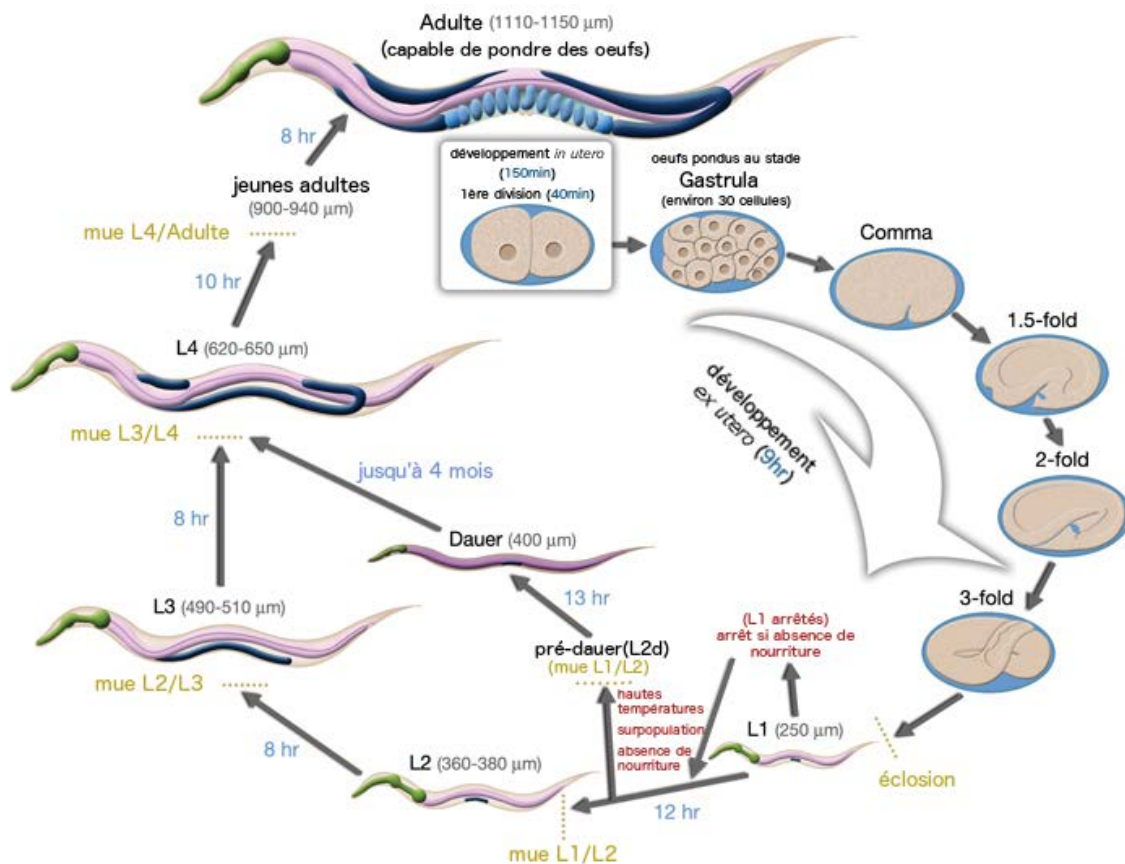


Figure 18 : Cycle de vie de *Caenorhabditis elegans*. Les différentes étapes du développement de *C. elegans* (temps indicatifs en bleu pour une croissance à 22°C, le cycle prend environ 3 jours). En conditions normales de croissance, quatre stades larvaires sont nécessaires avant d'atteindre le stade adulte (stade et taille en noir, éclosion et mues en jaune). Dans des conditions défavorables, le ver peut s'arrêter soit en L1, soit au stade Dauer. Source : wormatlas (<http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/introduction/Introframeset.html>)

Un autre avantage de ce modèle : son lignage invariant. Chaque adulte hermaphrodite est constitué de 959 noyaux somatiques (1033 pour les mâles). L'analyse du lignage a permis d'établir une carte complète de toutes les divisions cellulaires durant le développement du ver (de la première cellule zygotique au ver adulte) (SULSTON and HORVITZ 1977; SULSTON *et al.* 1983). Ce lignage invariant permet de connaître à l'avance la destinée et l'origine de chaque cellule au cours du développement, un avantage majeur pour observer et tracer chaque cellule.

C. elegans fût le premier animal complètement séquencé en 1998. Son génome d'environ 100 mégabases est divisé en cinq paires de chromosomes autosomes, et une paire de chromosomes sexuels XX pour les hermaphrodites (les mâles ne possèdent qu'un seul chromosome sexuel X, noté X0). Idéal pour conduire des cribles génétiques, il

constitue un modèle de choix pour des études non biaisées à grande échelle (par mutation aléatoire ou ARNi) sur organisme entier.

Ce modèle offre de nombreux outils moléculaires. La transparence du ver permet de visualiser des marqueurs fluorescents exprimés dans le ver (la GFP fût d'ailleurs exprimée la première fois dans *C. elegans* (CHALFIE *et al.* 1994)), permettant d'observer la dynamique de protéines d'intérêt marquées dans un organisme vivant. Pendant longtemps, l'inconvénient majeur de *C. elegans* était l'impossibilité d'intégrer des segments d'ADN par recombinaison homologue. Avec l'avènement de la méthode CRISPR-Cas9 (DICKINSON *et al.* 2013), *C. elegans* dispose désormais de tous les outils nécessaires pour l'édition précise de son génome.

Bref, *C. elegans* a permis d'étudier de nombreux processus biologiques (apoptose, durée de vie, polarité cellulaire, voie de signalisation des ARNi et des microARNs, épigénétique, héritabilité de caractères épigénétiques acquis, etc.) et de nombreuses grandes voies de signalisation conservées dans le ver (EGF, Notch, Wnt, insuline, TGF β , BMP, etc.). Il n'est donc pas surprenant de voir se multiplier depuis plusieurs années des études sur la reprogrammation cellulaire, qu'elles soient induites ou naturelles.

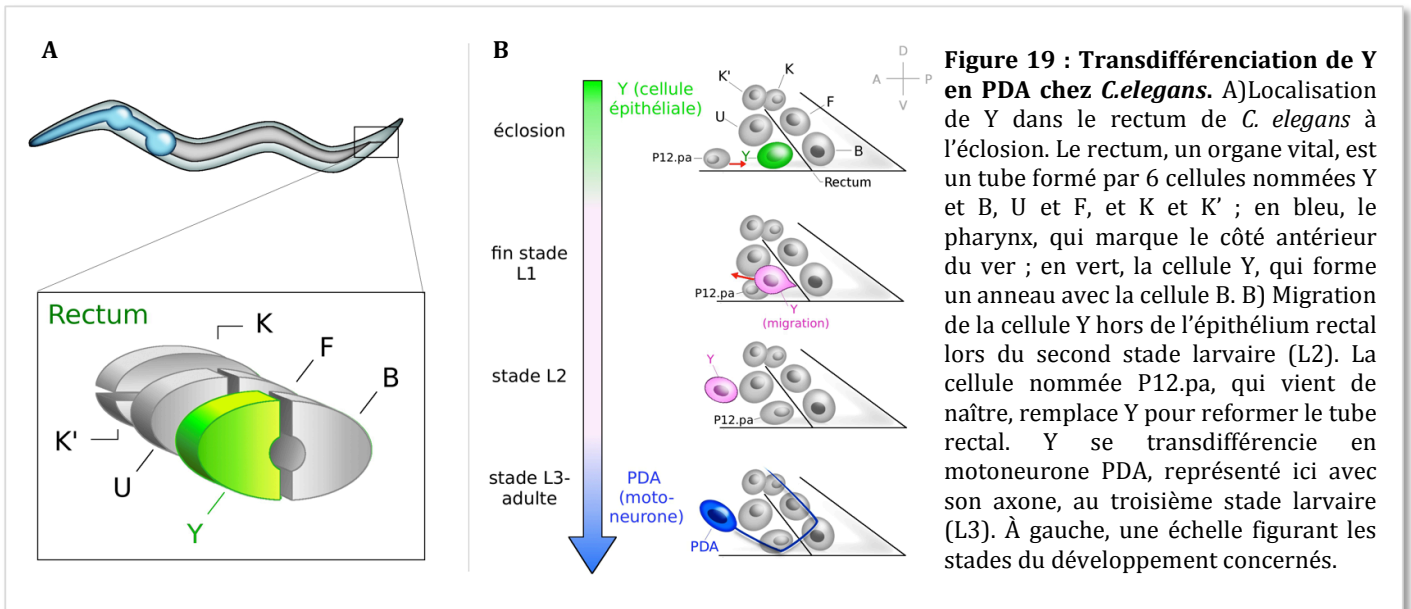
2) La transdifférenciation naturelle épithélio-neurale chez *C. elegans*

2.1) Description du modèle

Le rectum de *C. elegans* est composé de trois paires de cellules organisées en anneaux nommées Y, B, F, U, K et K' (figure 19A). A l'éclosion, Y fait partie intégrante du tube rectal, c'est une cellule complètement différenciée caractérisée par l'expression de marqueurs épithéliaux (*che-14*, *ajm-1*, *dlg-1*, *elg-26* et *lin-26*). Au microscope électronique, les jonctions adhérentes typiques des cellules épithéliales ont été observées entre Y et sa cellule voisine B.

Durant le stade larvaire L2, Y se rétracte hors du rectum, migre et change d'identité cellulaire pour devenir un motoneurone appelé PDA lors du troisième stade larvaire L3. La cellule épithéliale P12.pa remplace Y pour conserver l'intégrité de cet organe vital (figure 19B). PDA exprime désormais des marqueurs neuronaux (*unc-119*, *F25B3.2*, *ace3/4* et *cog-1*) et le programme épithélial est totalement éteint (JARRIAULT *et al.* 2008).

Cet événement intervient sans division cellulaire et offre donc un excellent modèle d'étude des mécanismes et acteurs qui permettent à un noyau somatique de changer radicalement d'identité. De plus ce phénomène est stéréotypé (100% des vers sauvages observés présenteront cette TD) et permet l'étude de la reprogrammation directe à l'échelle d'une cellule dans son contexte physiologique.



2.2) La découverte de facteurs clés de cette transdifférenciation

Afin de comprendre les mécanismes sous-tendant la transdifférenciation de Y en PDA, un crible par mutagenèse aléatoire à l'éthylméthane sulfonate (EMS) a été réalisé dans le but de découvrir de nouveaux acteurs de ce processus. Le traitement à l'EMS a été appliqué sur la souche IS98 exprimant un transgène intégré *cog-1::gfp*, marqueur du neurone PDA, et 17 mutants ne présentant pas de PDA ont été isolés. L'identification de ces mutants a permis de mettre en évidence plusieurs acteurs clés de cette TD naturelle.

L'observation au microscope à contraste interférentiel différentiel (DIC) permet de repérer l'arrangement des cellules rectales par observation des noyaux caractéristiques des cellules épithéliales. Il existe trois classes de mutants : les mutants de classe I, II ou III. Chez le ver sauvage, au stade L3 (c'est à dire après que Y se soit transformée en neurone) on peut distinguer nettement, les deux cellules U et P12.pa au côté antérieur du rectum (figure 20A). Les mutants dits de classe II présentent ces deux mêmes cellules au DIC mais PDA est absent (figure 20B). Dans ces mutants, Y semble avoir migré hors du rectum et a perdu son identité épithéliale sans avoir acquis les caractéristiques du motoneurone. L'identification des gènes mutés donne des informations précieuses sur les étapes intermédiaires de cette reprogrammation. Les mutants de classe I présentent trois cellules épithéliales dans cette zone : U, P12.pa et Y (figure 20C) : la cellule Y est ici bloquée aux premiers stades de la transdifférenciation. Ce type de mutants nous renseignera sur l'initiation du processus et les premières étapes de la conversion de Y en PDA. Les mutants de classe III ont deux phénotypes: une partie des mutants présentent les caractéristiques d'un mutant de classe I, l'autre partie d'un mutant de classe II, suggérant que les gènes affectés interviennent à plusieurs étapes de la transdifférenciation de Y.

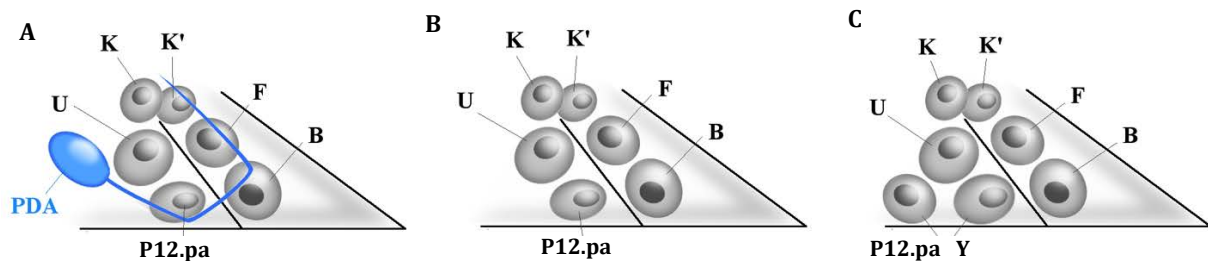


Figure 20 : Les différentes classes de mutants où la reprogrammation de Y n'a pas abouti. Schéma des noyaux des cellules rectales observables au microscope (DIC). A) Cellules rectales du ver sauvage. PDA est allumé par le marqueur *cog-1::gfp*, P12.pa a pris la place de Y. B) Mutant de classe II. Y a migré hors du rectum, mais n'a pas achevé sa reprogrammation en PDA (pas de marqueur exprimé). C) Mutant de classe I, ici Y demeure épithéliale rectale. P12.pa reste bloquée à côté du rectum. Les mutants de classe III présentent deux types de phénotypes : ceux représentés en B et en C.

L'analyse de ces mutants combinée à des approches candidates ont permis à l'équipe de Sophie Jarriault de préciser des acteurs clés à chaque étape de la reprogrammation de PDA.

2.3) Un processus passant par plusieurs étapes discrètes

Y passe par plusieurs étapes avant de devenir PDA. Chacune de ces étapes implique des acteurs moléculaires identifiés et caractérisés au fil des années d'étude au sein du laboratoire.

Y est la seule cellule rectale capable de se reprogrammer en PDA. Comment cette identité si spéciale est-elle conférée à cette cellule ? Quel signal lui donne la compétence pour pouvoir se reprogrammer en neurone PDA ?

Le lignage fixe de *C. elegans* permet de tracer l'origine de chaque cellule qui est identifiée par un code. AB.prrppaaaa est la future cellule Y (originale du blastomère AB, puis de la cellule postérieure de la division de AB (AB.p), ensuite de la cellule droite de la cellule AB.p (AB.pr), et ainsi de suite). Son homologue contra-latéral AB.plpppaaaa est la future cellule neuronale DA9 située proche du rectum. Ces deux cellules dépendent de la voie Notch pour définir leur identité. L'identité de Y et sa capacité à devenir le neurone PDA, est induite par un signal *lin-12/Notch*. L'identité de DA9 est induite par l'absence de ce signal Notch. Dans un mutant *lin-12(0)*, Y devient DA9, et dans un mutant *lin-12(gf)* DA9 devient Y et acquiert la capacité à devenir PDA (on peut observer 2 PDA au stade L3) (JARRIAULT *et al.* 2008). Dans le ver sauvage, seul Y reçoit le signal *lin-12/Notch* et acquiert la compétence à se reprogrammer en neurone PDA (GREENWALD *et al.* 1983).

Cette expression de *lin-12/Notch* doit être induite à un moment très précis : autour de la naissance de Y durant l'embryogenèse. L'expression continue d'une forme constitutivement active de *lin-12/Notch* permet à Y de devenir rectale mais empêche sa transdifférenciation en PDA (Thomas Daniele, non publié). La voie Notch confère à Y la compétence pour pouvoir se reprogrammer en neurone PDA, mais son expression doit être restreinte autour de la naissance de Y.

Une fois Y compétente à la transdifférenciation, quels sont les facteurs essentiels pour l'initiation du processus ?

L'identification de mutants de classe I a permis de découvrir certains de ces acteurs. *egl-27/Mta*, *ceh-6/Oct* et *sem-4/Sall* forment un complexe NODE-like qui

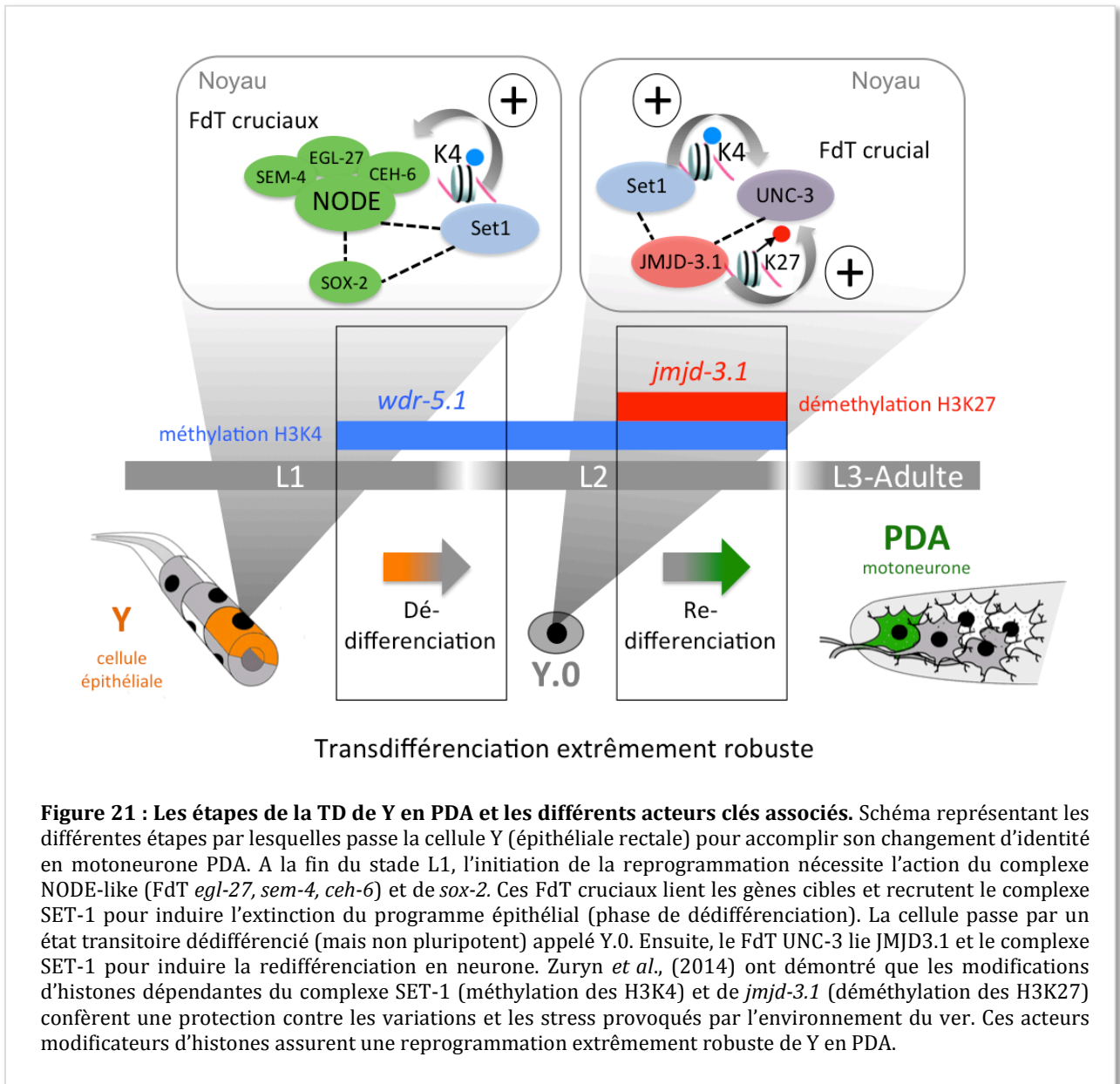
interagit avec *sox-2* pour induire l'expression du FdT *egl-5/HOX* et initier la reprogrammation. Quand ces gènes sont supprimés (par mutation ou ARNi) Y est bien présente dans le rectum mais elle demeure épithéliale et n'initie jamais sa reprogrammation en PDA (KAGIAS *et al.* 2012).

Un mutant du crible EMS de classe II a permis d'identifier l'implication du FdT *unc-3/COE* dans une étape plus tardive du processus. Dans le mutant *unc-3*, Y parvient à éteindre son programme épithélial, migre hors du rectum mais reste bloquée au début de l'étape de redifférenciation en neurone (certains gènes pan-neuronaux sont activés).

Au cours de cette transdifférenciation, jamais aucun marqueur épithélial n'est exprimé en même temps que des marqueurs neuronaux. Y subit une phase de dédifférenciation, transite par une étape dédifférenciée appelée Y.0. Ensuite, la cellule entame la redifférenciation en neurone et acquiert des caractéristiques pan-neurales, puis les gènes spécifiques au motoneurone PDA sont exprimés, et enfin la formation de son axone complète la reprogrammation en PDA (figure 21).

Y.0 est dédifférenciée mais non multipotente. En effet, induire l'expression ectopique de facteurs de reprogrammation tel que *hlh-1* (spécification musculaire), *end-1* (spécification intestinale), *lin-26* (spécification épithéliale), ou *unc-30* (spécification en neurone GABAergique) ne parvient pas à modifier le destin de Y.0 : dans le ver sauvage, Y deviendra toujours PDA (RICHARD *et al.* 2011).

Des facteurs épigénétiques assurent le bon déroulement des étapes de dédifférenciation (grâce au complexe SET-1 en interaction directe avec le complexe NODE-like) et de redifférenciation (avec le complexe SET-1 et Jmjd3.1 en liaison avec UNC-3) (voir partie III.3.3). Les mutants de ces complexes épigénétiques induisent des défauts de dédifférenciation/redifférenciation nettement amplifiés en présence de stress (chaleur, stress oxydatifs, radiation aux ultraviolets, DMSO). Ils assurent donc la robustesse de cette reprogrammation directe en toute circonstances (ZURYN *et al.* 2014) (figure 21).



2.4) Objectifs initiaux de ma thèse : identifier de nouveaux facteurs impliqués dans la conversion de Y en PDA

Seule la moitié des mutants du crible EMS avait été caractérisée et identifiée. Les premiers objectifs de ma thèse étaient d'identifier la mutation responsable du défaut de PDA dans 11 mutants différents. Cette enquête a mené à la découverte de deux

nouveaux gènes impliqués dans les toutes premières étapes du processus de reprogrammation : *lin-15A* et *hlh-16*.

hlh-16 est un facteur de transcription peu étudié. Son expression a retenu mon attention, il est en effet le seul gène identifié dans le laboratoire à n'être exprimé que dans Y au sein des cellules rectales au moment de l'initiation du processus. La présence de HLH-16 semble différencier Y des autres cellules du rectum. Cette expression particulière a permis au laboratoire d'élaborer une souche permettant de séparer et trier Y : un outil prometteur pour de futures analyses biochimiques et transcriptomiques à la résolution une-cellule.

La fonction de *lin-15A* était très floue. L'étudier m'a permis de déterminer qu'il s'agissait d'une protéine nucléaire liant les acides nucléiques impliquée dans l'initiation de la transdifférenciation de Y en PDA. Par des approches candidates, j'ai pu découvrir un groupe de gènes qui, une fois mutés, pouvaient restaurer l'initiation de la reprogrammation de Y dans les mutants *lin-15A*. Ces gènes sont impliqués dans le maintien de l'identité cellulaire des cellules de l'intestin et *lin-15A* joue un rôle déterminant pour lever l'action de ces gènes et induire la dédifférenciation de Y. Enfin, les travaux sur le mutant *lin-15A* m'ont amenée sur une voie inattendue : le rôle des conditions environnementales dans le maintien de l'identité cellulaire de Y. En effet, l'absence de nourriture chez le ver entraîne une déstabilisation du maintien de l'identité de Y, ce qui permet également de contourner l'absence de LIN-15A pour initier la transdifférenciation en PDA.

MATERIELS ET MÉTHODES

MATERIELS ET METHODES

Cette partie du manuscrit décrit les souches, plasmides, matériels et méthodes utilisés pour produire les résultats.

I/ Nomenclature chez *C.elegans*

Chez *C.elegans*, les gènes, construits et allèles sont écrits en minuscules italiques, les protéines en majuscule. Chaque nom de souche commence par une à trois lettres majuscules (notre laboratoire utilise les lettres IS), et chaque allèle commence par une à trois lettres minuscules (Laboratoire de Sophie Jarriault : *fp*) suivi d'une série de numéros. Exemple : IS318 (nom de souche) : *fp12(hlh-16)* (nom d'un allèle du gène *hlh-16* découvert au laboratoire de Sophie Jarriault). Dans tous les laboratoires, les épisomes non intégrés commencent par les lettres *Ex*, ceux intégrés au génome commencent par *Is*, suivi d'une série de numéros. Le détail des construits est indiqué entre crochets. Par exemple, IS2175 : *fpEx719[lin-15p::ha::flag::mcherry::lin-15A(ADNc)(10ng); ttx-3::gfp(50ng)] ; lin-15A(n767) X ; syIs63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV*. Dans cette souche, l'épisome *fpEx719* réalisé au laboratoire est non intégré. L'épisome *syIs63* est intégré au génome, dans le chromosome IV (*sy* = code pour les allèles provenant du laboratoire de P. Sternberg). Cette souche comporte également une mutation dans le gène *lin-15A* (allèle *n767*) situé sur le chromosome X.

II/ Maintenance de *C. elegans*, souches et allèles

Les conditions standards ont été utilisées pour le maintien des souches, comme décrit dans la publication originale de Sydney Brenner (BRENNER 1974). La température de culture utilisée est majoritairement à 20°C (sauf indication contraire dans les résultats).

Le tableau suivant décrit les souches utilisées, les allèles associés ainsi que le détail des constructions utilisées.

Tableau 3 : souches utilisées

nom	description
IS318	<i>hlh-16(fp12) I ; syls63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV</i>
IS319	<i>jmjd-3.1(fp11) X ; syls63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV</i>
IS320	<i>jmjd-3.1(fp13) X ; syls63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV</i>
IS1405	<i>ref-2(fp17) X ; syls63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV</i>
IS1277	<i>wdr-5.1(fp18) III ; syls63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV</i>
IS451	<i>egl-27(fp20) II ; syls63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV</i>
IS1416	<i>lin-15A(fp22) X ; syls63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV</i>
IS436	<i>sem-4(fp23) I ; syls63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV</i>
IS1407	<i>Q(fp24) ; syls63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV</i>
IS1319	<i>jmjd-3.1(fp25) X ; syls63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV</i>
IS449	<i>unc-3(fp26) X ; syls63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV</i>
IS616	<i>lin-15A(n767) X ; syls63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV</i>
CB4856	<i>souche sauvage de type hawaiian</i>
IS1971	<i>fpEx577[lin-15p::ha::flag::lin-15A(ADNc)::sl2::mcherry(10ng); myo-2::mcherry(2ng)] (lignée 1) ; lin-15A(n767) X ; syls63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV</i>
IS1972	<i>fpEx578[lin-15p::ha::flag::lin-15A(ADNc)::sl2::mcherry(10ng); myo-2::mcherry(2ng)] (lignée 2) ; lin-15A(n767) X ; syls63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV</i>
IS1973	<i>fpEx579[lin-15p::ha::flag::lin-15A(ADNc)::sl2::mcherry(10ng); myo-2::mcherry(2ng)] (lignée 3) ; lin-15A(n767) X ; syls63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV</i>
IS2174	<i>fpEx718[lin-15p::ha::flag::mcherry::lin-15A(ADNc)(10ng); ttx-3::gfp(50ng)] (lignée 1) ; lin-15A(n767) X ; syls63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV</i>
IS2175	<i>fpEx719[lin-15p::ha::flag::mcherry::lin-15A(ADNc)(10ng); ttx-3::gfp(50ng)] (lignée 2) ; lin-15A(n767) X ; syls63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV</i>
IS2500	<i>lin-15A(n433) X ; syls63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV</i>
IS2334	<i>fpEx832[lin-15p::ha::flag::mcherry::lin-15A(ADNc, ZF muté) (10ng); myo-2::mcherry(3ng)] (ignée 1) ; lin-15A(n767) X ; syls63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV</i>
IS2335	<i>fpEx833[lin-15p::ha::flag::mcherry::lin-15A(ADNc, ZF muté) (10ng); myo-2::mcherry(3ng)] (ignée 2) ; lin-15A(n767) X ; syls63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV</i>
IS2663	<i>fpEx952[hsp::mcherry::lin-15A(ADNc)(20ng); myo-2::gfp(3ng)] (lignée 1) ; lin-15A(n767) X ; syls63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV</i>
IS2664	<i>fpEx953[hsp::mcherry::lin-15A(ADNc)(20ng); myo-2::gfp(3ng)] (lignée 1) ; lin-15A(n767) X ; syls63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV</i>
IS2684	<i>lin-8(n111) II ; syls63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV</i>
IS2685	<i>lin-8(n111) II ; lin-15A(n767) X ; syls63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV</i>
IS2686	<i>lin-38(n751) II ; syls63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV</i>
IS2687	<i>lin-38(n751) II ; lin-15A(n767) X ; syls63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV</i>
IS85	<i>rrf-3(pk1426) II ; syls63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV</i>
IS2630	<i>unc-13(e1091am) I ; lin-35(n745) I ; syls63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV</i>
IS2632	<i>unc-13(e1091am) I ; lin-35(n745) I ; lin-15A(n767) X ; syls63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV</i>
IS2593	<i>dpl-1(n3643) II ; syls63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV</i>
IS2496	<i>dpl-1(n3643) II ; lin-15A(n767) X ; syls63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV</i>
IS2555	<i>lin-13(ok838) III ; syls63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV</i>
IS2532	<i>lin-13(ok838) III ; lin-15A(n767) X ; syls63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV</i>
IS2595	<i>lin-9(n112) III ; syls63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV</i>
IS2631	<i>lin-9(n112) III ; lin-15A(n767) X ; syls63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV</i>
IS2501	<i>lin-15B(n744) X ; syls63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV</i>
IS2000	<i>lin-15AB(n309) X ; syls63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV</i>
IS2629	<i>lin-36(n766) III ; syls63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV</i>
IS2562	<i>lin-36(n766) III ; lin-15A(n767) X ; syls63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV</i>
IS2586	<i>lin-37(n758) III ; syls63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV</i>
IS2563	<i>lin-37(n758) III ; lin-15A(n767) X ; syls63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV</i>
IS2588	<i>hpl-2(ok917) III ; syls63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV</i>
IS2503	<i>hpl-2(ok917) III ; lin-15A(n767) X ; syls63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV</i>

Tableau 3 : souches utilisées

nom	description
IS538	<i>dpy-5(e61) I lin-53(n833)I; syls63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV</i>
IS551	<i>lin-53(n833) I; lin-15A(n767) X; syls63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV</i>
IS2754	<i>lin-65(n3441) I; syls63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV</i>
IS2755	<i>lin-65(n3441) I; lin-15A(n767) X; syls63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV</i>
IS2756	<i>lin-52(n771) III; syls63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV</i>
IS2757	<i>lin-52(n771) III; lin-15A(n767) X; syls63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV</i>
IS2767	<i>met-2(ok2307) III; syls63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV</i>
IS2768	<i>met-2(ok2307) III; lin-15A(n767) X; syls63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV</i>
IS2758	<i>lin-61(n3809) I; lin-15A(n767) X; syls63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV</i>
IS1616	<i>rrf-3(pk1426) II; lin-15A(n767) X; syls63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV</i>
IS2493	<i>eri-1(mg366) IV; lin-15A(n767) X; syls63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV</i>
IS2791	<i>daf-16(mu86) I; lin-15A(n767) X; syls63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV</i>
IS2821	<i>daf-16(mu86) I; daf-7(e1372) III; lin-15A(n767) X; syls63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV</i>
IS2826	<i>daf-16(mu86) I; lin-15A(n767) X; lin-13(ok838) III; syls63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV</i>
IS2813	<i>daf-2(e1370) III; daf-3(ok3610) X; lin-15A(n767) X; syls63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV</i>
IS1999	<i>hlh16(fp12) I; syls63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV; fpEx598[ceh-6 FOSMID WRM0622aCO2(10 ng); myo-2::mcherry(2ng)]</i>
IS2330	<i>fpEx828[hlh-16p::mcherry::hlh1-16::hlh-16 3'UTR(20ng); myo-2::GFP(3ng)] ; hlh16(fp12) I; syls63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV</i>
IS2379	<i>fpEx853[hlh-16p (site lag-1 muté)::mcherry::hlh1-16::hlh-16 3'UTR(20ng); myo-2::gfp (3ng)] (lignée 2) ; hlh16(fp12) I; syls63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV</i>
IS2380	<i>fpEx854[hlh-16p (site lag-1 muté)::mcherry::hlh1-16::hlh-16 3'UTR(20ng); myo-2::gfp (3ng)] (lignée 3) ; hlh16(fp12) I; syls63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV</i>
IS2381	<i>fpEx855[hlh-16p (site lag-1 muté)::mcherry::hlh1-16::hlh-16 3'UTR(20ng); myo-2::gfp (3ng)] (lignée 5) ; hlh16(fp12) I; syls63[cog-1::gfp;unc-119(+)] IV</i>
IS2490	<i>fpEx888[hlh-16p::mcherry::hlh1-16(Δ fin de l'intron1 jusqu'au stop)::hlh-16 3'UTR(20ng); myo-2::GFP(3ng)] (lignée 1)</i>
IS2491	<i>fpEx889[hlh-16p::mcherry::hlh1-16(Δ fin de l'intron1 jusqu'au stop)::hlh-16 3'UTR(20ng); myo-2::GFP(3ng)] (lignée 2)</i>
IS2492	<i>fpEx890[hlh-16p::mcherry::hlh1-16(Δ fin de l'intron1 jusqu'au stop)::hlh-16 3'UTR(20ng); myo-2::GFP(3ng)] (lignée 3)</i>
IS2584	<i>fpEx926[hlh-16p::mcherry::hlh1-16(Δ exon2 jusqu'au stop)::hlh-16 3'UTR(20ng); prf4(100ng)]</i>
IS2558	<i>fpIs90[hlh-16p::gfp::hlh1-16(Δ exon2 jusqu'au stop)::hlh-16 3'UTR(20ng); prf4(100ng)]</i>
IS2538	<i>fpIs88[hlh-16p::gfp::hlh1-16::hlh-16 3'UTR; PRF-4] ; fpIs76[egl-5p(6,5kb)Δpes10::mCherry]</i>
OH10162	<i>otEx4503 [hlh-16p::gfp::hlh1-16::hlh-16 3'UTR, pFR4]</i>

III/ Construits (plasmides)

Ces tableaux résument les plasmides utilisés ainsi que les détails des constructions.

Tableau 4 : plasmides utilisés (partie résultats)

Nom	Construction	Commentaires
psj805	<i>lin-15p::ha::flag::mch::lin-15A(ADNc)</i>	rporteur traductionnel de <i>lin-15A</i>
psj838	<i>lin-15p::ha::flag::lin-15A(ADNc)::sl2::mcherry</i>	rporteur transcriptionnel de <i>lin-15A</i>
psj830	<i>hsp::mcherry::lin-15A(ADNc)::unc-54 3'UTR</i>	<i>lin-15A</i> sous contrôle d'un promoteur de choc thermique (HSP)
psj818	<i>lin-15p::ha::flag::mch::lin-15A(ADNc, ZF muté)::unc-54 3'UTR</i>	mutation du domaine ZF du domaine THAP-like de <i>lin-15A</i> (C212S C215S)
psj098	<i>hlh-16p::gfp::hlh-16::hlh-16 3'UTR</i>	rporteur traductionnel de <i>hlh-16</i> version <i>gfp</i> (plasmide reçu de Vincent Bertrand)
psj821	<i>hlh-16p::mcherry::hlh-16::hlh-16 3'UTR</i>	rporteur traductionnel de <i>hlh-16</i> version <i>mcherry</i>
psj824	<i>hlh-16p[site lag-1 muté]::mcherry::hlh-16::hlh-16 3'UTR</i>	la séquence reconnue par lag-1 (effecteur nucléaire de la voie Notch) est muté (TTCCATA to TTGCCTTA) dans le promoteur de <i>hlh-16</i>
psj826	<i>hlh-16p::mcherry::hlh-16[Δde puis la fin de l'intron 1 jusqu'au stop]::hlh-16 3'UTR</i>	Délétion des 22 derniers nucléotides de l'intron 1 jusqu'au codon stop de <i>hlh-16</i> . Délétion entre les séquences suivantes (incluses) : [TAACAAATAAAAAAAAAATTCT...ACTGCATCACATCAACATGA]
psj827	<i>hlh-16p::mcherry::hlh-16[Δ depuis l'exon 2 jusqu'au stop]::hlh-16 3'UTR</i>	Délétion partant du début de l'exon 2 jusqu'au codon stop de <i>hlh-16</i> . Délétion entre les séquences suivantes (incluses) : [AAAATCTGTTGAGAAACTCA...ACTGCATCACATCAACATGA]
psj828	<i>hlh-16p::gfp::hlh-16[Δexon2 depuis l'exon2 jusqu'au stop]::hlh-16 3'UTR</i>	Délétion partant du début de l'exon 2 jusqu'au codon stop de <i>hlh-16</i> . Délétion entre les séquences suivantes (incluses) : [AAAATCTGTTGAGAAACTCA...ACTGCATCACATCAACATGA]

Tableau 5 : Constructions évoquées dans la discussion

Nom	Construction	Commentaires
psj800	<i>lin-15p::ha::flag::lin-15A(ADNc)</i>	Construction intégrée dans la souche IS1961 (<i>fpls56</i>) utilisée pour purifier la protéine LIN-15A
psj819	<i>lin-15p::ha::flag::gfp</i>	Construction intégrée dans la souche IS2151 (<i>fpls63</i>) utilisée pour purifier la protéine GFP (contrôle)
psj811	<i>lin-15p::ha::flag::lin-15A(ADNc) ΔC-ter</i>	Délétion du domaine C-terminal après le domaine ZF. Délétion de R292 jusqu'au codon stop inclus
psj812	<i>lin-15p::ha::flag::lin-15A(ADNc) ΔN-ter</i>	Délétion du domaine N-terminal avant le domaine ZF. Délétion entre M1 et T207 inclus
psj813	<i>lin-15p::ha::flag::Vp16::lin-15A(ADNc)::sl2::mch</i>	Fusion de <i>lin-15A</i> avec le domaine activateur de la transcription VP16 (en 5')
psj814	<i>lin-15p::ha::flag::EnR::lin-15A(ADNc)::sl2::mch</i>	Fusion de <i>lin-15A</i> avec le domaine répresseur de la transcription EnR (en 5')
psj815	<i>lin-15p::ha::flag::lin-15A(ADNc)::Vp16::sl2::mch</i>	Fusion de <i>lin-15A</i> avec le domaine activateur de la transcription VP16 (en 3')
psj816	<i>lin-15p::ha::flag::lin-15A(ADNc)::EnR::sl2::mch</i>	Fusion de <i>lin-15A</i> avec le domaine répresseur de la transcription EnR (en 3')
psj817	<i>lin-15p::ha::flag::mch::lin-15A(ADNc) ΔNLS</i>	Délétion de la séquence NLS de <i>lin-15A</i> . Délétion des 33 acides aminés entre E442 et Y475 inclus.

