



**HAL**  
open science

# Etudes de nouveaux paramètres environnementaux sur la plasticité des cellules souches embryonnaires murines (mESC)

Aya Abou Hammoud

► **To cite this version:**

Aya Abou Hammoud. Etudes de nouveaux paramètres environnementaux sur la plasticité des cellules souches embryonnaires murines (mESC). Immunologie. Université de Bordeaux; Université Libanaise, 2015. Français. NNT : 2015BORD0169 . tel-01424137

**HAL Id: tel-01424137**

**<https://theses.hal.science/tel-01424137>**

Submitted on 2 Jan 2017

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

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

THÈSE EN COTUTELLE PRÉSENTÉE  
POUR OBTENIR LE GRADE DE  
**DOCTEUR DE**  
**L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**  
**ET DE L'UNIVERSITÉ LIBANAISE**

ÉCOLE DOCTORALE UBX  
ÉCOLE DOCTORALE DU LIBAN  
SPÉCIALITÉ : BIOLOGIE CELLULAIRE ET PHYSIOPHATOLOGIE

Par Aya ABOU HAMMOUD

**ETUDES DE NOUVEAUX PARAMETRES  
ENVIRONNEMENTAUX SUR LA  
PLASTICITE DES CELLULES SOUCHES  
EMBRYONNAIRES MURINES**

Sous la direction de Dr. Héléne BOEUF  
et de Pr. Mohamad MORTADA

Soutenu le 17 Décembre 2015

Membres du Jury

<b>M. Fabrice Lalloué</b> , Professeur, EA3842, Faculté de médecine Limoges	Président
<b>M. John de Vos</b> , Docteur, Ingénierie cellulaire et tissulaire, Université de Montpellier	Rapporteur
<b>M. Wissam Faour</b> , Professeur, Faculté de médecine, Lebanese American University	Rapporteur
<b>M. Bassam Badran</b> , Docteur, PRASE, Université Libanaise	Examineur
<b>M. Mohamad Mortada</b> , Professeur, Lab d'immunologie, Université Libanaise	Directeur
<b>Mme. Héléne Boeuf</b> , Docteur, UMR-CNRS-5164-CIRID, Université de Bordeaux	Directrice

*« No progress through improving what is already done, but striving to achieve what remains to be done »*

Gibran Khalil Gibran

# **Titre: Etudes de nouveaux paramètres environnementaux sur la plasticité des cellules souches embryonnaires murines (mESC)**

**Résumé:** Les cellules souches embryonnaires (ESCs) sont dérivées d'embryons au stade blastocyste. Elles sont caractérisées par la capacité de se diviser et de maintenir un phénotype indifférencié et en présence de stimuli, de se différencier en cellules spécialisées dérivées des trois feuillets embryonnaires, c'est la pluripotence. Elles sont un outil puissant pour modéliser des maladies génétiques à des fins de découvertes en recherche fondamentale et aussi dans un but d'applications cliniques.

Les mESCs sont maintenues pluripotentes *in vitro* en présence de LIF (Leukemia Inhibitor Factor), une cytokine de la famille des Interleukines 6 (IL6) présentant des effets pléiotropes en fonction du type et de la maturité cellulaire. Le retrait de LIF conduit à la différenciation hétérogène des mESCs dont une partie meurt par apoptose. Lors du retrait de LIF, les cellules entrent séquentiellement dans des phases d'engagement réversible (jusqu'à 36h après retrait du LIF) et irréversible, au cours desquelles la re-stimulation par le LIF induit des effets différents. Afin de mieux caractériser cet effet de LIF, nous avons mis au point un « test de plasticité » *in vitro* et avons étudié l'impact de paramètres environnementaux qui pourraient moduler cette plasticité dans les mESCs. Nous avons montré que la MMP1 (Matrix Metalloproteinase 1), qui peut remplacer le LIF dans le maintien de la pluripotence, est moins efficace pour le maintien de la plasticité cellulaire des mESCs. Nous avons aussi montré que les mESCs restent pluripotentes et plastiques à 3% d'O<sub>2</sub>, *in vitro*, et qu'elles se caractérisent par un nouvel équilibre d'expression des gènes et des protéines en comparaison à 20% d'O<sub>2</sub>.

**Mots clés:** mESCs; plasticité cellulaire; paramètres environnementaux.

---

## **Title: Studies of new environmental parameters on murine embryonic stem cell plasticity**

**Abstract :** Embryonic Stem Cells (ESCs) are derived from embryo at the blastocyst stage. These cells are characterized by their properties of self-renewal and pluripotency: ability to divide and maintain an undifferentiated phenotype and to differentiate into specialised cells of the three primary germ layers in the presence of stimuli. ESCs are a powerful tool to modelize genetic diseases for fundamental research and clinical applications.

Mouse Embryonic Stem Cells (mESCs) are maintained pluripotent *in vitro* in the presence of Leukemia Inhibitory Factor (LIF), an Interleukin 6 (IL6) cytokine family member which displays pleiotropic functions, depending on both maturity and type of cells. LIF withdrawal leads to heterogeneous differentiation of mESCs and part of the differentiated cells die by apoptosis. During the kinetics of LIF withdrawal, we show that cells enter a LIF-dependent reversible (up to 36h of LIF withdrawal) and irreversible phase of differentiation in which LIF-restimulation induces differential effects. To better characterize this period and LIF-dependent processes, we set up an *in vitro* « plasticity test » and investigated the impact of environmental parameters that could regulate cell plasticity in mESCs. Our results reveal that the Matrix Metalloproteinase 1 (MMP1), which can replace LIF cytokine for maintenance of mESCs pluripotency, mimics its effects in the plasticity window, but with less efficiency. In addition, we demonstrate that mESCs maintain plasticity and pluripotency potentials *in vitro*, under 3% O<sub>2</sub> (physioxic condition) with a new equilibrium of gene and protein expression levels compared to 20% O<sub>2</sub>.

**Key words:** mESCs; cell plasticity; environmental parameters.

---

### **Unité de recherche**

[Composantes Innées de la Réponse immunitaire et Différenciation, UMR-CNRS-5164, 146 Rue léo saignat 33076 BORDEAUX CEDEX]

## DEDICACES

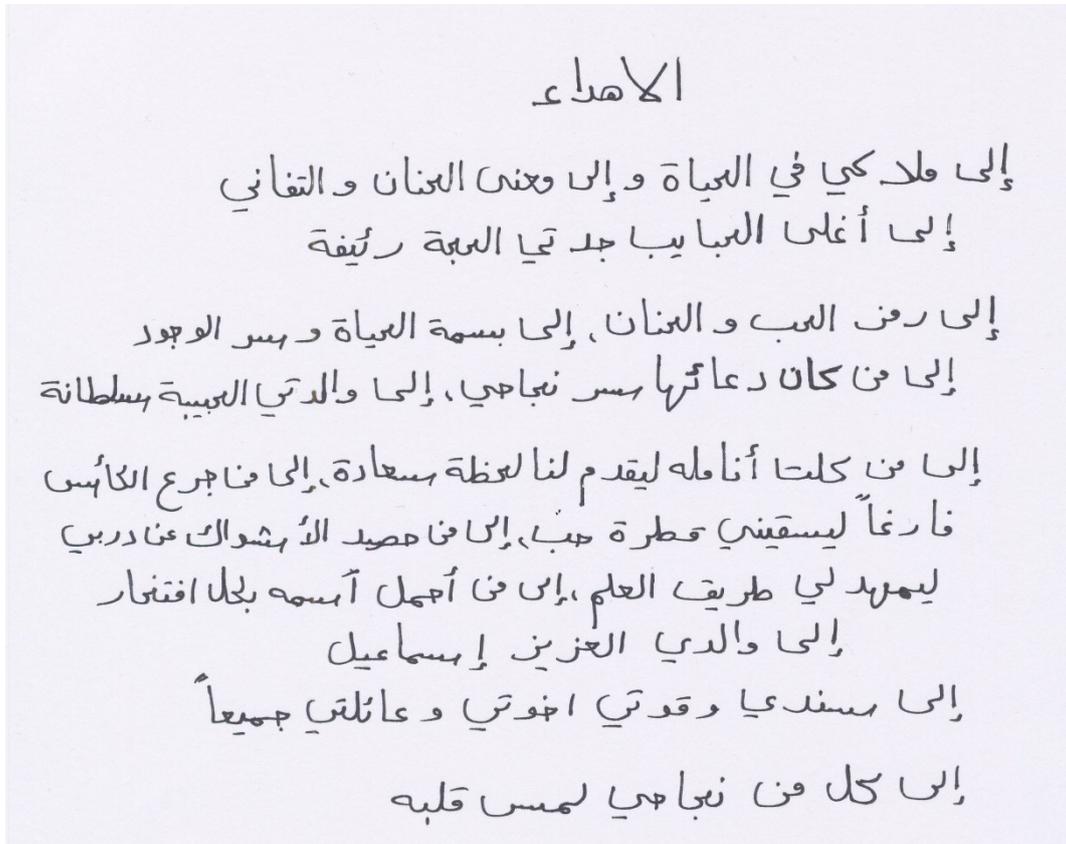
*Afin d'être reconnaissante envers ceux qui m'ont appuyée et encouragée à effectuer ce travail de recherche, je dédie ce mémoire :*

*À ma très chère grand-mère Hajeh Raïfeh pour son soutien moral, et pour tous les sentiments d'affection et d'amour.*

*À ma très chère mère Sultana et à mon très cher père Ismail qui n'ont cessé de me combler par leur soutien, leur amour et leur tendresse qui représentent pour moi le pilier de tous mes efforts.*

*À tous les membres de ma famille.*

*Et à tous ceux que ma réussite tient à coeur.*



# REMERCIEMENTS

Cette thèse de Doctorat a été réalisée dans le cadre d'une convention de cotutelle entre l'école doctorale des Sciences et Technologie (EDST) de l'université Libanaise et l'école doctorale de l'université de Bordeaux.

Par ces quelques lignes, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin au bon déroulement de cette thèse, en espérant n'avoir oublié personne...

Je tiens à remercier tout particulièrement ma directrice de thèse française Dr. **Hélène Boeuf** (responsable du groupe Cellules Souches au sein de l'unité CNRS-UMR-5164-CIRID) d'avoir bien assuré la direction et l'encadrement de mes travaux de thèse. Merci pour votre gentillesse, votre patience et vos précieux conseils. J'ai beaucoup apprécié travailler à vos côtés tant sur le plan scientifique que sur le plan humain. Je garde toujours beaucoup de plaisir à discuter avec vous et à bénéficier de vos conseils.

Je tiens à remercier spécialement mon directeur de thèse libanais Pr. **Mohamad Mortada** (Laboratoire d'immunologie Moléculaire et signalisation cellulaire à l'université Libanaise) d'avoir cru en mes capacités, pour le temps et la patience que vous m'avez accordés tout au long de ces années en me fournissant d'excellentes conditions logistiques. Je garderai dans mon coeur votre générosité, votre compréhension et votre efficacité. Pour tout ce que vous m'avez donné, je vous remercie très sincèrement.

Je tiens à remercier ma co-directrice de thèse libanaise Dr. **Dana Zeineddine** à qui j'adresse mes remerciements les plus sincères pour sa disponibilité, ses aides, ses conseils et ses encouragements.

Je tiens à remercier Mr. le professeur **Jean-François Moreau** pour m'avoir accueillie au sein de son unité.

Je remercie les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse:

M. le professeur **Fabrice Lalloué** (EA3842, Homeostasie Cellulaire et Pathologies) de la faculté de médecine-Limoges pour avoir accepté de présider ce jury.

M. le Professeur **Wissam Faour** de la faculté de médecine-Lebanese American University (LAU) et M. le docteur **John de Vos** (Département d'ingénierie cellulaire et tissulaire) de l'université de Montpellier pour m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs de ce travail.

M. le docteur **Bassam Badran** (PRASE, Plateforme de Recherche et d'Analyse en Sciences de l'Environnement) de l'université Libanaise pour m'avoir fait l'honneur d'être examinateur de

ce travail. Je vous remercie pour votre générosité et vos qualités humaines. Je vous adresse mes sentiments les plus respectueux.

Je remercie très chaleureusement Dr.**Wassim Abou Kheir** (Faculté de médecine à l'American University of Beirut-AUB) pour son soutien, ses aides, ses précieux conseils, sa générosité et ses qualités humaines. Un grand merci aux membres de son équipe: **Rabih, Alissar, Loyal et Ola**.

Je tiens à remercier également les **membres de la plateforme PRASE** surtout Dr. **Nabil el Zein et Zeinab** pour leurs aides et leurs soutiens.

Je remercie aussi vivement la **Fondation HARIRI**, Beyrouth, qui m'a accordé une bourse de Doctorante pour les travaux réalisés en France.

Je tiens également à remercier tous les membres de l'équipe de Mr. **Pierre Thiebaud**. Merci à **Pierre** pour ses précieux conseils et sa sympathie. Un très grand merci à **Sandrine**, ma meilleure amie, pour sa bonne humeur communicative, sa gentillesse, son soutien moral et tous ses encouragements. Un très grand merci aussi à **Corinne** pour sa disponibilité, ses aides, son soutien et sa gentillesse. Par ailleurs, Je n'oublierai pas nos discussions scientifiques, ses remarques pertinentes et ses précieux conseils. Sans oublier **Philippe et Karine** pour leur soutien. Je remercie aussi mes chères amies: **Alice, Emilie et Hélène** pour leur présence agréable, leur soutien et leur aide.

Je remercie **Xavier** pour ses conseils, son aide technique ponctuelle, sa disponibilité et pour toutes nos discussions animées partagées au cours de ma thèse.

Je remercie **Camille** pour son aide, sa disponibilité et ses encouragements et **Marine** pour son aide et sa gentillesse.

Je tiens également à remercier les membres de l'équipe de Mr. **Vincent praloran**, notamment **Arnaud** pour sa disponibilité, sa gentillesse et ses conseils avisés.

Je remercie **Vincent et Santiago** pour leur aide en cytométrie et **Sophie** pour ses aides et ses conseils en biochimie.

Je remercie aussi **Annie** pour son soutien administratif et **Aurélien** pour ses aides et ses encouragements illimités. Je n'oublierai pas nos bons moments durant les pauses déjeuners avec Sandrine.

J'adresse également tous mes remerciements aux **membres du laboratoire** avec qui j'ai interagis lors de cette thèse pour l'atmosphère agréable qu'ils contribuent à maintenir au sein de l'unité CNRS-UMR-5164-CIRID.