IV/ Préparations des souches pour séquençage haut débit

Stratégie du « Deep mapping »

Chez *C. elegans*, un traitement de quatre heures à l'éthylméthane sulfonate (EMS, 50mM) produit en moyenne 440 mutations par individu diploïde (DAVIES *et al.* 1999). Les mutations responsables du phénotype d'intérêt après un traitement à l'EMS sont donc noyées parmi les autres mutations imputables au traitement chimique. De plus, chez *C. elegans*, les souches dérivent rapidement : au fil des générations, une souche peut accumuler un grand nombre de variations (appelées variants). Après un séquençage complet du génome et une analyse bio-informatique des séquences d'un mutant issue d'un crible EMS, ces variants sont considérés comme des mutations par comparaison au génome de référence. Difficile de discriminer la mutation d'intérêt des variants et des autres mutations issues du traitement chimique.

Le laboratoire de Sophie Jarriault a mis au point une nouvelle méthode pour identifier les mutations d'intérêt à travers le génome : le deep mapping (ZURYN *et al.* 2010)

On peut décomposer cette méthode, dont le principe est résumé dans la partie résultats, en quatre étapes :

La 1ère étape consiste en un backcrossing (ou croisement retour) de la souche mutante, de préférence avec la souche d'origine utilisée pour le crible. Ceci permet, par brassage chromosomique et recombinaisons, d'éliminer ces mutations parasites induites par l'EMS, et sans rapport avec la mutation causant notre phénotype d'intérêt (figure 22 des Résultat I.3).

La 2ème étape est le séquençage complet du génome. Ceci permet de visualiser la répartition des mutations le long des chromosomes. Néanmoins des variations entre les mutants et la séquence de référence sont également observées, qui sont dues à la dérive naturelle des souches. Lors de la mise au point de cette technique au laboratoire, plus de 2000 variants naturels ont été trouvés entre le génome de référence et les souches mutantes séquencées. Ces variants naturels masquent la région qui contient toujours une forte densité de mutations induites par l'EMS.

La 3ème étape, par l'analyse des séquences obtenues, vise à éliminer ces variants pour pouvoir localiser le locus contenant la mutation d'intérêt. Il suffit pour cela de comparer les mutants issus d'un même crible EMS entre eux et de soustraire les variants qu'ils ont

en commun. Cette étape est très rapide (environ 1 heure) et permet d'obtenir un pic de mutation délimitant une région chromosomique précise (figure 22 des résultats).

Enfin, la 4^{ème} étape consiste à tester les mutations homozygotes imputables à l'EMS (G → A et C → T) présentes dans l'intervalle, en se concentrant dans un premier temps sur celles qui affectent la séquence codante d'un gène. La confirmation de la présence de la mutation par re-séquençage Sanger, la phénocopie du phénotype d'intérêt par interférence à l'ARN, l'analyse d'autres allèles mutants quand ils existent, ou le sauvetage du phénotype par injection d'une copie sauvage du gène permettront de confirmer l'implication du gène dans la transdifférenciation de Y en PDA.

Stratégies de backcross

La souche IS98 WT exprimant *cog-1::gfp* a été utilisée pour le traitement EMS et pour les backcrossings. Tous les mutants dérivent de cette souche, ils ont été croisés plusieurs fois avec IS98 et possèdent donc les mêmes variants (figure 22 dans les résultats, I.3).

Le backcross par les mâles, consiste à croiser des mutants hermaphrodites (mutation notée «m») avec des mâles de la souche sauvage utilisée avant traitement à l'EMS (IS98: souche sauvage exprimant *cog-1::gfp*, marqueur de PDA), puis d'isoler les mâles F1 m/+ (ou m/0 si la mutation est sur le chromosome X) pour refaire un croisement avec la souche WT hermaphrodite. Les hermaphrodites F2 m/+ et +/+ sont isolés. La moitié de ces F2 donnera une génération F3 contenant 25% de vers mutants m/m (figure 23 B des résultats I.3). Ces mutants sont repiqués puis l'opération est répétée 3 à 4 fois. Par recombinaison et brassage génétique, la majorité des mutations causées par l'EMS va disparaître. Cette méthode de choix a été utilisée pour les mutants O, M et K ainsi que le mutant E (le backcross de ce mutant a été réalisée par Steven Zuryn avant mon arrivée au laboratoire). Pour les autres mutants, l'étape de croisement des mâles F1 m/+ (ou m/0) est irréalisable en raison de la stérilité/paralysie des mâles F1 pour les mutants J, R et G. J'ai donc opté pour une autre stratégie : le backcross simple. Cette méthode consiste à croiser des mutants hermaphrodites avec des mâles de la souche sauvage IS98, puis d'isoler les hermaphrodites F1. Par autofécondation, ces F1 vont produire une génération F2 où sera sélectionné un mutant homozygote m/m (figure 23 A des résultats I.3). Il faudra recommencer l'opération six à huit fois pour obtenir la disparition d'un maximum de ces mutations parasites.

Préparation d'ADN génomique

L'extraction d'ADN génomique des mutants G, J, K, M, O et R a été réalisée suivant le protocole du kit Qiagen puregene Core Kit A. Huit grandes boîtes de pétri contenant une population dense de vers sont nécessaires à l'obtention d'une quantité finale de 10 µg d'ADN minimum pour le séquençage. Concentration requise pour le séquençage : 200ng/µL.

Séquençage complet du génome et alignement sur le génome de référence de *C. elegans* N2 via le logiciel MAQGene (BIGELOW *et al.* 2009).

Cette partie a été réalisée par nos collaborateurs du CNAG de Barcelone.

Librairie : l'ADN génomique a été fragmenté puis des adaptateurs spécifiques de chaque mutant ont été ajoutés aux fragments. Les fragments ont été amplifiés par PCR. Le séquençage a été réalisé par un séquenceur automatique Illumina HiSeq 2000 au centre national d'analyse génomique (CNAG) de Barcelone. Les deux extrémités des fragments ont été séquencées sur une distance de 100 bases (read length), les trois mutants ont été séquencés sur un même canal (une cellule de séquençage contient 2x8 canaux), et ce en double. Sachant que le génome de *C. elegans* est d'environ 100 Mb, et qu'un canal permet de lire 62,5 millions de clusters de séquences, la couverture théorique attendue est : $62,5 \times 10^6 \times 100 \text{ (read length)} \times 2 \text{ (deux extrémités lues)} \times 2 \text{ (2 canaux utilisés)} / 100 \times 10^6 \text{ (taille du génome)} \times 3 \text{ (3 mutants par canaux)} = 83X$. Ceci signifie que chaque base du génome devrait être couverte 83 fois en moyenne à l'issue du séquençage, donnant une très grande fiabilité dans les résultats.

L'extraction d'ADN du mutant E a été réalisée par Steven Zuryn avant mon arrivée dans le laboratoire (mêmes conditions, même kit de purification + nébulisation) et le séquençage avait été réalisé à la plateforme de séquençage de l'IGBMC sur le séquenceur IlluminaGAII avec une couverture du génome de 52,2-55,3X. Les fragments ont été alignés avec le génome de référence de la souche sauvage de *C.elegans* N2 via le logiciel MAQGene.

V/ Identification du mutant *hlh-16(fp12)*

Localisation de *E(fp12)* sur le chromosome I

Après le croisement $unc-29(e1072)/+ \text{♂} \times \text{♀} E(fp12)/E(fp12)$, seuls les vers de phénotype Unc (problème de mobilité), donc $unc-29(e1072)/unc-29(e1072)$ (mutation récessive) ont été repiqués 1♂/boite (sept vers F2). Après auto fécondation, toutes les boîtes contenaient des vers sans défaut de PDA (total n=190, entre 25 et 30 vers F3 observés par boîtes). Ce qui signifie que $unc-29(e1072)$ et $E(fp12)$ sont proches génétiquement et la recombinaison entre ces deux gènes est rare : 7/7 des $unc-29(e1072)/unc-29(e1072)$ repiqués sont +/+ pour le gène E (aucun vers ne présente le défaut de PDA). Dans le cas de non liaison génétique, la répartition serait de $\frac{1}{4} E(fp12)/E(fp12)$, $\frac{1}{2} E(fp12)/+$, $\frac{1}{4} +/+$.

Cartographie des SNP sur le chromosome I

Cette ancienne méthode consiste en la localisation de la région génomique où se situe la mutation par une cartographie basée sur l'analyse des polymorphismes d'un seul nucléotide (SNP), (méthode appelée *SNP mapping*). Le but de cette méthode est d'identifier les SNP liés génétiquement à la mutation d'intérêt afin de localiser la région génomique où elle se situe.

Le mutant E porte une mutation « m » et dérive d'une souche de type N2 bristol (couramment utilisée dans les laboratoires). Un croisement de cette souche mutante a été réalisé avec une autre souche sauvage Hawaiian qui contient une grande quantité de SNP différents de la souche N2. Ces SNP ont comme particularité de former un site de restriction.

Dans un premier temps, les hermaphrodites hétérozygotes F1 issus du croisement du mutant (N2) et de la souche sauvage Hawaiian ont été isolés. Par autofécondation, on obtient une génération F2 recombinée. Les F2 homozygotes pour la mutation recherchée (m/m repéré par leur phénotype « absence de PDA ») ont été isolés et une analyse de la présence des différents SNP N2 et Hawaiian a été réalisée par restriction des sites SNP Hawaiian (figure 26 des résultats I.4). Pour un locus précis, les SNP N2 proches de la mutation m seront surreprésentés : plus la mutation est proche d'un SNP plus la probabilité qu'un évènement de recombinaison se produise entre m et le SNP est faible.

Test de complémentation *ceh-6(mg60)/E(fp12)*

Croisement : *unc-29(e1072)/E(fp12)*; *syIs63* ♂ x ♀ *ceh-6(mg60)/dpy-5(e61);unc-29(e1072)* (souche TB1, *ceh-6(mg60)* homozygote létal), sélection des F1 de phénotype sauvage non Unc (*ceh-6(mg60)/unc-29(e1072)* ou *E(fp12)/dpy-5(e61);unc-29(e1072)* ou *ceh-6(mg60)/E(fp12)*) isolés 1♀ par boîte. Sélection de deux boîtes F3 sans vers Unc ni Dpy = *ceh-6(mg60)/E(fp12)* puis observation du phénotype « sans PDA ». Boîte F3 N°1 : 25% de vers sans PDA (n=44), boîte F3 N°2 = 16,9 % de vers sans PDA (n=59). Les vers *ceh-6(mg60)/ceh-6(mg60)* étant létaux, 1/3 des F3 sont *E(fp12)/E(fp12)*, 2/3 *ceh-6(mg60)/E(fp12)*. Les mutants *E(fp12)* ayant une pénétrance d'environ 70-80% de vers sans PDA, de faible pourcentage de vers présentant le défaut de PDA correspond au homozygote *E(fp12)*. Il y a donc complémentation entre *E(fp12)* et *ceh-6(mg60)*.

VI/ ARNi

Les ARNi sont réalisés par amplification PCR sur préparation d'ADNc de vers N2 (tous stades) avec les oligonucléotides commençant par la séquence T3 ([AATTAACCCTCACTAAAGG](#)). Les segments d'ADNc sont transcrits *in vitro* avec la T3-ARN polymérase puis purifiés avec le kit Qiagen RNeasy.

Oligonucléotides utilisés pour amplification PCR :

ARNi *hlh-16*:

mcm80F (T3-*hlh-16*) : [AATTAACCCTCACTAAAGG](#)TCATGTTGATGTGATGCAGTCTACTG

mcm80R (T3-*hlh-16*): [AATTAACCCTCACTAAAGG](#)ATGTCTTCGGAATCACCGCCTGG

ARNi *smo-1* :

mcm89F (T3-*smo-1*) : [AATTAACCCTCACTAAAGG](#)ATGGCCGATGATGCAGCTCAAGC

mcm89R (T3-*smo-1*) : [AATTAACCCTCACTAAAGG](#)CTAGAATCCGCCAGCTGCTC

ARNi *uba-2* :

mcm90F (T3-*uba-2*) : [AATTAACCCTCACTAAAGG](#)CTGCCACAAATAGAGCTAACC

mcm90R (T3-*uba-2*) : [AATTAACCCTCACTAAAGG](#)AGCCATTGACGTGTTCCAAGTGG

VII/ Expériences de chocs thermiques

Les expériences de chocs thermiques ont été réalisées de la même manière pour les souches IS2663 et IS2664. La protéine MCHERRY::LIN-15A est très faiblement visible après l'induction du choc thermique. D'après les expériences de chocs thermiques précédemment réalisées dans le laboratoire, l'induction de l'expression est effective 30 minutes après le choc thermique à tous les stades (ZURYN *et al.* 2014).

Induction de l'expression de *lin-15A* au milieu de l'embryogénèse

Environ 100 mères transgéniques gravides sont déposées sur deux boîtes avec nourriture. Après les avoir laissées pondre durant 1h, les mères sont soigneusement retirées des deux boîtes. Les œufs restent 3h à 20°C, puis une boîte est plongée dans un bain-marie à 34°C durant 1h (l'autre boîte contrôle ne subira pas de choc thermique et est déposée dans un incubateur à 20°C). Après le choc thermique, la boîte est immergée dans de l'eau à 20°C 1h pour un refroidissement rapide, puis laissée dans un incubateur à 20°C jusqu'à la croissance des œufs au stade L4. Les vers transgéniques et non transgéniques, ayant subi le choc thermique ou non, sont observés en parallèle.

Induction de l'expression de *lin-15A* au stade L1 précoce

Environ 50 mères transgéniques gravides sont déposées sur deux grandes boîtes avec nourriture le soir du Jour 0 (J0). A J1, des centaines d'œufs sont déposés seuls sur une nouvelle boîte avec nourriture à 20°C. 3h plus tard des vers L1s juste éclos sont repiqués sur deux boîtes avec nourriture : une boîte est plongée dans un bain-marie à 34°C durant 1h (l'autre boîte contrôle ne subira pas de choc thermique et est déposée dans un incubateur à 20°C). Après le choc thermique, la boîte est immergée dans de l'eau à 20°C 1h, puis laissée dans un incubateur à 20°C jusqu'à la croissance des œufs au stade L4. Les vers transgéniques et non transgéniques, ayant subi le choc thermique ou non, sont observés en parallèle.

Induction de l'expression de *lin-15A* au stade L2

Environ 100 mères transgéniques gravides sont déposées 1h sur boîtes avec nourriture. Les œufs restent 25h (pour le stade L2 précoce), 28h (pour le milieu du stade L2) ou 31h (pour la fin du stade L2) à 20°C avant le choc thermique (les stades sont vérifiés sur une quinzaine de vers au microscope DIC par observation du développement des gonades et l'absence des alae). Après le choc thermique d'1h à 34°C (bain-marie), la boîte est immergée dans de l'eau à 20°C 1h, puis laissée dans un incubateur à 20°C jusqu'à la croissance des œufs au stade L4. Les vers transgéniques et non transgéniques, ayant subi le choc thermique ou non, sont observés en parallèle.

Induction de l'expression de *lin-15A* au stade L3

Environ 50 mères transgéniques gravides sont déposées sur deux grandes boîtes avec nourriture le soir du Jour 0 (J0). A J1, des centaines d'œufs sont déposés seuls sur une nouvelle boîte avec nourriture à 20°C. 3h plus tard des vers L1s juste éclos sont repiqués sur deux boîtes avec nourriture puis laissés 26-28h avant choc thermique d'1h à 34°C (bain-marie). Après le choc thermique, la boîte est immergée dans de l'eau à 20°C 1h, puis laissée dans un incubateur à 20°C jusqu'à la croissance des œufs au stade L4. Les vers transgéniques et non transgéniques, ayant subi le choc thermique ou non, sont observés en parallèle.

VIII/ Immunolocalisations

Suivant le protocole établi par Finney et Ruvkun. Fixation des vers au stade L3 dans une solution MRWB (2 M KCl (160 mM), 5M NaCl (40mM), 0.1M EGTA (20 mM), 0.1M Spermidine (10 mM)) avec formaldéhyde (1%). Les anticorps primaires de souris anti-EGL-5 et de lapin anti-AJM-1 ont été utilisés respectivement à une concentration de 1/100 et 1/400, dans le tampon Ab A (2.0 ml 5X PBS, 5.0 ml BSA 2%, 50 µl Triton-X-100, 250 µl NaN₃ 2% , 20 µl 0.5M EDTA, qsp 10ml d'eau déminéralisée) toute une nuit. Lavage dans le tampon AbB (AbA+BSA0,2%). Les anticorps secondaires de Alexa488-

anti-souris et CY3 anti-lapin ont été utilisés à une concentration de 1/200 dans le tampon Ab B toute une nuit. Rinçage avec la solution Ab B, puis ajout du Hoechst dilué au 1/1000 dans le tampon Ab B. Lavage avec la solution Ab A. Conservation dans solution Ab A avec l'agent anti-fading vectashield. Observations au microscope confocal à disque rotatif.

IX/ Production des phéromones d'adulte

Culture liquide de vers adultes

La population dense de vers adultes contenus dans six grandes boîtes (Ø13 cm) ensemencées avec des bactéries *E.Coli* HB101 (tapis épais de bactéries) est transférée en culture liquide dans du milieu de croissance + bactéries HB101 à 25°C, sous agitation (HB101 ajoutées au J0, J3 et J5 de culture). Au septième jour, si la quantité de adultes est supérieure à 50%, le milieu est séparé des vers par centrifugation.

Milieu de croissance : 1 litre = 1ml 1M MgSO₄, 1ml 1M CaCl₂, 10 ml milieu trace métaux 10X (trace métaux 100X : 1 litre = FeSO₄ 0.69g, EDTA 1,9g, MnCl₂ 0,2g, ZnSO₄ 0,29g, CuSO₄ 0,025g, eau qsp 1 litre).

Extraction des phéromones

Le milieu de culture est chauffé sous agitation et sous hôte jusqu'à obtention d'une pâte brune collante. 2x 20ml d'éthanol 100% est ajouté à la préparation pour dissoudre les phéromones dans l'alcool. L'extrait est centrifugé (4000rpm, 5min), le surnageant est réservé puis évaporé par aspiration. Les résidus séchés au fond du tube sont dissous dans 10ml d'eau distillée, puis la solution est centrifugée (5000rpm, 10min), le surnageant est stérilisé (filtre 0,2 micron). La solution de phéromone adulte est stockée sous forme d'aliquotes à -20°C.

Application des phéromones

Les phéromones sont directement mélangées au milieu LB agar utilisé pour les boîtes de pétrie contenant les vers. Différentes concentrations de phéromones sont

testées après chaque préparation. Pour ma préparation, 8ul de solution phéromones/ml de milieu LB agar sont suffisants pour l'induction de plus de 30% de vers dauers (sur souche sauvage N2). Les boîtes sontensemencées par des bactéries E.Coli OP50 (tapis fin de bactérie).

X) Co-immunoprécipitation de l'ADN (nu ou enroulé) avec LIN-15A

L'ADN utilisé est la séquence répétée du gène de l'ARN 5S humain. 1ug de protéine purifiée FLAG::LIN-15A a été incubé avec 400ng d'ADN biotinylé ou 400ng d'ADN enroulé sur mononucléosomes H3 recombinants en bactéries (sans modifications) biotynilés ou 400ng d'ADN enroulé sur mononucléosomes H3 natifs (purifiés de cellules HeLa, avec modifications d'histones) biotinylés. Elution avec billes d'agarose Streptavidine. L'élua straptavidine a été resuspendu dans du tampon Laemml (2X concentré) et chargé sur gel SDS PAGE à gradient (8%→12%) et révélé avec des anticorps anti-FLAG et anti-H3.

Expériences réalisées par Manuela Portoso (laboratoire de Raphaël Margueron, institut Curie, Paris)

XI/ Observations microscopiques

Les observations au contraste interférentiel de phase (DIC) et par épifluorescence ont été réalisées sur un microscope Zeiss Z1 imager. Les vers anesthésiés dans 25mMM d'azyde de sodium étaient montés sur lame sur un coussin d'agarose 2%.

RÉSULTATS

RÉSULTATS

I/ Identification des mutants du crible EMS

1) Caractéristiques des mutants

Mon premier objectif au sein du laboratoire a été d'identifier les onze mutants restants du crible EMS réalisé quatre ans plus tôt. Le laboratoire de Sophie Jarriault assigne les lettres *fp* à chaque mutation découverte au sein de l'équipe. Les mutants sont également historiquement désignés par une lettre, nom qui leur avait été attribué lorsqu'ils ont été isolés durant le crible.

Chaque mutant présente différentes particularités phénotypiques et génétiques. La nature des gènes mutés étant inconnue, j'ai cherché à classer les mutants en plusieurs groupes et déterminer si certains pouvaient être mutés dans des gènes connus dans le laboratoire pour affecter la transdifférenciation de Y en PDA.

Premièrement, chaque souche mutante a été caractérisée en fonction de sa classe (I, II ou III) et de la pénétrance du défaut de transdifférenciation (mesurée par l'absence du neurone PDA - marqué par *syIs63[cog-1::gfp]*) ainsi que de leur phénotype général (Unc, Dpy, stérilité, défauts morphologiques divers, etc. Voir tableau 6).

Mutant (allèle)	Pénétrance à 20°C	Classe	Autres phénotypes visibles	Capacité de croisement des mâles hétérozygotes
<i>E (fp12)</i>	75,7% (±12,7, n=138)	I	aucun	bonne
<i>F (fp11)</i>	31,3% (±10, n=213)	II	aucun	ND
<i>G (fp13)</i>	10,6% (±3,9, n=131)	II	Léger problème de mobilité (Unc) à 25°C	aucune
<i>J (fp17)</i>	84,2% (±7,5, n=118)	I	Défaut de formation de la queue et vulve proéminente (Pv) chez les hermaphrodites	aucune (déformation de la queue)
<i>K (fp18)</i>	63,7% (±5,7, n=114)	III	croissance ralentie	bonne
<i>M (fp20)</i>	23% (±7,3, n=138)	I	aucun	bonne
<i>O (fp22)</i>	48,7% (±7,2, n=124)	I	aucun	bonne
<i>P (fp23)</i>	99,2% (±1,3, n=102)	I	défaut de formation de la queue, croissance ralentie	bonne
<i>Q (fp24)</i>	4,2% (±0,7, n=119)	I	Pv, quasiment stériles (peu d'œufs pondus), les hermaphrodites sont très difficilement fécondables.	aucune
<i>R (fp25)</i>	91,9% (±8,7, n=89)	II	légèrement plus gros (Dpy)	aucune (déformation de la queue)
<i>S (fp26)</i>	70% (±15,1, n=135)	II	forte paralysie (Unc)	aucune (mâles paralysés)

Tableau 6 : Caractéristiques phénotypiques des onze mutants du crible EMS. La colonne de droite décrit la capacité des mâles hétérozygotes (*fp(x)/+* pour un gène autosomique, *fp(x)/0* pour un gène situé sur le chromosome X) à pouvoir féconder des vers hermaphrodites. Cette information est importante pour le choix de la stratégie de backcross à utiliser en vue d'identifier les mutations d'intérêts par la méthode du *deep mapping* (voir partie 3 de ce chapitre et matériels et méthodes IV). Dpy : phénotype caractérisé par une taille réduite et une épaisseur accentuée. Unc : phénotype caractérisé par un défaut de mobilité (paralysie, locomotion anormale). Observations réalisées en triplicata.

2) Les premiers mutants rapidement identifiés (approches candidates)

Certains mutants présentaient de fortes similitudes avec des souches mutées dans des gènes identifiés dans le laboratoire.

Le mutant *P(fp23)* ressemble à un mutant du gène *sem-4/SALL* : même classe (I), même défaut de reprogrammation de Y dans presque 100% des vers ainsi qu'une déformation de la queue et une croissance lente observée également dans le mutant *sem-4(n1971)*. Un séquençage (Sanger) du gène *sem-4* du mutant *P* a révélé une mutation non-sens (Q306Stop). Ce codon stop prématuré tronquerait la protéine après le deuxième domaine en doigt de zinc (ZF) de la protéine, éliminant les six autres domaines ZF.

Le mutant *S(fp26)* de classe II, avec une forte pénétrance du défaut de PDA, présente un phénotype Unc similaire au mutant *unc-3(e151)*. UNC-3 est un facteur de transcription conservé (Collier/Olf-1/EBF) ayant un rôle dans les dernières étapes de reprogrammation de Y en PDA. Un séquençage du gène *unc-3* du mutant *S* a révélé une mutation non-sens (W309Stop). Ce codon stop prématuré tronquerait la protéine au milieu du domaine IPT/TIG, domaine important pour l'activité de UNC-3 lors de la transdifférenciation de Y (RICHARD *et al.* 2011).

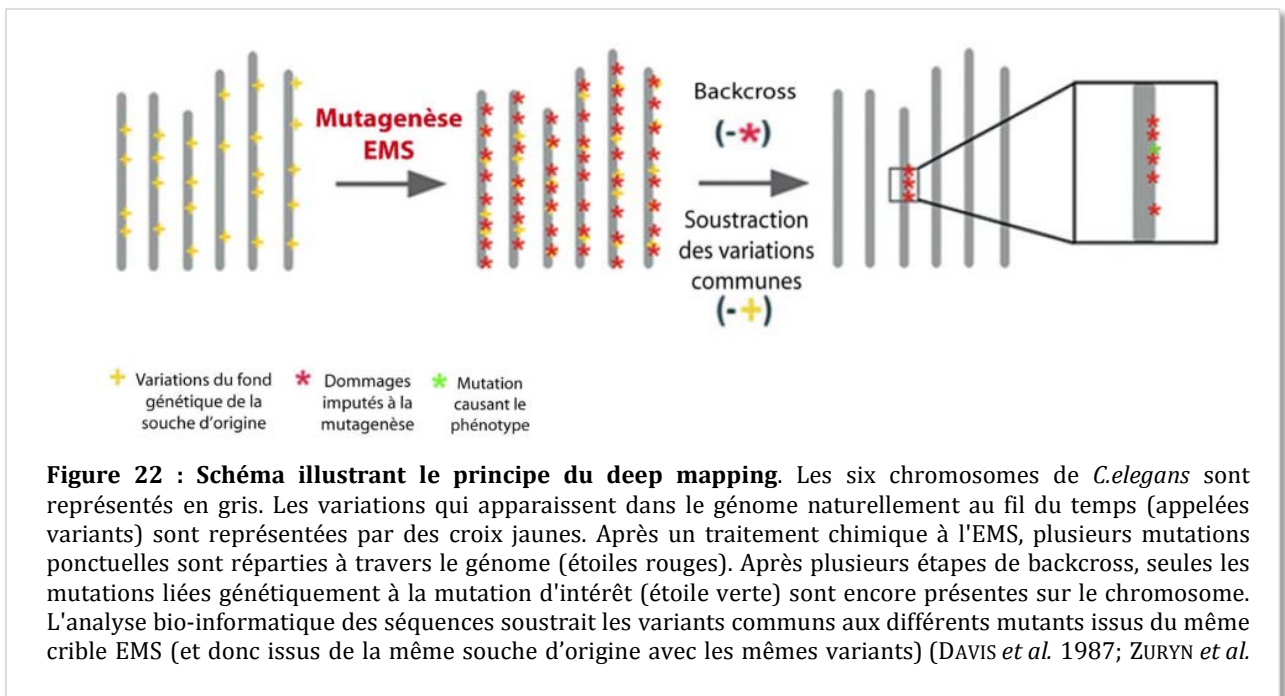
Le mutant *F(fp11)* avait une pénétrance et une classe (II) similaire au mutant *jmjd-3.1*. Le séquençage du gène a révélé une mutation faux-sens (G888E) touchant une glycine très conservée dans le domaine catalytique *JmjC*. Cette glycine est essentielle pour la fonctionnalité du domaine et la déméthylation des lysines 27 des histones 3 (ZURYN *et al.* 2014).

3) Identification des mutants par la méthode du « deep mapping »

Le laboratoire de Sophie Jarriault a mis au point une méthode pour identifier les mutations d'intérêt à travers le génome : le *deep mapping* (ZURYN *et al.* 2010).

3.1) Principe

Après plusieurs croisements retours (appelés *backcross*) avec une souche sauvage, les mutants issus du crible EMS auront perdu la plupart des mutations induites par l'EMS, exceptées celles se trouvant proches de la mutation causant notre phénotype d'intérêt (figure 22). Ainsi, après séquençage du génome, une région de forte densité de mutations typiques de l'EMS (transitions G/C → A/T) est facilement visualisée, et permet de localiser dans un intervalle de quelques Mégabases la mutation causant notre phénotype. Les mutations candidates dans cet intervalle sont ensuite analysées (pour plus de détails sur les croisements et la méthode, voir matériels et méthode, chapitre IV)



La technique du *deep mapping* requiert plusieurs étapes de backcross afin d'éliminer le plus de mutations dues à l'EMS sans rapport avec la mutation d'intérêt avant le séquençage complet du génome (voir détails dans matériels et méthodes IV). La stratégie de backcross la plus performante en terme de rapidité et de brassage du génome est le backcross par les mâles (figure 23B). Cette méthode n'a pu être appliquée qu'à quatre mutants : *E*, *O*, *K* et *M*. L'ADN de ces mutants a ensuite été séquencé. Pour leur part, les mutants *G*, *R* et *J*, dont les

mâles hétérozygotes ne sont pas fertiles, ont nécessité le recours à la méthode du backcross simples (figure 23A).

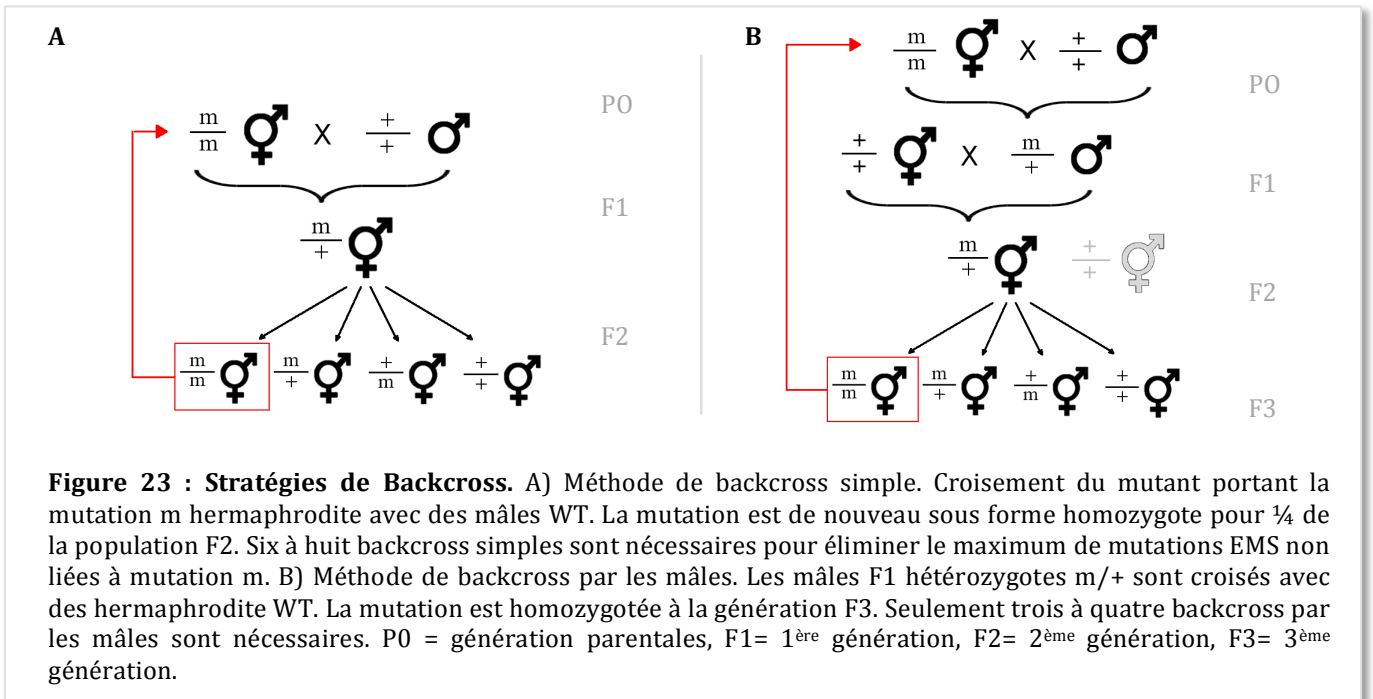


Figure 23 : Stratégies de Backcross. A) Méthode de backcross simple. Croisement du mutant portant la mutation *m* hermaphrodite avec des mâles WT. La mutation est de nouveau sous forme homozygote pour 1/4 de la population F2. Six à huit backcross simples sont nécessaires pour éliminer le maximum de mutations EMS non liées à mutation *m*. B) Méthode de backcross par les mâles. Les mâles F1 hétérozygotes *m/+* sont croisés avec des hermaphrodite WT. La mutation est homozygotée à la génération F3. Seulement trois à quatre backcross par les mâles sont nécessaires. P0 = génération parentales, F1= 1^{ère} génération, F2= 2^{ème} génération, F3= 3^{ème} génération.

Le mutant Q étant quasiment stérile et ne pouvant pas être fécondé par des mâles, les backcross n'ont pas pu être réalisés. Le gène muté créant le défaut de PDA dans ce mutant demeure aujourd'hui inconnu.

3.2) Résultats des séquençages et identification des gènes mutés

Une fois les ADN séquencés, les mutations spécifiques à l'EMS (G/C → A/T) sont comptées puis représentées sur un graphique dans le but de visualiser un pic de mutations dues à l'EMS dans la région liée génétiquement à la mutation d'intérêt.

Dans l'exemple du mutant *M(fp20)*, un pic très clair se dégage dans le chromosome II (figure 24A). Au sein de ce pic, des mutations faux-sens sont détectées dans la région codante des gènes *sra-7*, *ipla-1*, *epg-5* et *egl-27*. *egl-27* présente une mutation faux-sens (E148K). Cette mutation est au milieu du domaine protéique BAH. Ce gène déjà identifié au laboratoire et l'existence d'un mutant ayant une mutation dans ce domaine nous suggère que la mutation causant le défaut de PDA est sans doute la celle présente dans *egl-27*.

Pour les mutants *G*, *J*, *R* et *K*: même scénario. Des pics visibles ont permis d'identifier les régions chromosomiques porteuses de la mutation d'intérêt dans chacune des souches. Ces quatre mutants présentent des mutations dans trois gènes déjà identifiés au laboratoire.

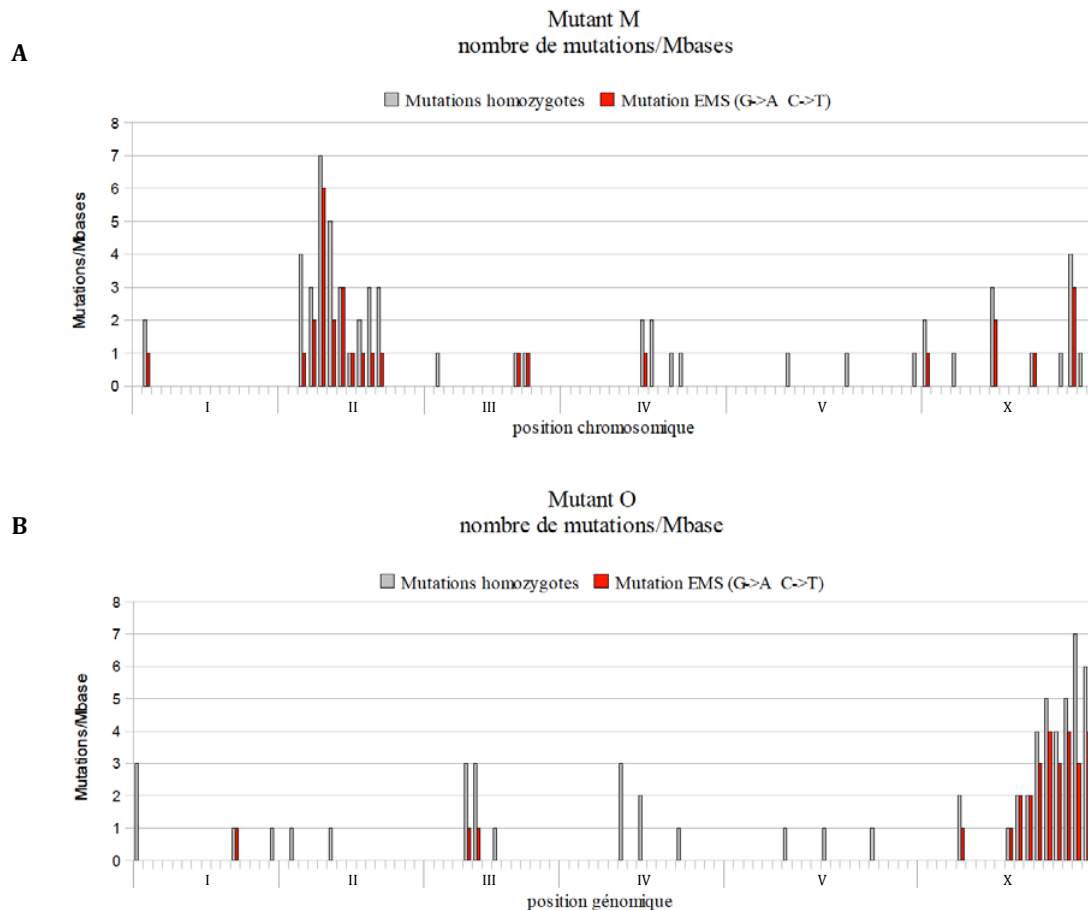


Figure 24 : Localisation des mutations homozygotes après backcross des mutants *M* et *O*. Le nombre de mutations homozygotes/Mbase dues à l'EMS (conversion de C en T ou de G en A) est représenté en rouge. Le nombre de mutations homozygotes total (mutations EMS comprises) par Mbases est représenté en gris. En abscisse : de gauche à droite, les chromosomes de I à X, par tranche de Mbases. A) Mutant *M* : un pic de mutations se dessine clairement sur le chromosome II étendu sur une région d'environ 8,6 Mbases. B) Mutant *O* : un pic de mutations apparaît nettement sur le chromosome X sur une région d'environ 7,5 Mbases.

Le mutant *G(fp13)* arbore un pic de mutation sur le chromosome X. Une mutation non-sens est présente dans le gène *jmjd-3.1* (Q545Stop). Ce codon stop tronquerait le domaine *jmjC* de la protéine, domaine essentiel pour l'étape de redifférentiation de Y en PDA (ZURYN *et al.* 2014). Le mutant *R(fp25)* présente également un pic au même endroit et une mutation faux-sens dans une sérine du domaine *jmjC* de *jmjd-3.1*(S903F).

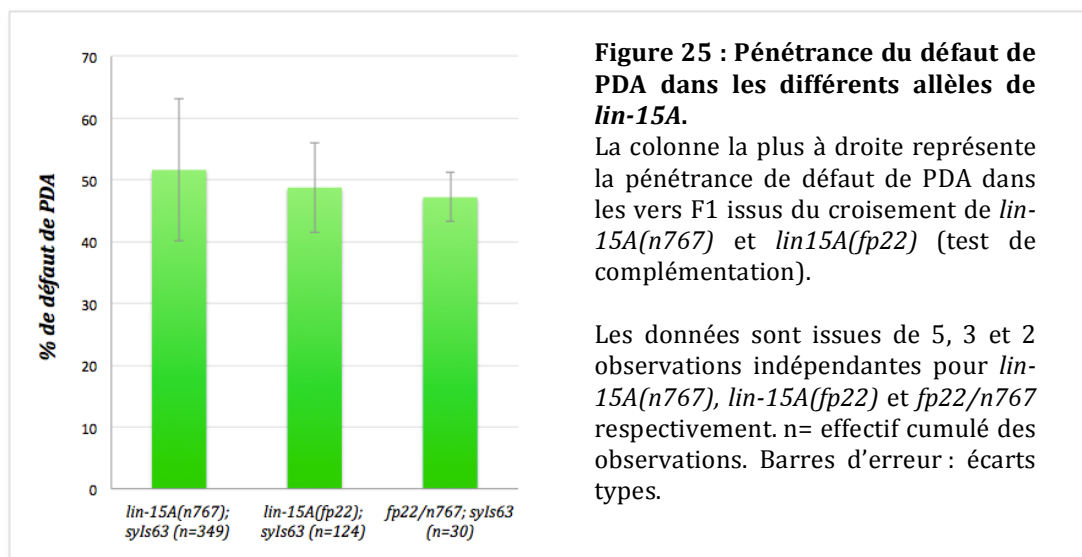
Dans le mutant *J(fp17)* un pic de mutations est également visible sur le chromosome X, mais cette fois une mutation faux-sens est présente dans un autre gène déjà connu dans le laboratoire : *ref-2* (D183N). En effet, cette protéine à domaines en doigts de zinc est impliquée dans l'initiation de la TD de Y (non publié).

Le mutant *K(fp18)* présente un large pic sur le chromosome III et une mutation ponctuelle faux-sens (I372K) est présente dans un gène qui, à l'époque, venait tout juste d'être découvert dans le laboratoire dans un crible ARNi mené en parallèle : *wdr5.1*. Ce membre du complexe SET-1 est impliqué dans les phases de dédifférenciation et de redifférenciation de Y en PDA.

Dans le mutant *O*, un pic est très clairement visible sur le chromosome X (figure 24B). Les gènes candidats étaient (enfin) tous inconnus pour leur potentiels rôles dans la reprogrammation de Y en PDA. Trois gènes candidats localisés dans le pic présentaient une mutation faux-sens (*sprrr-2*, *T25G12.2* et *T14B1.1*) et un quatrième gène avait une délétion de 502 pb dans ses régions codantes : *lin-15A*. LIN-15A est une protéine membre du groupe synMuvA (voir partie Introduction, III.2.2), elle est connue pour son implication dans la différenciation de la vulve chez *C.elegans*. Ce rôle dans le destin cellulaire d'un autre tissu en fit mon candidat favori.

lin-15A(n767) est le mutant de référence supposé nul (CLARK *et al.* 1994). La souche *lin-15A(n767)*, *syIs63* révèle un défaut de PDA de même classe (I) et de même pénétrance que le mutant *O(fp22)* (figure 23).

Un test de complémentation avec le mutant *lin-15A(n767)* a confirmé l'identité du mutant *O*. Le croisement des souches *lin-15A(n767)/0* ♂ x ♀ *O(fp22)* donne une génération F1 où les hermaphrodites présentent un défaut de PDA (figure 25). Cette absence de complémentation indique que *fp22* est bien un allèle mutant du gène *lin-15A*.



4) Identification du mutant *E* par l'ancienne méthode de cartographie des polymorphismes nucléotidiques (SNP)

Les backcross et le séquençage du mutant *E* avaient été réalisés par le post-doctorant Steven Zuryn (il avait identifié la première partie des mutants du crible EMS). Cependant, le séquençage de ce mutant révèle un nombre de mutations plutôt faible comparé aux autres mutants, aucun pic n'est réellement ressorti. J'ai dû confirmer et réduire la région contenant la mutation d'intérêt par la bonne vieille méthode de cartographie des polymorphismes nucléotidiques (SNP) (voir matériels et méthodes V).

Deux zones présentaient un regroupement un peu plus important de mutations : au centre du chromosome X et au centre du chromosome I.

Premièrement, j'ai pu déterminer que la mutation d'intérêt était localisée sur le chromosome I en testant la liaison génétique de *E(fp12)* à *unc-29* (chrom I) (voir matériels et méthodes). J'ai ensuite voulu délimiter la région du chromosome I contenant *E(fp12)* en utilisant la méthode de cartographie par les SNP (méthode basée sur l'analyse de liaisons génétiques entre la mutation d'intérêt et des SNP, voir matériels et méthode V et figure 26).

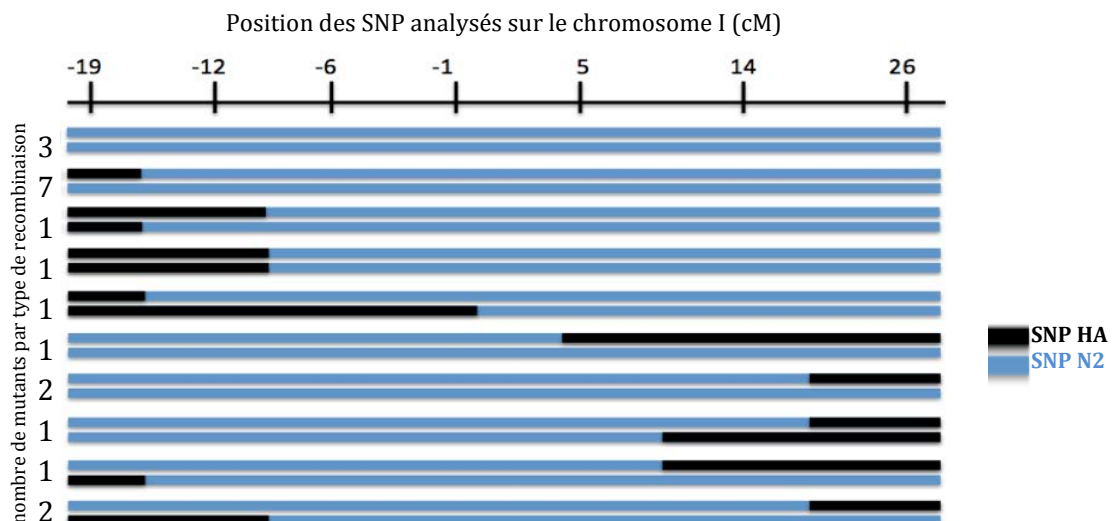


Figure 26 : Cartographie par les SNP de la région contenant *E(fp12)* sur le chromosome I. Représentation de la répartition des SNP spécifiques de la souche hawaïian (en noir) et de la souche N2 (en bleu) sur la paire de chromosome I de chaque recombinant. Après le croisement de la souche hawaïian WT ♂ x ♀ N2 *E(fp12)*, 20 vers F2 présentant un défaut de PDA ont été isolés (recombinants, homozygotes *E(fp12)/E(fp12)*). Les SNP spécifiques des souches hawaïian et N2 sur le chromosome I (aux positions I-19, I-12, I-6, I-1, I5, I14 et I26 cM) ont été analysées par PCR/restriction dans chacun des 20 F2 recombinants. Le nombre de mutants recombinants présentant chaque type de recombinaison est indiqué sur la gauche. La mutation d'intérêt se situe après le SNP localisé à -1cM et avant le SNP à 5cM.

La mutation d'intérêt est située au centre du chromosome I, plusieurs gènes candidats étaient présents entre la position -1 cM et 5 cM : une mutation faux-sens dans le gène *prpf-4*, une mutation très en amont du gène *ceh-6* (connu pour être impliqué dans l'initiation de la TD de Y en PDA), et une mutation du G du site accepteur d'épissage du gène *hlh-16*.

J'ai d'abord voulu vérifier qu'il ne s'agissait pas d'une mutation dans une potentielle séquence régulatrice de *ceh-6* (mutation ponctuelle située hors séquence codante à 10 775 pb en amont du promoteur de *ceh-6*) en injectant le cosmide contenant *ceh-6* et les séquences en amonts (WRM0622aC02) dans le mutant *E(fp12)*. Les vers transgéniques des deux lignées obtenues ne présentent pas de sauvetage du phénotype (lignée 1 : transgéniques = 71% de vers sans PDA (n=59), non transgéniques = 83%(n=48). Lignée 2 : transgéniques = 81% de vers sans PDA (n=21), non transgéniques = 82% (n=22)). Un test de complémentation avec le mutant *ceh-6* a montré également que *fp12* n'était pas un allèle de *ceh-6* (plus de détail dans matériels et méthodes V).

Le mutant *prpf4(tm3984)* présente une insertion/délétion dans la région codante du gène induisant un stop avant le domaine kinase de cette protéine (allèle supposée nul). La souche *prpf-4(tm3984); syls63* ne présente aucun défaut de PDA (n=41), suggérant que *prpf-4* n'est pas impliqué dans la TD de Y en PDA.

Le dernier candidat était le bon : un ARNi ciblant le gène *hlh-16* dans une souche sauvage sensibilisée aux ARNi exogènes *rrf-3(pk1426); syls63* produit un défaut de PDA de 62% (n=50) (la souche *rrf-3(pk1426); syls63* seule n'induit aucun défaut de PDA, n=260).

L'injection du plasmide *hlh-16p::mcherry::hlh-16::hlh-16 3'UTR* dans le mutant *E(fp12)* réduit significativement le défaut de PDA et sauve partiellement le phénotype (une lignée : vers transgéniques = 28,45% de défaut de PDA (± 8 , n=98), non transgéniques = 68,5% ($\pm 0,7$, n=67), observations réalisées trois fois, P-Value : test de Student = 0,02).

Au final, après analyse des derniers mutants du crible EMS, sept nouveaux allèles pour des gènes déjà connus dans laboratoire et deux nouveaux gènes ont été découverts (résumé dans le tableau 7). Seul le mutant Q n'a pas pu être identifié en raison de l'impossibilité de croiser de la souche.

Mutant	Gène (allèle)	Type de mutation
<i>E</i>	<i>hlh-16 (fp12)</i>	Mutation G → A dans le site accepteur d'épissage de l'exon 2
<i>F</i>	<i>jmjd-3.1 (fp11)</i>	G888E
<i>G</i>	<i>jmjd-3.1 (fp13)</i>	Q545Stop
<i>J</i>	<i>ref-2 (fp17)</i>	D183N
<i>K</i>	<i>wdr-5.1 (fp18)</i>	I372K
<i>M</i>	<i>egl-27 (fp20)</i>	E148K
<i>O</i>	<i>lin-15A (fp22)</i>	Délétion de 502 pb (nucléotides 808 à 1063 inclus de l'ADNc)
<i>P</i>	<i>sem-4 (fp23)</i>	Q306Stop
<i>Q</i>	? (<i>fp24</i>)	?
<i>R</i>	<i>jmjd-3.1(fp25)</i>	S903F
<i>S</i>	<i>unc-3 (fp26)</i>	W309Stop

Tableau 7 : Détails des mutations identifiées dans les onze mutants du crible EMS. Nouveaux gènes identifiés en rouge.

II/ LIN-15A

Le gène *lin-15A* code pour une protéine impliquée dans la différenciation de la vulve. *lin-15A* fait partie du groupe des gènes synMuv A. Comme décrit précédemment dans le chapitre IV.3.3 de l'introduction, les gènes synMuv A ont une fonction redondante avec les gènes synMuv B : ces deux groupes de gènes sont impliqués dans la différenciation de la vulve chez *C. elegans*.

La fonction moléculaire de LIN-15A reste inconnue. Le seul domaine conservé de cette protéine est le domaine en doigt de zinc de type THAP-like CC-CH. Les domaines THAP lient l'ADN de façon séquence-spécifique (SABOGAL *et al.* 2010). Les protéines THAP sont impliquées dans de nombreux processus biologiques tel que l'angiogenèse (CAYROL *et al.* 2007), l'apoptose (ROUSSIGNE *et al.* 2003), la régulation du cycle cellulaire (BALAKRISHNAN *et al.* 2009), le maintien de la pluripotence des cellules souches embryonnaire chez la souris (DEJOSEZ *et al.* 2008) ou germinales chez *C.elegans* (UNHAVAITHAYA *et al.* 2002) et la répression épigénétique des gènes (MACFARLAN *et al.* 2005; MACFARLAN *et al.* 2006).

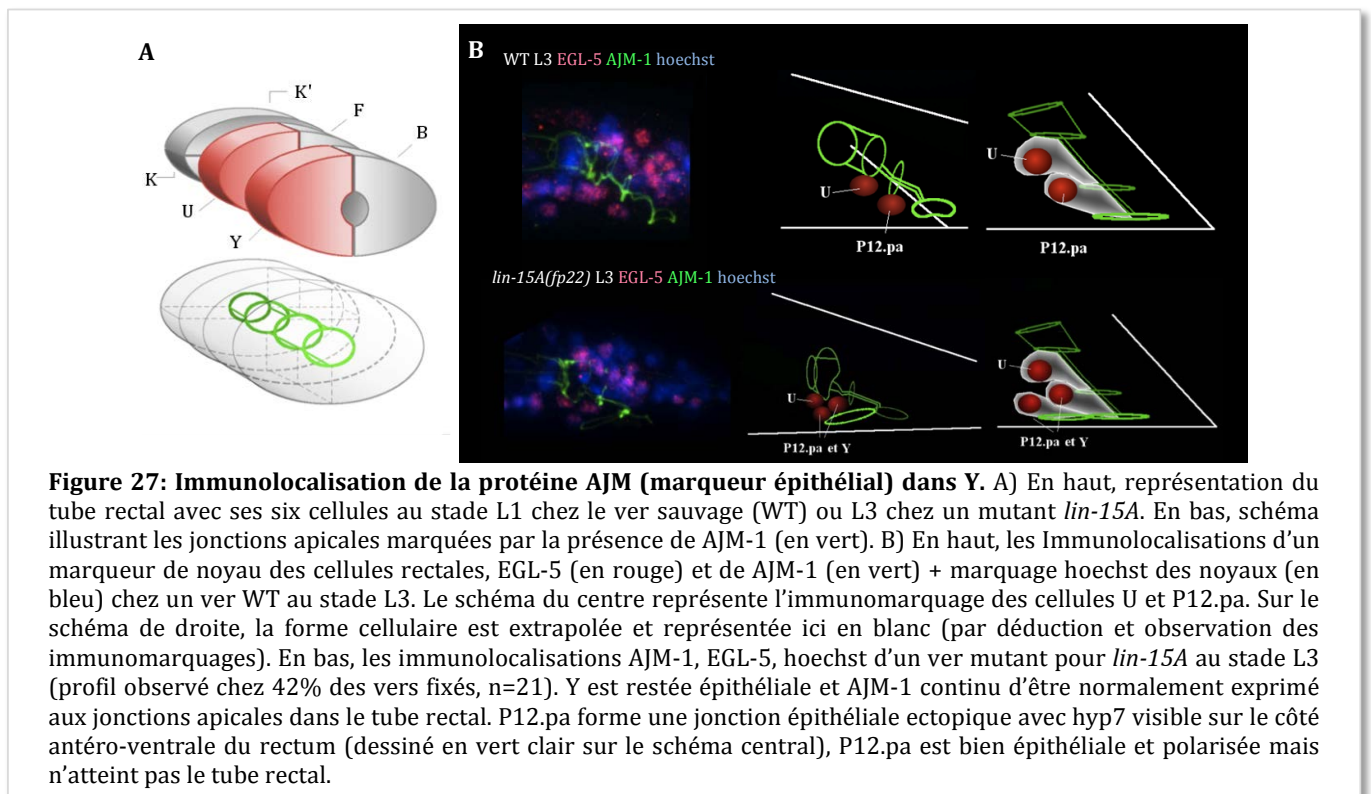
J'ai d'abord caractérisé l'action de *lin-15A* dans la TD de Y en PDA : rôle dans l'initiation du processus et établissement de la fenêtre temporelle d'activité. Ensuite, la

fonction moléculaire de *lin-15A* a été précisée par l'analyse du rôle du domaine THAP et la liaison de LIN-15A à l'ADN.

1) Caractérisation du rôle de *lin-15A* dans la TD de Y en PDA

1.1) Y demeure épithéliale dans le mutant *lin-15A*

Les mutants *lin-15A* (*fp22* et *n767*) présentent un défaut de PDA de classe I, c'est à dire que Y est restée bloquée dans le rectum à sa place initiale, P12.pa ne prend pas la place Y et reste positionnée à côté. L'observation au DIC des trois cellules situées du côté antéro-ventral du rectum (Y, U et P12.pa) laisse supposer leur identité épithéliale : la taille des noyaux et la dimension du nucléole sont caractéristiques des cellules épithéliales rectales. A l'inverse, lorsqu'il est formé, le motoneurone PDA affiche un noyau plus ramassé et d'aspect granuleux. Pour vérifier si Y était toujours épithéliale, j'ai réalisé un immunomarquage avec le marqueur épithélial de jonction apicales AJM-1 sur le mutant *lin-15A(fp22)*.



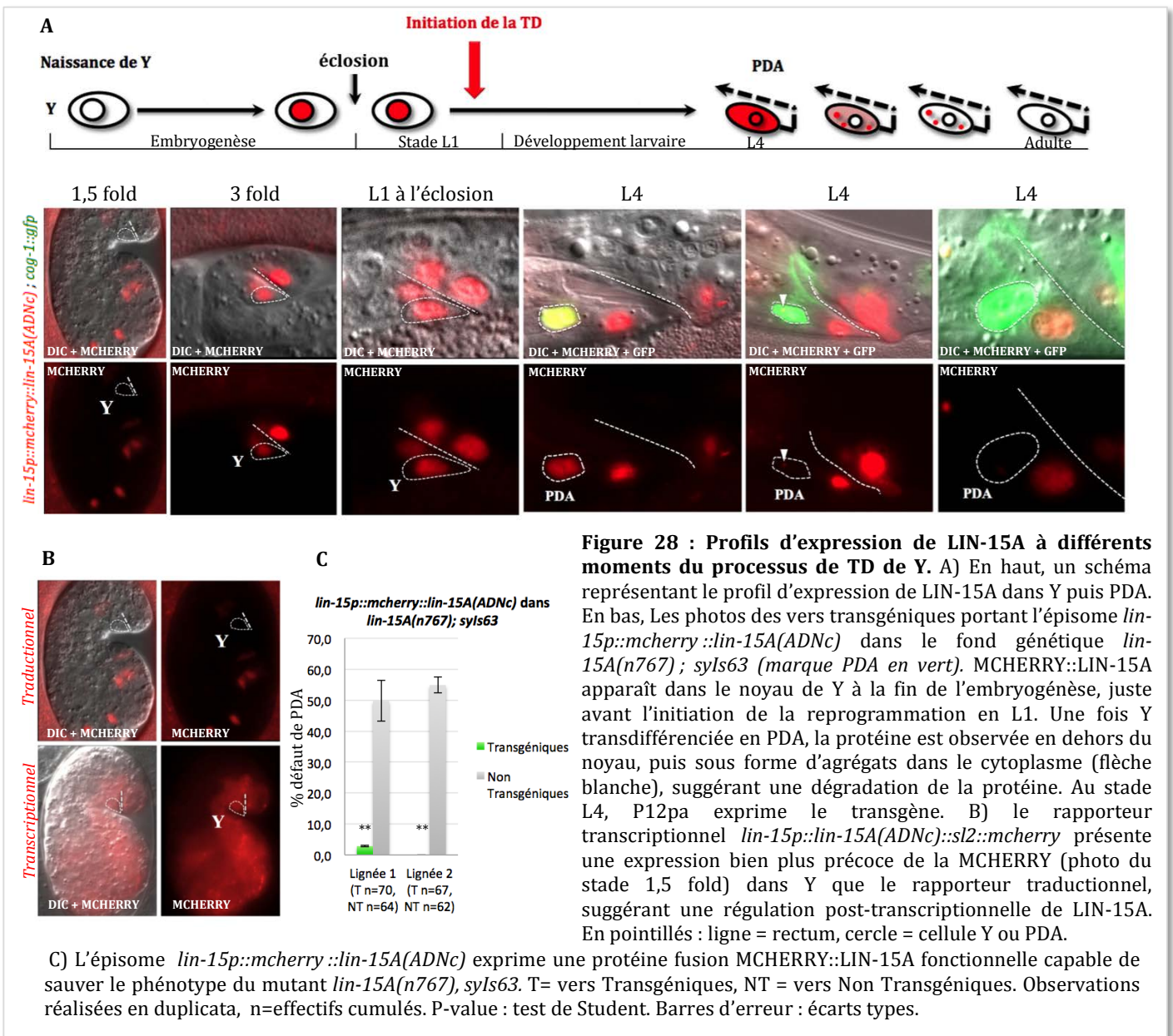
42% des vers L3 fixés observés (n=20) présentent trois cellules épithéliales rectales au côté antérieur droit du rectum, ce qui correspond à la pénétrance du défaut de PDA observé dans *lin-15A(fp22)*. Ces cellules sont marquées par AJM-1 et EGL-5 (protéine

exprimée de façon non exclusive dans les cellules rectales, marqueur utilisé pour visualiser les noyaux rectaux des vers fixés) : Y est toujours épithéliale et normalement polarisée au sein du tube rectal (figure 27) et P12.pa est restée accolée au tube rectal et formant une jonction adhérente ectopique avec le syncytium hypodermique hyp7 situé ventralement.

1.2) Expression de *lin-15A* dans Y

Il n'existait pas de rapporteur traductionnel et transcriptionnel pour *lin-15A*, seul un anticorps avait été produit, mais il est hautement aspécifique (les embryons sont fortement immunomarqués dans les vers sauvages, comme dans les vers mutants *lin-15AB(n1763)* où *lin-15A* est entièrement tronqué (DAVISON *et al.* 2011)). Le profil d'expression de *lin-15A* restait énigmatique. *lin-15A* est un gène en opéron avec le gène *lin-15B* (une autre protéine à domaine THAP-like, membre du groupe des synMuv B). J'ai réalisé un rapporteur traductionnel de *lin-15A(ADNc)* fusionné à la *mcherry* sous contrôle du promoteur de l'opéron *lin-15AB*. La construction du rapporteur transcriptionnel est quasiment similaire, avec une séquence *sl2* permettant un trans-épissage entre *lin-15A(ADNc)* et le gène codant pour la *mcherry* (les deux protéines ne sont pas fusionnées). Le rapporteur traductionnel est bien fonctionnel puisqu'il est capable de sauver le phénotype du mutant *lin-15A(n767)*(figure 28C).

Le rapporteur traductionnel révèle une expression nucléaire de la protéine LIN-15A. L'expression de *mcherry::lin-15A* devient visible dans toutes les cellules rectales à partir du stade embryonnaire 3-fold (derniers stades avant l'éclosion, n=6). Cette expression rectale perdure après le stade L4 (une fois dans le tube rectal, P12.pa est également marquée, figure 28A). La cellule Y n'est pas marquée dès sa naissance (n= 40 embryons 1,5 et 2 fold observés), *mcherry::lin-15A* devient visible juste avant l'éclosion et l'initiation de la TD. Une fois Y devenue PDA, plusieurs cas de figure ont été observés dans des vers L4 transgéniques : la *mcherry* n'est plus visible dans PDA (35,7% n=42), ou elle se présente sous une forme diffuse et faiblement exprimée dans le cytoplasme de PDA avec ou sans la présence de granules (54,8%, n=42), laissant supposer une éventuelle dégradation). Une petite partie des vers observés présentent une expression forte de *mcherry::lin-15A* dans le noyau et dans le cytoplasme de PDA (9,5%, n=42, figure 28A).



Ces différents profils au stade L4 laissent penser que la protéine pourrait être dégradée une fois PDA reprogrammé. Les vers transgéniques n'expriment d'ailleurs plus *mcherry::lin-15A* dans PDA une fois les vers adultes (n=15).

Il est intéressant de noter que le marqueur transcriptionnel de *lin-15A* est plus largement exprimé dans l'embryon. Le caractère aggloméré de la *mcherry* rend impossible toute analyse de ce marqueur après la première moitié de l'embryogénèse. Néanmoins, on peut noter que le promoteur *lin-15p* exprime la *mcherry* dans Y bien plus tôt que dans la souche contenant le marqueur traductionnel (figure 28B, expression dans Y au stade 1,5 fold). Ceci suggère une régulation post transcriptionnelle de LIN-

15A, la protéine est peut être finement régulée de cette manière pour être présente dans Y juste avant l'initiation de la TD et enclencher le processus à un temps clé.

1.3) La fenêtre temporelle d'action de LIN-15A se situe autour de l'initiation de la transdifférenciation de Y

La présence d'un Y persistant dans les mutants du gène *lin-15A* indique un rôle clé de ce facteur dans l'initiation de la reprogrammation de Y. La naissance de Y se situe à environ 290 minutes après fertilisation (SULSTON *et al.* 1983), l'initiation de la TD en fin de L1, et la reprogrammation de PDA est complète à la toute fin du stade L2. J'ai voulu préciser à quels moments LIN-15A était nécessaire pour initier cette reprogrammation. Un plasmide contenant *mcherry::lin-15A* sous contrôle d'un promoteur de choc thermique (HSP) a été injecté dans le mutant *lin-15A(n767); syls63*. Cette construction permet d'exprimer la protéine de façon ectopique dans tout le ver à différents moments du processus de reprogrammation de Y. Plusieurs chocs thermiques de 1h ont été réalisés : à la moitié de l'embryogenèse (une fois Y née), juste après l'éclosion dans des jeunes L1, à différents moments du stade L2 (L2 jeunes, intermédiaires ou tardifs) ou durant le stade L3 (figure 29)

Le défaut de transformation de Y en PDA dans le mutant *lin-15A(n767)* peut être sauvé efficacement par l'expression ectopique de *lin-15A* durant l'embryogenèse jusqu'au stade L1. Un sauvetage du phénotype partiel est possible jusqu'à la moitié du stade L2. L'expression de *lin-15A* aux stades L2 tardifs et L3 n'a plus d'effet sur la pénétrance du défaut de PDA dans le mutant *lin-15A*.

LIN-15A est nécessaire au moment de l'initiation du processus. Une fois cette fenêtre de temps passée, la reprogrammation ne peut plus être relancée. Après le milieu du stade L2, LIN-15A ne dispose peut être plus des partenaires moléculaires pour initier la reprogrammation (dans le ver sauvage à ce stade, PDA finalise sa redifférenciation).

Ces expériences montrent que LIN-15A n'est pas impliqué dans les événements précoces proches de la naissance de Y (C'est durant cette période que Y acquiert sa compétence pour devenir une cellule capable de se transdifférencier en PDA, voir introduction V.2). Le rôle déterminant de ce facteur dans le bon déroulement de l'initiation de la TD de Y en PDA est ici confirmé.

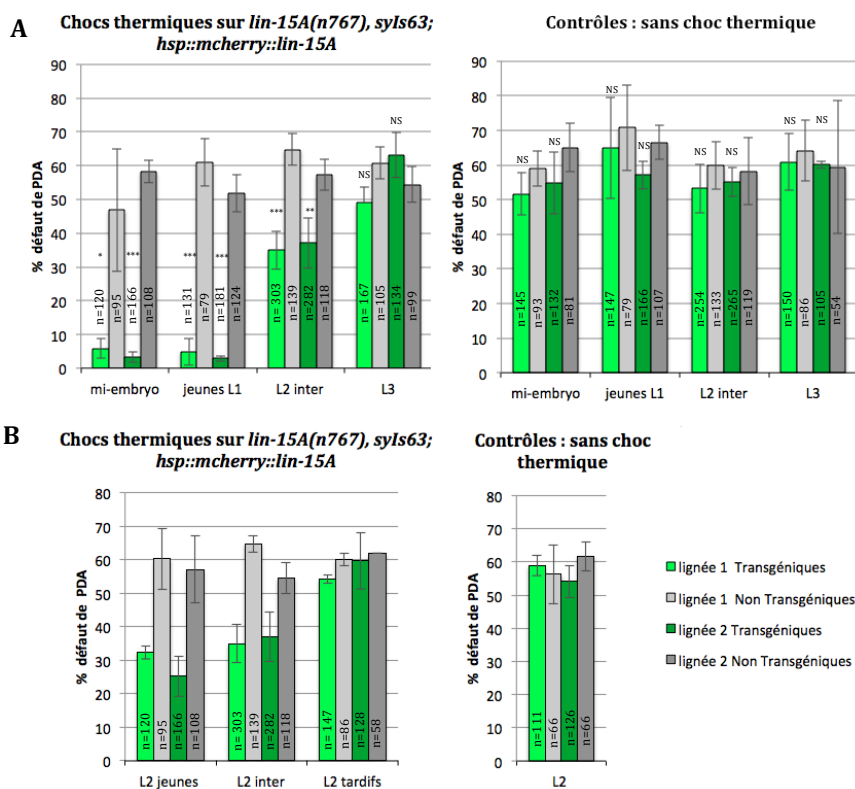


Figure 29 : Expression ectopique de LIN-15A à différents moments du processus de TD de Y. Le construit *hsp::mcherry::lin-15A* injecté dans *lin-15A(n767)*; *syIs63* permet l'expression ectopique de LIN-15A suite à un choc thermique (deux lignées indépendantes utilisées). A) A gauche, un graphique quantifiant le défaut de TD (% de vers sans PDA) chez les vers transgéniques (porteurs du construit) et non transgéniques (contrôles) après choc thermique à différents moments du développement. A droite, les mêmes souches ont été cultivées en parallèle, dans les mêmes conditions sans subir de choc thermique. B) Expression ectopique de LIN-15A à différent moment du stade L2, (à droite : contrôles sans choc thermique). mi-embryo = moitié de l'embryogenèse, L2 inter = stade L2 intermédiaire. Expériences HS et contrôles mid-embryo, jeunes L1 et L3 réalisées en triplicatas, L2 inter et contrôles en quadruplicata, L2 jeunes et tardifs et contrôles en duplicatas). n= effectifs cumulés. Barres d'erreur = écarts types. P-Value test de Student

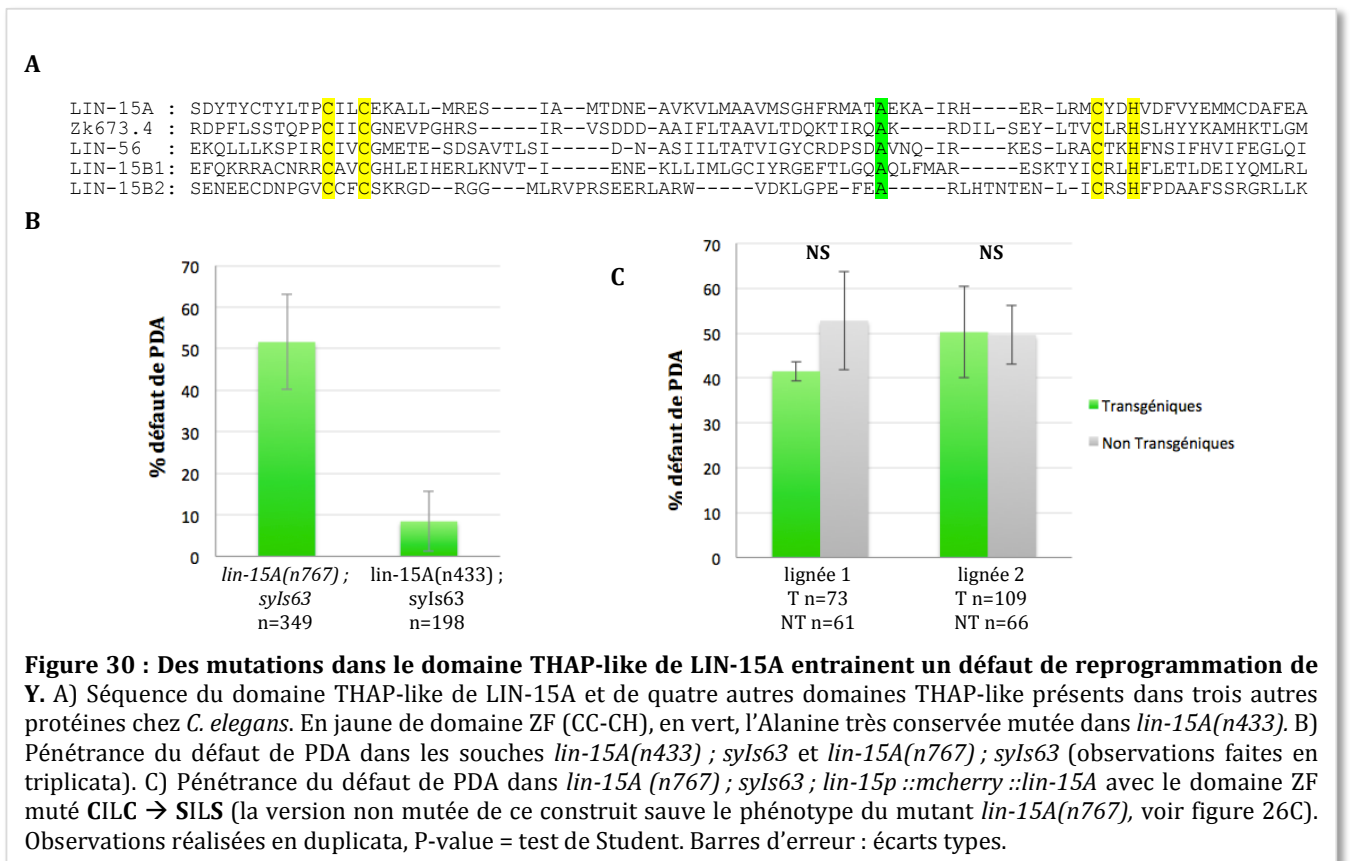
2) Fonction moléculaire de LIN-15A et importance du domaine THAP-like

Le profil d'expression nucléaire de *mcherry::lin-15A* laisse supposer une action dans le noyau. Les domaines THAP sont le plus souvent des domaines de liaison à l'ADN. Certaines études ont pu démontrer que le domaine THAP de la protéine humaine THAP7 reconnaît la protéine histone désacétylase HDA3. THAP7 lie les histones 3 et 4 et promeut leur désacétylation (répression) (MACFARLAN *et al.* 2005). En premier lieu l'importance du domaine THAP-like dans la reprogrammation de Y a été évalué. Dans un second temps, nous avons pu démontrer que la protéine LIN-15A lie l'ADN.