Un très grand merci à mes **amis de Bordeaux**: Osman, Faten, Montaha, Karim, Najwa, Mohamad-Ali, Liliane, Bourak, Layal, Hussein, Hasan, Maria, Ahmad et Haytham. Merci aussi pour mes **amis de Nantes**: Diana, Dalia, Nadine, Farah, Joanna, Ali A, Ali R, Ali G, Ali A, Nader, Ghassan, Alaa, Ahmad, Jaafar, Houssam et Sary pour leur aide et leur soutien avec mes meilleurs souhaits de réussite pour leur vie professionnelle et personnelle.

# Tables des matières

<b>Tables des matières</b> .....	<b>7</b>
<b>Sommaire</b> .....	<b>12</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>16</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>21</b>
<b>I. Généralités</b> .....	<b>21</b>
<b>II. La cellule Souche</b> .....	<b>24</b>
A. Historique .....	24
B. Qu'est-ce qu'une Cellule souche ? .....	25
1. Les cellules souches totipotentes .....	26
2. Les cellules souches pluripotentes .....	27
3. Les cellules souches multipotentes .....	27
4. Les cellules souches unipotentes .....	28
C. Le microenvironnement des cellules souches .....	29
1. Qu'est-ce qu'une niche ? .....	29
2. Fonctions et compositions.....	29
D. Les cellules souches « pathologiques » .....	31
E. Les cellules souches pluripotentes.....	34
1. Les différents types de cellules souches pluripotentes .....	34
1.1. Les Cellules Souches Embryonnaires (ESCs).....	34
1.1.1 Les tératocarcinomes ou cellules de Carcinomes Embryonnaires (ECs)....	34
1.1.2 Les Cellules Souches Embryonnaires murines (mESCs) .....	35
i Caractéristiques des mESCs .....	37
ii Mise en évidence de la pluripotence dans les ES murines : in vitro et in vivo	38
iii Culture in vitro des mECSs: capacité d'auto-renouvellement.....	39
1.1.3 Les ESCs dans le modèle humain (hESCs) .....	42
i Caractéristiques des hESCs.....	42
ii Culture in vitro des hECSs: maintien de l'auto-renouvellement.....	43
1.1.4 Les Cellules Souches Epiblastiques dans le modèle murin (mEpiSCs) .....	44
i Caractéristiques des mEpiSCs .....	44
ii Culture in vitro des mEpiSCs: maintien de l'auto-renouvellement.....	45
1.1.5 Les Cellules Souches embryonnaires germinales (EGC) et PGCs .....	45
1.2. Les Cellules souches pluripotentes induites (iPSCs).....	46
2. Les différents états de pluripotence .....	47

2.1.	Etat fondamental ou état ground de la pluripotence .....	48
2.2.	Etat naïf de la pluripotence .....	50
2.2.1	Origine et établissement de l'état naïf de la pluripotence .....	50
2.2.2	Etat naïf de la pluripotence, un état métastable et hétérogène .....	51
2.2.3	Plasticité et hétérogénéité de l'état naïf.....	54
2.3.	Etat engagé ou primed de la pluripotence .....	57
2.4.	Caractérisation intrinsèque des états naïfs et primed de la pluripotence .....	58
2.4.1	Le noyau de la pluripotence .....	59
i.	OCT4 .....	59
ii.	SOX2.....	60
iii.	NANOG .....	60
2.4.2	Le réseau de la pluripotence naïve.....	61
i.	KLF2, KLF4 et KLF5 .....	61
ii.	SALL4.....	62
iii.	GBX2.....	63
iv.	ESRR $\beta$ .....	63
2.4.3	Les marqueurs de l'état primed de la pluripotence.....	64
2.5.	Caractéristiques extrinsèques des états naïf et primed de la pluripotence.....	64
2.5.1	Les voies de signalisation induites par le LIF.....	64
i.	Voie JAK1/STAT3/SOCS3 .....	65
ii.	Voie SHP2/RAS/MAPK.....	66
iii.	Voie PI3K.....	66
2.5.2	Synergie avec la voie LIF .....	69
i.	La voie BMP4.....	69
ii.	La voie WNT .....	69
2.6.	Caractéristiques fonctionnelles des états naïf et primed de la pluripotence ...	70
2.7.	Caractéristiques métaboliques des états naïf et primed de la pluripotence ....	71
2.8.	L'état intermédiaire de la pluripotence.....	72
2.8.1	Isolement des IESC .....	72
2.8.2	Les caractéristiques moléculaires .....	73
2.8.3	Les caractéristiques fonctionnelles .....	73
2.9.2	La plasticité cellulaire: Balance entre les mESCs naïves et les EpiSCs primed .....	75
2.9.1	La Conversion : état naïf vers état primed (ICM/mESCs vers EpiSCs) .	75

2.9.2 La Réversion: état primed vers état naïf (Epiblaste/EpiSCs vers mESCs)	77
<b>III. Le LIF: Leukemia Inhibitor Factor</b>	<b>78</b>
A. Historique et Généralités	78
1. Historique	78
2. Généralités sur le LIF	79
B. LIF et son récepteur : gp130 et gp190	80
C. La signalisation LIF	81
D. LIF et le développement embryonnaire	83
E. LIF et les ESCs	83
<b>IV. La MMP1 (Matrix MetalloProteinase 1)</b>	<b>87</b>
A. Généralités	87
B. MMP1 et les ESCs	89
<b>V. Hypoxie</b>	<b>90</b>
A. Généralités	90
B. Le complexe HIF	91
C. Mécanisme de régulation de HIF1 $\alpha$ par l'oxygène	93
E. Les cibles de l'hypoxie	95
F. Hypoxie et les ESCs	95
<b>VI. Quelles sont les applications de la recherche sur les cellules souches (SCs)?</b>	<b>97</b>
A. Intérêts pour la recherche fondamentale	97
B. Intérêts pour le domaine de la santé	98
<b>VII. Objectifs de travail</b>	<b>99</b>
<b>MATERIELS ET METHODES</b>	<b>100</b>
<b>I. Culture cellulaire</b>	<b>100</b>
A. Entretien des cellules	100
B. Traitement des mESCs avec U0126, SU5402 et CHIR99021	100
C. Mise en évidence de la Phosphatase Alcaline (AP)	102
D. Analyse de la prolifération	102
E. Test de la pluripotence : Capacité de différenciation in vitro en Corps Embryoïdes (EBs)	103
F. Transfection cellulaire	103
<b>II. RT-qPCR</b>	<b>104</b>
A. Extraction d'ARN	104

B. Transcriptase inverse (RT) .....	104
C. Real Time Quantitative PCR (qPCR).....	105
<b>III. Western Blot (WB).....</b>	<b>107</b>
<b>IV. Analyse de la fluorescence par cytométrie en flux .....</b>	<b>108</b>
<b>RESULTATS.....</b>	<b>110</b>
<b>I. Mise en place du Test de « plasticité cellulaire ».....</b>	<b>110</b>
A. La mise au point du « Test de plasticité cellulaire » .....	110
B. Caractérisation des phases du « Test de plasticité cellulaire ».....	111
<b>II. « Test de Plasticité » effectué sur mESCs et miPSCs en parallèle.....</b>	<b>113</b>
A. Différences entre mESCs et miPSCs dans le test de plasticité.....	113
<b>III. Impact des facteurs de l'environnement : MMP1 et Hypoxie sur la pluripotence et la plasticité des mESCs.....</b>	<b>115</b>
A. MMP1.....	115
1. Validation de MMP1 .....	115
2. Etude de l'impact de la combinaison LIF/MMP1 sur la pluripotence et plasticité des mESCs.....	118
B. Hypoxie .....	120
1. Analyse de l'expression de Hif1 $\alpha$ et de ses gènes cibles dans nos expériences à [3% O <sub>2</sub> ].....	120
2. Analyse morphologique des cellules cultivées à [3% O <sub>2</sub> ] et [20% O <sub>2</sub> ] pendant des périodes différentes .....	121
3. Ralentissement de prolifération des mESCs cultivées à [3% O <sub>2</sub> ].....	124
4. Atténuation de la voie de signalisation LIF ? .....	127
5. Mise en évidence d'un mécanisme à l'origine de l'Hétérogénéité des mESCs ?	129
<b>IV. Mise au point d'un outil de criblage par cytométrie de flux: Construction des vecteurs d'expression dans lesquels une forme de l'EGFP à demi-vie courte (d2EGFP) est sous le contrôle de promoteurs strictement sensible au LIF.....</b>	<b>134</b>
<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>139</b>
<b>I. Mise en place du « Test de plasticité cellulaire ».....</b>	<b>139</b>
A. Quel est l'intérêt de l'établissement du « Test de plasticité cellulaire » ?.....	139
B. <i>Klf5</i> est impliqué dans la régulation de la plasticité et PI3K favorise l'engagement des cellules vers la différenciation mésodermique .....	140
<b>II. « Test de Plasticité » effectué sur mESCs et miPSCs en parallèle.....</b>	<b>142</b>
Pourquoi comparer les iPSCs aux ESCs? .....	142

<b>III. Etudier l'impact des facteurs de l'environnement : MMP1 et Hypoxie sur la pluripotence et la plasticité des mESCs.....</b>	<b>142</b>
A. MMP1 .....	142
B. Hypoxie .....	143
C. Existe-il un lien MMP1/Hypoxie dans les mESCs?.....	147
<b>CONCLUSION GENERALE .....</b>	<b>148</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>149</b>
<b>ANNEXE .....</b>	<b>175</b>

# Sommaire

## INTRODUCTION

**Figure 1:** Chronologie du développement embryonnaire précoce.

**Figure 2:** Les différents types de cellules souches selon leurs capacités de différenciation.

**Figure 3:** Types et spécificités des niches des cellules souches (A) Composition de la niche (B).

**Figure 4:** Deux modèles hypothétiques de la transformation maligne.

**Figure 5:** Traitement ciblant les cellules souches cancéreuses (CSCs).

**Figure 6:** Les cellules souches embryonnaires (ESCs) d'origine ICM.

**Figure 7:** Les différents types de cellules souches (SCs).

**Figure 8:** Etablissement de lignées de cellules iPSCs.

**Figure 9:** Schéma simplifié de diverses cascades de signalisation qui renforcent ou antagonisent l'état « ground » de Pluripotence (milieu 2i+LIF).

**Figure 10:** L'état naïf de pluripotence est un état métastable et hétérogène.

**Figure 11:** Voies de signalisation activées en (A) sérum/LIF+BMP4 ou (B) en 2i.

**Figure 12:** Progression de l'état naïf des ESCs à l'état d'engagement en différenciation.

**Figure 13:** Le réseau régulateur de l'état naïf de pluripotence.

**Figure 14:** Cascade de signalisation de la voie LIF.

**Figure 15:** Voies de signalisation régulant les états naïf et primed de pluripotence.

**Figure 16:** Modèle de différents états de pluripotence et qui sont présents dans le développement de l'embryon de souris.

**Figure 17:** La signalisation LIF et son récepteur hétérodimérique.

**Figure 18:** Signalisation LIF.

**Figure 19:** LIF dans la reproduction.

**Tableau-1:** Exemple de fonctions physiologique (A) et pathologique (B) du LIF.

**Figure 20:** Structure en domaine de la famille métalloprotéinase matricielle (MMP).

**Figure 21:** Modèle représentant l'effet de remodelage de la matrice extracellulaire des mESCs par MMP1.

**Figure 22:** Répartition de faibles concentration d'oxygène durant l'embryogenèse (A) et dans divers compartiments de cellules souches (B).

**Figure 23:** Structure de HIF1 $\alpha$ .

**Figure 24:** HIF1 $\alpha$  entre Normoxie et Hypoxie.

## MATERIELS ET METHODES

**Figure 25:** Schéma représentant le mode d'action des 3 inhibiteurs (3i) sur les voies FGF/MAPK et WNT/ $\beta$ -Caténine ( $\beta$ -Cat) dans les mESCs.

**Figure 26:** Exemple de courbe de qPCR et calcul du pourcentage d'expression.

**Tableau-2:** Séquences d'amorces (5'-3') utilisées en qPCR, en plus de celles données dans l'article publié dans PlosOne.

**Tableau-3:** Les anticorps primaires utilisés en Western Blot.

## RESULTATS

**Figure 27:** Etablissement de test de la plasticité dans le modèle des mESCs.

**Figure 28:** Similarité transcriptionnelle entre les mESCs et les miPSCs dans le test de plasticité.

**Figure 29:** MMP1 maintient la pluripotence des mESCs.

**Figure 30:** Effets combinés du LIF et de MMP1 sur la plasticité des mESCs.

**Figure 31:** Validation des conditions de faible concentration d'oxygène à [3% O<sub>2</sub>] par RT-qPCR.

**Figure 32:** Différence morphologique des mESCs entre [3% O<sub>2</sub>] et [20% O<sub>2</sub>] pendant les temps indiqués par le test de la Phosphatase Alcaline (AP).

**Figure 33:** Les cellules à [3% O<sub>2</sub>] prolifèrent moins vite que les cellules cultivées à [20% O<sub>2</sub>].

**Figure 34:** Ralentissement de prolifération et présence de plusieurs populations cellulaires à [3% O<sub>2</sub>].

**Figure 35:** Stabilité de l'expression du gène répresseur de la voie LIF, *Sox3* avec une chute de son expression de moitié après 7 jours de culture.

**Figure 36:** Equilibre dynamique de l'expression de gènes à [3% O<sub>2</sub>].

**Figure 37:** Analyse de l'effet de la densité cellulaire sur la morphologie des mESCs cultivées à [20% O<sub>2</sub>] par coloration à la phosphatase alcaline.

**Figure 38:** Lien entre hétérogénéité et présence des zones hypoxiques.

**Figure 39:** Schéma indiquant la présence potentielle de sous-populations de mESC à J1 du retrait de LIF.

**Figure 40:** Représentation des plasmides utilisés pour les expériences de cytométrie en flux.

**Figure 41:** Outil de caractérisation de la plasticité des mESCs par cytométrie en flux.

**Figure 42:** Analyse de la régulation des promoteurs *Ceacam1* et 2.

## DISCUSSIONS ET PERSPECTIVES

**Figure 43:** Plasticité Cellulaire des mESCs.

**Figure 44:** La faible  $[O_2]$  maintient la pluripotence des mESCs *in vitro* à long terme.

## Liste des abréviations

**ADN:** Acide DesoxyriboNucléique  
**ADNc:** Acide DesoxyriboNucléique complémentaire  
**aFGF:** acidic Fibroblast Growth Factor  
**AGZ:** Activation du Génome du Zygote  
**AKT:** serine/threonine protein Kinase B  
**AP:** Alcaline Phosphatase  
**ARN:** Acide RiboNucléique  
**ARNm:** Acide RiboNucléique messenger  
**ARNT:** aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein  
**ASCs:** Adult Stem Cells  
**ATP:** Adenosine TriPhosphate  
**Bcl2:** B-cell CLL/lymphoma 2  
**bFGF:** basic Fibroblast Growth Factor  
**bHLH:** basic Helix-Loop-Helix  
**BIO:** 6-bromoindirubin-3-oxime  
**BMP4:** Bone Morphogenetic Protein 4  
**BNIP3:**BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3  
**Car4:** Carbonic Anhydrase 4  
**CBMs:** Cytokine Binding Modules  
**Cdx2:** Caudal type homeobox 2  
**Ceacam 1 et 2:** Carcinoma Embryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule 1 et 2  
**Cer1:** Cerberus 1 homolog (*Xenopus laevis*)  
**CHO:** Chinese Hamster Ovarian  
**CMV:** CytoMegaloVirus  
**C-Myc:** v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog  
**CNTF:** Ciliary Neurotrophic Factor  
**Cox4I/2:** cytochrome c oxydase subunit IV 2  
**CREB:** cAMP response element-binding protein  
**CSCs:** Cancer Stem Cells  
**d2EGFP:** destabilized Enhanced Green Fluorescent Protein  
**Dax-1:** orphan nuclear receptor  
**DiD:** 1,1-Dioctadecyl-3,3,3,3-tetramethylindodicarbocyanine  
**DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium  
**Dapp5:** Developmental pluripotency associated 5

**EBs:** Embryoïd Bodies  
**EC:** Embryonal Carcinoma  
**E-Cad:** E-Cadhérine  
**E-cdk2:** Cyclin E-Cyclin-Dependent Kinase 2  
**EGCs:** Embryonic Germinal Cells  
**EGFP:** Enhanced Green Fluorescent Protein  
**ELK:** E twenty-six (Ets)-like transcription factor  
**Eomes:** Eomesodermin homolog (*Xenopus laevis*)  
**Epi:** épiblaste  
**EpiSCs:** Epiblast Stem Cells  
**ERK:** Extracellular-signal Regulated Kinase  
**ESCs:** Embryonic Stem Cells  
**Esrr $\beta$ :** EStrogen Related Receptor Beta  
**EYFP:** Enhanced Yellow Fluorescent Protein  
**FBS:** Fetal Bovine Serum  
**Fbx15:** F-box protein 15  
**FGF:** Fibroblast Growth Factor  
**Fgf5:** Fibroblast growth factor 5  
**FLCN:** Folliculin  
**Fos:** FBJ osteosarcoma oncogene  
**Foxa2:** Forkhead box A2  
**Foxp3:** Forkhead box P3  
**FZD:** FriZzleD  
**Gata6:** GATA binding protein 6  
**GFAP:** Glial Fibrillary Acidic Protein  
**Gjb3 et 5:** Gap junction protein, beta 3 et 5  
**Glut1:** Glucose Transporter 1  
**gp130:** Glycoprotein 130  
**gp190:** Glycoprotein 190 (ou LIFR)  
**GSK3 $\beta$ :** Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$   
**hDPSCs:** human Dental Pluripotent Stem Cells  
**hESCs:** human Embryonic Stem Cells  
**HIF1:** Hypoxia Inducible Factor 1  
**HIF2:** Hypoxia Inducible Factor 2  
**hiPSCs:** humaninducedPluripotent Stem Cells

**Hippo:** Salvador–Warts–Hippo pathway  
**hMADS:** human multipotent adipose derived stem  
**HMG:** High Mobility Group  
**Hprt:** Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase  
**HRE:** Hypoxic Response Element  
**HSCs:** Hematopoietic Stem Cells  
**Hypo:** hypoblaste  
**Id:** Inhibitor of differentiation  
**IL-6:** Inter Leukine 6  
**iPSCs:** induced Pluripotent Stem Cells  
**Irak3:** Interleukin-1 receptor-associated kinase 3  
**JAK1:** Janus associated Kinase 1  
**Jam2:** Junction Adhesion Molecule 2  
**JunB:** Jun B proto-oncogene  
**KD:** Knock-Down  
**KI:** Knock-In  
**Klf4:** Kruppel like Factor 4  
**KO:** Knock-Out  
**LdhA:** lactate dehydrogenase A  
**Lef 1:** Lymphoid Enhancer-binding Factor 1  
**Lefty1:** Left right determination factor 1  
**LIF:** Leukemia Inhibitory Factor  
**LIFR:** LIF receptor (ou gp190)  
**MAPK:** Mitogen Activated Protein Kinase  
**MDM2:** oncogene, E3 ubiquitin protein ligase  
**MEFs:** Mouse Embryonic Fibroblasts  
**MEK:** MAP kinase-ERK kinase  
**mESCs:** mouse Embryonic Stem Cells  
**MFI:** Mean Fluorescence Intensity  
**microARN:** micro Acide RiboNucléique  
**miPSCs:** murin induced Pluripotent Stem Cells  
**Mras:** Muscle and microspike RA Sarcoma  
**MSCs:** Mesenchymal Stem Cells  
**Mtc4:** Mitochondrial Tricarboxylate Carrier 4  
**Nanog:** « Tir Nan Og », qui signifie « la terre de l'éternelle jeunesse »

**NF- $\kappa$ B:** Nuclear Factor kappa B  
**Nr0b1:** nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1  
**NSCs:** Neural Stem Cells  
**Oct4:** OCTamer binding Transcription factor 4  
**OSM:** OncoStatine M  
**Otx2:** orthodenticle homolog 2  
**Pak1:** P21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 1  
**PBS:** *Phosphate Buffered Saline*  
**Pcdh1:** Protocadherin 1  
**Pdk1:** Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1  
**Pecam1:** Platelet endothelial cell adhesion molecule 1  
**PGCs:** Primordial Germinal cells  
**PHD:** Prolyl Hydroxylase Domain  
**PI3K:** Phosphatidyl Inositol 3 Kinase  
**PIP2:** PhosphoInositol (3,4) biPhosphate  
**PIP3:** PhosphoInositol (3,4,5) triPhosphate  
**Pitx2:** Paired-like homeodomain transcription factor 2  
**Pou:** Pit-1 Oct-1 Unc-86  
**PRB:** Protéine du rétinoblastome  
**PrE:** Primitive endoderm  
**PTEN:** Phosphatase and TENsin homolog  
**RAB:** RAs-like proteins in Brain  
**RAF:** murine leukemia viral oncogene homolog-1  
**RAS:** RAt Sarcoma  
**rHRE:** repressive HRE  
**ROCK:** Rho-associated kinase  
**RT-qPCR:** Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction  
**Sall4:** Sal-like protein  
**SC:** Stem Cells (cellule souche)  
**SDS:** Sodiom DodécylSulfate  
**SH2:** Src Homology 2  
**SHP2:** Src Homology 2 domain containing protein tyrosine Phosphatase 2  
**SMAD:** Small Mothers AgainstDecapentaplegic  
**SOCS3:** Suppressor of Cytokine Signalling 3  
**Sod2:** superoxide dismutase 2

**Sox17:** SRY (sex determining region Y)-box 17  
**Sox2:** Sex determining region Y- box2  
**Src:** Sarcoma Rous Carcinoma  
**SSEA1:** Stage Specific Early Antigen 1  
**STAT3:** Signal Transducer and Activator of Transcription 3  
**SUMO ligase:** Small Ubiquitin-related MOdifier ligase  
**Tbx3:** T-box Transcription Factor  
**TCF:** T Cell Factor  
**TCF15:** Transcription factor 15  
**Tcfcp2l1:** Transcription factor CP2-like 1  
**TE:** Trophectoderme  
**TEF3:** Transcriptional enhancer factor 3  
**TGFβ:** Transforming Growth Factor β  
**Th17:** T helper 17 cells, type of T lymphocytes  
**TRA-1:** Tumor Rejection Antigen-1  
**TYK:** TYrosine Kinase  
**Vegf:** Vascular Endothelial Growth Factor  
**pVHL:** Von Hippel-Lindau tumour suppressor protein  
**WNT:** Wg (wingless) Int (integration site)  
**YAP:** Yes-associated protein  
**Zfp42:** Zinc finger protein 42  
**Zscan4:** zinc finger and SCAN domain containing 4

# INTRODUCTION

Les cellules souches fascinent et attirent l'attention des chercheurs, des médecins et du grand public depuis plus d'un siècle, de par les débats éthiques et légaux qu'elles soulèvent. En effet, la recherche sur les cellules souches est un enjeu majeur des prochaines décennies, et leur utilisation en médecine régénératrice représente un espoir pour des milliers de personnes atteintes de maladies et de lésions dégénératives dans le monde.

## I. Généralités

Bien que les étapes du développement de la fécondation jusqu'au fœtus soient partagées par tous les mammifères, il existe des différences temporelles et moléculaires entre les différentes espèces.

La souris est le modèle principal utilisé depuis plusieurs décennies pour comprendre l'embryogénèse des mammifères et il est utilisé couramment dans la plupart des disciplines comme le développement, l'immunologie, l'infectiologie, la reproduction, la neurobiologie ou la physiologie

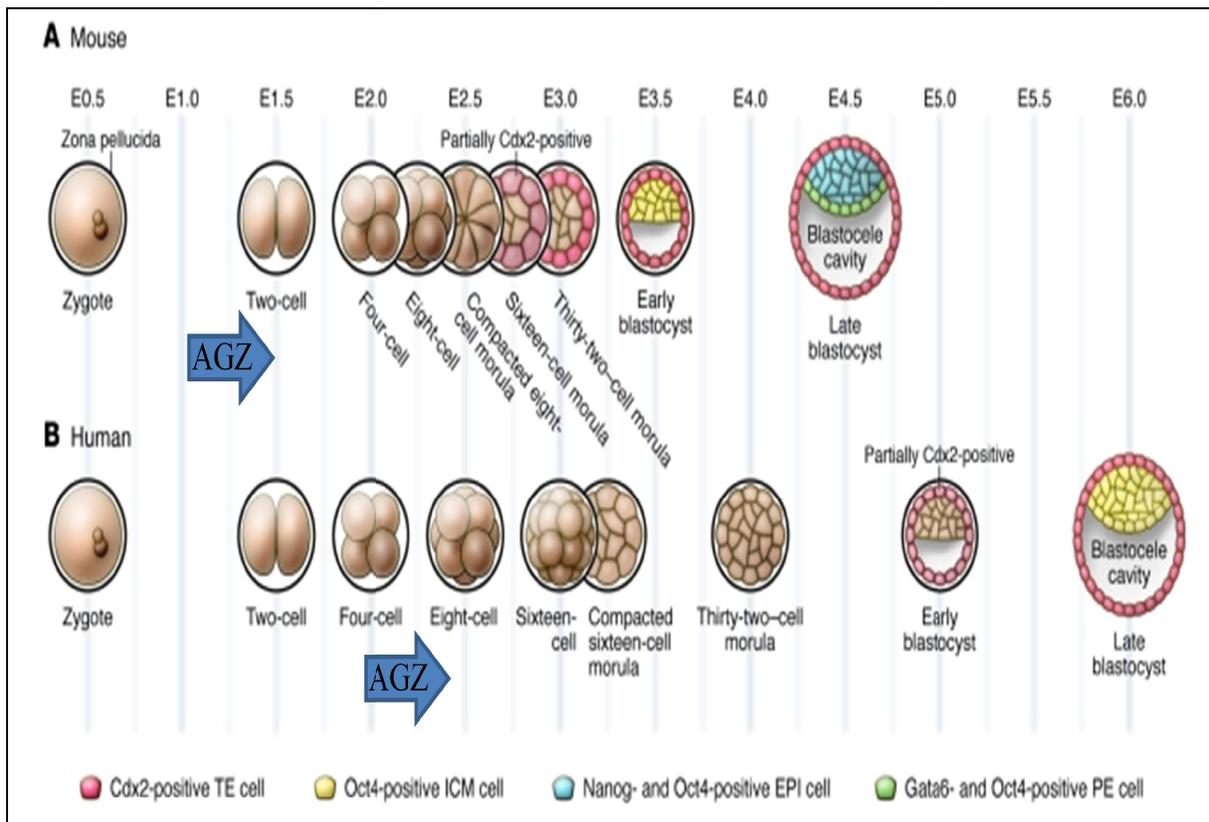
Chez la souris, le développement embryonnaire complet dure 21 jours. Après la fécondation, l'embryon se divise rapidement et atteint: le stade 8 cellules à E2, la morula à E2.5, le blastocyste précoce à E3.5 et le blastocyste tardif à E4-4.5. L'activation du génome du zygote (AGZ) intervient très précocement, dès le début du stade 2 cellules, et est accompagnée de la dégradation des ARNm maternels. L'embryon s'implante au stade «egg-cylinder» (ou ovocylindre E5.5). L'implantation est facilitée par la présence de facteurs et cytokines dont la cytokine LIF (Leukemia Inhibitory Factor), principal sujet d'étude de cette thèse.

Les premières cellules de l'embryon, les blastomères peuvent donner tous les types cellulaires composant les tissus embryonnaires et extra-embryonnaires (cellules totipotentes). La première spécialisation des cellules de l'embryon se fait entre le trophoctoderme (TE) et la masse cellulaire interne (ICM) (Gardner, 1982). Les cellules de la morula compactée sont polarisées et subissent les premières divisions asymétriques. Ainsi, les cellules situées à l'extérieur de la morula formeront le TE alors que les cellules à l'intérieur formeront l'ICM. C'est à partir de l'ICM qu'ont été dérivées les cellules souches embryonnaires qui ont perdu la capacité de se

différencier en cellules extra-embryonnaires. La deuxième spécialisation concerne les cellules de l'ICM qui donneront l'épiblaste (Epi) et l'hypoblaste (Hypo) ou endoderme primitif (PrE). Au cours du développement, le TE forme le placenta, alors que le PrE forme le sac vitellin et l'endoderme extra-embryonnaire pariétal. Les cellules de l'Epi, présentes dans le blastocyste tardif, sont à l'origine du futur fœtus.