2.1) Le doigt de zinc THAP-like : un domaine clé

Le mutant *lin-15A(n433)* possède une mutation ponctuelle au milieu du domaine ZF THAP-like dans une Alanine très conservée (A → V, figure 30A). Cette mutation induit un défaut de reprogrammation de Y. La pénétrance du phénotype est plus faible que le mutant nul *lin-15A(n767)* (figure 30B), mais l'induction d'un défaut suppose un rôle important du domaine THAP-like dans la TD de Y en PDA.

La mutation des deux Cystéines du ZF en Sérine (C212S et C215S) supprime totalement la fonctionnalité du ZF. Le construit *lin-15p::mcherry::lin-15A(CILC → SILS)* n'est pas capable de sauver le phénotype du mutant *lin-15A(n767)*; *syIs63* (figure 30C), ce qui démontre l'importance du domaine THAP-like au sein de LIN-15A pour l'initiation du processus.

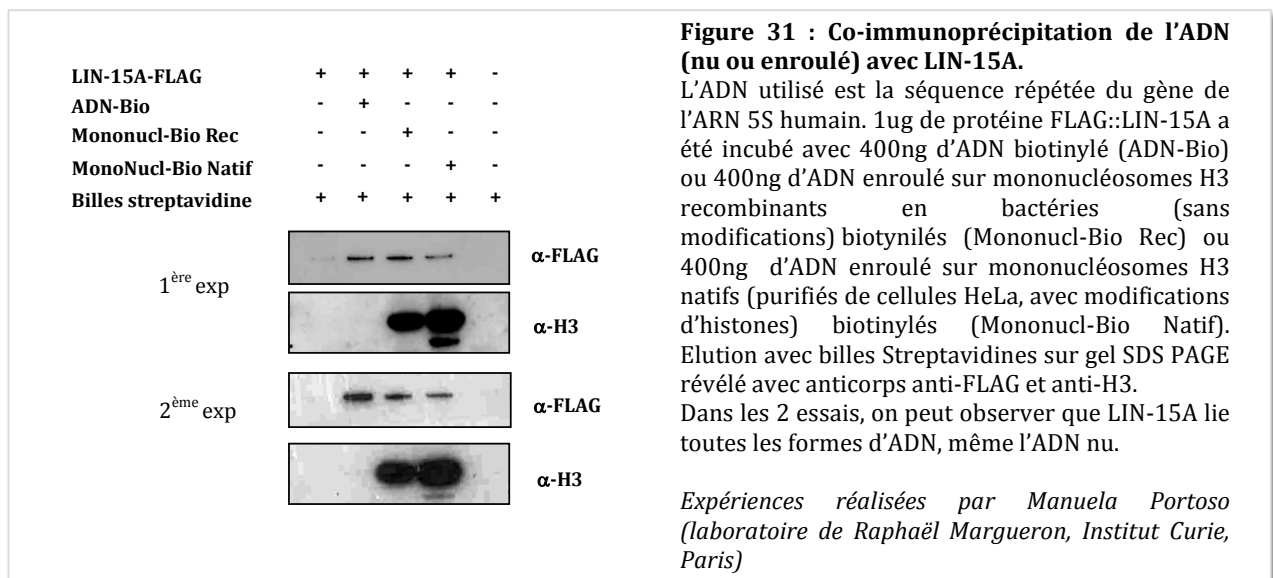


2.2) LIN-15A lie l'ADN

Avec la collaboration de l'équipe de Raphaël Margueron (institut Curie, Paris), nous avons pu tester les capacités de liaison de LIN-15A à l'ADN nu ou enroulé autour d'histones H3 (avec ou sans modifications). Il apparaît que LIN-15A lie l'ADN nu comme l'ADN nucléosomique (figure 31). Ici, l'équipe de R. Margueron a utilisé la séquence répétée du gène de l'ARN5S pour les essais de liaison à LIN-15A. Soit LIN-15A lie l'ADN de façon non séquence spécifique, soit le site de liaison est présent dans cette courte séquence. Cette dernière possibilité est envisageable car il existe au sein du gène de l'ARN 5S une séquence très proche de la séquence consensus reconnue par les domaines

THAP. Ces analyses restent préliminaires, il conviendra de préciser si LIN-15A peut reconnaître cette séquence et si LIN-15A lie toujours l'ADN une fois le domaine THAP-like muté.

Ces expériences confirment néanmoins l'interaction de LIN-15A avec l'ADN et la possibilité qu'il s'agisse d'un facteur de transcription, ou d'un facteur agissant sur la chromatine. La fonction moléculaire de LIN-15A méritera tout de même d'être précisée (voir discussion I).



3) Les partenaires de lin-15A dans la TD de Y en PDA

L'unique fonction de LIN-15A connue est son implication dans la différenciation de la vulve. J'ai voulu tester d'autres gènes faisant partie du même groupe : les synMuv A. Au vu de la redondance fonctionnelle entre les synMuv A et B dans la spécialisation des précurseurs de la vulve, certains synMuv B ont également été testés pour leur potentielles implications dans la reprogrammation de Y en PDA.

3.1) L'inactivation d'autres gènes synMuv A et B n'induit pas de défaut de TD de Y

L'inactivation des cinq autres gènes synMuv A seuls (*lin-56*, *lin-8*, *lin-38*, *smo-1* ou *uba-2*) ainsi que 12 synMuv B (*lin-35*, *dpl-1*, *lin-13*, *lin-9*, *lin-15B*, *lin-36*, *lin-37*, *hpl-2*, *lin-53*, *lin-65*, *lin-52* ou *met-2*) par mutation ou par ARNi, n'induisent pas de défaut de reprogrammation de Y tel qu'il a pu être observé chez les mutants *lin-15A* (voir

reprogrammation de Y tel qu' il a pu être observé chez les mutants *lin-15A* (voir tableau 8). Parmi les autres gènes synMuv A et B testés, *lin-15A* semble avoir un rôle unique dans la reprogrammation de Y en PDA : seul *lin-15A* est impliqué dans l'activation de la TD.

synMuv A				
gènes	description	allèle mutant/ARNi	% PDA formé	effectif
<i>lin-15A</i>	Protéine nucléaire à domaine THAP-like, lie l'ADN	<i>lin-15A(n767)</i>	48 % ($\pm 11,5$)	n=349
<i>lin-8</i>	Protéine nucléaire, interagit physiquement avec LIN-35/RB	<i>lin-8(n111)</i>	100%	n=214
<i>lin-38</i>	Protéine à domaine ZF C2-H2	<i>lin-38(n751)</i>	100%	n=122
<i>lin-56</i>	Protéine nucléaire à domaine THAP-like, interagit physiquement avec LIN-15A	<i>lin-56(n2728)</i>	100%	n=46
<i>smo-1</i>	homologue : SUMO. Petite protéine, fonctionnellement associée aux modifications post-traductionnelles appelées sumoylation	ARNi sur <i>rrf-3(pk1426), syls63</i>	100%	n=10 (forte létalité embryonnaire)
<i>uba-2</i>	homologue : E1B. Enzyme activatrice de <i>smo-1</i>	ARNi sur <i>rrf-3(pk1426), syls63</i>	100%	n=67 (létalité embryonnaire)

synMuv B (liste non exhaustive)				
gènes	description	allèle mutant	% PDA formé	effectif
<i>lin-35</i>	homologue : RB, lie et inhibe des facteurs de transcription (comme E2F)	<i>lin-35(n745)</i>	100%	n=139
<i>dpl-1</i>	homologue : DP, forme un complexe avec E2F (voie RB)	<i>dpl-1(n3643)</i>	100%	n=194
<i>lin-13</i>	protéine à domaine ZF C2H2, motif de liaison par RB (LXCXE), forme un complexe avec hpl-2	<i>lin-13(ok838)</i>	100%	n=258
<i>lin-9</i>	homologue : Mip130 (drosophile), lié à la voie RB	<i>lin-9(n112)</i>	100%	n=146
<i>lin-15B</i>	Protéine nucléaire à domaines THAP-like, interaction génétique avec LIN-35 dans le cycle cellulaire	<i>lin-15B(n744)</i>	100%	n=140
<i>lin-36</i>	Protéine nucléaire à domaine THAP-like	<i>lin-36(n766)</i>	100%	n=201
<i>lin-37</i>	Protéine nucléaire, interagit physiquement avec LIN-35, EFL-1, LIN-13, LIN-9, DPL-1, LIN-52, LIN-53 et LIN-54 (complexe DREAM)	<i>lin-37(n758)</i>	100%	n=441
<i>hpl-2</i>	homologue HP1, CHROMO domaine, interagit avec LIN-35	<i>hpl-2(ok917)</i>	100%	n=139
<i>lin-53</i>	homologue : RBAP48, lié à la voie RB	<i>lin-53(n833)</i>	100%	n= 134
<i>lin-65</i>	aucun domaine connu, pas d'homologue	<i>lin-65(n3441)</i>	100%	n=149
<i>lin-52</i>	aucun domaine connu, homologue non caractérisé chez la drosophile et l'homme	<i>lin-52(n771)</i>	100%	n=116
<i>met-2</i>	H3K9 Histone méthyltransférase	<i>met-2(ok2307)</i>	100%	n=120

Tableau 8 : Inactivation des gènes synMuv A et synMuv B : influence sur la TD de Y en PDA.

Il existe six gènes synMuv A et 24 synMuv B (12 testés ici). Les allèles mutants de chaque gène ont été croisés dans un fond génétique *syls63* (pour les gènes *uba-2* et *smo-1*, aucun allèle mutant existant, des ARNi ont été réalisés dans la souche sensibilisé au ARNi exogènes *rrf-3(pk1426)* ; *syls63*. Les effectifs sont faibles en raison de la létalité embryonnaire induite par l'inactivation de ces deux gènes). Sources description des gènes : wormbase.com + (COUTEAU *et al.* 2002) (FAY and YOCHER 2007)

3.2) Certains mutants de gènes synMuv B suppriment le défaut de reprogrammation de Y dans le mutant *lin-15A*

Durant la formation de la vulve, seule la double mutation d'un membre de chacun des groupes synMuv A et B entraîne l'apparition d'un phénotype multivulves (Muv). J'ai alors cherché à voir si les doubles mutants *lin-15A(n767)* ; synMuv B, *syIs63* présentaient une synergie avec une pénétrance du défaut différente du mutant *lin-15A* seul. Les synMuv A étant redondants dans la formation vulvaire, j'ai aussi testé des souches *lin-15A(n767)* ; synMuv A ; *syIs63*.

La mutation d'autres gènes synMuv A dans un fond génétique mutant pour *lin-15A* ne change pas la pénétrance du défaut de PDA (figure 32). Par contre, j'ai été surprise d'observer que l'inactivation de certains gènes synMuv B supprime, partiellement ou très fortement, le défaut de reprogrammation de Y dans le mutant *lin-15A* (figure 32).

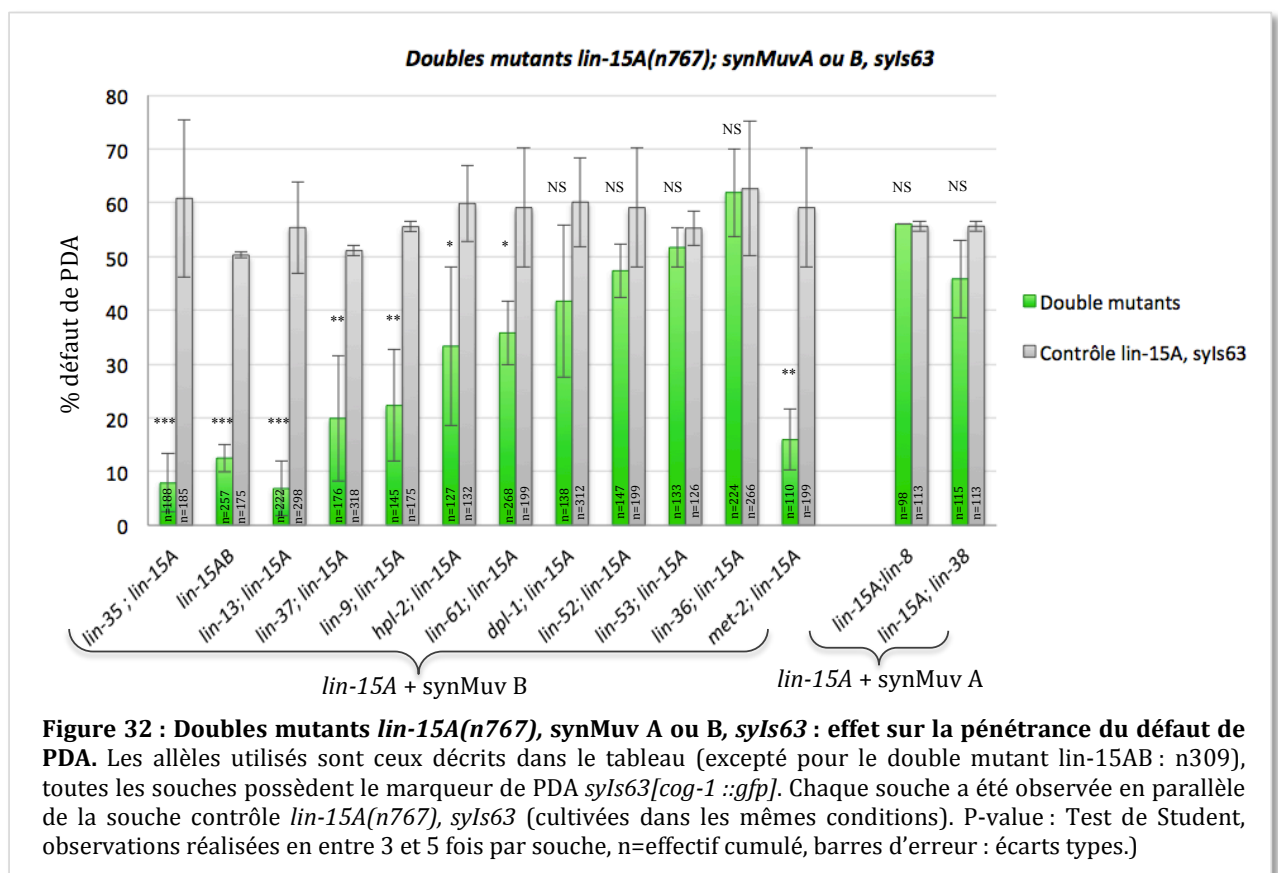


Figure 32 : Doubles mutants *lin-15A(n767)*, synMuv A ou B, *syIs63* : effet sur la pénétrance du défaut de PDA. Les allèles utilisés sont ceux décrits dans le tableau (excepté pour le double mutant *lin-15AB* : n309), toutes les souches possèdent le marqueur de PDA *syIs63[cog-1::gfp]*. Chaque souche a été observée en parallèle de la souche contrôle *lin-15A(n767)*, *syIs63* (cultivées dans les mêmes conditions). P-value : Test de Student, observations réalisées en entre 3 et 5 fois par souche, n=effectif cumulé, barres d'erreur : écarts types.)

Certains gènes synMuv B induisent un effet « suppresseur de défaut de *lin-15A* » et d'autres non. J'ai voulu savoir quelle était la caractéristique commune entre les gènes synMuv B qui produisaient cette suppression.

Les gènes synMuv B sont très hétéroclites et sont de nature et fonction très variées. Les souches mutantes pour les gènes *lin-35*, *lin-15B*, *lin-13*, *lin-9*, *hpl-2* ou *dpl-1* sont plus sensibles aux ARNi (WANG *et al.* 2005). Il est possible d'imaginer que ces gènes réguleraient des ARNi endogènes potentiellement impliqués dans la reprogrammation de Y en PDA. Pour tester cette hypothèse, deux mutants, *rrf-3(pk1426)* et *eri-1(mg366)*, provoquant la même amplification de la réponse aux ARNi ont été testés dans le fond génétique *lin-15A(n767) ; syls63*. Les souches *lin-15A(n767); rrf-3(pk1426); syls63* et *lin-15A(n767); eri-1(mg366); syls63* ne présentent pas de différence de pénétrance significative par rapport à la souche *lin-15A(n767) ; syls63* seule (figure 33A). Ce résultat suggère que ce n'est pas la sensibilité aux ARNi développée par certains synMuv B qui est à l'origine de la suppression du défaut de PDA dans le mutant *lin-15A*.

Un autre point commun phénotypique existe entre ces mutants supprimeurs de défaut : certaines souches mutantes pour des gènes synMuv B présentent une expression ectopique de gènes de la lignée germinale dans l'intestin de *C. elegans* (PETRELLA *et al.* 2011). Ces gènes synMuv B sont garants du maintien de l'identité cellulaire intestinale des cellules du tube digestif. Les souches des gènes mutés *lin-35*, *lin-15B*, *lin-13*, *lin-9*, *hpl-2*, *lin-37*, *lin-54* et *dpl-1* présentent une expression ectopique de la protéine germinale PGL-3 (à 20°C). Chez certains mutants, l'augmentation de la température à 26°C augmente encore l'expression de ce programme germinale au point d'altérer la fonction des cellules intestinales : les vers n'assimilent plus la nourriture et restent bloqués en diapause au premier stade larvaire (L1). Chez certains mutants synMuv B, il existe une corrélation frappante entre la capacité de déstabilisation de l'état différencié des cellules intestinales (mesurée par la pénétrance de l'arrêt en L1 à 26°C) et la capacité à supprimer le défaut de PDA dans le mutant *lin-15A*: les mutants de gènes synMuv B présentant les plus fortes suppressions du défaut de PDA dans *lin-15A(n767)* sont aussi les mutants où l'identité intestinale est la plus perturbée (*lin-35*, *lin-15B*, *lin-9* et *lin-37*, figure 33B).

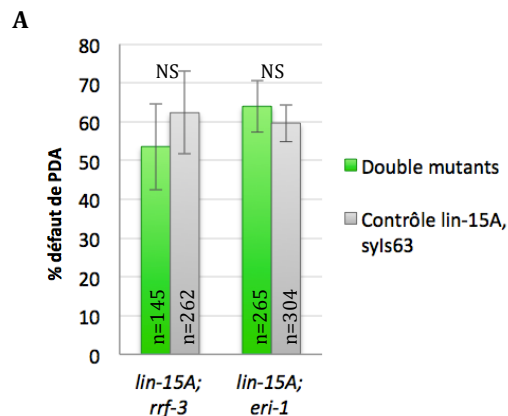
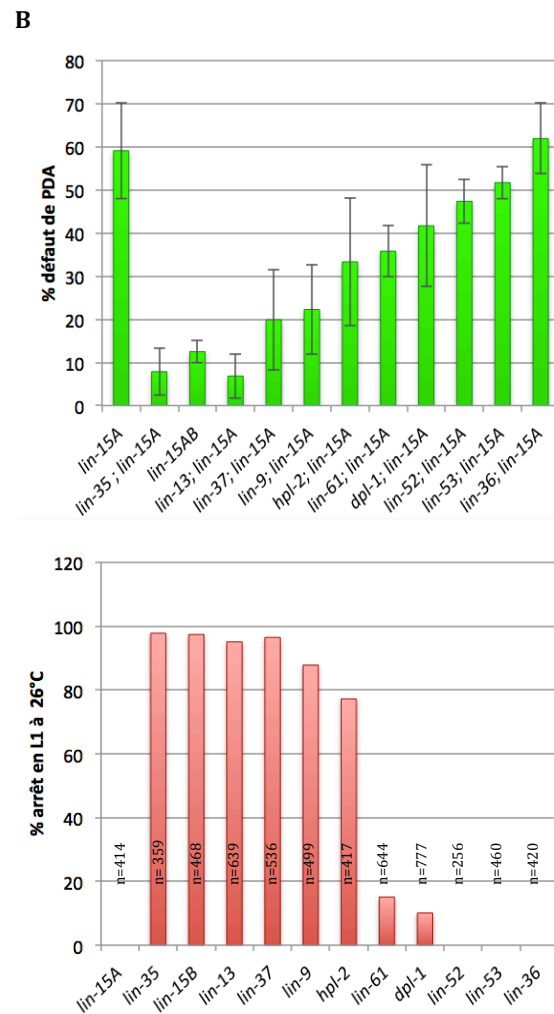


Figure 33 : Lien entre les synMuv B supresseurs de défaut. A) Hypothèse 1 : la sensibilité accrue aux ARNi pourrait être la cause de la suppression de défaut de PDA dans le mutant *lin-15A*. Les mutations des gènes *rrf-3(pk2614)* et *eri-1(mg366)* (souches sensibles aux ARNi) dans un fond génétique *lin-15A(n767); slys63* n'entraînent pas de suppression du défaut de PDA significative (P-Value : test de Student, observations réalisées en triplicata, barres d'erreurs : écart type. Souche *lin-15A(n767); eri-1(mg66); slys63* réalisée et observée par Sarah Becker). B) Hypothèse 2 : la déstabilisation de l'identité des cellules intestinales pourrait être liée à la suppression de défaut de PDA. En haut, la pénétrance du défaut de reprogrammation de Y dans les souches *lin-15A(n767); synMuv B; slys63* (chiffres de la figure 32). En bas, le pourcentage d'arrêt en L1 à 26°C des vers mutants pour les mêmes synMuv B (Données extraites de la publication de Petrella *et al.*, 2011). Plus un mutant synMuv B présente une perte importante de l'état différencié des cellules de l'intestin, plus la mutation de ce même gène synMuv B montre une suppression importante du défaut de PDA dans le mutant *lin-15A(n767)*.



Certains mutants mimant un état de jeûne entrent en diapause forcée au stade dauer (comme le mutant *daf-2*, DAF-2 étant le récepteur liant l'insuline et induisant la voie de signalisation de l'insuline chez *C.elegans*). Le mutant *daf-2* présente également une expression ectopique des mêmes gènes germinaux dans les cellules intestinales que les mutants synMuv B (CURRAN *et al.* 2009). Les mutants *daf-2* (et les vers dauers) ont pour particularité de vivre beaucoup plus longtemps que les vers sauvages (plus de 3X pour les mutants *daf-2*). Curran *et al.* démontrent que l'augmentation de l'expression du programme germinaux dans les cellules intestinales des mutants *daf-2* protège l'intestin de dommages causés à l'ADN. La suppression par ARNi de gènes germinaux (ceux surexprimés dans les mutants *daf-2* : *pie-1*, *pgl-1*, *pgl-2*, *pgl-3*, *isw-1* et *mes-4*) dans les mutants *daf-2* entraîne une réduction significative de la durée de vie de ces vers.

Les mutants synMuv B pourraient être garants de ce contrôle précis de l'identité intestinale pour permettre une bonne absorption des nutriments en conditions favorables avec un programme intestinal normal (nourriture accessible, températures normales). En cas de conditions défavorables (jeûne, hautes températures), ces synMuv B pourraient réguler l'expression d'un programme de protection contre des stress génotoxiques dans les cellules de l'intestin (voir discussion II et III).

Dans la cellule Y, ces gènes synMuv B pourraient jouer le même rôle en étant garants du maintien de l'identité de Y (épithéliale), *lin-15A* étant nécessaire pour lever ce verrou au moment de l'initiation de la reprogrammation de Y. Certains doubles mutants *lin-15A ; synMuv B* présentent une réduction du défaut de PDA, car en l'absence de ces gènes synMuv B gardiens de l'identité épithéliale de Y, *lin-15A* devient dispensable.

4) Influence de l'environnement sur la pénétrance du mutant *lin-15A*

4.1) L'état de diapause (en L1 ou en dauer) entraîne une suppression du défaut de TD de Y dans le mutant *lin-15A*

lin-15A serait donc une clé moléculaire nécessaire à la levée d'un verrou, un frein à la reprogrammation de Y induit par les gènes synMuv B (qui sont également gardien de l'identité intestinal).

Cette hypothèse est confortée par une observation qui m'a d'abord surprise : priver les vers de nourriture entraîne une forte réduction du défaut de reprogrammation de Y dans le mutant *lin-15A*.

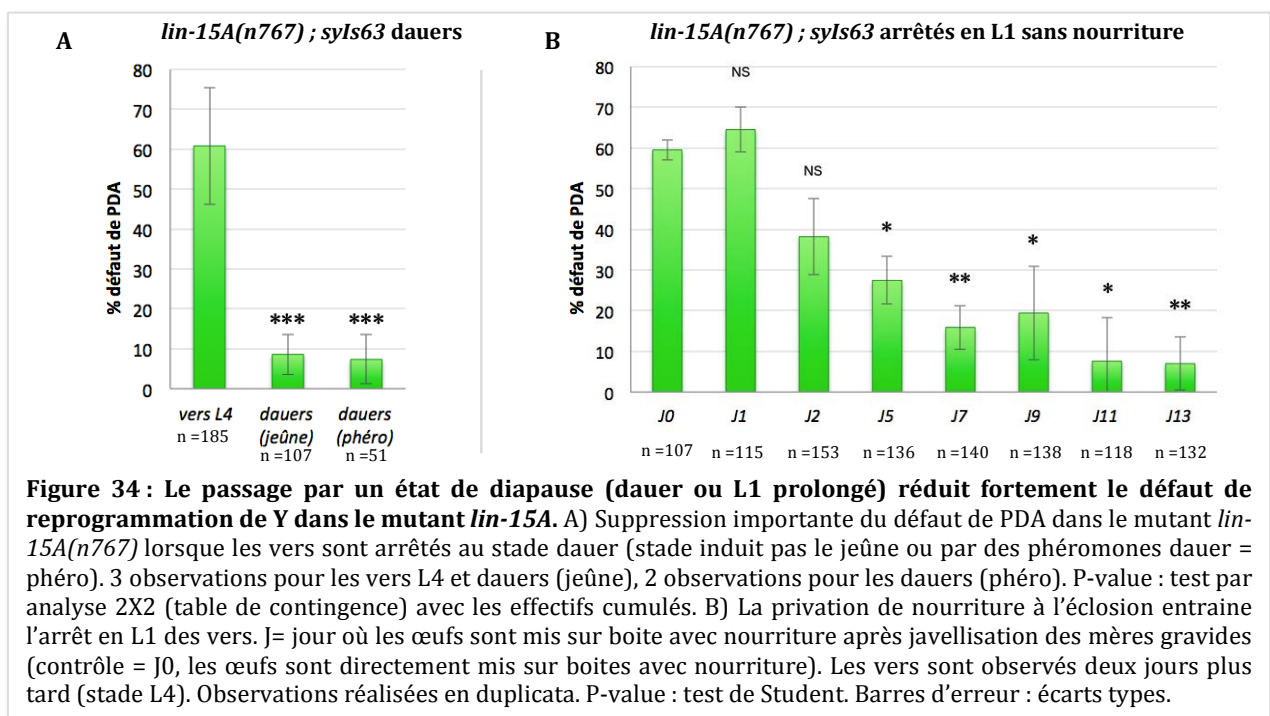
Un jour, en parallèle de l'observation d'une autre souche, j'ai voulu observer la pénétrance du défaut des mutants *lin-15A(n767) ; syls63*. Prise par le temps d'une réunion où je devais présenter mes résultats, j'ai repiqué plusieurs dizaines de vers d'une ancienne boîte où les vers manquaient de nourriture depuis plus d'une semaine. Deux jours plus tard, alors que j'observais la formation de PDA sous le microscope de mes vers L4, je me suis rendu compte que ma souche contrôle *lin-15A(n767) ; syls63*

présentait une pénétrance du défaut de PDA très largement inférieure à la normale. Après avoir vérifié par PCR que ma mutation était toujours présente à l'état homozygote, j'ai compris que la seule condition expérimentale qui avait changé depuis les précédentes observations était le jeûne imposé aux vers mutants.

Ma vieille boîte présentait des vers L1 arrêtés et des vers dauer. J'ai donc cherché à savoir laquelle de ces deux états de diapauses avait pu permettre de restaurer la reprogrammation de Y dans le mutant *lin-15A*.

Les vers dauer sont facilement reconnaissables: ils sont longs et très fins, véloces avec une gonade bloquée au stade L2. Des vers dauers ont été repiqués sur d'anciennes boîtes sans nourriture et immédiatement observés : la pénétrance du défaut de PDA dans ces vers dauers *lin-15A(n767)*, *syIs63* a radicalement chuté (figure 34A). J'ai pu observer la même suppression dans des vers dauers induits par la présence de phéromones entraînant l'activation du programme de diapause dauer (phéromones récoltées dans des populations denses de vers dauer en culture liquide, voir matériel et méthode IX).

En javellisant des mères gravides, j'ai déposé des vers L1 sur des boîtes sans nourriture, durant une période allant de 1 à 13 jours, puis les vers ont été repiqués sur une boîte avec nourriture, et enfin observés au stade L4 deux jours plus tard. La pénétrance du défaut de PDA est significativement réduite après cinq jours de jeûne (figure 34 B).



Cette suppression du phénotype de *lin-15A* n'est pas transmise à la génération suivante : la pénétrance du défaut de vers bloqués en diapause L1 prolongée repasse de 12,8% ($\pm 4,24$, n=114) à la génération P0 à 55% ($\pm 3,54$, n=145, observations en duplicata) à la génération F1, soit la pénétrance de vers mutants *lin-15A* continuellement nourris depuis plusieurs générations. Cette suppression est bien la résultante d'un passage par une diapause durant les stades larvaires précoces au cours de la vie du ver.

La littérature décrit les vers dauers mutant *daf-2* (mutant mimant l'état de jeûne) comme des souches ayant une expression ectopique de gènes germinaux dans les cellules intestinales. Cette expression du programme germinale dans l'intestin rappelle beaucoup le phénotype des mutants synMuv B et laisse penser qu'il existe un lien entre jeûne et levée de l'action de certains synMuv B.

4.2) Les voies de signalisation activées par le jeûne : quel rôle dans la suppression du défaut de PDA dans le mutant *lin-15A* ?

Il y a-t-il un lien mécanistique entre suppression du défaut de PDA soit par le jeûne ou soit par l'inactivation des gènes synMuv B ? Plusieurs études révèlent que *lin-35/RB* et la voie de l'insuline (induite par la privation de nourriture) sont liés.

DAF-16/FOXO est une protéine séquestrée dans le noyau quand l'insuline lie son récepteur DAF-2 (en conditions normales, avec nourriture). En période de jeûne (en diapause L1 ou dauer), l'insuline diminue, la voie de l'insuline est activée et DAF-16 passe dans le noyau pour activer l'expression de gènes de résistance au stress du jeûne et enclencher l'activation du programme dauer (schéma figure 35).

Les gènes synMuv B mutés induisant les plus fortes suppressions de défaut de PDA dans le mutant *lin-15A(n767)* sont tous liés, plus ou moins directement, à la voie du rétinoblastome : *lin-35/RB*, *lin-9*, *lin-15B*, *lin-13*, *hpl-2/HP1* et *lin-37* (voir tableau 8). Plusieurs études ont mis en lumière le rôle de la voie RB dans la réponse au manque de

nourriture durant le stade L1. *lin-35* (l'homologue de la protéine RB chez *C. elegans*) régule la réponse au jeûne durant le stade L1 en modulant l'expression de gènes de la voie de l'insuline, ainsi que d'autres gènes indépendamment impliqués dans la survie des vers arrêtés en diapause L1. Les mutants *lin-35* (arrêtés en diapause L1) et *daf-2* présentent une surexpression significative d'une trentaine de gènes cibles communs. Parmi eux, *daf-16/FOXO* (principal effecteur de la voie de l'insuline) : ce facteur de transcription est donc réprimé par LIN-35 et activé par la voie de l'insuline en cas de jeûne (induction mimé par la mutation du récepteur *daf-2*) (CUI *et al.* 2013). Les auteurs décrivent une action précise de *lin-35* dans les cellules intestinales et neuronales pour favoriser la survie en diapause L1. Ils précisent également que *daf-16* est nécessaire à l'activation de l'expression de certains gènes germinaux dans les cellules intestinales.

Une autre publication décrit le rôle de *lin-35* dans la modulation de l'expression de gènes nécessaires à une utilisation normale des nutriments dans l'intestin. Cette étude décrit également comment DAF-16 passe anormalement dans le noyau des cellules de vers mutants pour *lin-35*, malgré la présence de nourriture (KIRIENKO *et al.* 2008).

Autre fait notable : dans la littérature, il a été montré que la protéine DAF-16 est requise pour moduler la plasticité des cellules précurseurs de la vulve (VPC) durant la formation vulvaire après le passage par un stade dauer. Les VPC sont déjà engagées dans leur destin cellulaire en L2, elles stoppent leur développement dès l'entrée en diapause dauer et opèrent un retour en arrière en redevenant multipotentes. Les vers mutant *daf-16* développent une vulve normale en conditions favorables, mais en l'absence de nourriture, les VPC ne peuvent pas redevenir multipotentes durant le stade dauer et le développement de la vulve est compromis une fois les vers repartis en L4 (KARP and GREENWALD 2013).

Ce rôle de *daf-16* dans la modulation de l'état différencié de cellules somatiques uniquement au stade dauer ainsi que sa régulation par la voie RB lors de la diapause L1 en fit mon gène candidat favori pour faire le lien entre mutants synMuv B et jeûne dans la suppression de défaut de PDA dans les vers *lin-15A(n767)*. Si la mutation de certains gènes synMuv B et l'induction de la diapause (L1 ou dauer) entraînent l'activation de DAF-16, on peut imaginer que DAF-16 pourrait activer la transcription de gènes cibles

permettant la suppression du défaut de PDA dans *lin-15A(n767)*. Soit ces gènes cibles ont une fonction précise redondante à celle de LIN-15A (ou agissent en aval de LIN-15A), soit ils permettraient de déstabiliser l'état différencié de Y et d'initier sa reprogrammation, malgré l'absence de LIN-15A qui jouerait potentiellement ce rôle.

J'ai alors construit une souche avec le mutant nul *daf-16(mu86)* dans le fond génétique *lin-15A(n767); syls63* pour évaluer la suppression du défaut de PDA après plusieurs jours de diapause L1. J'ai été surprise de constater que la mutation *daf-16(mu86)* n'entraînait pas d'annulation, même partielle, de la suppression du défaut de PDA dans le mutant *lin-15A*, la pénétrance du défaut reste identique à la souche contrôle *lin-15A(n767); syls63* après 12 jours de jeûne en L1 (figure 35B).

Les vers mutants *daf-16* ne peuvent pas entrer en diapause dauer par induction via le jeûne ou les phéromones. Pour évaluer la pénétrance du défaut de PDA du double mutant *daf-16; lin-15A* en diapause dauer, il est nécessaire de suractiver une autre voie impliquée dans l'activation du programme dauer : la voie TGF β . En mutant le ligand *daf-7/TGF β* , les récepteurs DAF-1 et DAF4 activent constitutivement la voie TGF β , DAF-3 et DAF-5 passent alors dans le noyau, et activent l'expression du programme dauer (figure 35A). Le mutant *daf-7(e1372)* est thermosensible et l'inactivation du gène est effective à 25°C. Les vers dauers du triple mutant *daf-7(e1372); daf-16(mg86); lin-15A(n767); syls63* présentent eux aussi une pénétrance du défaut de PDA bien plus faible que le mutant *lin-15A(n767)*, une suppression du phénotype de *lin-15A* comparable à des vers dauers dans le simple mutant *lin-15A* (figure 35B).

Il apparaît donc clairement que la suppression du défaut de reprogrammation de Y dans le mutant *lin-15A* via le jeûne prolongé en L1 ou par une diapause en dauer n'est pas modulé par le facteur *daf-16*.

La mutation de *daf-16(mu86)* n'annule pas non plus la suppression du défaut de PDA dans le mutant *lin-15A* médiée par l'inactivation de gènes synMuv B. En effet, la souche *daf-16(mu86); lin-13(ok838); lin-15A(n767); syls63* présente toujours une très forte suppression du défaut de PDA (figure 35B). Ce résultat indique que la mutation des synMuv B ne passe pas non plus par la suractivation de *daf-16(mu86)* pour supprimer le phénotype du mutant *lin-15A*. Il est intéressant de noter que dans ces triple mutants, sur

les quatre observations faites, aucun défaut de PDA n'a été observé, la suppression du phénotype de *lin-15A(n767)* est totale.

daf-16 n'est visiblement pas le facteur de transcription clé qui permet l'activation de gènes cibles permettant de contourner l'absence de *lin-15A* et d'initier la reprogrammation de Y (en cas de jeûne ou lors de mutations de gènes synMuv B suppresseurs).

J'ai voulu chercher à savoir si l'autre voie de signalisation activée lors du jeûne, TGF β , pouvait avoir un rôle dans la suppression du phénotype lié au mutant *lin-15A*. La stratégie inverse a été réalisée : les vers triple mutants *daf-2(e1370) ; daf-3(ok3610) ; lin-15A(n767) ; syls63* sont dauers à 25°C grâce à la surexpression de la voie de l'insuline (via le mutant *daf-2(e1370)* thermosensible, comparable à *daf-7(e1372)*) dans une souche où la voie du TGF β est inactivée (DAF-3 étant l'effecteur de cette voie).