Afin de déterminer le devenir et le rôle des différentes parties de l'embryon, des expériences de greffes ont été réalisées. Ainsi, la greffe de l'épiblaste total à différents stades (entre E5.5 et E7.5), dans les testicules ou la capsule rénale d'une souris immuno-déficiente, conduit à la formation des tératomes (Beddington, 1983; Diwan and Stevens, 1976). Les mêmes résultats ont été obtenus après la greffe ectopique de différentes parties de l'épiblaste E7.5 (Beddington, 1983; Tam, 1984). L'analyse de ces tératomes suggère que les différentes régions de l'épiblaste ne diffèrent pas par leur potentiel de différenciation. De plus, des chimères post-implantatoires ont pu être produites *in-vitro*, suite à la greffe d'une partie de l'épiblaste dans un autre embryon au même stade (Beddington, 1981). Les expériences de greffes ortho- et hétérotopiques de l'épiblaste ont permis de montrer que le devenir des cellules était contrôlé par le lieu de greffe et non par le lieu d'origine de l'épiblaste. L'ensemble de ces résultats indique que les cellules composant l'épiblaste conservent la caractéristique de pluripotence jusqu'à 24h après le début de la gastrulation soit jusqu'au stade E7.5 (**Fig.1**).

Chez l'homme, le développement embryonnaire reste mal connu, en grande partie, en raison des difficultés techniques et éthiques qui limitent l'obtention d'embryons humains et l'expérimentation de ces derniers. Le développement embryonnaire chez l'homme est de 9 mois, ce qui est environ 12 fois plus long que chez la souris. En revanche, la chronologie du développement embryonnaire précoce est relativement proche, bien que plus lente. Les stades 2 et 4 cellules sont atteints respectivement à E1.5 et E2, comme chez la souris. A partir de ce stade, le développement est un peu plus long chez l'homme: 8 cellules à E2.5, 16 cellules à E3, 32 cellules à E4, blastocyste précoce à E5 et blastocyste tardif à E6-7 (contre E4.5 chez la souris). Après le stade blastocyste tardif, l'embryon humain continue de grossir en restant sphérique, alors que se forme un disque embryonnaire plat à sa surface (E6). L'embryon s'implante à E7-8, ceci diffère de la souris où l'embryon forme un "egg-cylinder" (E5.5). Une autre différence majeure est la compaction qui n'a lieu qu'au stade 16 cellules chez l'homme (stade 8 cellules chez la souris). L'AGZ survient également plus tard que chez la souris, au début du stade 8 cellules (stade 2 cellules chez la souris) (**Fig.1**).



**Figure 1: Chronologie du développement embryonnaire précoce :** Chez la souris (**A**), la cavité blastocoelique commence à se former à l'intérieur de l'embryon au stade 32-cellules et continue à se développer jusqu'au stade de blastocyste tardif. L'expression de *Cdx2* est up-régulée à l'extérieur, dans les futures cellules du TE, dès le stade 32-cellules, tandis que l'expression d'*Oct4* devient limitée à l'ICM au stade blastocyste précoce. Au stade blastocyste tardif, tout en continuant d'exprimer *Oct4* d'une manière ubiquitaire, l'ICM contient une population de cellules Epi-Nanog-positives et une population de cellules PE-Gata6 positive. Le développement est similaire dans l'embryon humain (**B**), bien que la compaction se produise au stade 16-cellules et les profils d'expression mutuellement exclusifs de *Cdx2* et *Oct4* ne sont pas établis jusqu'au stade de blastocyste tardif. Les profils d'expression de *Nanog* et *Gata6* dans l'embryon préimplantatoire humain n'ont pas encore été caractérisés. AGZ: Activation du Génome du Zygote (photo issue de Katie Cockburn and Janet Rossant, 2010).

Enfin, l'embryogenèse des mammifères est fortement influencée par des gradients d'oxygène. La preuve directe de cette constatation a été mise en évidence lorsque les niveaux d'oxygène ( $O_2$ ) ont été mesurés dans les tissus de l'endomètre et du trophoblastique en début de grossesse (Mitchell and Yochim, 1968; Rodesch *et al.*, 1992). L'oxygène a une distance de diffusion de l'ordre de  $150\mu m$  (Folkman *et al.*, 2000; Gatenby and Gillies, 2004). Ainsi, la concentration d' $O_2$  est  $\leq 3\%$  avant la formation de placenta puis elle augmente au cours de l'embryogenèse surtout avec la mise en place du système vasculaire, qui libère de l'oxygène et le

fournit à l'embryon. Par conséquent, le développement précoce des mammifères a lieu dans un environnement relativement pauvre en oxygène qui, par abus de langage a été appelé « environnement hypoxique ».

## II. La cellule Souche

### A. Historique

Dès la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, le terme cellule souche est apparu pour la première fois dans les travaux de l'éminent biologiste et philosophe allemand Ernst Haeckel en 1868 pour décrire l'ancêtre unicellulaire à partir duquel auraient évolué tous les organismes multicellulaires (Haeckel, 1868). En 1877, Haeckel va plus loin (de manière analogue à sa théorie de la phylogénie de l'évolution), et il propose en embryologie que l'ovule fécondé donnant lieu à l'ensemble des cellules de l'organisme devrait également être appelée la cellule souche ou « *Stammzelle* » (en terme en allemand) (Ernst Heinrich Philipp August Haeckel, 1877). En 1885, August Weismann pensait que le patrimoine génétique transmis d'une génération à l'autre, était isolé durant le développement embryonnaire à des cellules spécialisées (cellules germinales) distinctes du reste du corps (cellules somatiques) (August Weismann, 1885). En 1892, Theodor Boveri et Valentin Häcker ont utilisé le terme cellule souche pour décrire les cellules destinées à donner naissance à la lignée germinale (Häcker, 1892; Boveri, 1892). A la même époque, la recherche sur le développement et la régénération du système sanguin (ou hématopoïétique) a soulevé la question de l'existence d'un précurseur commun des différents types de cellules du sang. Ainsi, dès 1896, Pappenheim a repris le terme « *Stammzelle* » pour décrire une cellule susceptible d'être à l'origine à la fois des globules rouges et des globules blancs (Pappenheim, 1896). Au début du 20<sup>ème</sup> siècle, certains hématologistes, dont Alexander Maximow (Maximow, 1909) proposent l'existence d'un précurseur commun qui serait à l'origine de toutes les cellules du système sanguin. La preuve définitive d'une cellule souche hématopoïétique commune a été fournie, entre autre, par le travail expérimental chez la souris de James Till, Ernest McCulloch dans les années 1960 (Becker *et al.*, 1963; McCulloch and Till, 1960; Till and McCulloch, 1961).

Les cellules pluripotentes ont d'abord été isolées en 1964 à partir d'un tératocarcinome et ont été appelées "cellules de carcinome embryonnaire (EC)". En 1981, les chercheurs Evans, Kaufman et Martins ont établi les premières lignées de cellules souches embryonnaires (mESC) chez la souris à partir de l'ICM de blastocyste explanté murin (Evans and Kaufman, 1981; Marins *et al.*, 1981). En 1998, Thomson a isolé la première lignée de cellules souches humaines (hESC) (Thomson *et al.*, 1998). Dans la même année, Gearhart a publié l'isolement de cellules germinales primordiales pluripotentes à partir de tissus des gonades fœtales (Shamblott *et al.*, 1998). A cette époque, de nombreuses publications ont décrit les travaux d'isolation et de caractérisation d'autres types de cellules souches tissulaires spécifiques, y compris Gronthos qui a isolé des cellules souches dentaires (hDPSCs, human Dental Pluripotent Stem Cells) (Gronthos *et al.*, 2000). Le dogme que le cœur est un organe post-mitotique incapable de se régénérer a été remise en cause en 2003 par l'introduction d'un test de cardiosphère pour isoler les premières cellules souches cardiaques (Beltrami *et al.*, 2003).

En 2006, Yamanaka et ses collègues ont montré pour la première fois la capacité de reprogrammation de cellules somatiques de mammifères par l'ajout d'un cocktail de facteurs de transcription identifiés dans les ES murines. Ceci a conduit à la reprogrammation de cellules somatiques en cellules souches pluripotentes, appelées iPSC (Cellules Souches Pluripotentes induites) (Takahashi and Yamanaka, 2006). Cette technologie a contribué à l'expansion rapide d'un nouveau champ expérimental qui a permis la production de cellules spécifiques d'un patient avec un potentiel thérapeutique. Ces travaux pionniers, reproduits à partir de différents types de cellules somatiques de différentes espèces dont l'homme, ont été couronnés par le prix Nobel en 2012 (Japonais Shinya Yamanaka et au Britannique John Gurdon).

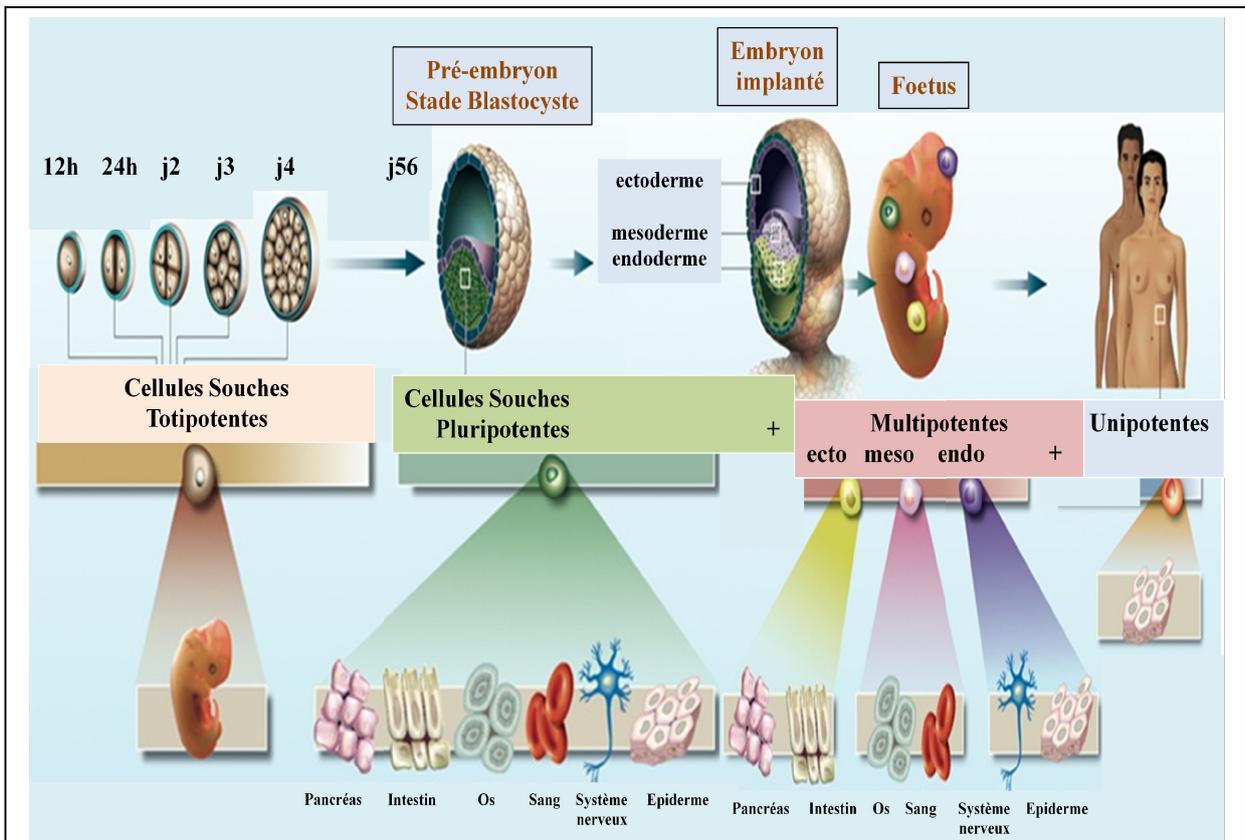
## **B. Qu'est-ce qu'une Cellule souche ?**

La cellule souche (SC) ou en anglais Stem Cell est une cellule indifférenciée qui en présence de stimuli, va donner naissance à différents types de cellules différenciées. La cellule souche est présente au stade embryonnaire conduisant à la formation des différents tissus qui constitueront l'organisme mais également, dans l'organisme adulte où elle est localisée dans des endroits protégés appelés « niches ». De manière globale, les cellules souches sont trouvées chez tous les êtres multicellulaires (Rey, 2003). D'un point de vue cytologique, une cellule souche a

un rapport nucléo/cytoplasmique élevé, c'est-à-dire peu de cytoplasme, peu d'organelles et un noyau sphérique proéminent.

Les cellules souches se caractérisent par :

- l'**auto-renouvellement** qui est la capacité de proliférer indéfiniment tout en maintenant un état indifférencié. Les cellules souches peuvent se multiplier par division symétrique ou asymétrique.
- les **potentialités de différenciation** qui sont les capacités pour une cellule de se différencier en un ou plusieurs types de cellules matures. Selon leurs capacités de différenciation, on distingue plusieurs types de cellules souches (Hervé Ratel, 2012) (**Fig.2**).



**Figure 2: Les différents types de cellules souches selon leurs capacités de différenciation.**  
Photo adaptée de l'article d'Hervé Ratel (Sciences et Avenir, 2012).

## 1. Les cellules souches totipotentes

Ces cellules sont issues des premières divisions de l'ovocyte fécondé (zygote) jusqu'au stade morula de 8 à 16 cellules (3<sup>ème</sup> jour après la fécondation chez la souris). Etymologiquement, totipotence signifie « tout pouvoir ». En effet, ces cellules sont caractérisées par leur aptitude à se différencier en tissus embryonnaires et extra-embryonnaires. Elles peuvent donner naissance à

tous les types de cellules spécialisées comme les cellules épithéliales, les cellules neuronales, les cellules musculaires.... Par ailleurs, les cellules souches totipotentes permettent de conduire à la formation des annexes embryonnaires, organes assurant la survie et les fonctions vitales de l'embryon, puis du fœtus. Chez les mammifères placentaires, les annexes embryonnaires sont le placenta (tissu fœto-maternel provenant de la fusion partielle de l'endomètre utérin et du chorion), le sac amniotique (ou amnios) et le liquide amniotique. Si on divise la morula en deux (scission embryonnaire), on obtiendra deux embryons dont les gènes sont identiques (vrais jumeaux ou jumeaux monozygotiques). Ainsi, ce sont les seules cellules capables de donner un embryon puis un individu complet.