L'inactivation de la voie TGF β n'empêche pas la suppression du défaut de PDA dans les vers dauers *lin-15A(n767) ; daf-2(e1370) ; syls63*. Par contre la suppression semble moins importante : 25,18% de défaut de PDA dans les vers dauers triple mutants *daf-2(e1370) ; daf-3(ok3610) ; lin-15A(n767) ; syls63* ($\pm 5,59$, n= 197, 5 observations indépendantes) contre 8,6 % chez les vers dauers *lin-15A(n767) ; syls63* induits par le jeûne et 7,35 % pour les vers dauers *lin-15A(n767) ; syls63* induits par les phéromones (chiffres présentés figure 32A). Cette observation peut suggérer que la voie TGF β pourrait contrôler des gènes cibles responsables de la suppression du phénotype de *lin-15A(n767)*. Il est aussi envisageable que les vers dauers induits par la mutation *daf-2* puissent présenter une suppression moins forte du défaut de PDA dans le mutant *lin-15A*. Pour discriminer ces deux hypothèses, la construction de la souche *daf-2(e1370) ; lin-15A(n767) ; syls63* permettrait de révéler si les vers dauers induits par la mutation *daf-2* présentent la même réduction de défaut de PDA dans le fond génétique mutant pour *lin-15A* que les vers dauers induits par le jeûne, les phéromones ou la mutation *daf-7*.

Les gènes cibles activés par le jeûne (en L1 ou dauers) ou par l'inactivation de certains synMuv B restent énigmatiques. Nous savons que la mutation de l'effecteur de

la voie de l'insuline, *daf-16*, n'est pas nécessaire pour relancer la reprogrammation de Y quand *lin-15A* est muté. Les dernières expériences préliminaires présentées ci-dessus pourraient laisser supposer un rôle de la voie TGFβ ou peut être l'implication d'une voie alternative à l'insuline induite par le récepteur *daf-2* (voir discussion III).

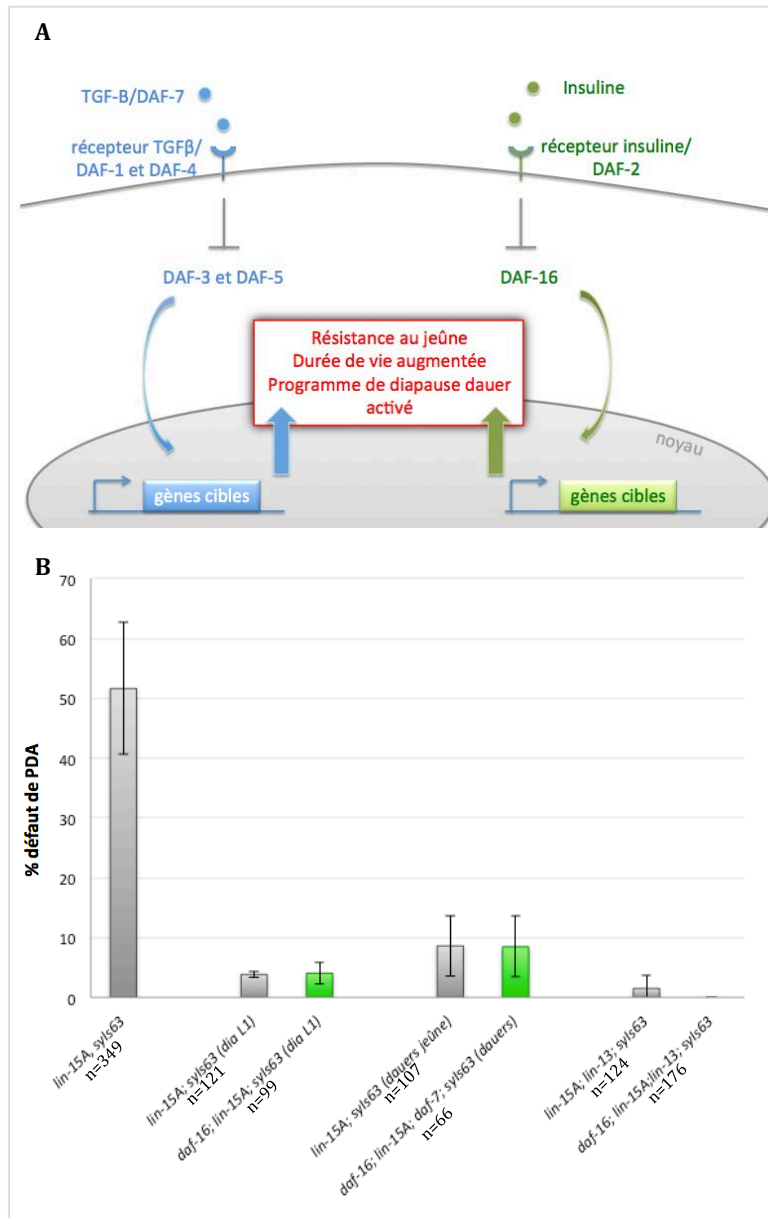


Figure 35 : La mutation de *daf-16* ne modifie pas la suppression du défaut de PDA dans le mutant *lin-15A* via le jeûne (L1 ou dauer) ou via la mutation de gènes *synMuv* B. A) Schéma

représentant les deux voies de signalisation induites par des conditions défavorables (comme l'absence de nourriture) : la voie de l'insuline et la voie TGFβ. Les deux voies sont activées lorsque le ligand (TGFβ/DAF-7 ou l'insuline) ne se lie pas à leurs récepteurs. Une cascade moléculaire (non détaillée ici) provoque la translocation de gènes effecteurs dans le noyau (DAF-3/DAF-5 et DAF-16) qui vont pouvoir activer leurs gènes cibles. La mutation d'un effecteur d'une voie compromet l'entrée en diapause dauer. Seule la suractivation de la voie alternative dans ces mutants permet de forcer l'activation du programme dauer. B) De gauche à droite: pénétrance du défaut de PDA dans *lin-15A(n767); syls63* (indicatif, observations non réalisées en parallèle). Mutation de *daf-16* dans la souche *lin-15A(n767); syls63* puis induction de la diapause L1 prolongée (dia L1. Expérience réalisée en duplicata). Ici aucune différence de pénétrance du défaut de PDA n'est observée par comparaison à la souche contrôle. Les dauers *daf-7(e1372)* ; *daf-16(mg86)* ; *lin-15A(n767)* ont toujours une pénétrance faible du défaut de PDA comparable aux vers dauers induits par le jeûne dans le fond génétique mutant pour *lin-15A* (observation en duplicata, contrôles indicatifs non réalisés en parallèle). Même constat pour le triple mutant *daf-16(mu86); lin-13(ok838); lin-15A(n767); syls63* qui arbore une très forte suppression du phénotype de *lin-15A(n767)*, tout comme la souche contrôle *lin-13(ok838); lin-15A(n767); syls63*.

Barres d'erreur : écarts types.

Pour résumer cette partie, *lin-15A* est un gène clé à l'initiation du processus de reprogrammation de Y en PDA. LIN-15A lie l'ADN et son domaine THAP-like est essentiel à sa fonction dans cette transdifférenciation. Aucun autre gène synMuv A ou B (même ceux contenant des domaines THAP-like) ne sont redondants avec *lin-15A*.

Nous pouvons affirmer que *lin-15A* est nécessaire pour lever un verrou qui maintient la cellule Y épithéliale-rectale. Certains synMuv B (en lien avec la voie RB) agissent comme un frein à l'initiation de la TD de Y qu'il est nécessaire de lever via l'action de *lin-15A*. Lorsque *lin-15A* est muté, la reprogrammation de Y est bloquée dans la moitié des vers, Y demeure épithéliale. Deux processus permettent de contourner l'inactivation de *lin-15A* pour relancer la TD de Y : inactiver certains gènes synMuv B, et induire un état de jeûne (prolongé en L1 ou de passer par le stade dauer).

Les gènes synMuv B induisant la plus grosse suppression du défaut de PDA dans les mutant *lin-15A* sont liés à la voie du rétinoblastome. La mutation de *lin-35/RB* et l'induction de l'état de jeûne induisent l'augmentation de l'expression de plusieurs gènes cibles communs, comme *daf-16*. Ce FdT n'est ici pas nécessaire et ne joue pas de rôle dans la suppression du défaut de PDA dans le mutant *lin-15A*.

III/ HLH-16

Le gène *hlh-16* code pour une protéine contenant un domaine bHLH, appartenant aux familles de protéines à bHLH Beta3 et Olig. *hlh-16* est un facteur de transcription peu étudié chez *C. elegans*. Durant le développement embryonnaire, *hlh-16* est exprimé de façon asymétrique dans plusieurs paires de neurones réparties sur les deux côtés de l'embryon : AIYR et AIYL, SMDDR et SMDDL, SIADR et SIADL et SIBVR et SIBVL (R=version droite, *Right*, L=version gauche, *Left*). Les quatre neurones situés sur la

partie droite de l'embryon expriment bien plus faiblement *hlh-16* que leurs homonymes contra-latéraux de gauche. Cette expression forte de *hlh-16* dans AIYL est nécessaire pour que cet interneurone puisse étendre correctement son axone (BERTRAND *et al.* 2011). Cette expression asymétrique de *hlh-16* est sous contrôle direct de la voie Notch.

hlh-16 est aussi exprimé dans les cellules du canal et du pore excrétoire, mais sa fonction au sein de cet organe reste inconnue (ABDUS-SABOOR 2012).

1) Une expression unique dans Y au sein du rectum

Les vers mutants *hlh-16(fp12)* présentent un phénotype de classe I où Y demeure rectale, suggérant un rôle dans l'initiation de la TD. L'expression du rapporteur traductionnel *hlh-16p::mcherry::hlh-16* révèle une expression de *hlh-16* exclusivement dans Y dans le tube rectal au stade L1 (n=45) (figure 34A). Ceci est frappant, car c'est le premier gène qui ne soit pas exprimé dans toutes les cellules rectales (ou un sous ensemble de cellules rectales). Les autres gènes connus dans le laboratoire pour leur implication dans la reprogrammation de Y présentent des expressions dans d'autres cellules rectales que Y (par exemple, *lin-15A* est exprimée dans Y, B, U, F et parfois K ou K', *egl-5*, *ceh-6* et *egl-27* sont exprimés dans toutes les cellules rectales). L'expression commence dès le milieu de l'embryogenèse et se poursuit jusqu'à la reprogrammation de Y. Après la TD, *hlh-16* n'est plus exprimé dans PDA (figure 36A). Par contre, *hlh-16* est ensuite exprimé dans P12.pa (la cellule qui remplace Y pour assurer l'intégrité du rectum) une fois la cellule ayant intégré le tube rectal. La protéine HLH-16 semble être présente uniquement dans la cellule du rectum la plus distale, du côté antérieur.

Le rapporteur transcriptionnel intégré *stIs10546 [hlh-16p::his24::mcherry]* comporte uniquement la région promotrice de *hlh-16* (2421 pb en amont du gène) fusionné à la séquence *his-24::mcherry*. J'ai été étonnée de constater que ce rapporteur n'est pas exprimé dans les cellules rectales, de l'embryon à l'âge adulte, ni dans Y ni dans P12.pa.

L'intron entre le 1^{er} et 2^{ème} exon est long et relativement conservé chez un autre nématode proche (*Caenorhabditis briggsae*, source UCSC). Après avoir réalisé le construit comportant la séquence promotrice (514 pb en amont de *hlh-16*, jusqu'au

début du gène précédent, Bertrand *et al.* 2011) ainsi que l'exon 1 fusionné à la *mcherry* suivi de l'intron 1 et de la séquence 3'UTR de *hlh-16*, l'expression est restaurée dans la cellule Y (figure 36B). L'intron 1 est donc muni de séquences régulatrices de l'expression rectale de *hlh-16* (Notons que la séquence 3'UTR pourrait également être impliquée dans cette régulation rectale). J'ai réalisé le même construit en tronquant la fin de l'intron 1 (conservée). Le résultat est plutôt surprenant car ce construit est désormais exprimé dans plusieurs cellules rectales hors Y et P12.pa (figure 36C).

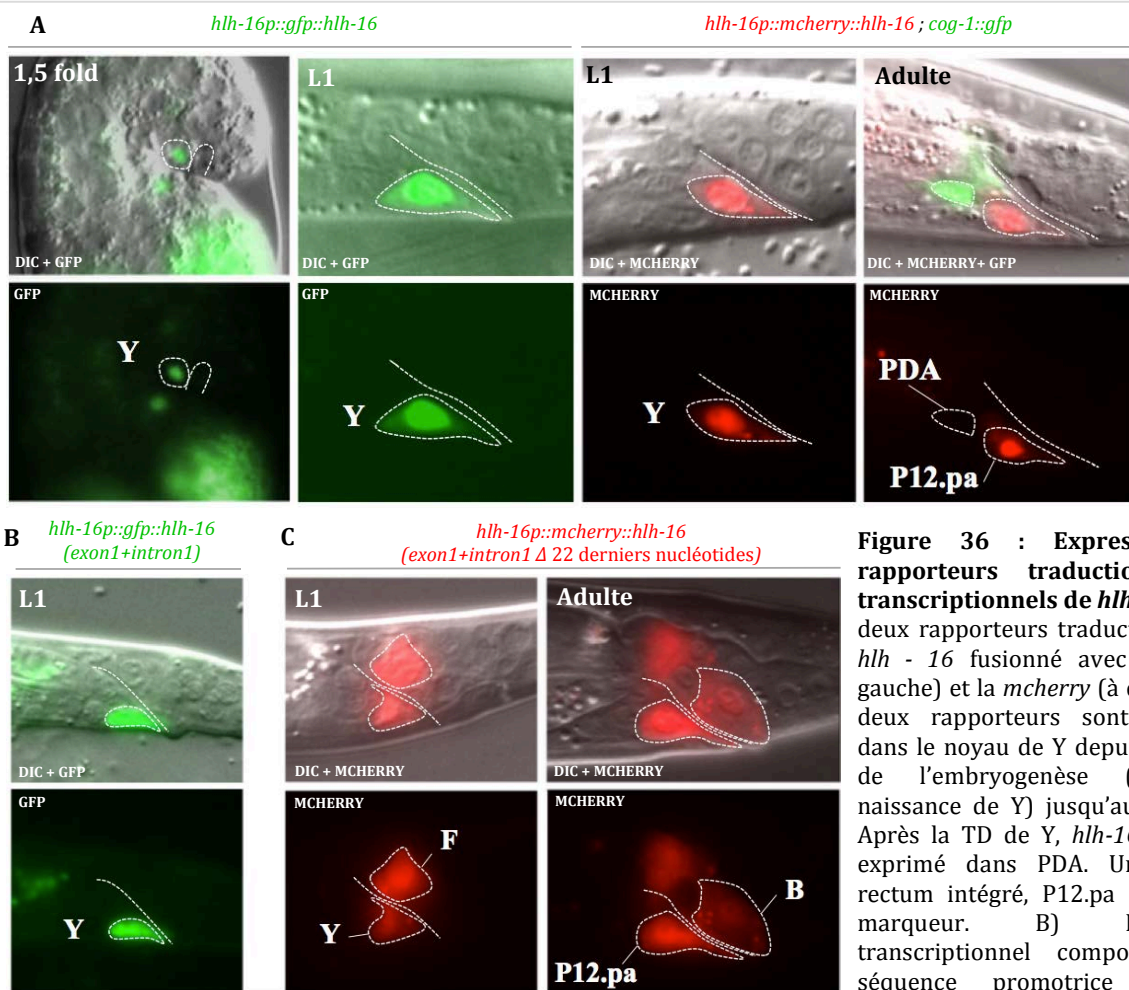


Figure 36 : Expression des rapporteurs traductionnels et transcriptionnels de *hlh-16*. A) Les deux rapporteurs traductionnels de *hlh-16* fusionné avec la *gfp* (à gauche) et la *mcherry* (à droite). Les deux rapporteurs sont exprimés dans le noyau de Y depuis le milieu de l'embryogenèse (après la naissance de Y) jusqu'au stade L1. Après la TD de Y, *hlh-16* n'est pas exprimé dans PDA. Une fois le rectum intégré, P12.pa exprime le marqueur. B) Rapporteur transcriptionnel composé de la séquence promotrice + exon 1+intron 1 complet (+3'UTR *hlh-16*).

Seule Y exprime la *gfp* de l'embryogenèse au stade L1 (ici, photo d'un ver au stade L1 juste après éclosion). C) Version *mcherry* du rapporteur transcriptionnel avec la fin de l'intron 1 tronqué (22 derniers nucléotides). Ici, d'autres cellules que Y expriment la *mcherry* (ici, F exprime la *mcherry* au stade L1 ainsi que B au stade adulte). La fin de l'intron 1 est importante pour la restriction de l'expression de *hlh-16* à la seule cellule Y.

L'intron 1 de *hlh-16* contiendrait une séquence permettant l'expression dans les cellules rectales. Le promoteur seul ne permet pas l'expression dans Y ou P12.pa. Il existe dans les 22 nucléotides à la fin de l'exon 1 une séquence indispensable à la restriction de cette expression dans la seule cellule Y et P12.pa. Il conviendrait de faire une étude poussée des séquences cibles de FdT pouvant être contenues dans ce segment d'ADN.

2) *hlh-16*, une cible de la voie Notch ?

Le promoteur de *hlh-16* comporte une séquence reconnue par *lag-1*. *lag-1* est l'effecteur nucléaire de la voie LIN-12/GPL-1 (voie Notch chez *C.elegans*). LAG-1 lie l'ADN et est un membre clé du complexe nucléaire qui active les gènes cibles de la voie LIN-12/GPL-1 à la suite de l'activation du récepteur. La voie Notch contrôle l'expression asymétrique de *hlh-16* dans certains neurones de la tête (décrits au début de ce chapitre) (BERTRAND *et al.* 2011). Dans notre modèle, l'identité de Y et sa capacité à se transdifférencier en neurone PDA est induite par un signal *lin-12*/Notch autour de la naissance de Y. Les deux ligands inducteurs de la voie Notch dans Y, *apx-1* et *lag-2*, sont produits par des cellules proches de Y (dont B qui est en contact direct avec Y et exprime fortement le ligand *lag-2* dès la naissance de Y, jusqu'au stade L1) (données non publiées, Thomas Daniele). Il était alors tentant de penser que *hlh-16* pourrait être une cible de la voie Notch également dans Y.

Pour déterminer si *hlh-16* est activée par la voie Notch, le site *lag-1* a été muté dans le promoteur de *hlh-16* dans le plasmide *hlh-16p::mcherry::hlh-16* de la même manière que Bertrand *et al.* (2011) (TTCCCATATA → TTGCCTTA), puis j'ai évalué la capacité du construit à sauver le phénotype du mutant *hlh-16(fp12)*. La souche présente la même symétrie d'expression de *hlh-16* dans les neurones de la tête durant l'embryogenèse (lignée 5, n=10, figure 37A), et la même expression dans le noyau de Y en L1 (lignée 5, n=23, figure 37B).

Sur les trois lignées observées, on peut noter un sauvetage du phénotype partiel, mais significatif (le construit non modifié ne sauve pas non plus totalement le phénotype de *hlh-16(fp12)*).

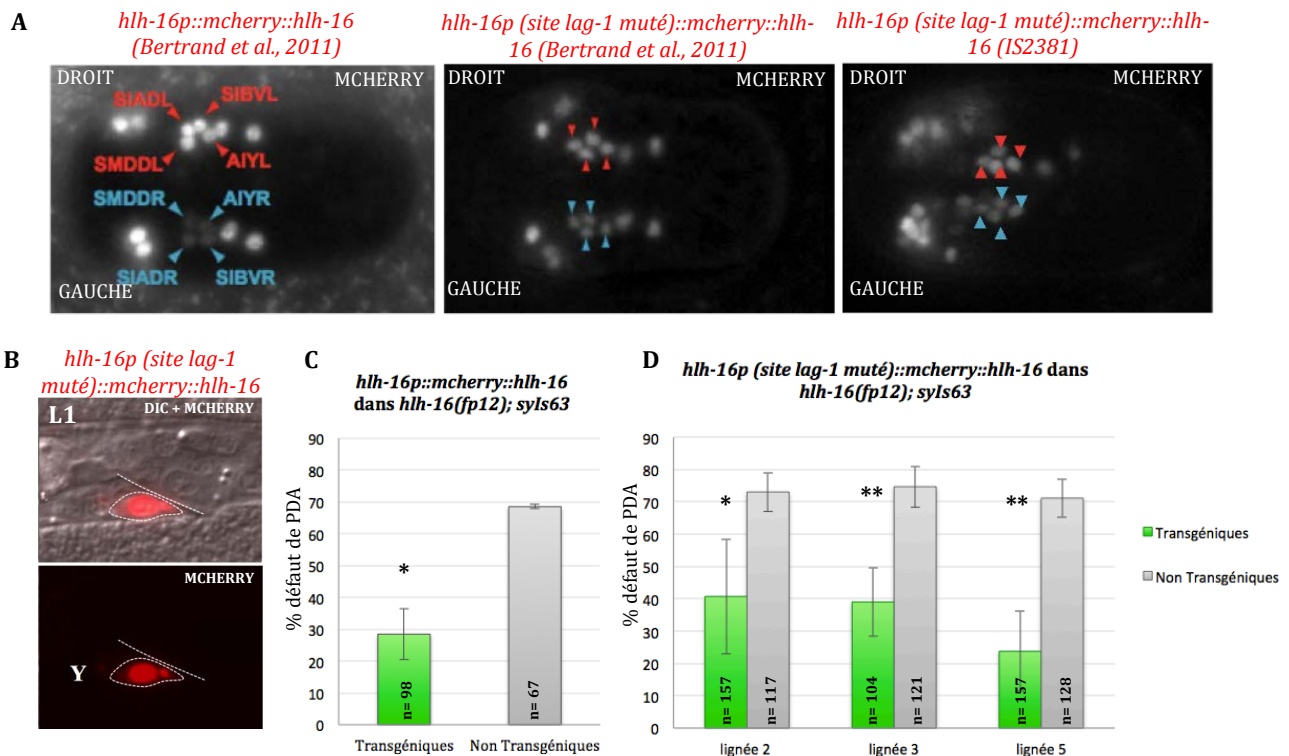


Figure 37 : Expression de *hlh-16* avec le site *lag-1* muté dans son promoteur. A) Expression de *mcherry::hlh-16* dans les neurones de la tête avec ou sans le site *lag-1* muté dans le promoteur de *hlh-16*. Les deux premières images à gauche sont tirées de la publication Bertrand *et al.*, 2011. On y voit la perte de l'expression asymétrique de *hlh-16* à la suite de la mutation du site *lag-1*. L'image la plus à droite montre l'expression symétrique de *hlh-16* dans via le construit similaire réalisé au laboratoire. B) Expression dans Y de ce même construit. C) Sauvetage partiel du phénotype de *hlh-16(fp12)* avec la version non mutée *hlh-16p::mcherry::hlh-16* (observations réalisées en duplicata, P-Value test de Student). D) Sauvetage du phénotype du mutant *hlh-16(fp12)* dans trois lignées indépendantes du construit *hlh-16p (site lag-1 muté)::mcherry::hlh-16* (observations réalisées en triplicata, P-Value : test de Student). Barres d'erreur : écarts types.

Ces résultats indiquent que la voie Notch ne semble pas contrôler directement l'expression de *hlh-16* dans Y : la protéine est toujours présente dans le noyau de Y à l'initiation de la TD et le site *lag-1* dans le promoteur de *hlh-16* n'est pas nécessaire pour assurer une expression de *hlh-16* suffisante pour sauver le phénotype du mutant *hlh-16(fp12)*.

3) La découverte de *hlh-16* fournit un nouvel outil pour isoler la cellule Y

Notre modèle de reprogrammation cellulaire permet un suivi au niveau une-cellule d'une TD naturelle *in vivo*. Si cette TD stéréotypée d'une cellule unique permet un traçage cellulaire sans faille et une reproductibilité dans 100% des vers, c'est aussi un

inconvenient du point de vue des analyses biochimiques qui ne sont pas pertinentes si réalisées sur le ver entier. Nous avons cruellement besoin d'un moyen d'isoler la cellule Y pour réaliser de multiples expériences précieuses à la compréhension des mécanismes de reprogrammation de Y en PDA : comparer des niveaux d'expression de certains gènes (vers sauvages contre vers mutants) via des analyses transcriptomiques, réaliser des immuno-précipitations de chromatine (Chip-sequencing) pour identifier les gènes cibles des FdT clés impliqués dans le processus, pouvoir faire de la spectrométrie de masse pour découvrir les partenaires directs et les complexes liés au gènes identifiés dans le laboratoire, etc.

Les difficultés pour purifier la cellule Y résidait en l'identification d'un ou plusieurs marqueurs étant exprimés uniquement dans Y. Au sein des cellules rectales au stade embryonnaire et L1 (avant et pendant l'initiation de la reprogrammation) *hlh-16* est exprimé uniquement dans Y. Le gène *egl-5* est un gène HOX exprimé dans la queue de *C. elegans* et présent dans toutes les cellules rectales. Une souche porteuse des rapporteurs des gènes *hlh-16* et *egl-5* de couleurs distinctes permet d'isoler Y (la seule cellule exprimant ces deux gènes dans l'embryon et le ver L1) par tri en cytométrie de flux. La souche exprimant les transgènes intégrés *egl-5p(6,5kb)::Δpes10::mcherry* et *hlh-16p::gfp::hlh-16* exprime bien les deux marqueurs uniquement dans la cellule Y (figure 38A)

La dissociation des cellules au stade L1 étant très difficile à cause de la solidité de la cuticule et les premières expériences étant destinées à identifier des cibles de la voie Notch (active dans l'embryogenèse), les essais ont été conduits sur des embryons au stade 1,5 fold, une fois Y née (l'intégration des construits, la dissociation des cellules et les expériences de tri cellulaire ont été menés par Nadine Fischer, ingénieure dans notre laboratoire). Des cellules exprimant la *gfp* et la *mcherry* ont été isolées avec succès (figure 38B). L'essai le plus concluant a été réalisé sur 3 560 000 embryons et a permis la récolte de 30 000 cellules vertes et rouges, pour une quantité d'ARN total de 115 ng (figure 38C).

Ces données préliminaires sont très encourageantes, nous pouvons désormais isoler la cellule Y, et dans un futur proche exploiter ce nouvel outil pour approfondir

notre compréhension de sa transdifférenciation. Même si le rôle et les partenaires de *hlh-16* dans la TD de Y restent mystérieux, la découverte de ce gène aura permis la confection d'un formidable outil pour le laboratoire.

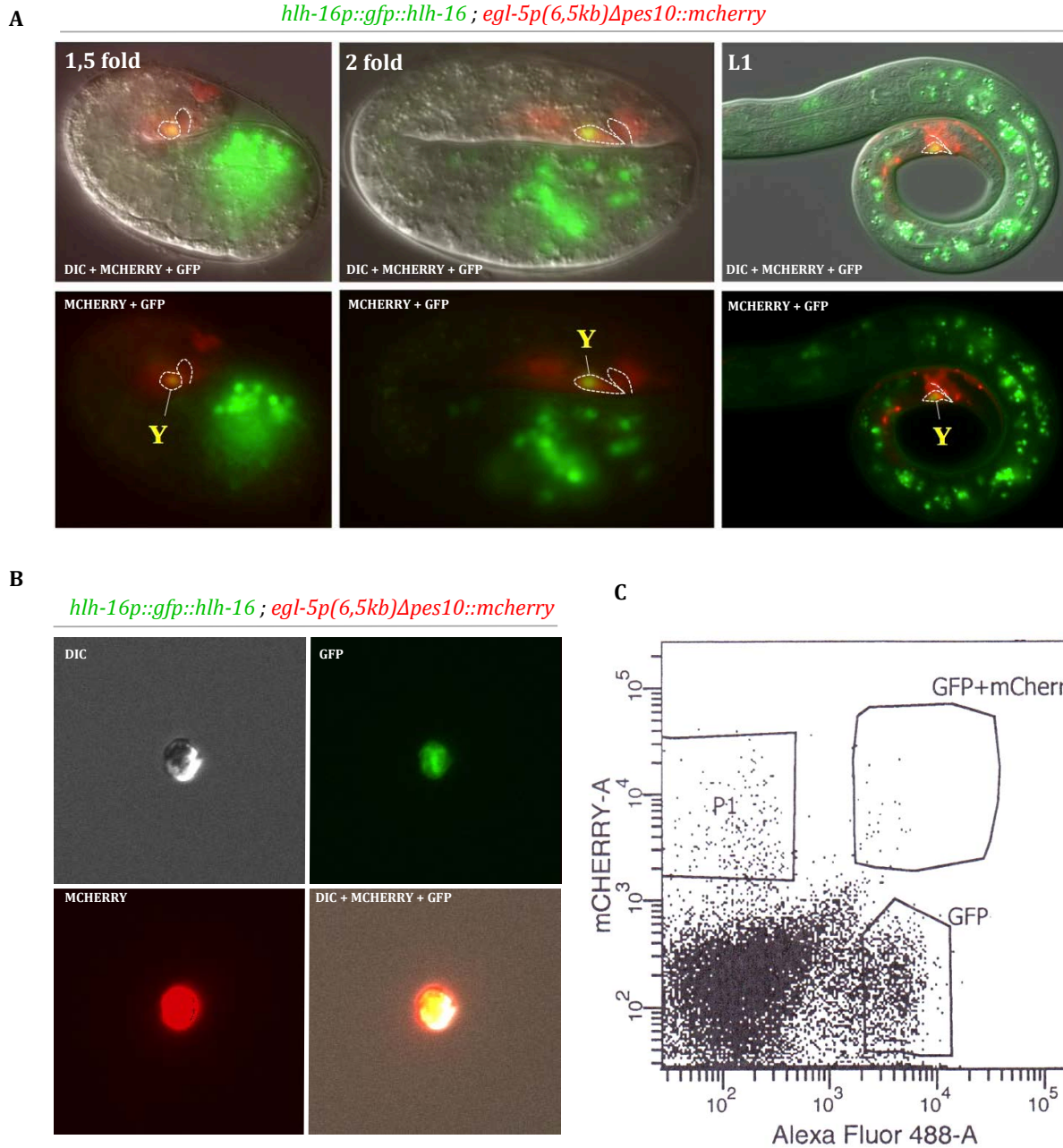


Figure 38 : Stratégie d'isolement de la cellule Y par cytométrie de flux. A) Souche comportant les construits intégrés *hlh-16p::gfp::hlh-16* et *egl-5p(6,5kb) Δ pes10::mcherry* : dans le ver, seule la cellule Y (en jaune) exprime ces deux marqueurs de l'embryon au stade L1. En pointillés : la cellule Y et le rectum du ver. B) Image d'une cellule Y isolée après tri et sélection par cytométrie de flux des cellules vertes et rouges. C) Diagramme obtenu après tri cellulaire en cytométrie de flux. La population GFP+mCherry représente les cellules Y collectées dans des embryons \approx 1,5 fold. Données récoltées par Nadine Fischer.

DISCUSSION

Discussion

I/ La fonction de *lin-15A* dans la reprogrammation de Y

lin-15A n'est pas un gène absolument indispensable à l'initiation de la reprogrammation de Y, seule la moitié des vers mutants présente un défaut de PDA. Ce facteur semble jouer un rôle clé pour induire une reprogrammation robuste dans tous les vers. Il n'est pas exclu que d'autres gènes pourraient avoir une action redondante à celle de *lin-15A*, expliquant que la pénétrance du défaut de reprogrammation ne soit pas totale (il faudrait alors muter ces gènes en parallèle de *lin-15A* pour annihiler complètement l'initiation du processus). Nous pouvons supposer que *lin-15A* aide la cellule Y à lever un verrou qui maintient Y épithéliale, et ainsi induire un état plus favorable à l'initiation de la reprogrammation de Y.

1) La fonction moléculaire de LIN-15A

Dans tous ces cas de figure, la fonction moléculaire exacte de *lin-15A* reste floue. Le caractère essentiel du domaine THAP-like et la capacité de liaison à l'ADN de LIN-15A ont été mis en évidence. Beaucoup de gènes à domaine THAP étudiés sont des facteurs de transcription (GERVAIS *et al.* 2013). Cependant, rien ne permet d'affirmer que LIN-15A puisse être un régulateur de l'expression des gènes. Le domaine en doigt de zinc CC-CH de LIN-15A ressemble à un domaine THAP, mais certains acides aminés clés extrêmement conservés du domaine THAP canonique manquent. Selon Clouaire *et al.*, quatre acides aminés proches des résidus CC-CH (P, W, F et P) essentiels à la liaison ADN du ZF, définissent l'appartenance d'un ZF CC-CH à la famille des protéines THAP (CLOUAIRE *et al.* 2005). Le domaine ZF de *lin-15A* ne possède pas les résidus P et W entre CC et CH, et le résidu F ne suit pas directement le résidu H du ZF, mais est présent trois acides aminés plus loin du côté N-terminal. Je ne peux pas affirmer que le domaine THAP-like lie assurément l'ADN à l'instar de ses homologues murins et humains.

Certains domaines THAP peuvent également lier des protéines, comme la protéine humaine THAP7 qui lie directement la protéine HDAC3 via son domaine THAP (MACFARLAN *et al.* 2005). Dans la protéine THAP-like PIE-1, le 1^{er} ZF CC-CH est un domaine qui interagit avec protéine ZIF-1 pour induire la dégradation de PIE-1 (DERENZO *et al.* 2003). La fonction moléculaire du domaine THAP-like de *lin-15A* reste encore à découvrir.

Dans un premier temps, il serait intéressant d'évaluer la capacité de liaison à l'ADN de LIN-15A une fois le domaine THAP-like muté pour attester que le ZF est le domaine de liaison à l'ADN. Il conviendrait aussi de déterminer si LIN-15A lie l'ADN de manière non séquence spécifique ou si la séquence reconnue par LIN-15A se trouve bien dans les fragments d'ADN co-précipités avec la protéine durant les expériences menées par l'équipe de R. Margueron (voir résultats II.2.2).

Quand LIN-15A s'est avérée lier l'ADN, j'ai cherché à savoir si LIN-15A était un facteur qui pouvait activer l'expression de gènes cibles ou au contraire réprimer leur transcription. Pour répondre à cette question, nous nous sommes inspirés d'une étude récente (chez la souris) qui se posait la même question pour le facteur Neurog2 : ce facteur activait-il ou réprimait-il l'expression de ses gènes cibles (KOVACH *et al.* 2013) ? Les auteurs ont fusionné Neurog2 au domaine activateur de la transcription VP16 ou au domaine répresseur Engrailed (EnR) et ont observé laquelle de ces constructions mimait le phénotype du mutant Neurog2 (donc laquelle antagonisait la fonction de Neurog2). Vp16 interagit avec la machinerie transcriptionnelle basale et induit l'acétylation des histones proches pour activer l'expression des gènes à proximité (HALL and STRUHL 2002). Le domaine EnR interagit avec le co-répresseur Grg/TLE pour recruter des histones désacétylases et réprimer la transcription (BUSCARLET and STIFANI 2007).

De la même manière que Kovach *et al.*, les domaines VP16 ou EnR ont été fusionnés à LIN-15A (en 3' ou en 5' avec une séquence de liaison) puis injectés dans le mutant *lin-15A(n767); syls63* pour déterminer si l'un des deux construits pouvait sauver le phénotype du mutant *lin-15A* tandis que l'autre empêcherait l'action de LIN-15A. De façon inattendue, tous les construits ont sauvés efficacement le phénotype du mutant *lin-15A* (données non présentées). Ces résultats ne m'ont pas permis de préciser l'action de LIN-15A sur la régulation de potentiels gènes cibles. Si LIN-15A possède réellement une activité de modulation d'expression génique, il est possible que son domaine associé

à l'activation/la répression transcriptionnelle puisse prendre le dessus sur les domaines *EnR/VP16*. De façon peu probable, il est aussi possible que les domaines EnR ou VP16 ne soient pas fonctionnels dans ces fusions. Bien que LIN-15A lie l'ADN *in vitro* et soit présente dans le noyau de Y, il est également envisageable que LIN-15A puisse avoir une autre fonction moléculaire non liée à la liaison à l'ADN dans la reprogrammation de Y, *lin-15A* n'agit peut-être pas sur la modulation de la transcription.

Il conviendrait d'ailleurs de vérifier que l'action de LIN-15A est bien nucléaire. Dans ce sens, j'avais réalisé une version du construit *lin-15p::mcherry::lin-15A* avec sa séquence d'adressage au noyau NLS tronquée (délétion des 33 acides aminés entre E442 et Y475 inclus, NLS prédit par NLS mapper). Si la séquence NLS semble être la bonne (la protéine est présente dans le cytoplasme des cellules rectales), LIN-15A passe tout de même dans le noyau et le construit sauve le phénotype du mutant *lin-15A(n767)* (données non présentées). Il faudra réellement associer LIN-15A à un domaine volumineux (ou un domaine NES d'exclusion du noyau) pour s'assurer que la protéine LIN-15A soit exclue du noyau et ainsi tester sa capacité à sauver le phénotype de *lin-15A(n767)* hors expression nucléaire.

Il n'existe pas d'autres domaines connus dans LIN-15A mais des données préliminaires suggèrent que la partie C-terminale pourrait jouer un rôle important. J'ai réalisé des versions du construit *lin-15p::mcherry::lin-15A* avec la partie N-terminale ou C-terminale tronquée (Δ N-ter : délétion entre M1 et T207 inclus, Δ C-ter : délétion de R292 jusqu'au codon stop inclus, les deux construits possèdent le domaine THAP-like). Sur trois lignées obtenues pour la version Δ N-ter, deux présentent un sauvetage du phénotype de *lin-15(n767)* partiel mais significatif. La seule lignée obtenue pour la version Δ C-ter ne parvient pas à sauver le phénotype (données non présentées). Il est nécessaire d'obtenir plus de lignées indépendantes de cette version Δ C-ter de LIN-15A pour pouvoir affirmer qu'il existe bel et bien un domaine capital à la reprogrammation de Y dans la partie C-terminale de la protéine. La partie C-terminal de THAP7 est également impliquée dans une autre fonction essentielle à l'activité répressive de THAP7 puisqu'elle possède un nouveau domaine de liaison aux queues d'histones 3 et 4 (MACFARLAN *et al.* 2005). Le logiciel d'alignement de séquences treefam prédit des similitudes de séquences entre LIN-15A et ZCWPW1, une protéine conservée chez l'homme et la souris liant les histones 3 méthylés en lysine 4 (HOPPMANN *et al.* 2011). Il

serait également intéressant de tester la capacité de LIN-15A à lier les histones (en collaboration avec R. Margueron).

2) Les partenaires directs de LIN-15A

Nous pourrions en savoir plus sur la fonction moléculaire de LIN-15A si les partenaires physiquement liés à la protéine pouvaient être identifiés. Dans cette optique, nous avons cherché à purifier la protéine LIN-15A et analyser les protéines liées par spectrométrie de masse. J'ai réalisé les souches exprimant *lin-15A* (ou la *gfp* pour la souche contrôle) fusionnée avec des étiquettes HA et FLAG sous le contrôle du promoteur *lin-15p* (construits intégrés au génome de *C. elegans*). De nombreux essais d'extractions protéiques dans des embryons (stades supérieurs à 1,5 fold) ont été réalisés pour purifier la protéine LIN-15A sur billes d'agarose-anti-HA. Après une formation aux méthodes d'extraction et de purifications protéique chez Lionel Pintard (Institut Jacques Monod, Paris), l'extraction des noyaux de HA::FLAG::LIN-15A a demandé beaucoup de mises au point, et j'ai rencontré des difficultés aux dernières étapes d'élutions de HA::FLAG::LIN-15A. Cette expérience est toujours en cours, reprise par Sarah Becker (chercheuse post-doctorante) qui finalise la mise au point des conditions de purification/élution.

Cette approche nous renseignera sur des partenaires de LIN-15A dans le ver entier. Nous parions sur une conservation de certains de ces liens pour découvrir la fonction moléculaire de LIN-15A dans le processus qui nous intéresse, la TD de Y en PDA.

lin-15A pourrait également agir de concert avec d'autres gènes connus pour leur implication dans le processus de reprogrammation de Y. Nous avons testé si le jeûne pouvait influencer sur la pénétrance d'autres souches mutées dans des gènes impliqués dans l'initiation du processus (au même moment que *lin-15A*), des mutants de classe I. Ces souches ont été observées après induction d'une période de jeûne prolongé en L1. La pénétrance des mutants clés de l'initiation de la TD, *sem-4* et *egl-5*, ne varie pas en fonction de l'accessibilité de la nourriture. Par contre, la souche mutante pour *egl-27* présente une baisse significative de la pénétrance de son défaut de PDA (données non publiées, Sarah Becker). Il a été montré que *egl-27* est impliqué dans la réponse au stress

et son expression est modulée par la voie de l'insuline (XU and KIM 2012). *lin-15A* et *egl-27* pourraient peut-être intervenir dans les mêmes voies de signalisation modulées par les conditions environnementales. L'allèle de *egl-27(fp20)* découvert dans le crible présente une pénétrance du défaut de PDA plus faible que la version nulle ($\approx 23\%$), ce qui permet de mettre en évidence des interactions génétiques avec *lin-15A* : il serait intéressant de voir si la souche double mutante *lin-15A(n767), egl-27(fp20)* entraîne une hausse du défaut de PDA supérieure à la pénétrance de *lin-15A(n767)* seul (effet additif, donc implication dans des voies de signalisation différentes). Dans le cas inverse, un défaut de PDA similaire à celui de *lin-15A(n767)* seul présagerait une action dans la même voie ou le même complexe. Il serait également intéressant d'inactiver des gènes synMuv B liés à RB dans le mutant *egl-27* et d'observer si, à l'instar de *lin-15A*, le phénotype de *egl-27* peut être supprimé par l'inactivation de la voie RB. Il y aurait donc deux groupes de gènes impliqués dans l'initiation de la reprogrammation de Y : les premiers sont indépendants des conditions d'accès à la nourriture (*sem-4* et *egl-5*), les deuxièmes lèvent un verrou à la reprogrammation de Y, et ce frein peut être levé par l'induction du jeûne (et potentiellement de l'inactivation des synMuv B).

3) *lin-15A* : une régulation directe de gènes synMuv B ?

La suppression du phénotype de *lin-15A(n767)* par l'inactivation de certains synMuv B pose la question d'une éventuelle inhibition des gènes synMuvB par *lin-15A* (directement ou indirectement, via la modulation de leur expression ou d'autres mécanismes). *lin-15A* agit-il en amont des gènes synMuv B ou sur des gènes cibles communs en aval ? Les rapporteurs traductionnels de *lin-13 (stIs10452)* ou *lin-35 (vrIs60)* ne révèlent pas de changement visible d'expression dans les cellules rectales dans un fond génétique mutant *lin-15A(n767)* par rapport à la souche sauvage (données non présentées). Il s'agit de comparaisons à l'œil nu de marqueur intégrés (multicopies), une variation plus subtile de l'expression de *lin-13* ou *lin-35* dans *lin-15A(n767)* ne serait pas perceptible, le niveau d'expression des gènes synMuvB mériterait d'être testé avec des outils plus précis. Cependant, ces outils (Q-PCR, Western Blot, micropuces) sont inutilisables dans notre modèle, les analyses étant réalisées sur le ver entier. Seul le tri des cellules Y par FACS permettrait des analyses pertinentes, ainsi que des

quantifications précises et quantitatives comme la méthode du smFISH (hybridation in situ permettant de détecter des ARNm isolés et de réaliser une quantification de l'expression d'un gène donné dans un tissu ou une cellule précise). De plus, nous ne savons pas si les gènes *synMuv B* et *lin-15A* agissent de façon cellule-autonome (voir partie II.3 de la discussion), et donc si l'observation de l'expression rectale de ces marqueurs est pertinente.

II/ Le rôle des gènes *synMuv B* dans l'initiation de la TD

1) La voie du rétinoblastome (RB) : rôle dans le maintien de l'identité cellulaire

Nous l'avons vu, tous les gènes *synMuv B* entraînant la plus forte suppression du phénotype de *lin-15A(n767)* sont liés à la voie RB. Cette voie joue un rôle dans de nombreux processus biologiques. Elle est historiquement connue pour son rôle clé dans la régulation du cycle cellulaire. La protéine RB (pRB) contrôle négativement la transcription de nombreux gènes impliqués dans la transition G1-S via son interaction avec E2F et DP. Plus récemment, il a été montré que pRB aurait également une fonction régulatrice en phase G2 et durant la transition en phase M (HENLEY and DICK 2012).

Chez la souris, la mutation de pRB provoque une ré-entrée dans le cycle cellulaire de cellules différenciées et une prolifération ectopique (SAGE *et al.* 2003; SAGE *et al.* 2005). Les mutants RB chez la souris et chez la drosophile présentent également une réduction de la différenciation des cellules dans de multiples tissus, suggérant qu'en plus de son rôle régulateur du cycle cellulaire, la voie RB jouerait un rôle dans la maintenance de l'état différencié des cellules somatiques. Chez la souris, pRB interagit avec le FdT ostéoblastique CBFA1/Runx2 et agit comme un co-activateur transcriptionnel direct de cibles de CBFA1/Runx2 requises pour les dernières étapes de différenciation des ostéoblastes (THOMAS *et al.* 2001). pRB (en interaction avec E2F3) contrôle également la différenciation terminale des cellules de Sertoli. Sa délétion conditionnelle dans les testicules de souris entraîne la dédifférenciation des cellules de Sertoli (ROTGERS *et al.* 2014).

Dans l'œil de la drosophile, indépendamment de son rôle dans le cycle cellulaire, la voie RB (en collaboration avec la voie Hippo) maintient l'état différencié des cellules

neuronales photoréceptrices. Les doubles mutants de ces deux voies de signalisation présentent une perte de l'identité neuronale des photorécepteurs qui se dédifférencient et ce, même après blocage complet de la prolifération ectopique de ces cellules (via la mutation du gène *de2f1*) (NICOLAY *et al.* 2010).

Une autre transdifférenciation naturelle implique la voie RB pour assurer l'étape de dédifférenciation : la régénération de la lentille chez la salamandre. Les cellules épithéliales pigmentées de l'iris vont se dédifférencier et proliférer, puis se transdifférencier en cellules de la lentille. Si RB n'est pas inactivé, cette reprogrammation est très largement perturbée (Tsonis *et al.*, 2004).

Chez *Arabidopsis thaliana*, *RBR/pRB* a récemment été décrit comme contrôlant le processus de maintien de l'état différencié de cellules très spécialisées de la feuille (ici encore, sans aucun lien avec son rôle dans le cycle cellulaire). Les cellules pavimenteuses forment un épithélium imperméable sur les feuilles et les cellules gardiennes forment un pore (appelé stomate) permettant des échanges d'eau, d'oxygène et de dioxyde de carbone. Ces deux types cellulaires sont issus de la même cellule souche. Une fois la différenciation de ces deux types de cellules complète, les cellules pavimenteuses et les cellules gardiennes ne changent plus jamais d'identité durant la vie de la plante. *RBR/pRB*, en association avec la protéine FAMA, contrôle la transition cellule souche - cellule pavimenteuse/cellule gardienne par remodelage de la chromatine dans les régions qui contrôlent les gènes de cellules souches (MATOS *et al.* 2014). Quand l'association de FAMA et *RBR/pRB* est rompue, des cellules gardiennes redeviennent des cellules souches de stomates (mais pas des cellules souches totipotentes). Ici aussi, *RBR/pRB* s'avère gardien de l'état différencié de cellules somatiques.

Le laboratoire de Wernig a montré que l'inactivation de *pRB* promeut la reprogrammation induite de fibroblastes en cellules IPS. Ici aussi, cet effet est sans lien avec son rôle dans le cycle cellulaire. Cette étude montre que *pRB* lie directement des gènes de pluripotence tel que *Sox-2* et *Oct-4* (homologues de *sox-2* et *ceh-6* chez *C. elegans*, deux gènes clés de l'initiation de la TD de Y) et réprime leur expression. Ici, *pRB* est décrit comme un répresseur de la pluripotence. Dans notre modèle, la voie RB

pourrait réprimer la dédifférenciation de Y en jouant sur la répression des mêmes acteurs (KARETA *et al.* 2015).

Le rôle des synMuv B liés à la voie RB dans la répression de gènes germinaux dans les cellules intestinales de *C.elegans* confirme cette fonction de garant de l'état différencié de cellules somatiques différenciées (PETRELLA *et al.* 2011). Il est très excitant de découvrir que ce rôle pourrait être conservé dans notre modèle : la voie RB pourrait jouer le rôle de verrou, assurant le maintien de l'identité épithéliale de Y. *lin-15A* serait donc nécessaire au moment de l'initiation du processus de reprogrammation pour lever ce frein au changement d'identité de Y.

Il est important de noter que je n'ai testé qu'une partie des gènes synMuv B. Même si l'implication de la voie RB est avérée, il existe peut-être d'autres gènes synMuv B pouvant induire cette suppression de défaut. C'est notamment le cas du gène synMuv B *met-2* qui réduit significativement le défaut de PDA dans le mutant *lin-15A* (voir figure 32 des résultats). *met-2* interagit avec la voie RB dans le contrôle du cycle cellulaire des cellules intestinales durant l'embryogenèse (OUELLET and ROY 2007), mais la littérature ne précise pas si les mutants *met-2* présentent également une perte du maintien de l'identité des cellules intestinales, à l'instar des autres gènes synMuv B impliqués dans la TD de Y.

Il existe aussi un autre groupe de gènes, appelé synMuv C, qui exercent également une fonction redondante aux gènes synMuv A et B dans la formation de la vulve. Leurs potentielles implications dans la reprogrammation de Y pourront également être testées.

En conclusion, il apparaît clairement que les gènes synMuv B induisant une forte suppression du défaut de PDA dans *lin-15A(n767)* sont liés à la voie RB. Cette voie pourrait jouer un rôle dans le maintien de l'identité épithéliale de Y en réprimant les programmes alternatifs (et donc empêchant sa transdifférenciation) ou directement en réprimant les acteurs clés de la reprogrammation de Y (comme *sox-2* ou *ceh-6*). Il est donc nécessaire d'inactiver ces gènes synMuv B (ou de lever la répression des gènes cibles de la voie RB) pour pouvoir induire un changement d'identité de Y : c'est le rôle supposé du gène *lin-15A* qui permet de lever ce frein et d'initier la TD.

2) Lien entre la voie RB et l'expression de programmes modulés par l'apport de nourriture

Dans la littérature, la voie RB se trouve impliquée dans la régulation de programmes induits par un changement dans l'apport de nourriture. Nous savons que *lin-35*/RB joue un rôle important dans l'induction d'un programme de résistance au jeûne. En cas de privation de nourriture à l'éclosion du ver, l'inactivation du gène *lin-35* mène à une dérégulation de gènes activés lors de la diapause L1 (certains seront réprimés, d'autres surexprimés). La voie RB est donc nécessaire pour une régulation fine d'un programme induit par le jeûne durant la diapause L1 et principalement dans les cellules intestinales et neuronales (CUI *et al.* 2013).

De façon intéressante, chez la plante *Arabidopsis thaliana*, RBR/RB interagit avec plusieurs modificateurs de la chromatine pour réprimer l'expression de gènes embryonnaires durant la germination de la plante (transformation de la graine en jeune plant). RBR promeut également la transition d'un métabolisme hétérotrophe (chez la graine) à un métabolisme autotrophe (chez la jeune plante). RBR réprime le programme embryonnaire de réponse au sucre (source carbonée utilisée par la graine pour se nourrir en mode hétérotrophe) et induit l'établissement du programme autotrophe de la plante. Cette régulation du programme de réponse au sucre de RBR est indépendante de ces fonctions de contrôle du cycle cellulaire que RBR joue plus tôt dans l'embryogenèse. Les mutants RBR présentent un arrêt de la germination. En présence de sucrose, ces graines mutantes pour RBR bloquées peuvent même ré-exprimer des gènes embryonnaires, contrairement aux graines sauvages du même stade qui ne répondent plus aux stimulations des sources carbonées (le mode autotrophe étant activé) (GUTZAT *et al.* 2011).

D'après ces études, la voie RB joue un rôle très conservé dans l'instauration de programme d'expression permettant d'opérer une transition pour mieux répondre aux changements dans l'alimentation d'un organisme.

La mutation de *lin-35*/RB chez *C. elegans* ou de RBR/RB chez *Arabidopsis* entraîne l'augmentation de l'expression d'un programme germinal. Les cellules germinales sont

très résistantes à de nombreux stress. Curran *et al.*, (2009) proposent que l'activation de l'expression de ces gènes germinaux dans les cellules somatiques de *C. elegans* permettrait aux vers d'être mieux armés lors de stress environnementaux. Des gènes synMuv B répriment ce programme en conditions favorables, et leur inactivation semble nécessaire pour exprimer des gènes de résistance aux stress, mais leur totale suppression peut s'avérer délétère pour la survie du ver si ce programme germinaux n'est pas finement régulé. En effet les vers mutants pour les synMuv B liés à la voie RB présentent un arrêt du développement en L1 à 26°C suite à la perte de fonctionnalité des cellules intestinales exprimant très fortement des gènes germinaux (PETRELLA *et al.* 2011). De la même manière, les mutants *lin-35* survivent moins longtemps lors de la diapause L1 (CUI *et al.* 2013).

Cette expression d'un programme déstabilisant l'état différencié de cellules somatiques en cas d'inactivation de la voie RB pourrait aider notre cellule Y à initier sa dédifférenciation. *lin-15A* serait nécessaire pour inhiber la voie RB, ou ses gènes cibles, au moment de l'initiation de la TD (d'où une expression de *lin-15A* dans Y juste avant l'éclosion du ver, peu avant le début de la reprogrammation de Y en L1). Dans ce sens, une étude dans des cellules endothéliales humaines a démontré qu'une protéine à domaine THAP régule l'expression de cibles de la voie RB : la protéine THAP1 réprime plusieurs cibles de la voie pRB-E2F et module précisément l'entrée dans le cycle cellulaire de ces cellules endothéliales (CAYROL *et al.* 2007).

La privation de nourriture et l'inactivation de gènes synMuv B liés à la voie RB présentent des phénotypes similaires. La mutation de *daf-2* (mimant l'induction du jeûne) présente la même augmentation d'expression du programme germinaux dans les cellules intestinales que l'inactivation de gènes synMuv B liés à la voie RB. De la même manière, le jeûne et la mutation de ces gènes synMuv B peuvent relancer la reprogrammation de Y dans des vers mutants pour *lin-15A*. Il a été montré que le gène *slr-2* est génétiquement redondant avec *lin-35* dans la régulation de fonctions intestinales chez *C. elegans*. Plusieurs gènes du programme germinaux cibles de *lin-35* sont également suractivés dans le mutant *slr-2*. Il serait intéressant de tester si la mutation *slr-2* pourrait également induire une suppression du phénotype du mutant *lin-15A*.

L'expression somatique de gènes germinaux dans les mutants synMuv B peut être supprimée par l'inactivation de remodeleurs de la chromatine tel que *isw-1* et *mes-4* (CUI *et al.* 2006). Il serait très intéressant d'observer l'effet de l'inactivation de *isw-1* ou *mes-4* sur la pénétrance du défaut de PDA du double mutant *lin-15A(n767) ; lin-35(n745)*. Cette expérience nous permettra de savoir si l'induction du programme germinaux est responsable de la suppression du phénotype de *lin-15A*.

Le jeûne et la voie RB ont de nombreux gènes cibles en commun. Il existe plusieurs publications faisant la liste des gènes communs surexprimés en cas d'inactivation de la voie RB ou durant l'induction du jeûne (ou dans le mutant *daf-2*). La cible commune *daf-16* ne semble pas jouer de rôle dans la reprogrammation de Y, mais d'autres gènes surexprimés dans le mutant *lin-35* et durant l'instauration de diapause mériteraient d'être testés dans notre modèle.

Un de ces gènes retient particulièrement mon attention : *cbp-1*. Ce gène code pour une histone acétyltransférase (HAT), dont l'homologue CBP chez la souris est un co-activateur de transcription (via l'interaction avec différents FdT) (KAMEI *et al.* 1996). *cbp-1* joue un rôle clé dans la différenciation de nombreux tissus chez *C. elegans* durant l'embryogenèse (VICTOR *et al.* 2002). Chez *C. elegans*, l'expression de cette protéine est significativement augmentée dans les mutants *daf-2* ainsi qu'en condition de restriction de nourriture (ZHANG *et al.* 2009) et dans la souche mutante pour *lin-35* (KIRIENKO and FAY 2007). Cette augmentation d'expression de *cbp-1* est encore amplifiée dans les vers mutants *lin-35* arrêtés en diapause L1 (x3,12 par rapport au vers WT L1 nourris, alors que l'expression de *cbp-1* est multipliée par 1,5 dans les mutants *lin-35* L1 nourris par rapport aux vers sauvages L1 nourris). Des données préliminaires dans notre laboratoire ont montré l'induction d'un défaut de reprogrammation de Y de classe I (de faible pénétrance) après l'inactivation de *cbp-1* par ARNi dans la souche sauvage (données non publiées, Arnaud Ahier). Il apparaît donc que *cbp-1* pourrait jouer un rôle dans l'initiation de la TD de Y en PDA, mais le lien avec *lin-15A* reste à définir. Il serait maintenant intéressant de voir si l'expression de *cbp-1* sous contrôle d'un promoteur rectal pourrait induire la suppression du défaut de PDA dans les mutants *lin-15A*.

On peut aussi envisager qu'il ne s'agisse pas de gènes cibles communs précis qui permettraient de supprimer le phénotype du mutant *lin-15A*, mais que l'activation du programme germinale dans les cellules somatiques puisse rendre Y plus permissive à un changement d'identité. Dans ces conditions, la chromatine pourrait être plus accessible aux facteurs clés de l'initiation de Y, *lin-15A* jouerait donc ici un rôle de régulateur plus global de l'état de la chromatine au sein de Y pour permettre l'initiation du processus.

3) Les gènes synMuv B agissent-ils de façon cellule-autonome dans Y ?

Jusqu'à maintenant, j'ai supposé que les gènes synMuv B suppresseurs du défaut de PDA dans *lin-15A(n767)* étaient un verrou à la reprogrammation de Y à l'intérieur même de cette cellule. Cette hypothèse d'un rôle gardien de l'identité de Y de façon cellule-autonome n'est pour l'instant pas vérifiée. Premièrement, il n'est pas précisé dans la littérature si les mutants de ces gènes synMuv B induisent également l'expression d'un programme germinale dans les cellules rectales, et donc dans Y. Il conviendrait de vérifier s'il y a déstabilisation de l'état différencié de Y dans ces mutants synMuv B (ainsi que dans les vers en diapause par la même occasion) par l'observation de l'expression de marqueurs germinaux (*pgl-1* ou *pgl-3* par exemple) dans Y.

Dans un second temps, il faudra également déterminer où ces gènes synMuv B sont actifs pour supprimer le défaut de PDA dans le mutant *lin-15A* : est-ce directement dans Y ou peut être dans les cellules intestinales proches (une action non cellule-autonome). Pour ce faire, des construits exprimant *lin-35* sous contrôle d'un promoteur strictement intestinal ou de promoteurs exprimés dans la cellule Y (séquences régulatrices de *hlh-16* et/ou promoteur rectal *egl-5* par exemple) devront être injectés dans la souche double mutante *lin-15A(n767) ; lin-35(n745) ; syls63*. Ceci permettra de déterminer si l'expression de *lin-35* dans Y (ou dans les cellules intestinales) peut annuler la suppression du phénotype de *lin-15A* et précisera s'il s'agit ici d'un mécanisme cellule-autonome. Si l'action des gènes synMuv B n'est pas cellule-autonome, il faudra déterminer comment cette information est transmise à la cellule Y.

III/ Le jeûne : induction d'un état de diapause augmentant la plasticité cellulaire ou un stress cellulaire parmi d'autres ?

Il existe un autre exemple où la mutation d'un gène induisant un défaut de différenciation peut être supprimée par le passage en diapause dauer. La souche mutante pour le gène *lin-28* entraîne une induction du destin cellulaire vulvaire trop précoce dans les VPC (des marqueurs exprimés normalement en L3 sont ici précocement exprimés en L2), ceci produisant une malformation de la vulve. Dans ce mutant, le passage par un stade dauer permet aux VPC de revenir à un état multipotent durant la diapause : les marqueurs précocement exprimés sont alors réprimés, et une fois le ver réengagé dans le développement larvaire (en L4), la différenciation des VPC se fait correctement (KARP and GREENWALD 2013). On pourrait imaginer que dans Y, l'état de diapause pourrait entraîner une augmentation de sa plasticité, permettant de faire repartir la reprogrammation en engageant la phase de dédifférenciation. Il serait également intéressant d'étudier si *lin-15A* jouerait là aussi un rôle. Dans ce sens, j'avais réalisé une souche double mutante *lin-15A(n767); lin-28(n719)* pour observer une quelconque synergie et observer si la mutation *lin-15A* pourrait enrayer cette suppression du défaut vulvaire via le passage par un stade dauer. J'ai été très surprise de voir que ce double mutant présente un phénotype multivulve très fort (phénotype non observé dans *lin-28(n718)* seul à 20°C. Données non présentées). Pourtant *lin-28* n'a jamais été décrit comme faisant partie d'un groupe de gènes synMuv (A, B ou C). Ce résultat montre qu'il existe bien une interaction (jamais décrite au paravent) entre *lin-15A* et *lin-28* dans différenciation de la vulve. Je n'ai malheureusement pas pu induire la diapause dauer dans ces doubles mutants via les phéromones dauer ainsi que par le jeûne (un très faible nombre de vers dauers a été observé par privation de nourriture). Introduire la mutation *daf-7* ou *daf-2* pourrait permettre d'observer si dans les vers dauers, la suppression de *lin-15A* dans le fond génétique mutant pour *lin-28* permet encore ce retour à un état multipotent des VPC.

Dans le cas du mutant *lin-28*, ce retour à un état multipotent des VPC se fait via l'intermédiaire de *daf-16*. Si Y suit le même processus, un autre facteur induit par le jeûne est en jeu. Nous avons vu que l'inactivation de la voie de l'insuline (via la mutation de *daf-16*) ou de la voie TGF β (via la mutation de *daf-3*) n'empêche pas une suppression

du phénotype de *lin-15A* dans les vers dauers. Ces deux voies de réponse à l'absence de nourriture ont de nombreux gènes cibles en communs. Il est possible que l'inactivation de l'une soit compensée par l'action de la voie alternative pour induire l'expression des facteurs permettant de relancer la reprogrammation de Y dans le mutant *lin-15A*. Muter les effecteurs de ces deux voies permettrait de mettre en évidence cette redondance. Cependant, l'induction de la diapause dauer n'est plus possible, et seule la diapause en L1 pourra être testée dans *lin-15A*.

La privation de nourriture peut également être perçue sous son aspect de stress cellulaire. Nous avons vu dans l'introduction que la pénétrance du défaut de PDA dans certaines souches mutées (dans *jmjd-3.1* ou dans les gènes membres du complexe SET-1) peut être modulée en fonction de certains stress cellulaires, différents de la privation de nourriture.

Cette suppression du phénotype de *lin-15A(n767)* n'est peut-être pas spécifique à l'absence de nourriture mais pourrait être dû à un stress environnemental parmi d'autre. Les variations de températures ne réduisent pas significativement le défaut de PDA du mutant *lin-15A(n767)* (défaut de PDA à 15°C = 51,4% ($\pm 5,3$, n= 207), 20°C= 54,8% ($\pm 3,3$, n=275) , 25°C = 46,4% ($\pm 5,2$, n=264), observations en triplicata, P-Value=0,08 test de Student, 20°C pour référence). Ces observations mériteraient d'être reproduites un plus grand nombre de fois pour la température 25°C, car la P-value est proche de 0,5, et les chiffres laissent penser que la chaleur pourrait réduire faiblement le défaut de PDA dans le mutant *lin-15A*.

A 20°C, plusieurs jours consécutifs en diapause L1 sont nécessaires pour induire une suppression du phénotype de *lin-15A(n767)*. Il s'est avéré que l'élévation de la température à 25°C permet une suppression élevée du phénotype de *lin-15A* significativement plus rapide de quelques jours (données non publiées, Sarah Becker). La combinaison de certains stress cellulaires pourrait donc amplifier la suppression du défaut de reprogrammation de Y dans le mutant *lin-15A*.

Des résultats préliminaires montrent que l'induction de stress par radiations aux ultraviolets juste avant l'initiation de la reprogrammation semble influencer sur la pénétrance du défaut de PDA dans *lin-15A(n767)*. Après exposition de vers L1 juste éclos

(moins de 3h) aux UV (10 à 15 J/m²), la pénétrance du défaut de PDA est réduite (42,5% ($\pm 4,81$, n=132) après exposition aux UV contre 60% ($\pm 0,35$, n=150) pour les vers contrôles *lin-15A(n767)*; *syIs63* cultivés en parallèle dans les mêmes conditions non soumis aux UV. Expérience réalisée en duplicata, P-Value =0,04). Ici aussi, la P-Value reste proche de la limite de significativité, et il est nécessaire de reproduire ces observations. Ces résultats laissent penser que d'autres stress pourraient moduler la pénétrance du phénotype de *lin-15A*. Néanmoins, l'efficacité de suppression du phénotype de *lin-15A(n767)* reste faible, bien moins efficace que l'induction du jeûne et pourrait être indirect.

Ici aussi, il existe un lien entre stress cellulaire et gènes synMuv B. Au sein du réticulum endoplasmique (RE), quand le repliement des protéines se fait mal, des voies de signalisation sont activées pour répondre à ce stress (elles induisent la diminution de la synthèse protéique, l'augmentation de l'expression de protéines chaperonnes ou de protéines impliquées dans la dégradation des protéines associées au RE). L'activation de ces voies est appelée UPR (*Unfolded Protein Response*). La mutation des gènes synMuv B *hpl-2*, *lin-13* ou *lin-35* entraîne une suractivation de l'UPR (augmentation de la transcription des protéines chaperonnes via l'élévation de l'expression de *xbp-1* et augmentation de la voie de l'autophagie aidant à la dégradation des protéines mal repliées). Seuls certains synMuv B répriment ce programme de réponse au stress. Par exemple le gène synMuv B *lin-36* ne joue ici aussi aucun rôle (KOZŁOWSKI *et al.* 2014). Cui *et al.*, (2013) précisent également que la mutation de *lin-35* entraîne une expression accrue de gènes de réponse au stress oxydatifs, aux stress induits par des pathogènes et toxines.

Ces gènes synMuv B liés à la voie RB permettent ici aussi l'activation d'un programme en réponse à un stress environnemental (l'accumulation de protéines mal repliées dans le RE), tout comme le gène *lin-35* module l'expression d'un programme de résistance au stress induit par la privation de nourriture en L1 (CUI *et al.* 2013). Il paraît vraisemblable que ces programmes (induit par le jeûne et induit par d'autres stress cellulaires) aient de nombreux gènes cibles en communs et certains d'entre eux pourraient jouer un rôle dans la reprogrammation de Y. L'induction de plusieurs types de stress dans le mutant *lin-15A* devra être testée.

IV/ Pourquoi un processus de transdifférenciation complexe pour créer un nouveau neurone ?

Quand le modèle de TD de Y en PDA m'a été présenté, les premières questions que je me suis posées ont été les suivantes : pourquoi l'évolution a-t-elle permis la sélection d'un processus si complexe pour créer un nouveau motoneurone ? Pourquoi une cellule rectale doit-elle éteindre son programme épithélial, migrer puis se transdifférencier en neurone alors qu'une autre cellule (telle que P12.pa créée à ce moment-là) pourrait générer ce nouveau neurone ?

Si les voies de l'évolution sont parfois impénétrables, on notera que ce processus est également retrouvé dans un autre organe tubulaire : le système excrétoire de *C.elegans*. Nous avons vu que la cellule de pore G1 va elle aussi subir une reprogrammation en neuroblaste après l'éclosion. Le pore excrétoire étant vital, G1 sera remplacée par la cellule G2. Il est important de noter que cette reprogrammation directe a été décrite sur la base du lignage cellulaire et n'a pas formellement été prouvée par une fine analyse de marqueurs. Néanmoins, la TD putative de G1 en neuroblaste et la TD de Y en PDA présentent beaucoup de similitudes.

Premièrement, la voie Notch assigne l'identité de Y et de G1. Nous avons vu que DA9 (la cellule contra-latérale de Y) a le potentiel pour devenir une cellule Y capable de se transdifférencier en PDA. Cette compétence est activée si la voie Notch est exprimée dans DA9. Pour G1, c'est l'absence de signal Notch qui induira son identité en cellule de pore excrétoire. La cellule du conduit excrétoire est la cellule contra-latérale de G1 (G1 = AB.prpaaaapa, cellule du conduit = AB.plpaaaapa). L'identité de cette cellule de conduit est dictée par la présence d'un signal Notch. En effet, dans les mutants *lin-12/Notch*, la cellule du conduit devient une cellule de pore comparable à G1 (ABDUS-SABOOR *et al.* 2011). Dans un cas Notch induit l'identité de Y (et son absence induit l'identité de DA9), dans l'autre cas l'absence de Notch confère son identité à G1 (et le signal Notch l'identité de la cellule du conduit excrétoire).

Deux autres gènes clés dans l'initiation de la reprogrammation de Y sont également exprimés dans la cellule G1 : *ceh-6* et *hlh-16*. La mutation de *ceh-6* entraîne de profondes malformations du système excrétoire (la cellule du canal excréteur est soit malformée, soit absente, entraînant une forte létalité) (BURGLIN and RUVKUN 2001). *hlh-16* est aussi exprimé dans G1 et la cellule du conduit excrétoire (ABDUS-SABOOR 2012), mais sa fonction dans la reprogrammation de G1 n'a pas été testée.

Dans les embryons exprimant *hlh-16p::gfp::hlh-16*, j'ai pu observer qu'une cellule proche du rectum exprimait ce marqueur traductionnel. Il conviendrait de vérifier s'il s'agit de DA9 en croisant cette souche avec un marqueur de cette cellule (*mig-13p::mCherry* ou *itr-1p::mCherry*). Dans le rectum, l'expression de *hlh-16* est restreinte à la seule cellule Y avant la TD. Une expression dans DA9 serait intéressante dans la mesure où *hlh-16* marquerait les cellules qui possèdent le potentiel de se transdifférencier. Sachant que la délétion de la fin de l'intron 1 de *hlh-16* entraîne son expression dans d'autres cellules rectales, il serait intéressant d'observer si son expression peut entraîner une compétence à se transdifférencier dans ces autres cellules.

Y et G1 font partie d'un organe tubulaire en contact avec le milieu extérieur. Ma thèse révèle l'implication des conditions environnementales dans la modulation de l'initiation de la reprogrammation de Y (dans le mutant *lin-15A*). On pourrait imaginer qu'un signal venant du milieu extérieur pourrait participer à l'initiation du processus de TD, ce qui expliquerait que des cellules en contact avec l'extérieur seraient les plus à même de percevoir ce signal, et donc à se reprogrammer.

PDA est un motoneurone qui innerve un muscle dorsal postérieur. PDA est également en contact avec des neurones impliqués dans l'innervation des muscles intestinaux ainsi que le muscle anal nécessaire à la défécation (WHITE *et al.* 1986). Bien que la fonction exacte de PDA soit inconnue et que l'absence de PDA ne conduise à aucun phénotype visible, ce neurone pourrait aider à la défécation après l'éclosion du ver (à partir du moment où il consomme de la nourriture). Il est possible que l'absence de phénotype dans les vers dépourvus de PDA vienne de la nourriture facilement assimilable distribuée en laboratoire. Cette hypothèse mériterait d'être testée pour en savoir plus sur la fonction exacte de ce motoneurone. On pourrait observer la capacité

des vers, avec ou sans PDA, à gérer l'ingestion d'une nourriture plus difficile à assimiler (mimant celle d'un milieu sauvage).

Il serait aussi intéressant de déterminer si un signal extérieur pourrait participer à l'initiation de la reprogrammation de Y. Il reste à savoir quelle est la nature de ce signal. Le jeûne semble plus efficace pour activer la reprogrammation de Y que l'apport de nourriture (du moins dans un fond génétique mutant pour le gène *lin-15A*). Une autre piste pourrait être celle du stress mécanique induit par le passage du contenu intestinal.

Cette dernière hypothèse est à mettre en lien avec le chapitre précédent : si des stress différents de la privation de nourriture peuvent participer à l'initiation de la reprogrammation (du moins dans les mutants *lin-15A*), alors un stress mécanique capté par la cellule Y pourrait actionner un programme de stress participant à la reprogrammation de la cellule.

V/ Conclusion

La recherche de nouveaux acteurs de la TD de Y en PDA m'a permis de découvrir deux gènes impliqués dans l'initiation de ce processus : *hlh-16* et *lin-15A*.

hlh-16 est le seul facteur connu dans le laboratoire à n'être exprimé que dans Y au moment de l'initiation de la TD. La fonction exacte de *hlh-16* et les gènes cibles de ce FdT restent à découvrir. Un parallèle avec la reprogrammation de G1 est également une piste intéressante pour mettre en évidence la conservation des mécanismes sous-tendant deux événements de transdifférenciation naturels dans des organes différents.

lin-15A est un gène nécessaire à la levée d'un verrou à la reprogrammation de Y. Des gènes synMuv B liés à la voie RB jouent le rôle de frein à l'initiation de la TD. *lin-15A* est nécessaire pour inhiber l'action de ces gènes synMuv B gardiens de l'identité épithéliale de Y et permettre une induction robuste de la reprogrammation de Y.

Un des aspects les plus excitants de ma thèse a été de découvrir que le jeûne pouvait également relancer la reprogrammation de Y dans les mutants *lin-15A*. L'état de diapause en L1 (prolongé) et au stade dauer permet d'activer un programme capable de pallier à l'absence de *lin-15A*. La suppression de gènes synMuv B et l'induction du jeûne mènent au même phénotype : la suppression du défaut de reprogrammation de Y dans le mutant *lin-15A*. La littérature démontre que synMuv B et voies de signalisations induites

par la privation de nourriture régulent l'expression de nombreux gènes communs. L'expression d'un ou plusieurs de ces gènes pourraient permettre de relancer l'initiation de Y, malgré l'absence de *lin-15A* (voir modèle figure 39). La découverte de ce(s) potentiel(s) facteur(s) commun(s) permettrait d'établir une cascade moléculaire modulant l'initiation de la TD de Y en PDA.