## 2. Les cellules souches pluripotentes

Ces cellules peuvent se différencier en cellules des trois feuillets embryonnaires (endoderme, mésoderme et ectoderme) *in vivo* et *in vitro* en présence des stimuli (comme l'ajout de N2B27 et l'acide rétinoïque activent la différenciation neuronale, 5-azacytidine, ascorbic acid, retinoic acid, dimethyl sulfoxide (DMSO) and dynorphin B favorisent la différenciation cardiomyogénique) et de facteurs de croissance. Néanmoins, ces cellules ne sont pas capables de conduire aux annexes embryonnaires. Parmi les cellules souches pluripotentes, on retrouve :

- les cellules de carcinomes embryonnaires (EC) issues des tératocarcinomes,
- les cellules embryonnaires germinales (EGCs) provenant des cellules primordiales germinales (PGCs),
- les cellules souches embryonnaires (ESCs) issues de la masse cellulaire interne des blastocystes (Buecker *et al.*, 2010; Evans and Kaufman, 1981; Kieffer *et al.*, 2010; Thomson *et al.*, 1998; Wobus and Boheler, 2005),
- et les cellules souches induites à la pluripotence (iPSCs- induced Pluripotent Stem Cells) obtenues par la reprogrammation de cellules somatiques (Takahashi and Yamanaka, 2006; Takahashi *et al.*, 2007).

Les caractéristiques de ces cellules seront développées en détail ci-dessous.

## 3. Les cellules souches multipotentes

Ces cellules ont une restriction de potentiel par rapport aux cellules souches pluripotentes. En effet, ces cellules sont à l'origine de plusieurs types cellulaires, mais sont déjà engagées dans un programme de différenciation tissulaire spécifique. Elles sont présentes au cours du développement embryonnaire, mais également chez l'adulte. Parmi ces cellules, on distingue notamment :

- les cellules souches hématopoïétiques (HSCs, les premières cellules souches adultes caractérisées) qui sont nichées au niveau de la moelle osseuse dans des niches hypoxiques et qui sont à l'origine de tous les types cellulaires lymphohématopoïétiques (érythrocytes, plaquettes, granulocytes, neutrophiles, éosinophiles, mastocytes, macrophages, lymphocytes B et T).
- les cellules souches mésenchymateuses (MSCs) qui sont également présentes au niveau de la moelle osseuse et aussi dans le gras (voir ci-dessous, cellules hMADS) et qui sont à l'origine des cellules des lignages ostéoblastiques, chondroblastiques, myoblastiques, adipocytaires et stromales (Casteilla *et al.*, 2011; Dromard *et al.*, 2011; Kaltz *et al.*, 2010; Mohsen-Kanson *et al.*, 2014; Solchaga *et al.*, 2010) ,
- et les cellules souches neurales (NSCs) qui sont localisées au niveau de deux zones dans le cerveau adulte: la zone sous-ventriculaire et le gyrus denté de l'hippocampe et qui peuvent se différencier en neurones et en cellules gliales (Coulombel, 2003a, 2003b; Encinas *et al.*, 2008; Hodge *et al.*, 2008).

Plus récemment, des cellules souches multipotentes ont été identifiées au sein du tissu adipeux dans le SVF (fraction stroma-vasculaire). Ces cellules, nommées hMADS (human multipotent adipose derived stem) sont capables de se différencier *ex vivo* en divers types cellulaires: ostéoblastes, chondroblastes, cellules endothéliales, myocytes et de manière encore plus inattendue, cardiomyocytes (Casteilla *et al.*, 2011; Hafner and Dani, 2014; Planat-Benard *et al.*, 2004; Rodriguez *et al.*, 2005; Zuk *et al.*, 2001).

#### **4. Les cellules souches unipotentes**

Ces cellules, quant à elles, se différencient en un seul type cellulaire. On distingue les kératinocytes de la peau, les cellules satellites du muscle, les cellules ovales du foie, les adipoblastes, les cellules de l'épithélium de la muqueuse gastro-intestinales (Ailhaud *et al.*, 1992; Biressi and Rando, 2010; Bjerknes and Cheng, 2006; Coulombel, 2003b).

## C. Le microenvironnement des cellules souches

### 1. Qu'est-ce qu'une niche ?

Historiquement, Grinnell a proposé le terme de « niche » pour définir l'environnement et les conditions dans lesquelles vit une espèce (Grinnell, 1917). En 1978, Schofield propose l'hypothèse de la « niche » pour décrire le microenvironnement physiologique qui permet la pérennisation des cellules souches hématopoïétique (Schofield, 1978).

La niche est un microenvironnement spécifique, dans lequel se trouvent les cellules souches, qui maintient l'homéostasie tissulaire: régulation de la balance entre quiescence/auto-renouvellement/ différenciation et mobilisation/domiciliation (« homing » en anglais).

La notion de niche est largement confirmée et peut être appliquée à la plupart des cellules souches comme les cellules souches embryonnaires, les cellules souches adultes (cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse, cellules souches du cerveau, cellules souches intestinales...) (**Fig.3A**), ainsi que les cellules souches cancéreuses (Fuchs *et al.*, 2004; Jiang and Papoutsakis, 2013).

### 2. Fonctions et compositions

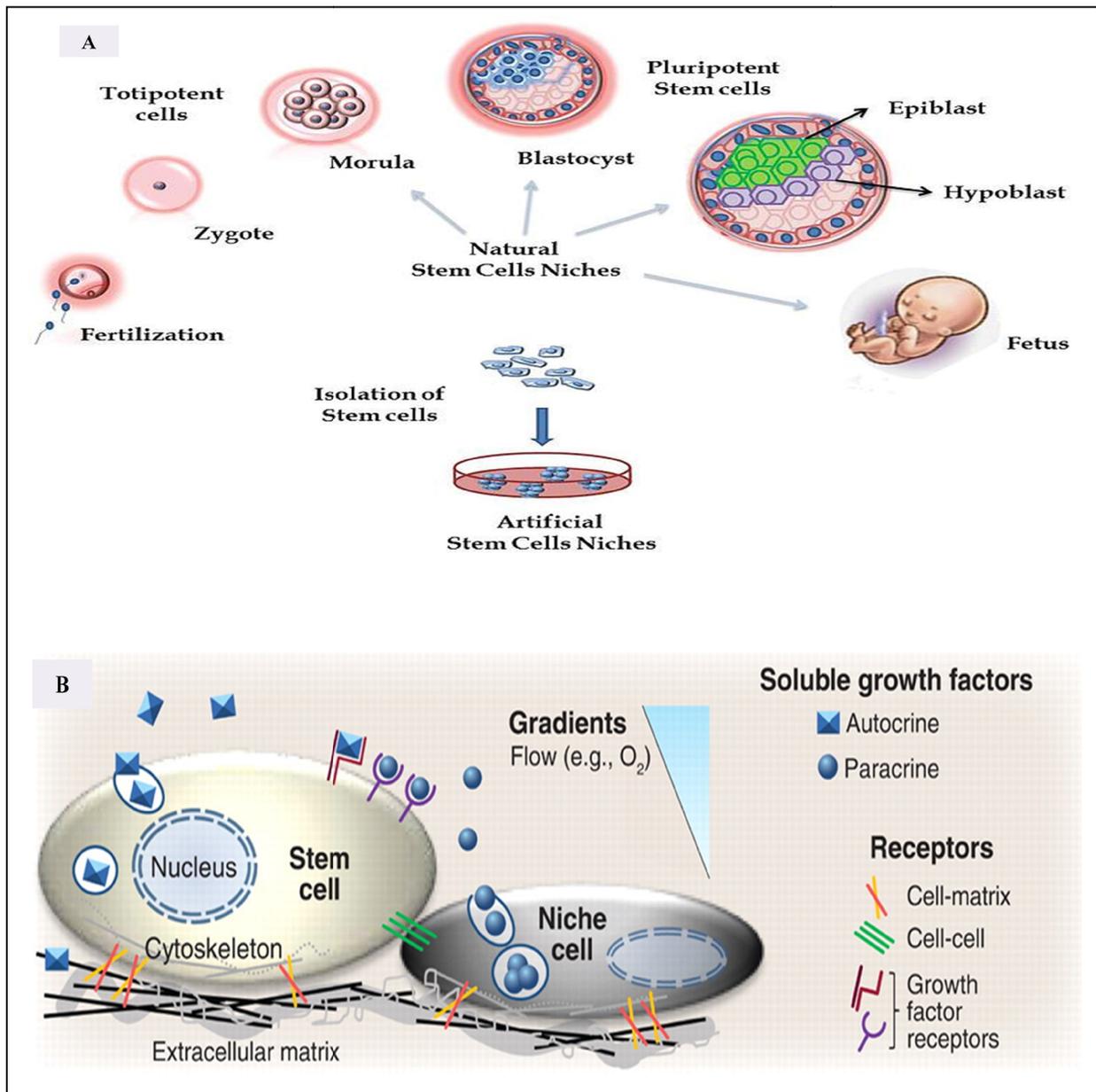
L'étude des différentes niches a révélé plusieurs caractéristiques physiques et fonctionnelles qui apparaissent être la « marque » de la niche des cellules souches. Elle est composée des constituants cellulaires du microenvironnement qui entourent les cellules souches ainsi que des signaux solubles provenant de ces cellules. Chaque niche est très spécifique du lignage cellulaire. En rassemblant les caractéristiques de ces niches, une liste des particularités définissant la niche des cellules souches peut être constituée (**Fig.3B**). Une niche possède une structure asymétrique et se compose (Boveri T, 1892; Chandra and Lee, 2015; Discher *et al.*, 2009; Lander *et al.*, 2012) :

- des cellules souches elles-mêmes,
- de cellules stromales de support qui interagissent directement avec les cellules souches et entre elles par l'intermédiaire de récepteurs membranaires, de jonctions communicantes ou de facteurs solubles,

- d'une matrice extracellulaire (MEC) qui entoure les cellules et comprend des signaux moléculaires,
- mais également, d'un réseau hautement hydraté constitué de trois éléments importants : (1) les macromolécules solubles [facteurs de croissance comme FGF, EGF, TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ ), les facteurs des cellules souches (SCFs), des cytokines comme les membres de la famille de l'interleukine 6 (IL-6) et des chimiokines]; (2) les protéines à la surface des cellules voisines; et (3) des macromolécules hydratées insolubles, qui comprennent les protéines fibrillaires telles que les collagènes, les glycoprotéines non collagéniques telles que l'élastine, la laminine, la fibronectine, ou les protéoglycanes hydrophiles avec de grandes chaînes latérales de glycosaminoglycane,

La concentration en oxygène (O<sub>2</sub>) est un élément important dans la composition de cette niche. La faible concentration d'oxygène est répandue dans le microenvironnement des cellules souches embryonnaires et dans les niches de nombreuses cellules souches adultes à des stades précoces du développement (Nekanti *et al.*, 2010). Ainsi, les embryons de mammifères se développent dans un environnement à faible concentration d'oxygène.

Les cellules souches sont ainsi régulées à la fois par un programme intrinsèque et par des facteurs extrinsèques provenant de la niche. Les programmes intrinsèques contrôlant l'auto-renouvellement, la quiescence et la différenciation des cellules souches sont très variés. A la suite d'une division, une des deux cellules est maintenue dans la niche et devient une cellule souche (auto-renouvellement) tandis que l'autre cellule quitte la niche, prolifère et s'engage dans une voie de différenciation. La niche semble avoir un rôle dans le maintien de la vitalité des cellules souches ainsi dans le vieillissement de l'organisme. Il est aussi à noter que certaines cellules souches peuvent migrer d'une niche à l'autre ou se localiser provisoirement dans des niches dites facultatives (Morrison and Spradling, 2008).



**Figure 3: Types et spécificités des niches des cellules souches (A). Composition de la niche (B).** Les facteurs solubles et les facteurs libérés par la matrice extracellulaire se combinent avec le contact cellule-cellule, l'adhérence cellule-matrice et les gradients (tels que l' $O_2$ ) pour déterminer le destin cellulaire. La Photo (B) est issue de Discher DE *et al.* 2009.

#### D. Les cellules souches « pathologiques »

*In vivo*, les cellules souches sont capables d'acquérir un phénotype pathologique en se transformant en cellules cancéreuses.

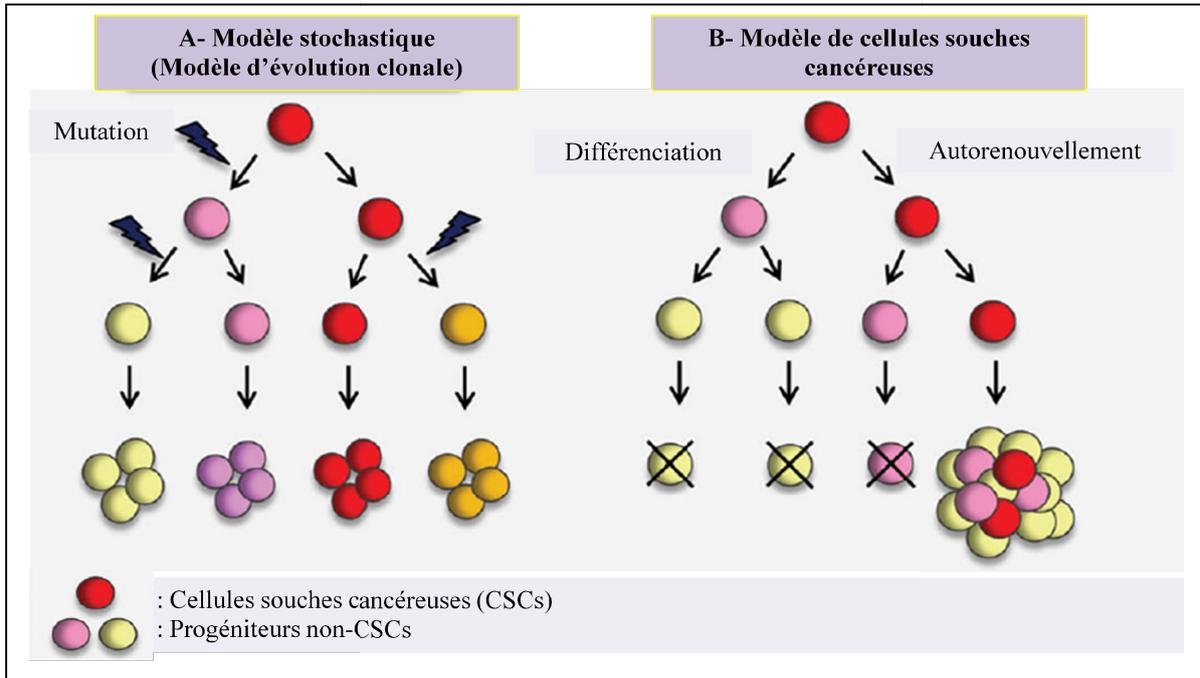
Il y a deux théories principales d'oncogenèse: le modèle stochastique et le modèle hiérarchique (Fig.4). Selon ce second modèle, une cellule initiatrice de cancer est le moteur de

l'activité tumorigène du cancer qui se développe de manière organisée. La cellule initiatrice de cancer présente toutes les caractéristiques d'une cellule souche. Dans ce cas, la petite population cellulaire de cellules souches cancéreuses est suffisante pour initier et développer une tumeur (Frank *et al.*, 2010; Shackleton *et al.*, 2009; Vermeulen, 2013). L'hypothèse de l'existence de cellules souches cancéreuses a été suggérée pour la première fois dans les années 1970 au cours de recherches sur la leucémie. Cette sous-population de cellules néoplasiques aurait la capacité de s'auto-renouveler, de proliférer et de se différencier (Bonnet and Dick, 1997). Ces cellules souches cancéreuses ont par la suite été isolées dans une grande variété de néoplasie comme les tumeurs du système nerveux (entre autre les glioblastomes), les carcinomes de la prostate, du sein et du côlon, les mélanomes multiples, les adénocarcinomes du pancréas, et les cancers Oto-Rhino-Laryngologiques (ORL) (Al-Hajj *et al.*, 2003; Collins *et al.*, 2005; Fang *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007; O'Brien *et al.*, 2007; Prince *et al.*, 2007).