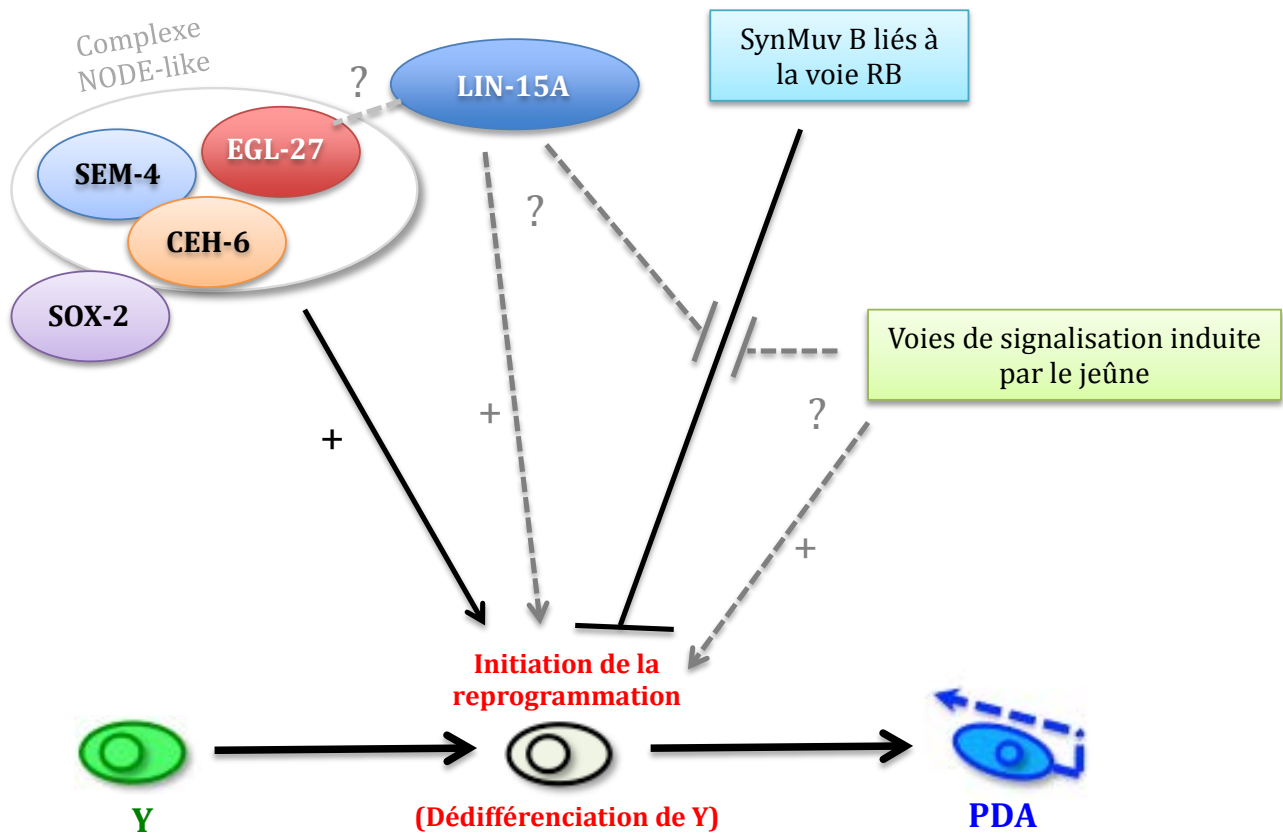


Figure 39 : Modèle. Le complexe NODE-like et SOX-2 initient la TD de Y en PDA. Les gènes synMuv B liés à la voie RB bloquent l'initiation de la reprogrammation de Y. Le rôle de *lin-15A* est de lever ce verrou pour activer le processus de TD. Pour ce faire, *lin-15A* pourrait directement inhiber l'action des gènes synMuv B ou activer des gènes cibles réprimés par la voie RB. La privation de nourriture en L1 et au stade dauer permet l'activation de facteurs initiant la reprogrammation malgré l'absence de *lin-15A*. Les voies de signalisation activées par le jeûne pourraient potentiellement réguler les gènes synMuv B ou directement induire l'activation de gènes cibles réprimés par la voie RB. Sur ce schéma, un lien putatif est représenté entre LIN-15A et EGL-27, il est possible que ces deux facteurs soient impliqués dans la même voie ou le même complexe.

ANNEXES

BIBLIOGRAPHIE

- Abdus-Saboor, I., 2012 The EGF-Ras-Erk pathway and the Nkx-5/HMX homeodomain protein MLS-2 promote tube development in the *C. elegans* excretory system.
- Abdus-Saboor, I., V. P. Mancuso, J. I. Murray, K. Palozola, C. Norris *et al.*, 2011 Notch and Ras promote sequential steps of excretory tube development in *C. elegans*. *Development* 138: 3545-3555.
- Addis, R. C., J. L. Ifkovits, F. Pinto, L. D. Kellam, P. Estes *et al.*, 2013 Optimization of direct fibroblast reprogramming to cardiomyocytes using calcium activity as a functional measure of success. *J Mol Cell Cardiol* 60: 97-106.
- Akashi, K., D. Traver, T. Miyamoto and I. L. Weissman, 2000 A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404: 193-197.
- Altun-Gultekin, Z., Y. Andachi, E. L. Tsalik, D. Pilgrim, Y. Kohara *et al.*, 2001 A regulatory cascade of three homeobox genes, *ceh-10*, *ttx-3* and *ceh-23*, controls cell fate specification of a defined interneuron class in *C. elegans*. *Development* 128: 1951-1969.
- Amano, T., T. Sagai, H. Tanabe, Y. Mizushima, H. Nakazawa *et al.*, 2009 Chromosomal dynamics at the *Shh* locus: limb bud-specific differential regulation of competence and active transcription. *Dev Cell* 16: 47-57.
- Ambasudhan, R., M. Talantova, R. Coleman, X. Yuan, S. Zhu *et al.*, 2011 Direct reprogramming of adult human fibroblasts to functional neurons under defined conditions. *Cell stem cell* 9: 113-118.
- Arnold, P., A. Scholer, M. Pachkov, P. J. Balwierz, H. Jorgensen *et al.*, 2013 Modeling of epigenome dynamics identifies transcription factors that mediate Polycomb targeting. *Genome Res* 23: 60-73.
- Avilion, A. A., S. K. Nicolis, L. H. Pevny, L. Perez, N. Vivian *et al.*, 2003 Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev* 17: 126-140.
- Balakrishnan, M. P., L. Cilenti, Z. Mashak, P. Popat, E. S. Alnemri *et al.*, 2009 THAP5 is a human cardiac-specific inhibitor of cell cycle that is cleaved by the proapoptotic Omi/HtrA2 protease during cell death. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 297: H643-H653.
- Banito, A., S. T. Rashid, J. C. Acosta, S. Li, C. F. Pereira *et al.*, 2009 Senescence impairs successful reprogramming to pluripotent stem cells. *Genes Dev* 23: 2134-2139.
- Batta, K., M. Florkowska, V. Kouskoff and G. Lacaud, 2014 Direct reprogramming of murine fibroblasts to hematopoietic progenitor cells. *Cell reports* 9: 1871-1884.
- Beermann, W., 1952 [Chromomere constancy and specific modifications of the chromosome structure in development and organ differentiation of *Chironomus tentans*]. *Chromosoma* 5: Unknown.
- Beermann, W., 1961 [A Balbiani ring as locus of a salivary gland mutation]. *Chromosoma* 12: 1-25.
- Benchetrit, H., S. Herman, N. van Wietmarschen, T. Wu, K. Makedonski *et al.*, 2015 Extensive Nuclear Reprogramming Underlies Lineage Conversion into Functional Trophoblast Stem-like Cells. *Cell stem cell* 17: 543-556.
- Berkes, C. A., D. A. Bergstrom, B. H. Penn, K. J. Seaver, P. S. Knoepfler *et al.*, 2004 Pbx marks genes for activation by MyoD indicating a role for a homeodomain protein in establishing myogenic potential. *Mol Cell* 14: 465-477.
- Bertrand, V., P. Bisso, R. J. Poole and O. Hobert, 2011 Notch-dependent induction of left/right asymmetry in *C. elegans* interneurons and motoneurons. *Current Biology* 21: 1225-1231.

- Bichsel, C., D. Neeld, T. Hamazaki, L. J. Chang, L. J. Yang *et al.*, 2013 Direct reprogramming of fibroblasts to myocytes via bacterial injection of MyoD protein. *Cell Reprogram* 15: 117-125.
- Bigelow, H., M. Doitsidou, S. Sarin and O. Hobert, 2009 MAQGene: software to facilitate *C. elegans* mutant genome sequence analysis. *Nature methods* 6: 549-549.
- Blau, H. M., G. K. Pavlath, E. C. Hardeman, C. P. Chiu, L. Silberstein *et al.*, 1985 Plasticity of the differentiated state. *Science* 230: 758-766.
- Brazelton, T. R., F. M. V. Rossi, G. I. Keshet and H. M. Blau, 2000 From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 290: 1775-1779.
- Bredenkamp, N., S. Ulyanchenko, K. E. O'Neill, N. R. Manley, H. J. Vaidya *et al.*, 2014 An organized and functional thymus generated from FOXP1-reprogrammed fibroblasts. *Nature cell biology* 16: 902-908.
- Brenner, S., 1974 The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77: 71-94.
- Briggs, R., and T. J. King, 1952 Transplantation of Living Nuclei From Blastula Cells into Enucleated Frogs' Eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 38: 455-463.
- Brouwer, M., H. Zhou and N. Nadif Kasri, 2015 Choices for Induction of Pluripotency: Recent Developments in Human Induced Pluripotent Stem Cell Reprogramming Strategies. *Stem Cell Rev.*
- Brown, S. W., 1966 Heterochromatin. *Science* 151: 417-425.
- Browne, E. N., 1909 The production of new hydranths in hydra by the insertion of small grafts. *J. exp. Zool* 7.
- Buganim, Y., E. Itskovich, Y.-C. Hu, A. W. Cheng, K. Ganz *et al.*, 2012 Direct reprogramming of fibroblasts into embryonic Sertoli-like cells by defined factors. *Cell stem cell* 11: 373-386.
- Burglin, T. R., and G. Ruvkun, 2001 Regulation of ectodermal and excretory function by the *C. elegans* POU homeobox gene *ceh-6*. *Development* 128: 779-790.
- Buscarlet, M., and S. Stifani, 2007 The 'Marx' of Groucho on development and disease. *Trends in cell biology* 17: 353-361.
- Busslinger, M., J. Hurst and R. A. Flavell, 1983 DNA methylation and the regulation of globin gene expression. *Cell* 34: 197-206.
- Bussmann, L. H., A. Schubert, T. P. Vu Manh, L. De Andres, S. C. Desbordes *et al.*, 2009 A robust and highly efficient immune cell reprogramming system. *Cell Stem Cell* 5: 554-566.
- Cahan, P., H. Li, S. A. Morris, E. Lummertz da Rocha, G. Q. Daley *et al.*, 2014 CellNet: network biology applied to stem cell engineering. *Cell* 158: 903-915.
- Caiazzo, M., M. T. Dell'Anno, E. Dvoretzkova, D. Lazarevic, S. Taverna *et al.*, 2011 Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts. *Nature* 476: 224-227.
- Caiazzo, M., S. Giannelli, P. Valente, G. Lignani, A. Carissimo *et al.*, 2015 Direct conversion of fibroblasts into functional astrocytes by defined transcription factors. *Stem cell reports* 4: 25-36.
- Cartwright, P., C. McLean, A. Sheppard, D. Rivett, K. Jones *et al.*, 2005 LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development* 132: 885-896.
- Cavelti-Weder, C., W. Li, G. C. Weir and Q. Zhou, 2014 Direct lineage conversion of pancreatic exocrine to endocrine Beta cells in vivo with defined factors. *Methods Mol Biol* 1150: 247-262.

- Cayrol, C., C. Lacroix, C. Mathe, V. Ecochard, M. Ceribelli *et al.*, 2007 The THAP–zinc finger protein THAP1 regulates endothelial cell proliferation through modulation of pRB/E2F cell-cycle target genes. *Blood* 109: 584-594.
- Chalfie, M., Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward and D. C. Prasher, 1994 Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263: 802-805.
- Chamberlain, G., J. Fox, B. Ashton and J. Middleton, 2007 Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem cells* 25: 2739-2749.
- Chambers, I., D. Colby, M. Robertson, J. Nichols, S. Lee *et al.*, 2003 Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 113: 643-655.
- Chanda, S., C. E. Ang, J. Davila, C. Pak, M. Mall *et al.*, 2014 Generation of induced neuronal cells by the single reprogramming factor ASCL1. *Stem Cell Reports* 3: 282-296.
- Chang, S., R. J. Johnston, Jr. and O. Hobert, 2003 A transcriptional regulatory cascade that controls left/right asymmetry in chemosensory neurons of *C. elegans*. *Genes Dev* 17: 2123-2137.
- Chen, H. I., B. Sharma, B. N. Akerberg, H. J. Numi, R. Kivela *et al.*, 2014 The sinus venosus contributes to coronary vasculature through VEGFC-stimulated angiogenesis. *Development* 141: 4500-4512.
- Cheng, L., W. Hu, B. Qiu, J. Zhao, Y. Yu *et al.*, 2014 Generation of neural progenitor cells by chemical cocktails and hypoxia. *Cell Res* 24: 665-679.
- Chesne, P., P. G. Adenot, C. Viglietta, M. Baratte, L. Boulanger *et al.*, 2002 Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nat Biotechnol* 20: 366-369.
- Choi, J., M. L. Costa, C. S. Mermelstein, C. Chagas, S. Holtzer *et al.*, 1990 MyoD converts primary dermal fibroblasts, chondroblasts, smooth muscle, and retinal pigmented epithelial cells into striated mononucleated myoblasts and multinucleated myotubes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 7988-7992.
- Christoforou, N., M. Chellappan, A. F. Adler, R. D. Kirkton, T. Wu *et al.*, 2013 Transcription factors MYOCD, SRF, Mesp1 and SMARCD3 enhance the cardio-inducing effect of GATA4, TBX5, and MEF2C during direct cellular reprogramming. *PloS one* 8: e63577.
- Christoforou, N., R. A. Miller, C. M. Hill, C. C. Jie, A. S. McCallion *et al.*, 2008 Mouse ES cell-derived cardiac precursor cells are multipotent and facilitate identification of novel cardiac genes. *J Clin Invest* 118: 894-903.
- Clark, S. G., X. Lu and H. R. Horvitz, 1994 The *Caenorhabditis elegans* locus *lin-15*, a negative regulator of a tyrosine kinase signaling pathway, encodes two different proteins. *Genetics* 137: 987-997.
- Clouaire, T., M. Roussigne, V. Ecochard, C. Mathe, F. Amalric *et al.*, 2005 The THAP domain of THAP1 is a large C2CH module with zinc-dependent sequence-specific DNA-binding activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 6907-6912.
- Colasante, G., G. Lignani, A. Rubio, L. Medrihan, L. Yekhlief *et al.*, 2015 Rapid Conversion of Fibroblasts into Functional Forebrain GABAergic Interneurons by Direct Genetic Reprogramming. *Cell Stem Cell* 17: 719-734.
- Colucci, V. L., 1891 Sulla rigenerazione parziale dell'occhio nei Tritoni. *Istogenesi e sviluppo. Studio sperimentale. Mem R Accad Bologna Sez Sci Nat* 1: 167-203.
- Costamagna, D., E. Berardi, G. Ceccarelli and M. Sampaolesi, 2015 Adult stem cells and skeletal muscle regeneration. *Current Gene Therapy* 15: 348-363.

- Couteau, F., F. Guerry, F. Müller and F. Palladino, 2002 A heterochromatin protein 1 homologue in *Caenorhabditis elegans* acts in germline and vulval development. *EMBO reports* 3: 235-241.
- Cui, M., M. L. Cohen, C. Teng and M. Han, 2013 The tumor suppressor Rb critically regulates starvation-induced stress response in *C. elegans*. *Current Biology* 23: 975-980.
- Cui, M., E. B. Kim and M. Han, 2006 Diverse chromatin remodeling genes antagonize the Rb-involved SynMuv pathways in *C. elegans*. *PLoS Genet* 2: e74.
- Curran, S. P., X. Wu, C. G. Riedel and G. Ruvkun, 2009 A soma-to-germline transformation in long-lived *Caenorhabditis elegans* mutants. *Nature* 459: 1079-1084.
- Davies, E. K., A. D. Peters and P. D. Keightley, 1999 High frequency of cryptic deleterious mutations in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 285: 1748-1751.
- Davis, R. L., H. Weintraub and A. B. Lassar, 1987 Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 51: 987-1000.
- Davison, E. M., A. M. Saffer, L. S. Huang, J. DeModena, P. W. Sternberg *et al.*, 2011 The LIN-15A and LIN-56 transcriptional regulators interact to negatively regulate EGF/Ras signaling in *Caenorhabditis elegans* vulval cell-fate determination. *Genetics* 187: 803-815.
- Dejosez, M., J. S. Krumenacker, L. J. Zitour, M. Passeri, L.-F. Chu *et al.*, 2008 Ronin is essential for embryogenesis and the pluripotency of mouse embryonic stem cells. *Cell* 133: 1162-1174.
- DeRenzo, C., K. J. Reese and G. Seydoux, 2003 Exclusion of germ plasm proteins from somatic lineages by cullin-dependent degradation. *Nature* 424: 685-689.
- Dhawan, S., S. Georgia, S. I. Tschen, G. Fan and A. Bhushan, 2011 Pancreatic beta cell identity is maintained by DNA methylation-mediated repression of *Arx*. *Dev Cell* 20: 419-429.
- Di Tullio, A., T. P. Vu Manh, A. Schubert, G. Castellano, R. Mansson *et al.*, 2011 CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBP(alpha))-induced transdifferentiation of pre-B cells into macrophages involves no overt retrodifferentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 17016-17021.
- Dickinson, D. J., J. D. Ward, D. J. Reiner and B. Goldstein, 2013 Engineering the *Caenorhabditis elegans* genome using Cas9-triggered homologous recombination. *Nature methods* 10: 1028-1034.
- Du, Y., J. Wang, J. Jia, N. Song, C. Xiang *et al.*, 2014 Human hepatocytes with drug metabolic function induced from fibroblasts by lineage reprogramming. *Cell stem cell* 14: 394-403.
- Du, Z., F. He, Z. Yu, B. Bowerman and Z. Bao, 2015 E3 ubiquitin ligases promote progression of differentiation during *C. elegans* embryogenesis. *Developmental biology* 398: 267-279.
- Duggan, A., C. Ma and M. Chalfie, 1998 Regulation of touch receptor differentiation by the *Caenorhabditis elegans* *mec-3* and *unc-86* genes. *Development* 125: 4107-4119.
- Eggan, K., K. Baldwin, M. Tackett, J. Osborne, J. Gogos *et al.*, 2004 Mice cloned from olfactory sensory neurons. *Nature* 428: 44-49.
- Egli, D., J. Rosains, G. Birkhoff and K. Eggan, 2007 Developmental reprogramming after chromosome transfer into mitotic mouse zygotes. *Nature* 447: 679-685.
- Eguchi, G., Y. Eguchi, K. Nakamura, M. C. Yadav, J. L. Millán *et al.*, 2011 Regenerative capacity in newts is not altered by repeated regeneration and ageing. *Nature communications* 2: 384.

- Elmen, J., M. Lindow, S. Schutz, M. Lawrence, A. Petri *et al.*, 2008 LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature* 452: 896-899.
- Etchberger, J. F., A. Lorch, M. C. Sleumer, R. Zapf, S. J. Jones *et al.*, 2007 The molecular signature and cis-regulatory architecture of a *C. elegans* gustatory neuron. *Genes Dev* 21: 1653-1674.
- eurostemcell, s. w., <http://www.eurostemcell.org/fr/glossaire>, pp.
- Fay, D. S., and J. Yochem, 2007 The SynMuv genes of *Caenorhabditis elegans* in vulval development and beyond. *Dev Biol* 306: 1-9.
- Feng, R., S. C. Desbordes, H. Xie, E. S. Tillo, F. Pixley *et al.*, 2008 PU.1 and C/EBPalpha/beta convert fibroblasts into macrophage-like cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 6057-6062.
- Ferrari, G., D. Angelis, M. Coletta, E. Paolucci, A. Stornaiuolo *et al.*, 1998 Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279: 1528-1530.
- Filoni, S., 2009 Retina and lens regeneration in anuran amphibians, pp. 528-534 in *Seminars in cell & developmental biology*. Elsevier.
- Forsberg, M., M. Carlén, K. Meletis, M. S. Y. Yeung, F. Barnabé-Heider *et al.*, 2010 Efficient reprogramming of adult neural stem cells to monocytes by ectopic expression of a single gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 14657-14661.
- Fu, J.-D., N. R. Stone, L. Liu, C. I. Spencer, L. Qian *et al.*, 2013 Direct reprogramming of human fibroblasts toward a cardiomyocyte-like state. *Stem cell reports* 1: 235-247.
- Fu, Y., C. Huang, X. Xu, H. Gu, Y. Ye *et al.*, 2015 Direct reprogramming of mouse fibroblasts into cardiomyocytes with chemical cocktails. *Cell Res* 25: 1013-1024.
- Fukushige, T., and M. Krause, 2005 The myogenic potency of HLH-1 reveals wide-spread developmental plasticity in early *C. elegans* embryos. *Development* 132: 1795-1805.
- Gan, Q., T. Yoshida, O. G. McDonald and G. K. Owens, 2007 Concise review: epigenetic mechanisms contribute to pluripotency and cell lineage determination of embryonic stem cells. *Stem Cells* 25: 2-9.
- Gervais, V., S. Campagne, J. Durand, I. Muller and A. Milon, 2013 NMR studies of a new family of DNA binding proteins: the THAP proteins. *Journal of biomolecular NMR* 56: 3-15.
- Gettings, M., F. Serman, R. Rousset, P. Bagnerini, L. Almeida *et al.*, 2010 JNK signalling controls remodelling of the segment boundary through cell reprogramming during *Drosophila* morphogenesis. *PLoS Biol* 8: e1000390.
- Ghasemi-Kasman, M., M. Hajikaram, H. Baharvand and M. Javan, 2015 MicroRNA-Mediated In Vitro and In Vivo Direct Conversion of Astrocytes to Neuroblasts. *PLoS one* 10: e0127878.
- Gifford, C. A., M. J. Ziller, H. Gu, C. Trapnell, J. Donaghey *et al.*, 2013 Transcriptional and epigenetic dynamics during specification of human embryonic stem cells. *Cell* 153: 1149-1163.
- Gilleard, J. S., and J. D. McGhee, 2001 Activation of Hypodermal Differentiation in the *Caenorhabditis elegans* Embryo by GATA Transcription Factors ELT-1 and ELT-3. *Molecular and cellular biology* 21: 2533-2544.
- Ginsberg, M., D. James, B.-S. Ding, D. Nolan, F. Geng *et al.*, 2012 Efficient direct reprogramming of mature amniotic cells into endothelial cells by ETS factors and TGFβ suppression. *Cell* 151: 559-575.

- Gonczy, P., and L. S. Rose, 2005 Asymmetric cell division and axis formation in the embryo. *WormBook*: 1-20.
- Graf, T., 2011 Historical origins of transdifferentiation and reprogramming. *Cell Stem Cell* 9: 504-516.
- Graf, T., K. McNagny, G. Brady and J. Frampton, 1992 Chicken "erythroid" cells transformed by the Gag-Myb-Ets-encoding E26 leukemia virus are multipotent. *Cell* 70: 201-213.
- Greenwald, I. S., P. W. Sternberg and H. R. Horvitz, 1983 The lin-12 locus specifies cell fates in *Caenorhabditis elegans*. *Cell* 34: 435-444.
- Grogg, M. W., M. K. Call and P. A. Tsonis, 2006 Signaling during lens regeneration, pp. 753-758 in *Seminars in cell & developmental biology*. Elsevier.
- Guo, Z., L. Zhang, Z. Wu, Y. Chen, F. Wang *et al.*, 2014 In vivo direct reprogramming of reactive glial cells into functional neurons after brain injury and in an Alzheimer's disease model. *Cell Stem Cell* 14: 188-202.
- Gurdon, J. B., 1962 Adult frogs derived from the nuclei of single somatic cells. *Dev Biol* 4: 256-273.
- Gurdon, J. B., S. Brennan, S. Fairman and T. J. Mohun, 1984 Transcription of muscle-specific actin genes in early *Xenopus* development: nuclear transplantation and cell dissociation. *Cell* 38: 691-700.
- Gurdon, J. B., T. R. Elsdale and M. Fischberg, 1958 Sexually mature individuals of *Xenopus laevis* from the transplantation of single somatic nuclei. *Nature* 182: 64-65.
- Gurdon, J. B., and D. A. Melton, 2008 Nuclear reprogramming in cells. *Science* 322: 1811-1815.
- Gutzat, R., L. Borghi, J. Fütterer, S. Bischof, Y. h. Laizet *et al.*, 2011 RETINOBLASTOMA-RELATED PROTEIN controls the transition to autotrophic plant development. *Development* 138: 2977-2986.
- Haeckel, E., 1873 *Natürliche Schöpfungsgeschichte: 1*. Kröner.
- Haeckel, E. H. P. A., 1869 *Zur entwicklungsgeschichte der siphonophoren*. Verlag von C. van der Post, Jr.
- Hajduskova, M., A. Ahier, T. Daniele and S. Jarriault, 2012 Cell plasticity in *Caenorhabditis elegans*: from induced to natural cell reprogramming. *genesis* 50: 1-17.
- Hall, D. B., and K. Struhl, 2002 The VP16 activation domain interacts with multiple transcriptional components as determined by protein-protein cross-linking in vivo. *Journal of Biological Chemistry* 277: 46043-46050.
- Halley-Stott, R. P., V. Pasque and J. B. Gurdon, 2013 Nuclear reprogramming. *Development* 140: 2468-2471.
- Han, D. W., N. Tapia, A. Hermann, K. Hemmer, S. Höing *et al.*, 2012 Direct reprogramming of fibroblasts into neural stem cells by defined factors. *Cell stem cell* 10: 465-472.
- Hayashi, T., N. Mizuno, Y. Ueda, M. Okamoto and H. Kondoh, 2004 FGF2 triggers iris-derived lens regeneration in newt eye. *Mechanisms of development* 121: 519-526.
- Hayhurst, G. P., Y. H. Lee, G. Lambert, J. M. Ward and F. J. Gonzalez, 2001 Hepatocyte nuclear factor 4alpha (nuclear receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis. *Mol Cell Biol* 21: 1393-1403.
- Heinrich, C., R. Blum, S. Gascón, G. Masserdotti, P. Tripathi *et al.*, 2010 Directing astroglia from the cerebral cortex into subtype specific functional neurons. *PLoS Biol* 8: e1000373.

- Hendry, C. E., J. M. Vanslambrouck, J. Ineson, N. Suhaimi, M. Takasato *et al.*, 2013 Direct transcriptional reprogramming of adult cells to embryonic nephron progenitors. *Journal of the American Society of Nephrology* 24: 1424-1434.
- Henley, S. A., and F. A. Dick, 2012 The retinoblastoma family of proteins and their regulatory functions in the mammalian cell division cycle. *Cell Div* 7.
- Herrera, S. C., and G. Morata, 2014 Transgressions of compartment boundaries and cell reprogramming during regeneration in *Drosophila*. *Elife* 3: e01831.
- Hiramatsu, K., S. Sasagawa, H. Outani, K. Nakagawa, H. Yoshikawa *et al.*, 2011 Generation of hyaline cartilaginous tissue from mouse adult dermal fibroblast culture by defined factors. *The Journal of clinical investigation* 121: 640-657.
- Hochedlinger, K., and R. Jaenisch, 2002 Monoclonal mice generated by nuclear transfer from mature B and T donor cells. *Nature* 415: 1035-1038.
- Holmberg, J., and T. Perlmann, 2012 Maintaining differentiated cellular identity. *Nat Rev Genet* 13: 429-439.
- Hoppmann, V., T. Thorstensen, P. E. Kristiansen, S. V. Veiseth, M. A. Rahman *et al.*, 2011 The CW domain, a new histone recognition module in chromatin proteins. *The EMBO journal* 30: 1939-1952.
- Horner, M. A., S. Quintin, M. E. Domeier, J. Kimble, M. Labouesse *et al.*, 1998 *pha-4*, an HNF-3 homolog, specifies pharyngeal organ identity in *Caenorhabditis elegans*. *Genes & development* 12: 1947-1952.
- Hou, P., Y. Li, X. Zhang, C. Liu, J. Guan *et al.*, 2013 Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science* 341: 651-654.
- Huang, P., Z. He, S. Ji, H. Sun, D. Xiang *et al.*, 2011 Induction of functional hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts by defined factors. *nature* 475: 386-389.
- Huang, X., and J. Wang, 2014 The extended pluripotency protein interactome and its links to reprogramming. *Current opinion in genetics & development* 28: 16-24.
- Ieda, M., J. D. Fu, P. Delgado-Olguin, V. Vedantham, Y. Hayashi *et al.*, 2010 Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell* 142: 375-386.
- Inagawa, K., K. Miyamoto, H. Yamakawa, N. Muraoka, T. Sadahiro *et al.*, 2012 Induction of cardiomyocyte-like cells in infarct hearts by gene transfer of *Gata4*, *Mef2c*, and *Tbx5*. *Circulation research* 111: 1147-1156.
- Islas, J. F., Y. Liu, K.-C. Weng, M. J. Robertson, S. Zhang *et al.*, 2012 Transcription factors *ETS2* and *MESP1* transdifferentiate human dermal fibroblasts into cardiac progenitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 13016-13021.
- Jacob, F., and J. Monod, 1961 Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J Mol Biol* 3: 318-356.
- Jang, Y.-Y., M. I. Collector, S. B. Baylin, A. M. Diehl and S. J. Sharkis, 2004 Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. *Nature cell biology* 6: 532-539.
- Jarriault, S., Y. Schwab and I. Greenwald, 2008 A *Caenorhabditis elegans* model for epithelial-neuronal transdifferentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 3790-3795.
- Jayawardena, T. M., B. Egemnazarov, E. A. Finch, L. Zhang, J. A. Payne *et al.*, 2012 MicroRNA-mediated in vitro and in vivo direct reprogramming of cardiac fibroblasts to cardiomyocytes. *Circ Res* 110: 1465-1473.
- Jeong, Y., K. El-Jaick, E. Roessler, M. Muenke and D. J. Epstein, 2006 A functional screen for sonic hedgehog regulatory elements across a 1 Mb interval identifies long-range ventral forebrain enhancers. *Development* 133: 761-772.

- Johnson, N. C., M. E. Dillard, P. Baluk, D. M. McDonald, N. L. Harvey *et al.*, 2008 Lymphatic endothelial cell identity is reversible and its maintenance requires Prox1 activity. *Genes Dev* 22: 3282-3291.
- Jones, P., 2011 Out of Africa and into epigenetics: discovering reprogramming drugs. *Nat Cell Biol* 13: 2.
- Jones, P. A., and S. M. Taylor, 1980 Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell* 20: 85-93.
- Kadkhodaei, B., T. Ito, E. Joodmardi, B. Mattsson, C. Rouillard *et al.*, 2009 Nurr1 is required for maintenance of maturing and adult midbrain dopamine neurons. *J Neurosci* 29: 15923-15932.
- Kagias, K., A. Ahier, N. Fischer and S. Jarriault, 2012 Members of the NODE (Nanog and Oct4-associated deacetylase) complex and SOX-2 promote the initiation of a natural cellular reprogramming event in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 6596-6601.
- Kajimura, S., P. Seale, K. Kubota, E. Lunsford, J. V. Frangioni *et al.*, 2009 Initiation of myoblast to brown fat switch by a PRDM16-C/EBP- β transcriptional complex. *Nature* 460: 1154-1158.
- Kajimura, S., P. Seale and B. M. Spiegelman, 2010 Transcriptional control of brown fat development. *Cell Metab* 11: 257-262.
- Kamei, Y., L. Xu, T. Heinzel, J. Torchia, R. Kurokawa *et al.*, 1996 A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell* 85: 403-414.
- Kang, L., J. Wang, Y. Zhang, Z. Kou and S. Gao, 2009 iPS cells can support full-term development of tetraploid blastocyst-complemented embryos. *Cell Stem Cell* 5: 135-138.
- Kareta, M. S., L. L. Gorges, S. Hafeez, B. A. Benayoun, S. Marro *et al.*, 2015 Inhibition of pluripotency networks by the Rb tumor suppressor restricts reprogramming and tumorigenesis. *Cell stem cell* 16: 39-50.
- Karow, M., R. Sánchez, C. Schichor, G. Masserdotti, F. Ortega *et al.*, 2012 Reprogramming of pericyte-derived cells of the adult human brain into induced neuronal cells. *Cell stem cell* 11: 471-476.
- Karp, X., and I. Greenwald, 2013 Control of cell-fate plasticity and maintenance of multipotency by DAF-16/FoxO in quiescent *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110: 2181-2186.
- Kawamura, T., J. Suzuki, Y. V. Wang, S. Menendez, L. B. Morera *et al.*, 2009 Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature* 460: 1140-1144.
- Kayne, P. S., U. J. Kim, M. Han, J. R. Mullen, F. Yoshizaki *et al.*, 1988 Extremely conserved histone H4 N terminus is dispensable for growth but essential for repressing the silent mating loci in yeast. *Cell* 55: 27-39.
- Kielman, M. F., M. Rindapaa, C. Gaspar, N. van Poppel, C. Breukel *et al.*, 2002 Apc modulates embryonic stem-cell differentiation by controlling the dosage of beta-catenin signaling. *Nat Genet* 32: 594-605.
- Kikuchi, K., 2015 Dedifferentiation, Transdifferentiation, and Proliferation: Mechanisms Underlying Cardiac Muscle Regeneration in Zebrafish. *Current Pathobiology Reports* 3: 81-88.
- Kim, J., K. P. Kim, K. T. Lim, S. C. Lee, J. Yoon *et al.*, 2015a Generation of integration-free induced hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts. *Sci Rep* 5: 15706.

- Kim, J., S. C. Su, H. Wang, A. W. Cheng, J. P. Cassidy *et al.*, 2011 Functional integration of dopaminergic neurons directly converted from mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* 9: 413-419.
- Kim, M. P., Y. Zhang and G. Lozano, 2015b Mutant p53: Multiple Mechanisms Define Biologic Activity in Cancer. *Front Oncol* 5: 249.
- Kim, Y. J., H. Lim, Z. Li, Y. Oh, I. Kovlyagina *et al.*, 2014 Generation of multipotent induced neural crest by direct reprogramming of human postnatal fibroblasts with a single transcription factor. *Cell stem cell* 15: 497-506.
- Kirienko, N. V., and D. S. Fay, 2007 Transcriptome profiling of the *C. elegans* Rb ortholog reveals diverse developmental roles. *Developmental biology* 305: 674-684.
- Kirienko, N. V., J. D. McEnerney and D. S. Fay, 2008 Coordinated regulation of intestinal functions in *C. elegans* by LIN-35/Rb and SLR-2. *PLoS Genet* 4: e1000059-e1000059.
- Kovach, C., R. Dixit, S. Li, P. Mattar, G. Wilkinson *et al.*, 2013 Neurog2 simultaneously activates and represses alternative gene expression programs in the developing neocortex. *Cerebral Cortex* 23: 1884-1900.
- Kozlowski, L., S. Garvis, C. Bedet and F. Palladino, 2014 The *Caenorhabditis elegans* HP1 family protein HPL-2 maintains ER homeostasis through the UPR and hormesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111: 5956-5961.
- Krause, D. S., N. D. Theise, M. I. Collector, O. Henegariu, S. Hwang *et al.*, 2001 Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 105: 369-377.
- Kyrmizi, I., P. Hatzis, N. Katrakili, F. Tronche, F. J. Gonzalez *et al.*, 2006 Plasticity and expanding complexity of the hepatic transcription factor network during liver development. *Genes Dev* 20: 2293-2305.
- Ladewig, J., J. Mertens, J. Kesavan, J. Doerr, D. Poppe *et al.*, 2012 Small molecules enable highly efficient neuronal conversion of human fibroblasts. *Nature methods* 9: 575-578.
- Lafkas, D., A. Shelton, C. Chiu, G. de Leon Boenig, Y. Chen *et al.*, 2015 Therapeutic antibodies reveal Notch control of transdifferentiation in the adult lung. *Nature*.
- Lagasse, E., H. Connors, M. Al-Dhalimy, M. Reitsma, M. Dohse *et al.*, 2000 Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nature medicine* 6: 1229-1234.
- Laskey, R. A., and J. B. Gurdon, 1970 Genetic content of adult somatic cells tested by nuclear transplantation from cultured cells. *Nature* 228: 1332-1334.
- Lemper, M., G. Leuckx, Y. Heremans, M. S. German, H. Heimberg *et al.*, 2015 Reprogramming of human pancreatic exocrine cells to β -like cells. *Cell Death & Differentiation* 22: 1117-1130.
- Lewis, E. B., 1978 A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 276: 565-570.
- Li, J., N. F. Huang, J. Zou, T. J. Laurent, J. C. Lee *et al.*, 2013a Conversion of human fibroblasts to functional endothelial cells by defined factors. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 33: 1366-1375.
- Li, P., S. Burke, J. Wang, X. Chen, M. Ortiz *et al.*, 2010 Reprogramming of T cells to natural killer-like cells upon Bcl11b deletion. *Science* 329: 85-89.
- Li, W., K. Li, W. Wei and S. Ding, 2013b Chemical approaches to stem cell biology and therapeutics. *Cell Stem Cell* 13: 270-283.
- Li, W., M. Nakanishi, A. Zumsteg, M. Shear, C. Wright *et al.*, 2014 In vivo reprogramming of pancreatic acinar cells to three islet endocrine subtypes. *Elife* 3: e01846.

- Li, X., X. Zuo, J. Jing, Y. Ma, J. Wang *et al.*, 2015 Small-molecule-driven direct reprogramming of mouse fibroblasts into functional neurons. *Cell Stem Cell* 17: 195-203.
- Li, Y., J. McClintick, L. Zhong, H. J. Edenberg, M. C. Yoder *et al.*, 2005 Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4. *Blood* 105: 635-637.
- Lim, L. P., N. C. Lau, P. Garrett-Engele, A. Grimson, J. M. Schelter *et al.*, 2005 Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 433: 769-773.
- Litovchick, L., S. Sadasivam, L. Florens, X. Zhu, S. K. Swanson *et al.*, 2007 Evolutionarily conserved multisubunit RBL2/p130 and E2F4 protein complex represses human cell cycle-dependent genes in quiescence. *Molecular cell* 26: 539-551.
- Liu, C., T. Maejima, S. C. Wyler, G. Casadesus, S. Herlitze *et al.*, 2010 Pet-1 is required across different stages of life to regulate serotonergic function. *Nat Neurosci* 13: 1190-1198.
- Liu, M.-L., T. Zang, Y. Zou, J. C. Chang, J. R. Gibson *et al.*, 2013 Small molecules enable neurogenin 2 to efficiently convert human fibroblasts into cholinergic neurons. *Nature communications* 4.
- Liu, X., F. Li, E. A. Stubblefield, B. Blanchard, T. L. Richards *et al.*, 2012 Direct reprogramming of human fibroblasts into dopaminergic neuron-like cells. *Cell research* 22: 321-332.
- Lu, J., H. Dong, L. Lin, Q. Wang, L. Huang *et al.*, 2014 miRNA-302 facilitates reprogramming of human adult hepatocytes into pancreatic islets-like cells in combination with a chemical defined media. *Biochem Biophys Res Commun* 453: 405-410.
- Lujan, E., S. Chanda, H. Ahlenius, T. C. Südhof and M. Wernig, 2012 Direct conversion of mouse fibroblasts to self-renewing, tripotent neural precursor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 2527-2532.
- Macfarlan, T., S. Kutney, B. Altman, R. Montross, J. Yu *et al.*, 2005 Human THAP7 is a chromatin-associated, histone tail-binding protein that represses transcription via recruitment of HDAC3 and nuclear hormone receptor corepressor. *Journal of Biological Chemistry* 280: 7346-7358.
- Macfarlan, T., J. B. Parker, K. Nagata and D. Chakravarti, 2006 Thanatos-associated protein 7 associates with template activating factor-1 β and inhibits histone acetylation to repress transcription. *Molecular Endocrinology* 20: 335-347.
- Maduro, M. F., M. D. Meneghini, B. Bowerman, G. Broitman-Maduro and J. H. Rothman, 2001 Restriction of mesendoderm to a single blastomere by the combined action of SKN-1 and a GSK-3 β homolog is mediated by MED-1 and-2 in *C. elegans*. *Molecular cell* 7: 475-485.
- Marro, S., Z. P. Pang, N. Yang, M. C. Tsai, K. Qu *et al.*, 2011 Direct lineage conversion of terminally differentiated hepatocytes to functional neurons. *Cell Stem Cell* 9: 374-382.
- Masserdotti, G., S. Gillotin, B. Sutor, D. Drechsel, M. Irmeler *et al.*, 2015 Transcriptional Mechanisms of Proneural Factors and REST in Regulating Neuronal Reprogramming of Astrocytes. *Cell Stem Cell* 17: 74-88.
- Matos, J. L., O. S. Lau, C. Hachez, A. Cruz-Ramírez, B. Scheres *et al.*, 2014 Irreversible fate commitment in the Arabidopsis stomatal lineage requires a FAMA and RETINOBLASTOMA-RELATED module. *Elife* 3: e03271.

- Matsuda, T., T. Nakamura, K. Nakao, T. Arai, M. Katsuki *et al.*, 1999 STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *EMBO J* 18: 4261-4269.
- Mayshar, Y., U. Ben-David, N. Lavon, J. C. Biancotti, B. Yakir *et al.*, 2010 Identification and classification of chromosomal aberrations in human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 7: 521-531.
- McGrath, J., and D. Solter, 1984 Inability of mouse blastomere nuclei transferred to enucleated zygotes to support development in vitro. *Science* 226: 1317-1319.
- Meng, F., X. Wang, P. Gu, Z. Wang and W. Guo, 2013 Induction of retinal ganglion-like cells from fibroblasts by adenoviral gene delivery. *Neuroscience* 250: 381-393.
- Mezey, E., K. J. Chandross, G. Harta, R. A. Maki and S. R. McKercher, 2000 Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 290: 1779-1782.
- Mikkola, I., B. Heavey, M. Horcher and M. Busslinger, 2002 Reversion of B cell commitment upon loss of Pax5 expression. *Science* 297: 110-113.
- Mishra, A. K., M. Tsachaki, J. Rister, J. Ng, A. Celik *et al.*, 2013 Binary cell fate decisions and fate transformation in the *Drosophila* larval eye. *PLoS Genet* 9: e1004027.
- Mitsui, K., Y. Tokuzawa, H. Itoh, K. Segawa, M. Murakami *et al.*, 2003 The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 113: 631-642.
- Mizoshiri, N., T. Kishida, K. Yamamoto, T. Shirai, R. Terauchi *et al.*, 2015 Transduction of Oct6 or Oct9 gene concomitant with Myc family gene induced osteoblast-like phenotypic conversion in normal human fibroblasts. *Biochemical and biophysical research communications* 467: 1110-1116.
- Montana, C. L., A. V. Kolesnikov, S. Q. Shen, C. A. Myers, V. J. Kefalov *et al.*, 2013 Reprogramming of adult rod photoreceptors prevents retinal degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110: 1732-1737.
- Najm, F. J., A. M. Lager, A. Zaremba, K. Wyatt, A. V. Caprariello *et al.*, 2013 Transcription factor-mediated reprogramming of fibroblasts to expandable, myelinogenic oligodendrocyte progenitor cells. *Nature biotechnology* 31: 426-433.
- Nam, Y.-J., K. Song, X. Luo, E. Daniel, K. Lambeth *et al.*, 2013 Reprogramming of human fibroblasts toward a cardiac fate. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110: 5588-5593.
- Neo, W. H., K. Yap, S. H. Lee, L. S. Looi, P. Khandelia *et al.*, 2014 MicroRNA miR-124 controls the choice between neuronal and astrocyte differentiation by fine-tuning Ezh2 expression. *J Biol Chem* 289: 20788-20801.
- Nichols, J., B. Zevnik, K. Anastasiadis, H. Niwa, D. Klewe-Nebenius *et al.*, 1998 Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 95: 379-391.
- Nicolay, B. N., B. Bayarmagnai, N. S. Moon, E. V. Benevolenskaya and M. V. Frolov, 2010 Combined inactivation of pRB and hippo pathways induces dedifferentiation in the *Drosophila* retina.
- Niu, W., T. Zang, Y. Zou, S. Fang, D. K. Smith *et al.*, 2013 In vivo reprogramming of astrocytes to neuroblasts in the adult brain. *Nature cell biology* 15: 1164-1175.
- Niwa, H., T. Burdon, I. Chambers and A. Smith, 1998 Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev* 12: 2048-2060.

- Niwa, H., J. Miyazaki and A. G. Smith, 2000 Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 24: 372-376.
- Notta, F., S. Zandi, N. Takayama, S. Dobson, O. I. Gan *et al.*, 2016 Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny. *Science* 351: aab2116.
- Nutt, S. L., B. Heavey, A. G. Rolink and M. Busslinger, 1999 Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature* 401: 556-562.
- Ogas, J., J.-C. Cheng, Z. R. Sung and C. Somerville, 1997 Cellular differentiation regulated by gibberellin in the *Arabidopsis thaliana* pickle mutant. *Science* 277: 91-94.
- Ouellet, J., and R. Roy, 2007 The lin-35/Rb and RNAi pathways cooperate to regulate a key cell cycle transition in *C. elegans*. *BMC developmental biology* 7: 38.
- Ouyang, H., Y. Xue, Y. Lin, X. Zhang, L. Xi *et al.*, 2014 WNT7A and PAX6 define corneal epithelium homeostasis and pathogenesis. *Nature*.
- Pagliara, P., S. Piraino, F. Boero and L. Dini, 2003 Morphological and ultrastructural analysis of *Turritopsis nutricula* during life cycle reversal. *Tissue and Cell* 35: 213-222.
- Pang, Z. P., N. Yang, T. Vierbuchen, A. Ostermeier, D. R. Fuentes *et al.*, 2011 Induction of human neuronal cells by defined transcription factors. *Nature* 476: 220-223.
- Paredes, B. D., L. A. P. Faccioli, L. F. Quintanilha, K. D. Asensi, C. Z. do Valle *et al.*, 2012 Bone marrow progenitor cells do not contribute to liver fibrogenic cells. *World journal of hepatology* 4: 274.
- Park, C. M., and M. J. Hollenberg, 1989 Basic fibroblast growth factor induces retinal regeneration in vivo. *Developmental biology* 134: 201-205.
- Park, K.-S., J. M. Wells, A. M. Zorn, S. E. Wert, V. E. Laubach *et al.*, 2006 Transdifferentiation of ciliated cells during repair of the respiratory epithelium. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 34: 151-157.
- Parry, J. M., and M. V. Sundaram, 2014 A non-cell-autonomous role for Ras signaling in *C. elegans* neuroblast delamination. *Development* 141: 4279-4284.
- Patel, T., B. Tursun, D. P. Rahe and O. Hobert, 2012 Removal of Polycomb repressive complex 2 makes *C. elegans* germ cells susceptible to direct conversion into specific somatic cell types. *Cell Rep* 2: 1178-1186.
- Pereira, C.-F., B. Chang, J. Qiu, X. Niu, D. Papatsenko *et al.*, 2013 Induction of a hemogenic program in mouse fibroblasts. *Cell stem cell* 13: 205-218.
- Petersen, B. E., W. C. Bowen, K. D. Patrene, W. M. Mars, A. K. Sullivan *et al.*, 1999 Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284: 1168-1170.
- Petrella, L. N., W. Wang, C. A. Spike, A. Rechtsteiner, V. Reinke *et al.*, 2011 synMuv B proteins antagonize germline fate in the intestine and ensure *C. elegans* survival. *Development* 138: 1069-1079.
- Pfisterer, U., A. Kirkeby, O. Torper, J. Wood, J. Nelander *et al.*, 2011 Direct conversion of human fibroblasts to dopaminergic neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 10343-10348.
- Piraino, S., F. Boero, B. Aeschbach and V. Schmid, 1996 Reversing the life cycle: medusae transforming into polyps and cell transdifferentiation in *Turritopsis nutricula* (Cnidaria, Hydrozoa). *The Biological Bulletin* 190: 302-312.
- Polejaeva, I. A., S. H. Chen, T. D. Vaught, R. L. Page, J. Mullins *et al.*, 2000 Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* 407: 86-90.

- Pontes, T. B., E. S. Chen, C. O. Gigeck, D. Q. Calcagno, F. Wisnieski *et al.*, 2014 Reduced mRNA expression levels of MBD2 and MBD3 in gastric carcinogenesis. *Tumour Biol* 35: 3447-3453.
- Prokesch, A., A. Smorlesi, J. Perugini, M. Manieri, P. Ciarmela *et al.*, 2014 Molecular aspects of adipoepithelial transdifferentiation in mouse mammary gland. *Stem Cells* 32: 2756-2766.
- Protze, S., S. Khattak, C. Poulet, D. Lindemann, E. M. Tanaka *et al.*, 2012 A new approach to transcription factor screening for reprogramming of fibroblasts to cardiomyocyte-like cells. *J Mol Cell Cardiol* 53: 323-332.
- Pulecio, J., E. Nivet, I. Sancho - Martinez, M. Vitaloni, G. Guenechea *et al.*, 2014 Conversion of human fibroblasts into monocyte - like progenitor cells. *Stem Cells* 32: 2923-2938.
- Qian, L., Y. Huang, C. I. Spencer, A. Foley, V. Vedantham *et al.*, 2012 In vivo reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes. *Nature* 485: 593-598.
- Quintin, S., G. Michaux, L. McMahon, A. Gansmuller and M. Labouesse, 2001 The *Caenorhabditis elegans* gene *lin-26* can trigger epithelial differentiation without conferring tissue specificity. *Developmental biology* 235: 410-421.
- Rais, Y., A. Zviran, S. Geula, O. Gafni, E. Chomsky *et al.*, 2013 Deterministic direct reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Nature* 502: 65-70.
- Ratajczak, M. Z., E. Zuba-Surma, M. Kucia, A. Poniewierska, M. Suszynska *et al.*, 2012 Pluripotent and multipotent stem cells in adult tissues. *Advances in medical sciences* 57: 1-17.
- Red-Horse, K., H. Ueno, I. L. Weissman and M. A. Krasnow, 2010 Coronary arteries form by developmental reprogramming of venous cells. *Nature* 464: 549-553.
- Richard, J. P., S. Zuryn, N. Fischer, V. Pavet, N. Vaucamps *et al.*, 2011 Direct in vivo cellular reprogramming involves transition through discrete, non-pluripotent steps. *Development* 138: 1483-1492.
- Riddell, J., R. Gazit, B. S. Garrison, G. Guo, A. Saadatpour *et al.*, 2014 Reprogramming committed murine blood cells to induced hematopoietic stem cells with defined factors. *Cell* 157: 549-564.
- Riddle, M. R., A. Weintraub, K. C. Q. Nguyen, D. H. Hall and J. H. Rothman, 2013 Transdifferentiation and remodeling of post-embryonic *C. elegans* cells by a single transcription factor. *Development* 140: 4844-4849.
- Ring, K. L., L. M. Tong, M. E. Balestra, R. Javier, Y. Andrews-Zwilling *et al.*, 2012 Direct reprogramming of mouse and human fibroblasts into multipotent neural stem cells with a single factor. *Cell stem cell* 11: 100-109.
- Rolink, A. G., S. L. Nutt, F. Melchers and M. Busslinger, 1999 Long-term in vivo reconstitution of T-cell development by Pax5-deficient B-cell progenitors. *Nature* 401: 603-606.
- Rotgers, E., A. Rivero-Müller, M. Nurmio, M. Parvinen, F. Guillou *et al.*, 2014 Retinoblastoma protein (RB) interacts with E2F3 to control terminal differentiation of Sertoli cells. *Cell death & disease* 5: e1274.
- Rouaux, C., and P. Arlotta, 2013 Direct lineage reprogramming of post-mitotic callosal neurons into corticofugal neurons in vivo. *Nature cell biology* 15: 214-221.
- Roussigne, M., C. Cayrol, T. Clouaire, F. Amalric and J.-P. Girard, 2003 THAP1 is a nuclear proapoptotic factor that links prostate-apoptosis-response-4 (Par-4) to PML nuclear bodies. *Oncogene* 22: 2432-2442.

- Sabogal, A., A. Y. Lyubimov, J. E. Corn, J. M. Berger and D. C. Rio, 2010 THAP proteins target specific DNA sites through bipartite recognition of adjacent major and minor grooves. *Nature structural & molecular biology* 17: 117-123.
- Sage, C., M. Huang, K. Karimi, G. Gutierrez, M. A. Vollrath *et al.*, 2005 Proliferation of functional hair cells in vivo in the absence of the retinoblastoma protein. *Science* 307: 1114-1118.
- Sage, J., A. L. Miller, P. A. Pérez-Mancera, J. M. Wysocki and T. Jacks, 2003 Acute mutation of retinoblastoma gene function is sufficient for cell cycle re-entry. *Nature* 424: 223-228.
- Sammut, M., S. J. Cook, K. C. Q. Nguyen, T. Felton, D. H. Hall *et al.*, 2015 Glia-derived neurons are required for sex-specific learning in *C. elegans*. *Nature* 526: 385-390.
- Sandler, V. M., R. Lis, Y. Liu, A. Kedem, D. James *et al.*, 2014 Reprogramming human endothelial cells to haematopoietic cells requires vascular induction. *Nature* 511: 312-318.
- Sayed, N., W. T. Wong, F. Ospino, S. Meng, J. Lee *et al.*, 2015 Transdifferentiation of Human Fibroblasts to Endothelial Cells Role of Innate Immunity. *Circulation* 131: 300-309.
- Schafer, B. W., B. T. Blakely, G. J. Darlington and H. M. Blau, 1990 Effect of cell history on response to helix-loop-helix family of myogenic regulators. *Nature* 344: 454-458.
- Schmich, J., Y. Kraus, D. De Vito, D. Graziussi, F. Boero *et al.*, 2007 Induction of reverse development in two marine Hydrozoans. *International Journal of Developmental Biology* 51: 45.
- Seaberg, R. M., and D. van der Kooy, 2003 Stem and progenitor cells: the premature desertion of rigorous definitions. *Trends in neurosciences* 26: 125-131.
- Sedgwick, W. T., and E. B. Wilson, 1886 *General Biology*. H. Holt and Company.
- Sekiya, S., and A. Suzuki, 2011 Direct conversion of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells by defined factors. *Nature* 475: 390-393.
- Serov, O. L., N. M. Matveeva and A. A. Khabarova, 2011 Reprogramming mediated by cell fusion technology. *Int Rev Cell Mol Biol* 291: 155-190.
- Sheng, C., Q. Zheng, J. Wu, Z. Xu, L. Sang *et al.*, 2012a Generation of dopaminergic neurons directly from mouse fibroblasts and fibroblast-derived neural progenitors. *Cell research* 22: 769.
- Sheng, C., Q. Zheng, J. Wu, Z. Xu, L. Wang *et al.*, 2012b Direct reprogramming of Sertoli cells into multipotent neural stem cells by defined factors. *Cell research* 22: 208-218.
- Shibata, Y., H. Takeshita, N. Sasakawa and H. Sawa, 2010 Double bromodomain protein BET-1 and MYST HATs establish and maintain stable cell fates in *C. elegans*. *Development* 137: 1045-1053.
- Shin, T., D. Kraemer, J. Pryor, L. Liu, J. Rugila *et al.*, 2002 A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature* 415: 859.
- Smith, A., 2006 A glossary for stem-cell biology. *Nature* 441: 1060-1060.
- Smorlesi, A., A. Frontini, A. Giordano and S. Cinti, 2012 The adipose organ: white-brown adipocyte plasticity and metabolic inflammation. *Obes Rev* 13 Suppl 2: 83-96.
- Son, E. Y., J. K. Ichida, B. J. Wainger, J. S. Toma, V. F. Rafuse *et al.*, 2011 Conversion of mouse and human fibroblasts into functional spinal motor neurons. *Cell stem cell* 9: 205-218.
- Song, K., Y. J. Nam, X. Luo, X. Qi, W. Tan *et al.*, 2012 Heart repair by reprogramming non-myocytes with cardiac transcription factors. *Nature* 485: 599-604.

- Song, N. N., J. B. Xiu, Y. Huang, J. Y. Chen, L. Zhang *et al.*, 2011 Adult raphe-specific deletion of *Lmx1b* leads to central serotonin deficiency. *PLoS One* 6: e15998.
- Soufi, A., G. Donahue and K. S. Zaret, 2012 Facilitators and impediments of the pluripotency reprogramming factors' initial engagement with the genome. *Cell* 151: 994-1004.
- Sprecher, S. G., and C. Desplan, 2008 Switch of rhodopsin expression in terminally differentiated *Drosophila* sensory neurons. *Nature* 454: 533-537.
- Steward, F. C., M. O. Mapes, A. E. Kent and R. D. Holsten, 1964 Growth and Development of Cultured Plant Cells. *Science* 143: 20-27.
- Sulston, J. E., and H. R. Horvitz, 1977 Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology* 56: 110-156.
- Sulston, J. E., E. Schierenberg, J. G. White and J. N. Thomson, 1983 The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology* 100: 64-119.
- Sumer, H., C. Nicholls, A. R. Pinto, D. Indraharan, J. Liu *et al.*, 2010 Chromosomal and telomeric reprogramming following ES-somatic cell fusion. *Chromosoma* 119: 167-176.
- Szabo, E., S. Rampalli, R. M. Risueno, A. Schnerch, R. Mitchell *et al.*, 2010 Direct conversion of human fibroblasts to multilineage blood progenitors. *Nature* 468: 521-526.
- Takahashi, K., K. Mitsui and S. Yamanaka, 2003 Role of ERas in promoting tumour-like properties in mouse embryonic stem cells. *Nature* 423: 541-545.
- Takahashi, K., and S. Yamanaka, 2006 Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663-676.
- Takeuchi, J. K., and B. G. Bruneau, 2009 Directed transdifferentiation of mouse mesoderm to heart tissue by defined factors. *Nature* 459: 708-711.
- Terada, N., T. Hamazaki, M. Oka, M. Hoki, D. M. Mastalerz *et al.*, 2002 Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 416: 542-545.
- Theise, N. D., M. Nimmakayalu, R. Gardner, P. B. Illei, G. Morgan *et al.*, 2000 Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 32: 11-16.
- Thier, M., P. Wörsdörfer, Y. B. Lakes, R. Gorris, S. Herms *et al.*, 2012 Direct conversion of fibroblasts into stably expandable neural stem cells. *Cell stem cell* 10: 473-479.
- Thomas, D. M., S. A. Carty, D. M. Piscopo, J.-S. Lee, W.-F. Wang *et al.*, 2001 The retinoblastoma protein acts as a transcriptional coactivator required for osteogenic differentiation. *Molecular cell* 8: 303-316.
- Tian, C., Y. Li, Y. Huang, Y. Wang, D. Chen *et al.*, 2015 Selective generation of dopaminergic precursors from mouse fibroblasts by direct lineage conversion. *Scientific reports* 5.
- Torper, O., U. Pfisterer, D. A. Wolf, M. Pereira, S. Lau *et al.*, 2013 Generation of induced neurons via direct conversion in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110: 7038-7043.
- Tsonis, P. A., M. Madhavan, E. E. Tancous and K. Del Rio-Tsonis, 2004 A newt's eye view of lens regeneration. *Int J Dev Biol* 48: 975-980.
- Tursun, B., T. Patel, P. Kratsios and O. Hobert, 2011 Direct conversion of *C. elegans* germ cells into specific neuron types. *Science* 331: 304-308.
- Uchida, O., H. Nakano, M. Koga and Y. Ohshima, 2003 The *C. elegans* *che-1* gene encodes a zinc finger transcription factor required for specification of the ASE chemosensory neurons. *Development* 130: 1215-1224.

- Uhlenhaut, N. H., S. Jakob, K. Anlag, T. Eisenberger, R. Sekido *et al.*, 2009 Somatic sex reprogramming of adult ovaries to testes by FOXL2 ablation. *Cell* 139: 1130-1142.
- Unhavaithaya, Y., T. H. Shin, N. Miliaras, J. Lee, T. Oyama *et al.*, 2002 MEP-1 and a homolog of the NURD complex component Mi-2 act together to maintain germline-soma distinctions in *C. elegans*. *Cell* 111: 991-1002.
- Victor, M., Y. Bei, F. Gay, D. Calvo, C. Mello *et al.*, 2002 HAT activity is essential for CBP - 1 - dependent transcription and differentiation in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO reports* 3: 50-55.
- Victor, M. B., M. Richner, T. O. Hermansteyne, J. L. Ransdell, C. Sobieski *et al.*, 2014 Generation of human striatal neurons by microRNA-dependent direct conversion of fibroblasts. *Neuron* 84: 311-323.
- Vidali, G., E. L. Gershey and V. G. Allfrey, 1968 Chemical studies of histone acetylation. The distribution of epsilon-N-acetyllysine in calf thymus histones. *J Biol Chem* 243: 6361-6366.
- Vierbuchen, T., A. Ostermeier, Z. P. Pang, Y. Kokubu, T. C. Sudhof *et al.*, 2010 Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 463: 1035-1041.
- Wada, R., N. Muraoka, K. Inagawa, H. Yamakawa, K. Miyamoto *et al.*, 2013 Induction of human cardiomyocyte-like cells from fibroblasts by defined factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110: 12667-12672.
- Waddington, C. H., 1957 *The strategy of the genes. A discussion of some aspects of theoretical biology. With an appendix by H. Kacser. The strategy of the genes. A discussion of some aspects of theoretical biology. With an appendix by H. Kacser.:* ix+-262.
- Wakayama, T., A. C. Perry, M. Zuccotti, K. R. Johnson and R. Yanagimachi, 1998 Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 394: 369-374.
- Wang, C., H. Fong and Y. Huang, 2015 Direct Reprogramming of RESTing Astrocytes. *Cell stem cell* 17: 1-3.
- Wang, D., S. Kennedy, D. Conte, J. K. Kim, H. W. Gabel *et al.*, 2005 Somatic misexpression of germline P granules and enhanced RNA interference in retinoblastoma pathway mutants. *Nature* 436: 593-597.
- Wang, X., H. Willenbring, Y. Akkari, Y. Torimaru, M. Foster *et al.*, 2003 Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 422: 897-901.
- Wapinski, O. L., T. Vierbuchen, K. Qu, Q. Y. Lee, S. Chanda *et al.*, 2013 Hierarchical mechanisms for direct reprogramming of fibroblasts to neurons. *Cell* 155: 621-635.
- Weintraub, H., S. J. Tapscott, R. L. Davis, M. J. Thayer, M. A. Adam *et al.*, 1989 Activation of muscle-specific genes in pigment, nerve, fat, liver, and fibroblast cell lines by forced expression of MyoD. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 5434-5438.
- Weismann, A., 1892 *Das Keimplasma; eine Theorie der Vererbung*. Fischer.
- Wenick, A. S., and O. Hobert, 2004 Genomic cis-regulatory architecture and trans-acting regulators of a single interneuron-specific gene battery in *C. elegans*. *Dev Cell* 6: 757-770.
- White, J. G., E. Southgate, J. N. Thomson and S. Brenner, 1986 The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*: the mind of a worm. *Phil. Trans. R. Soc. Lond* 314: 1-340.

- Wilmut, I., A. E. Schnieke, J. McWhir, A. J. Kind and K. H. Campbell, 1997 Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385: 810-813.
- Wolff, G., 1895 Entwicklungsphysiologische Studien. I. Regeneration der Urodelenlinse. *Wilhelm Roux Arch Entwickl-Mech Org* 1:380-390.
- Xie, H., M. Ye, R. Feng and T. Graf, 2004 Stepwise reprogramming of B cells into macrophages. *Cell* 117: 663-676.
- Xie, W., M. D. Schultz, R. Lister, Z. Hou, N. Rajagopal *et al.*, 2013 Epigenomic analysis of multilineage differentiation of human embryonic stem cells. *Cell* 153: 1134-1148.
- Xu, J., Y. Du and H. Deng, 2015 Direct lineage reprogramming: strategies, mechanisms, and applications. *Cell Stem Cell* 16: 119-134.
- Xu, X., and S. K. Kim, 2012 The GATA transcription factor *egl-27* delays aging by promoting stress resistance in *Caenorhabditis elegans*.
- Xue, Y., K. Ouyang, J. Huang, Y. Zhou, H. Ouyang *et al.*, 2013 Direct conversion of fibroblasts to neurons by reprogramming PTB-regulated microRNA circuits. *Cell* 152: 82-96.
- Yamanaka, S., and H. M. Blau, 2010 Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature* 465: 704-712.
- Yang, N., J. B. Zuchero, H. Ahlenius, S. Marro, Y. H. Ng *et al.*, 2013 Generation of oligodendroglial cells by direct lineage conversion. *Nature biotechnology* 31: 434-439.
- Yang, R., Y. Zheng, L. Li, S. Liu, M. Burrows *et al.*, 2014a Direct conversion of mouse and human fibroblasts to functional melanocytes by defined factors. *Nature communications* 5.
- Yang, R., Y. Zheng, L. Li, S. Liu, M. Burrows *et al.*, 2014b Direct conversion of mouse and human fibroblasts to functional melanocytes by defined factors. *Nat Commun* 5: 5807.
- Yang, X., S. L. Smith, X. C. Tian, H. A. Lewin, J.-P. Renard *et al.*, 2007 Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. *Nature genetics* 39: 295-302.
- Yang, Y., J. Jiao, R. Gao, R. Le, X. Kou *et al.*, 2015 Enhanced Rejuvenation in Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neurons Compared with Directly Converted Neurons from an Aged Mouse. *Stem Cells Dev* 24: 2767-2777.
- Yeboor, V., V. Liu, C. Espiritu, A. Paul, K. Oka *et al.*, 2009 Neurogenin3 is sufficient for transdetermination of hepatic progenitor cells into neo-islets in vivo but not transdifferentiation of hepatocytes. *Developmental cell* 16: 358-373.
- Yoo, A. S., A. X. Sun, L. Li, A. Shcheglovitov, T. Portmann *et al.*, 2011 MicroRNA-mediated conversion of human fibroblasts to neurons. *Nature* 476: 228-231.
- Yoshii, C., Y. Ueda, M. Okamoto and M. Araki, 2007 Neural retinal regeneration in the anuran amphibian *Xenopus laevis* post-metamorphosis: transdifferentiation of retinal pigmented epithelium regenerates the neural retina. *Developmental biology* 303: 45-56.
- Yu, B., Z.-Y. He, P. You, Q.-W. Han, D. Xiang *et al.*, 2013 Reprogramming fibroblasts into bipotential hepatic stem cells by defined factors. *Cell stem cell* 13: 328-340.
- Yu, J., M. A. Vodyanik, K. Smuga-Otto, J. Antosiewicz-Bourget, J. L. Frane *et al.*, 2007 Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318: 1917-1920.
- Zaret, K. S., and J. S. Carroll, 2011 Pioneer transcription factors: establishing competence for gene expression. *Genes Dev* 25: 2227-2241.

- Zhang, K., G.-H. Liu, F. Yi, N. Montserrat, T. Hishida *et al.*, 2014 Direct conversion of human fibroblasts into retinal pigment epithelium-like cells by defined factors. *Protein & cell* 5: 48-58.
- Zhang, M., M. Poplawski, K. Yen, H. Cheng, E. Bloss *et al.*, 2009 Role of CBP and SATB-1 in aging, dietary restriction, and insulin-like signaling. *PLoS biology* 7: 2484.
- Zhang, Q., H. Fan, J. Shen, R. M. Hoffman and H. R. Xing, 2010 Human breast cancer cell lines co-express neuronal, epithelial, and melanocytic differentiation markers in vitro and in vivo. *PLoS One* 5: e9712.
- Zhang, R., P. Han, H. Yang, K. Ouyang, D. Lee *et al.*, 2013 In vivo cardiac reprogramming contributes to zebrafish heart regeneration. *Nature* 498: 497-501.
- Zhao, S., S. C. Thornquist and C. J. Barnstable, 1995 In vitro transdifferentiation of embryonic rat retinal pigment epithelium to neural retina. *Brain research* 677: 300-310.
- Zhao, X. Y., W. Li, Z. Lv, L. Liu, M. Tong *et al.*, 2009 iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature* 461: 86-90.
- Zhou, C., H. Gu, R. Fan, B. Wang and J. Lou, 2015 MicroRNA 302/367 Cluster Effectively Facilitates Direct Reprogramming from Human Fibroblasts into Functional Neurons. *Stem cells and development* 24: 2746-2755.
- Zhou, Q., J. Brown, A. Kanarek, J. Rajagopal and D. A. Melton, 2008 In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature* 455: 627-632.
- Zhou, Q., J. P. Renard, G. Le Friec, V. Brochard, N. Beaujean *et al.*, 2003 Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation. *Science* 302: 1179.
- Zhu, J., M. Adli, J. Y. Zou, G. Verstappen, M. Coyne *et al.*, 2013 Genome-wide chromatin state transitions associated with developmental and environmental cues. *Cell* 152: 642-654.
- Zhu, J., T. Fukushige, J. D. McGhee and J. H. Rothman, 1998 Reprogramming of early embryonic blastomeres into endodermal progenitors by a *Caenorhabditis elegans* GATA factor. *Genes & development* 12: 3809-3814.
- Zuryn, S., A. Ahier, M. Portoso, E. R. White, M. C. Morin *et al.*, 2014 Transdifferentiation. Sequential histone-modifying activities determine the robustness of transdifferentiation. *Science* 345: 826-829.
- Zuryn, S., S. Le Gras, K. Jamet and S. Jarriault, 2010 A strategy for direct mapping and identification of mutations by whole-genome sequencing. *Genetics* 186: 427-430.

Mise en évidence de nouveaux acteurs de la transdifférenciation naturelle : implication pour le maintien de l'identité cellulaire et impact de l'environnement.

Résumé

Les cellules différenciées peuvent être reprogrammées et adopter un destin cellulaire très différent. Connaître les acteurs et mécanismes qui contrôlent les processus de reprogrammation est un objectif scientifique fascinant qui éclairera notre compréhension du contrôle et du maintien de l'identité cellulaire. Notre laboratoire étudie le changement d'identité (ou transdifférenciation, TD) naturel d'une cellule épithéliale rectale (nommée Y) en motoneurone (nommé PDA) chez *Caenorhabditis elegans*.

Dans les vers mutants pour le gène *lin-15A* (gène isolé dans un crible génétique du laboratoire), la cellule Y n'initie pas sa reprogrammation : Y demeure rectale. Cette protéine apparaît dans le noyau de Y juste avant le début de la TD de Y et joue un rôle clé dans l'initiation de ce processus. LIN-15A lie l'ADN et son domaine conservé en doigt de zinc (de type THAP-like) est essentiel pour initier la reprogrammation de Y. Nous nous sommes attachés à mieux comprendre le rôle de LIN-15A dans ce processus.

L'inactivation de certains gènes (impliqués dans le maintien de l'identité cellulaire) permet de supprimer partiellement ou très fortement le défaut de reprogrammation de Y causé par la mutation *lin-15A*. Ces gènes appartiennent au groupe appelé synMuv B et ceux induisant la plus forte suppression du phénotype de *lin-15A* sont tous liés à la voie du rétinoblastome (RB). Dans la littérature, tous les mutants suppresseurs de défaut de PDA existant dans le mutant *lin-15A* présentaient une dérive de l'identité des cellules intestinales.

Certains mutants de voies de réponse au jeûne chez le ver présentent également une perte du maintien de l'identité des cellules intestinales très similaire à celle induite par l'inactivation de certains gènes synMuv B. De façon très intéressante, nous avons pu observer que les vers mutants *lin-15A* présentent une pénétrance du défaut de PDA bien plus faible une fois privés de nourriture (au 1^{er} stade larvaire ou au stade dauer). Certaines études laissent supposer que ces diapauses suite au jeûne entraînent une perte du maintien de l'identité cellulaire de cellules somatiques (et possiblement dans l'intestin), ce qui pourrait permettre à Y d'enclencher sa reprogrammation malgré l'absence de *lin-15A*, facteur clé à la levée du verrou pour initier la TD.

En résumé, mes résultats ont montré que la transdifférenciation d'une cellule dépendait d'une clé moléculaire, LIN-15A, nécessaire pour lever un verrou de maintien de l'identité cellulaire dans la cellule qui va changer d'identité, et ce précisément juste avant la conversion cellulaire de Y en PDA. De façon plus générale, mes travaux ouvrent la possibilité que l'état physiologique et métabolique du ver influe sur le maintien de l'identité cellulaire. Sur le long terme, il conviendra alors de déterminer par quel biais cet état est perçu, dans quelles cellules, et comment cette information est relayée ou captée par la cellule Y, pour finalement influencer sa plasticité.

Résumé en anglais

Differentiated cells can be reprogrammed to adopt a different cell identity. The discovery of factors and mechanisms controlling cellular reprogramming is a fascinating scientific goal that will shed light on the mechanisms controlling cell identity maintenance. Our laboratory studies the natural identity switch (or transdifferentiation, TD) of an epithelial rectal cell (called Y) into a motor neuron (called PDA) in *Caenorhabditis elegans*.

In worm mutants for the gene *lin-15A* (isolated in a genetic screen performed in the laboratory), the Y cell does not initiate the Y reprogramming : Y stays rectal. This protein appears in the Y nucleus just before the beginning of the Y TD and plays a key role in the process initiation. LIN-15A binds DNA and its zinc finger domain (THAP-like) is essential for the initiation of Y reprogramming.

Inactivation of some genes that are involved in cell identity maintenance allow a partial or strong suppression of the Y reprogramming defect due to *lin-15A* mutation. These genes belong to a group called synMuv B and those inducing the strongest *lin-15A* phenotype suppression are all linked to the retinoblastoma (RB) pathway. In the literature, all the mutants that are PDA defect suppressors in *lin-15A* mutant show a switch of intestinal cell identity.

Some mutants in starvation-response genes in worms show a loss of intestinal cell identity maintenance very similar to the one observed in synMuv B mutants. Interestingly, we observed that starvation (in 1st larval stage or dauer stage) induces a strong drop of the PDA defect in *lin-15A* mutant. Different studies suggest diapause induced by starvation trigger a loss of somatic cell identity maintenance (and possibly in intestinal cells), that could allow Y to start the reprogramming despite the lack of *lin-15A*, even it is a key factor to release a break and initiate the TD.

In summary, my results show the cell transdifferentiation depends on a molecular key, LIN-15A, that is needed, just prior to TD initiation, to release a cell maintenance lock to allow a cell to undergo cell identity switch. My work opens the possibility that the worm physiologic and metabolic state influences cell identity maintenance. In the future, how this state is perceived has to be determined, in which cells and how this information is transmitted to Y to finally influence its plasticity.