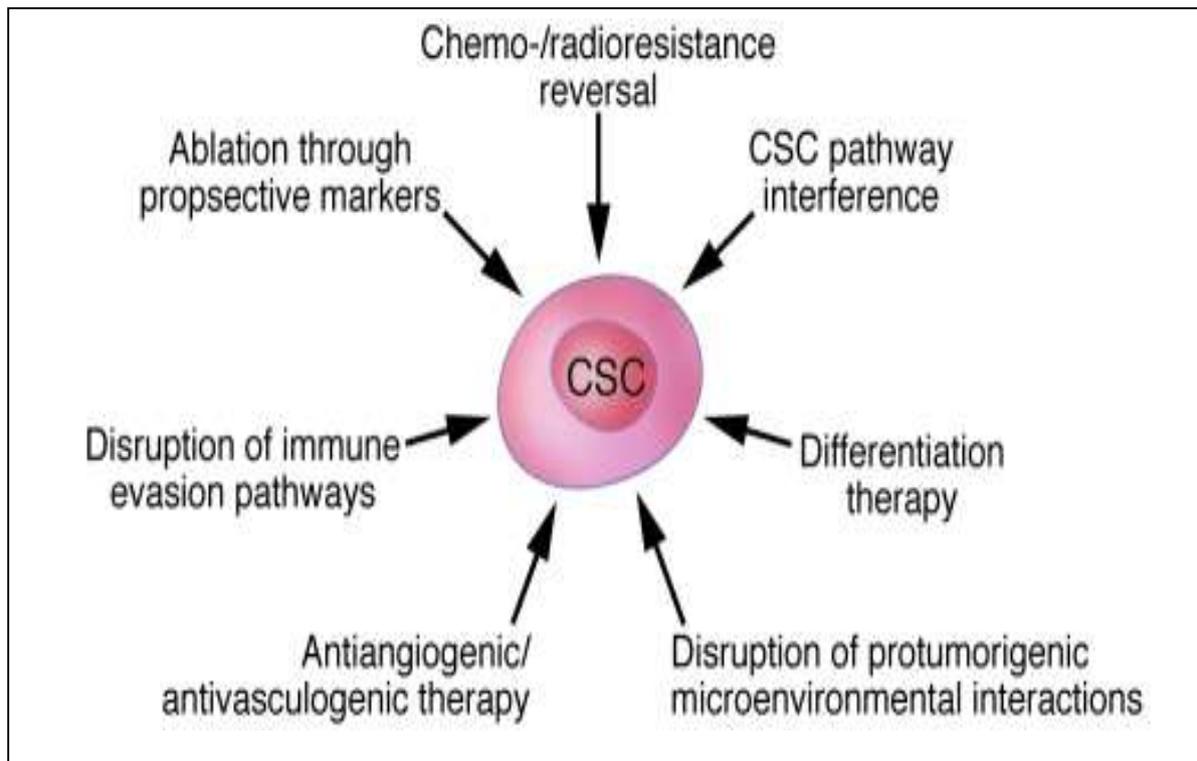
Les SC cancéreuses partagent plusieurs caractéristiques avec les cellules souches normales (Fabián *et al.*, 2013). En effet, elles ont la capacité de s'auto-renouveler de façon illimitée et de se différencier. Les SC cancéreuses ont la faculté de se diviser de façon symétrique et sont enrichies dans les sous-populations de cellules exprimant des marqueurs de cellules souches normales (Sugihara and Saya, 2013). La culture en suspension dans un milieu contenant du sérum supplémenté avec bFGF et EGF permet l'isolement de cellules tumorales avec une capacité d'auto-renouvellement (Lee *et al.*, 2006). De plus, une méthode basée sur l'activité enzymatique de l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH) est largement utilisée pour identifier et évaluer les SC cancéreuses (Cheung *et al.*, 2007; Ginestier *et al.*, 2007). L'ALDH catalyse la conversion irréversible du rétinolaldehyde en acide rétinoïque et contribue à la prolifération et la différenciation cellulaire (Ma and Allan, 2011). Ainsi, les SC cancéreuses à forte activité d'ALDH sont résistantes à la chimiothérapie (Tanei *et al.*, 2009).

De très nombreuses études montrent que les SC cancéreuses sont à l'origine de l'agressivité de nombreuses tumeurs en raison de leur caractère chimiorésistante. Ainsi, elles sont responsables des rechutes observées chez certains patients atteints d'un cancer semblant avoir été soigné avec succès, c'est-à-dire dont la tumeur a diminué, voire disparu apparemment complètement. C'est pourquoi, un ciblage thérapeutique des SC cancéreuses permettrait de prévenir les métastases, limiter la croissance tumorale, et surtout éviter les rechutes (Frank *et al.*, 2010) (**Fig.5**). Dans ce but, un criblage de molécules capables de mettre les SC cancéreuses hors d'état de nuire a été réalisé (Gupta *et al.*, 2009).

Vue la ressemblance entre les cellules souches cancéreuses et les cellules souches embryonnaires normales, l'identification des mécanismes contrôlant l'auto-renouvellement et la différenciation de celles-ci, peut permettre de mieux comprendre les étapes de transformation maligne. Ceci pourrait faciliter le développement de thérapies préventives.



**Figure 4: Deux modèles hypothétiques de la transformation maligne.** Le modèle stochastique (A) de la croissance des cancers où toutes les cellules tumorales ont une capacité proliférative élevée; les cellules tumorales prolifèrent suite à l'âge, à des apports en nutriments ou en oxygène. N'importe quelle cellule du tissu, même différenciée, peut donc, à la suite de mutations acquises de façon aléatoire, proliférer de façon indéfinie et former un clone tumoral indépendant. Le modèle hiérarchique (B) selon lequel le cancer provient de la transformation d'une petite fraction de la population tumorale, composée de cellules souches cancéreuses. Photo adaptée du Sugihara and Saya 2013.



**Figure 5: Traitement ciblant les cellules souches cancéreuses (CSCs).** Un certain nombre de stratégies thérapeutiques ciblant les CSCs commence à être validé expérimentalement. Ces approches pourraient augmenter la réponse thérapeutique et diminuer le risque de rechute et de dissémination. Elles incluent les agents anti-tumorigènes qui ciblent des marqueurs des CSCs (anticorps monoclonaux et cellules immunitaires activées); des agents ciblant les voies qui confèrent une résistance aux CSCs ou en limitant les interactions de ces cellules avec certains éléments du microenvironnement ayant des propriétés pro-tumorigènes, ou encore en privant les cellules de nutriments grâce à des molécules anti-angiogénique et antivascularogénique et enfin en ciblant les mécanismes de la transition épithélio-mesenchymateuse responsables de la dissémination métastatique. Photo issue de Frank *et al.* 2010).

## E. Les cellules souches pluripotentes

### 1. Les différents types de cellules souches pluripotentes

#### 1.1. Les Cellules Souches Embryonnaires (ESCs)

##### 1.1.1 Les tératocarcinomes ou cellules de Carcinomes Embryonnaires (ECs)

En 1952, Dixon et Moore ont découvert chez la souris des tumeurs particulières appelées tératocarcinomes où l'on retrouve des cellules et des structures appartenant aux trois feuillets embryonnaires (Dixon and Moore, 1953). Ce sont des tumeurs malignes développées majoritairement à partir des testicules au cours du développement embryonnaire. Plus tard, l'équipe de Stevens a montré que la lignée 129/sv de souris consanguines développe ce type de tumeurs et qu'elles peuvent se transmettre aux autres souris par transplantation (Diwan and Stevens, 1976; Stevens and Little, 1954). Ces études ont fait émerger l'idée de cellules souches tumorales ou cellules de Carcinome Embryonnaire (ECs).

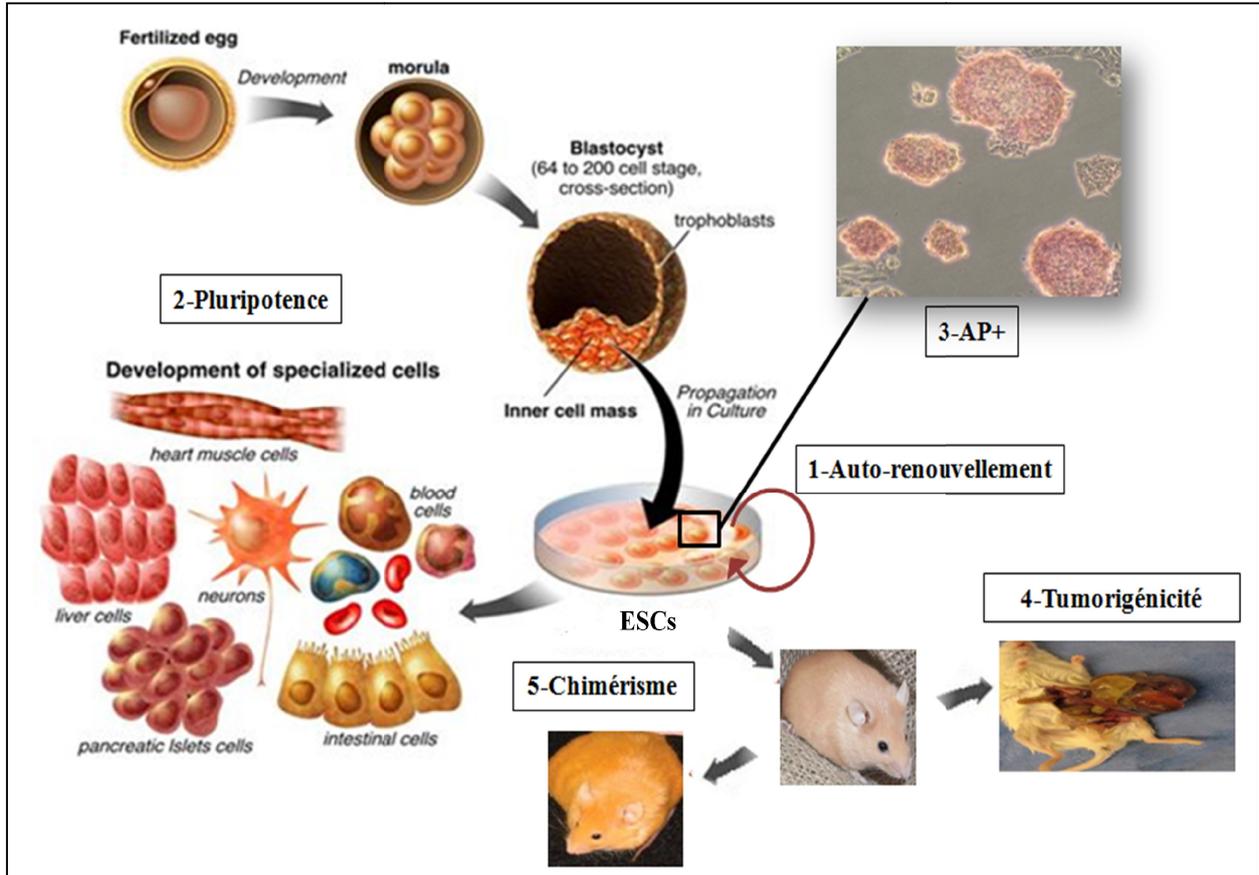
Dans une étude pionnière, une autre équipe a injecté une seule cellule EC dans le cerveau de souris adultes et a découvert qu'elles pouvaient générer un tératocarcinome (Kleinsmith and Pierce, 1964). Cette expérience a établi qu'une seule cellule EC peut générer tous les types cellulaires constitutifs de la tumeur. En outre, les tumeurs sont transplantables, ce qui indique que les cellules ECs s'auto-renouvellent. En revanche, les cellules différenciées provenant du tératocarcinome ne reforment pas de tumeurs (Martin, 1980). Ainsi, les ECs sont des cellules archétypales des cellules souches cancéreuses alimentant la croissance maligne et la différenciation (Dick, 2008; Kleinsmith and Pierce, 1964; Martello and Smith, 2014).

Les tératocarcinomes chez l'homme sont majoritairement des testicules, comme chez les souris 129/sv. Stevens a montré, chez les souris, que les ECs étaient issues des cellules primordiales germinales (PGCs) et qu'elles pouvaient être induites avec une grande efficacité par greffe des cellules germinales fœtales à des tissus adultes (Martello and Smith, 2014; Stevens, 1983). Cependant, les ECs ne ressemblent pas à des PGCs vu que ces dernières ne se différencient pas en tératocarcinomes. De nombreuses études *in vitro* ont montré que les cellules ECs présentent une morphologie similaire aux cellules d'ICM, et qu'elles sont capables d'engendrer des souris chimériques et de générer toutes les cellules somatiques correspondant aux trois lignages lorsqu'elles sont injectées dans un embryon puis transférer dans une souris pseudogestante (Brinster, 1974; Diwan and Stevens, 1976; Papaioannou *et al.*, 1975; Solter *et al.*, 1970; Stevens, 1968). D'où la naissance de l'idée que les ECs représentent l'équivalent malin des cellules de l'ICM (Martello and Smith, 2014).

### **1.1.2 Les Cellules Souches Embryonnaires murines (mESCs)**

La première dérivation des ESCs a été décrite dans le modèle murin par trois groupes dans les années 80 (Axelrod, 1984; Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981). Les ESCs murines sont

des cellules indifférenciées provenant de la masse cellulaire interne (ICM) de blastocystes au stade de pré-implantation de l'embryon (E3.5-E4.5). Elles sont caractérisées par ses capacités d'auto-renouvellement et de pluripotence (Fig.3-4).



**Figure 6: Les cellules souches embryonnaires (ESCs) d'origine ICM:** Schéma représentatif des différentes caractéristiques des ESCs: 1) L'autorenouvellement, 2) La pluripotence, 3) Présentent une activité Phosphatase Alcaline (PAL): AP+, 4) La capacité à former des tératomes, 5) Donnent naissance à une chimère une fois transplantées dans un blastocyste, avec une transmission à la lignée germinale (pour les mESCs).

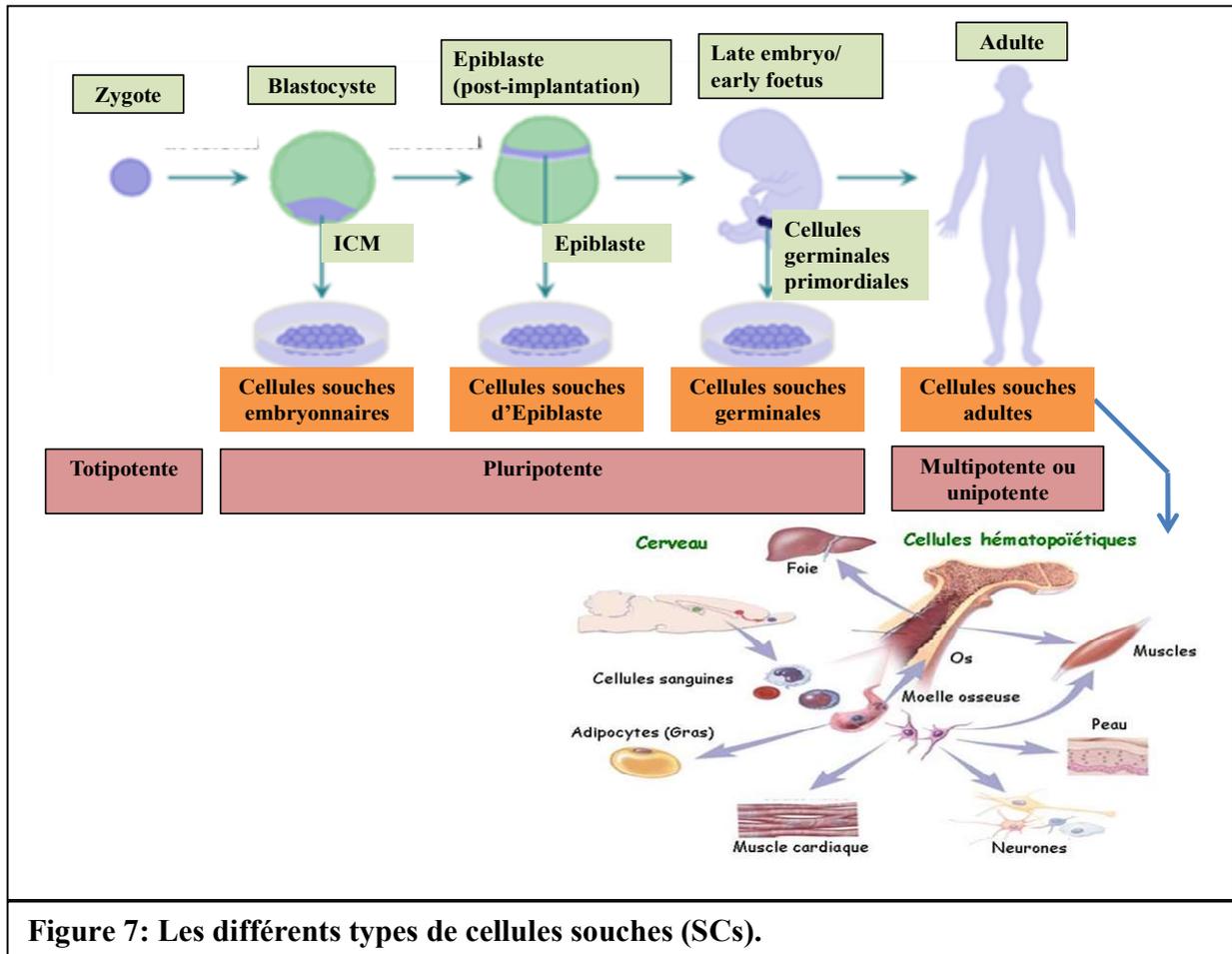


Figure 7: Les différents types de cellules souches (SCs).

## i Caractéristiques des mESCs

Les mESCs ont permis de définir les caractéristiques moléculaires et fonctionnelles des ESCs pour prouver leur « **Souchitude** » ou « **Stemness** » (en terme anglais, c'est-à-dire leur capacité à s'auto-renouveler et leur potentialités de différenciation) ainsi que leur « **Pluripotence** » (Smith and Hooper, 1987).

Les mESCs prolifèrent en formant des colonies compactes. Elles présentent un rapport nucléo-cytoplasmique élevé, ce qui est probablement dû à leur cycle cellulaire particulièrement rapide (12h-16h). Les mESCs sont génétiquement stables, elles peuvent être cultivées plusieurs mois sans présenter d'anomalies génétiques ou chromosomiques grâce à une forte activité télomérase (enzyme transcriptase inverse spécialisée permettant la conservation de la longueur du chromosome en ajoutant à l'extrémité 3' une séquence répétée de 6 nucléotides). Elles peuvent donc être cultivées à long terme sans atteindre de sénescence répliative.

Les mESCs ont une forte activité de la phosphatase alcaline que l'on peut utiliser comme marqueurs. Elles expriment des marqueurs de surface plus ou moins spécifiques comme la molécule d'adhésion E-Cadhérine et le Stage Specific Early Antigen 1 (SSEA1) (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981). Il est à noter que ces marqueurs de surface peuvent être utilisés pour isoler des populations cellulaires par cytométrie en flux. Elles supportent très bien la dissociation enzymatique à l'aide de la trypsine ainsi que l'ensemencement en cellule unique, et elles ont également un taux de clonogénicité proche de 100%. De plus, tout comme pour les cellules de l'ICM, seule la région distal de l'enhancer (DE) du facteur de transcription d'OCT4 (facteur centrale dans le noyau de la pluripotence) est active dans les mESCs (Yeom *et al.*, 1996). Une autre caractéristique propre aux mESCs concerne le statut des chromosomes X dans les lignées femelles. Les deux chromosomes X sont actifs (XaXa) à l'état indifférencié alors qu'il y a une inactivation aléatoire d'un chromosome X (XaXi) très tôt durant le processus de différenciation (Leahy *et al.*, 1999; Monk, 1981).

Les modifications épigénétiques concernant les histones sont une autre caractéristique des cellules mESCs. La tri-méthylation de la Lysine 4 de l'histone 3 (H3K4me3) est un signal activateur (Santos-Rosa *et al.*, 2003; Sims *et al.*, 2005) alors que la tri-méthylation de la Lysine 27 de l'histone 3 (H3K27me3) est répressif (Francis *et al.*, 2004; Ringrose *et al.*, 2004). La particularité des mESCs est l'existence de ces deux marques d'histones sur les promoteurs de gènes de lignage, nommées « marques bivalentes ». Le recrutement de complexe d'initiation de transcription est fait par H3K4me3 tandis que H3K27me3 bloque la transcription malgré la présence de tous les acteurs nécessaires. Les auteurs parlent d'un état « prêt pour l'action » (Bernstein *et al.*, 2006). La présence de ces « marques bivalentes » sur les gènes spécifiques de lignages facilite leur activation lors de l'initiation de différenciation.

## ii Mise en évidence de la pluripotence dans les ES murines : *in vitro* et *in vivo*

Plusieurs tests permettent de vérifier la pluripotence des mESCs. Les mESCs se caractérisent par leur capacité à se différencier vers les trois feuillets embryonnaires *in vitro* et *in vivo*. La capacité *in vitro* est évaluée en analysant les types cellulaires présents dans les structures tridimensionnelles obtenues après la mise en culture des mESCs sur un support empêchant leur adhérence, c'est-à-dire quand elles sont cultivées en suspension soit dans des gouttes suspendues de milieu de culture (Hanging drop), soit dans des boîtes de culture ne favorisant pas l'adhésion de ces cellules (comme les boîtes de pétri pour bactéries). Les structures obtenues sont appelées

corps embryoides (ou EBs pour « Embryoid bodies »). La capacité *in vivo* est mesurée par la formation des tératomes composés des cellules dérivées des trois feuillets embryonnaires (endoderme, mésoderme et ectoderme). L'injection des mESCs en sous cutanée ou dans les testicules ou la capsule rénale d'une souris immunodéficiente conduit à la formation d'un tératome (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981).

De plus, la pluripotence est caractérisée par la capacité de formation des chimères avec une transmission germinale. Cette propriété est établie en injectant des mESCs génétiquement modifiées dans un blastocyste, puis en implantant ce blastocyste dans une souris pseudo-gestante. Il en résulte la formation de chimères composées d'un mélange de cellules provenant de l'ICM du blastocyste hôte et des mESCs injectées (Bradley *et al.*, 1984; Evans *et al.*, 1985; Robertson *et al.*, 1986).

La compétence pour la transmission de la lignée germinale signifie que les cellules ES peuvent être utilisées comme véhicule pour introduire des modifications génétiques dans des souris (Robertson *et al.*, 1986). Elles sont permissives à toutes les approches de manipulation génétique standard comme la Recombinaison Homologue (RH), particularité rendant les stratégies de Knock-in et Knock-out possibles. En 1989, la première souris KO a été générée avec une mutation ciblée de gène *Hprt1* (cette souris a constitué un modèle pour la maladie de Lech-Nyhan) dans les ESCs (Koller *et al.*, 1989). La modélisation de génomes des ESCs est rapidement devenue une technique omniprésente dans la génétique de la souris (Capecchi, 2005). Le prix Nobel de médecine en 2007 a été attribué aux Américains Mario Capecchi et Oliver Smithies, ainsi qu'au Britannique Martin Evans, pour cette découverte.

Enfin, le test de complémentarité d'embryons tétraploïdes est le test *in vivo* le plus rigoureux pour déterminer la pluripotence d'une lignée mESC. Dans ce test, les cellules sont injectées dans le blastocyste hôte 4n (suite à la fusion de 2 blastomères au stade 2 cellules). En effet, les cellules tétraploïdes de ce blastocyste récepteur sont uniquement capables de former le trophoctoderme et les tissus extra-embryonnaires, et donc ne participent pas aux différents lignages embryonnaires (Coulombel, 2009; Doetschman *et al.*, 1988). Ainsi, seules les mESCs injectées seront à l'origine de l'organisme entier. Dans ce cas, il n'y a pas de chimères.

Toutes ces capacités et ces caractéristiques définissent les mESCs comme un outil incontournable et la souris comme le modèle animal le plus utilisé à l'heure actuelle.

### **iii Culture *in vitro* des mESCs: capacité d'auto-renouvellement**

Les premières lignées de cellules mESCs ont été cultivées en présence de sérum de veau foetal (FBS) sur cellules nourricières, les MEFs (Murin Embryonic Fibroblasts) qui constituent un support pour les mESCs et libèrent des facteurs indispensables à la croissance et au maintien de l'état indifférencié de celles-ci. Parmi les facteurs libérés par les MEFs, il a été identifié une cytokine, le LIF (pour Leukemia Inhibitory Factor) (Trouillas *et al.*, 2009a; Williams *et al.*, 1988). Aussi, la culture *in vitro* des mESCs sans MEFs est possible après traitement des boîtes de culture avec un composé tel que la gélatine permettant l'attachement nécessaire de ces cellules, en présence de sérum et en ajoutant dans le milieu de culture cette cytokine. Le LIF en agissant sur son récepteur hétérodimerique active la voie JAK1/STAT3/SOCS3 (voie essentielle pour le maintien de l'auto-renouvellement des mESCs). Il faut noter que le récepteur murin a plus d'affinité pour le LIF humain que pour son orthologue murin, c'est pourquoi le LIF humain est préférentiellement utilisé pour maintenir les mESCs en culture.

Ying et Smith ont montré qu'en absence de sérum, le LIF réduit mais n'empêche pas la différenciation des mESCs vers les voies neuronales et que l'ajout de BMP4 pouvait remplacer le FBS en inhibant ce type de différenciation (Ying and Smith, 2003). De plus, il a été montré que la voie BMP4/SMAD1,5,8 (effecteur de la voie BMP, Bone Morphogenetic Protein) permet d'activer les gènes *Id* qui bloquent la différenciation en neuroectoderme. Aussi, les mESCs peuvent être cultivées dans un milieu de base (N2B27) en absence de FBS et de MEFs, par l'ajout de LIF et de BMP4.

Ces résultats ont conduit au modèle suivant: la voie LIF/STAT3 prévient la différenciation des cellules en mésoderme et endoderme (Bourillot *et al.*, 2009) alors que la voie BMP4/SMAD/ID bloque la différenciation en neuroectoderme (Ying *et al.*, 2003a). Ces deux facteurs de croissance, LIF et BMP4, sont donc nécessaires et suffisants pour promouvoir de l'auto-renouvellement des mESCs. De plus, l'activation de la voie canonique WNT par la molécule BIO [6-bromoindirubin-3-oxime, inhibiteur chimique de la GSK3 $\beta$  (glycogène synthasekinase3 $\beta$ )] a montré que la voie WNT/ $\beta$ -Caténine permet également le maintien de cet auto-renouvellement (Sato *et al.*, 2004). Enfin, en 2013, il a été montré que l'ajout de MMP1 (nommée aussi interstitial collagenase et fibroblast collagenase) était suffisante au maintien de l'auto-renouvellement des mESCs en absence de LIF (Przybyla *et al.*, 2013).

Malgré toutes ces connaissances, la dérivation de ces cellules est restée inefficace et a été limitée à quelques souches de souris pendant de nombreuses années. En effet, le système de culture des mESCs est fortement dépendant de leur contexte génétique. Il existe deux types de

cellules souches murines: les souches dites «permissives » qui incluent les 129/sv ou les BALB/c et souches dites « non permissives », comme C57BL6, CBA, NOD, DBA et FVB (Brook and Gardner, 1997; Cinelli *et al.*, 2008; Ohtsuka and Niwa, 2015). Cependant, l'efficacité de dérivation des cellules souches permissives était au mieux de 30% (déterminé par le pourcentage d'embryons donnant naissance à des lignées stables de mESCs). Pour surmonter les limitations de la dérivation de cellules mES, une variété d'approches ont été utilisées. Par exemple, fondée sur l'idée que la présence d'endoderme primitif a causé la perte de la pluripotence des progéniteurs des mESCs dans l'ICM, l'excision soignée de l'épiblaste par biopsie ou immuno-chirurgie a permis l'amélioration de l'efficacité de dérivation (Brook and Gardner, 1997; Handyside *et al.*, 1989). En outre, depuis de nombreuses années, le retard de l'implantation, l'induction de diapause par ovariectomie ou l'injection de tamoxifène ont également été utilisés pour promouvoir l'efficacité de dérivation éventuellement à un stade de développement au cours duquel l'épiblaste a eu l'occasion de se développer.

L'identification des gènes nécessaires au maintien de la pluripotence et à la spécification précoce des lignages a amélioré les protocoles de la dérivation des mESCs. Ainsi, des stratégies d'induction ou d'inhibition de l'expression des gènes spécifiques ont été développées. Par exemple, il a été montré que la perte d'*Oct4* altère l'établissement des lignées stables de mESCs (Buehr and Smith, 2003). Sur la base de cette découverte, des conditions de culture qui favorisent l'induction d'*Oct4*, comme l'inhibition de la voie MAPK/ERK (Mitogen Activated Protein Kinase/ Extracellular Regulated Kinase, voie induite par le LIF mais inhibant l'auto-renouvellement des mESCs) ont été introduits. Cependant, la réussite de la dérivation des mESCs « non permissives » comme CBA, nécessite toujours une combinaison de l'induction de la diapause, l'excision de l'épiblaste et l'inhibition de la MAPK/ERK par PD98059 (inhibiteur de la voie MAPK). Ces modifications des protocoles de dérivation des mESCs ont augmenté l'efficacité d'obtention de CBA à 25%, une avancée significative pour une lignée de souris « non permissive » (Buehr and Smith, 2003; Martello and Smith, 2014; Ohtsuka and Niwa, 2015).

Enfin, des cultures sans sérum contenant des inhibiteurs de la GSK3 $\beta$  et la protéine MAPK (2i) ont amélioré de manière remarquable les conditions de culture pour toutes les lignées de souris quel que soit leur origine génétique (Nichols *et al.*, 2009a; Ying *et al.*, 2008a). Ainsi, la combinaison de 2i avec le LIF (2iLIF) est plus appropriée que 2i seul (Kiyonari *et al.*, 2010; Ohtsuka and Niwa, 2015).

### 1.1.3 Les ESCs dans le modèle humain (hESCs)

En 1998, les premières lignées de cellules souches humaines (hESCs) ont été établies par l'équipe de Thomson qui a réussi à isoler, à multiplier et à maintenir en culture à l'état indifférencié ces cellules (Thomson *et al.*, 1998). L'établissement des hESCs a été relativement tardif par rapport aux mESCs. Ceci peut s'expliquer notamment par le fait que l'auto-renouvellement des hESCs et des mESCs dépend de facteurs différents. Les hESCs sont établies à partir d'embryons surnuméraires au stade post-implantatoire de blastocyste (5<sup>ème</sup> et 7<sup>ème</sup> jour après la fécondation) suite à des tentatives de fécondation *in vitro* (FIV) pour des couples stériles. Elles sont caractérisées, comme les mESCs, par leurs capacités d'auto-renouvellement et de pluripotence (Fig.6-7).

#### i Caractéristiques des hESCs

Les colonies de hESCs ont une morphologie très plate et étalée. Les hESCs sont amplifiées par dissociation mécanique en amas et supportent difficilement la dissociation enzymatique à la trypsine. Elles possèdent une forte activité télomérase et phosphatase alcaline. Les hESCs sont génétiquement stables et elles peuvent être cultivées au moins un an sans avoir d'anomalies génétiques (Amit *et al.*, 2000). La pluripotence des hESCs est évaluée par la présence de marqueurs tels que les facteurs de transcription OCT4 et NANOG (facteur de transcription appartenant comme OCT4 au noyau de la pluripotence), les marqueurs de surface comme SSEA3 et SSEA4 (Stage Specific Early Antigen 3 et 4, qui sont des gangliosides), TRA-1-60 et TRA-1-81 (protéoglycannes) et par leur capacité à se différencier *in vitro* en formant des EBs. Elles se différencient également *in vivo* en formant de tératomes chez la souris (Reubinoff *et al.*, 2000; Thomson *et al.*, 1998). Dans les hESCs, l'inactivation du chromosome X est un sujet controversé et dépend souvent des lignées et des conditions de culture (Hall *et al.*, 2008; Shen *et al.*, 2008).

En 2010, Lengner a montré que les hESCs cultivées en condition de faible concentration d'oxygène [5% O<sub>2</sub>] possèdent deux chromosomes X actifs (XaXa). Les limites éthiques imposées par la manipulation des hESCs empêchent les tests *in vivo* pour vérifier leur pluripotence par la capacité de coloniser le blastocyste. C'est alors le test du tératome et l'apparition de cellules des trois feuillets germinaux dans les tumeurs qui ont permis d'affirmer la pluripotence des hESCs (Lengner *et al.*, 2010).

## ii Culture *in vitro* des hECSs: maintien de l'auto-renouvellement

Les premières lignées hECSs établies par Thomson (H, H7, H9, H13 et H14) ont été cultivées sur des MEFs et en présence de 20% FBS. Bien qu'encore certains laboratoires utilisent les composants d'origine animale comme les MEFs et le sérum pour la culture des hECSs, ce protocole présente des inconvénients et il est incompatible dans l'optique d'une utilisation en thérapie cellulaire. Donc, il est nécessaire de s'affranchir de tous risques de contamination liés à l'utilisation des composants d'origine animale. Dans ce but, plusieurs stratégies ont été développées: (i) d'une part concernant le support d'attachement nécessaire aux hECSs, les MEFs ont été remplacés par l'utilisation des cellules nourricières d'origine humaine ou par le traitement des boîtes de culture avec des composés tels que la laminine, la fibronectine ou plus récemment un mélange des protéines (Amit *et al.*, 2003, 2004; Pfeiffer *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2001), (ii) d'autre part le sérum FBS a été remplacé par du sérum d'origine humaine, puis par des milieux chimiquement définis récemment développés (par exemple, le milieu KOSR : KO-DMEM+20% de Remplacement Sérum) (Li *et al.*, 2005; Pfeiffer *et al.*, 2010; Richards *et al.*, 2002). Par ailleurs, certaines substances facilitant la culture des hECSs peuvent être ajoutées au milieu de culture, comme le composé Y-27632, inhibiteur de ROCK (pour Rho-associated kinase) pour inhiber l'apoptose induite lors de la dissociation mécanique et/ou enzymatique (collagénase, trypsine) de ces cellules (Watanabe *et al.*, 2007).

Contrairement aux mECSs, le maintien des hECSs à l'état indifférencié est indépendant des facteurs LIF et BMP4/SMAD1,5,8. Ce sont les voies ACTIVINE/NODAL et FGF2 (Fibroblast Growth Factor) qui permettent le maintien pluripotent des hECSs (Humphrey *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2002). Le BMP4 induit la différenciation des hECSs en cellules du trophectoderme et son inhibition par l'utilisation de Noggin (son antagoniste) et la Dorsomorphine (un inhibiteur pharmacologique de BMP4) bloque la différenciation des hECSs (Gonzalez *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2002).

De plus, il a été montré que les dimères actifs de STAT3 dans le noyau des hECSs n'ont pas d'effet sur la pluripotence (Dahéron *et al.*, 2004). Aussi, l'auto-renouvellement des hECSs est maintenu par l'activation de la voie WNT/ $\beta$ -Caténine par l'inhibition pharmacologique de la GSK3 $\beta$  (Sato *et al.*, 2004). Cependant, l'activation de la voie WNT seule n'est pas suffisante pour maintenir les hECSs à l'état indifférencié (James *et al.*, 2005).

#### 1.1.4 Les Cellules Souches Epiblastiques dans le modèle murin (mEpiSCs)

Depuis l'établissement des premiers ESCs en 1981, un autre type de cellules a pu être stabilisé en culture, appelé Epiblast Stem Cells ou EpiSCs. Les mEpiSCs ont été établies la première fois en 2007 par deux équipes (Brons *et al.*, 2007; Tesar *et al.*, 2007). Elles ont été dérivées à partir de l'épiblaste post-implantatoire (E5,5-E7) (**Fig.7**) chez différentes lignées de souris, ou à partir des ESCs *in vitro* (Guo *et al.*, 2009).

##### i Caractéristiques des mEpiSCs

Les mEpiSCs partagent plusieurs caractéristiques avec les hESCes ce qui a rendu leur étude essentielle pour mieux comprendre le modèle humain. Ces cellules se multiplient en formant des colonies ayant la même morphologie que les hESCes, elles sont plates et plus étalées que celles issues des mESCes. Elles ne supportent pas la dissociation enzymatique par la trypsine, comme les hESCes, et nécessitent un repiquage manuel pour leur expansion clonale ce qui rend leur taux de clonogénicité faible (Tesar *et al.*, 2007).

Des analyses de transcriptome ont montré que les mEpiSCs étaient plus proches de leur tissu original, l'épiblaste, que de l'ICM dont sont issues les mESCes. Bien que les mEpiSCs expriment les gènes de pluripotence *Nanog*, *Oct4* (seule la partie proximale de l'enhancer PE d'OCT4 est actif) et *Sox2*, à un niveau comparable aux mESCes, elles n'expriment pas d'autres marqueurs comme *Rex1* (*Zfp42*), *Dax1* (*Nrb01*), *Pecam*, *Gbx2* ou *Tbx3*. Elles expriment davantage les marqueurs d'épiblaste comme *Fgf5* et *Nodal* mais également certains gènes de différenciation précoce à un niveau plus élevé que dans les mESCes comme *Otx2*, *Eomes*, *Foxa2*, *Brachyury* (T), *Gata6*, *Sox17* et *Cer1* (Brons *et al.*, 2007; Rossant, 2008; Tesar *et al.*, 2007; Yeom *et al.*, 1996).

La pluripotence des mEpiSCs a été démontrée par leur capacité de se différencier en trois feuillets embryonnaires, *in vitro* par la formation de corps embryoïdes (EBs) et *in vivo* par la formation de tératomes. En revanche, elles sont incapables de coloniser la masse interne des blastocystes et donc de participer à la formation des chimères (Brons *et al.*, 2007; Tesar *et al.*, 2007). Cette incapacité pourrait s'expliquer par l'origine plus tardive des mEpiSCs au cours du développement, le stade post-implantatoire. Récemment, il a été montré que les mEpiSCs surexprimant la E-Cadhérine contribuent à des chimères lors de leur injection dans le blastocyste d'une souris, mais les mécanismes restent inconnus, et aucune contribution de ces cellules à la

lignée germinale n'a été observée (Ohtsuka *et al.*, 2012). De plus, des mEpiSCs injectés dans l'embryon à E7.5 s'incorporent dans l'hôte et contribuent aux tissus chimériques (Huang *et al.*, 2012).

Contrairement aux mESCs, les mEpiSCs ne présentent pas les deux chromosomes X actifs dans la lignée femelle (XaXi) (Huang *et al.*, 2012). L'établissement des mEpiSCs à partir d'embryons de souris au stade post-implantatoire et leur ressemblance avec les hESCs ont fait naître l'hypothèse que les hESCs seraient en réalité issues de l'épiblaste. Cette différence temporelle expliquerait les nombreuses divergences observées entre les ESCs murines et humaines.

## ii Culture *in vitro* des mEpiSCs: maintien de l'auto-renouvellement

Comme les hESCs, la dérivation des mEpiSCs dépend de la voie ACTIVINE/NODAL et du facteur de croissance FGF2, mais pas du LIF ni de BMP4 contrairement aux mESCs. Elles peuvent être stabilisées soit sur la fibronectine, dans un milieu chimiquement défini supplémenté avec du FGF2 et de l'ACTIVINE A (Brons *et al.*, 2007), soit sur les MEFs dans un milieu contenant un cocktail de facteurs sériques de remplacement (KO-SR) supplémenté avec du FGF2 (Tesar *et al.*, 2007). L'inhibition pharmacologique de la voie LIF (JI: Inhibiteur de JAK qui abroge la phosphorylation du STAT3 au Y705 en réponse au LIF) n'induit aucune modification du phénotype, alors qu'une inhibition de la voie ACTIVINE A induit la différenciation des mEpiSCs (Brons *et al.*, 2007; Tesar *et al.*, 2007).

### 1.1.5 Les Cellules Souches embryonnaires germinales (EGC) et PGCs

Après la gastrulation, seules les cellules germinales primordiales (PGCs) (**Fig.7**) conservent des caractéristiques de pluripotence (même si elles sont unipotentes au sein de l'organisme dans lequel elles sont formées), puisqu'elles sont à l'origine d'un individu entier à la génération suivante (Matsui *et al.*, 1992). Les cellules EGCs (Embryonic Germ Cells) ont été établies à partir des PGCs de souris aux stades E8.5 et E12.5 en présence du facteur de cellules souches (SCF), LIF et bFGF, chez la souris et chez l'homme (Guan *et al.*, 2006; Matsui *et al.*, 1992; Shambloott *et al.*, 1998). A ce stade, les PGCs expriment des marqueurs de pluripotence tels que

OCT4, NANOG et SOX2 (Leitch *et al.*, 2013; Ying *et al.*, 2008b). Les PGCs *in vitro* peuvent donner des EGCs, alors qu'*in vivo*, elles donnent exclusivement des gamètes.

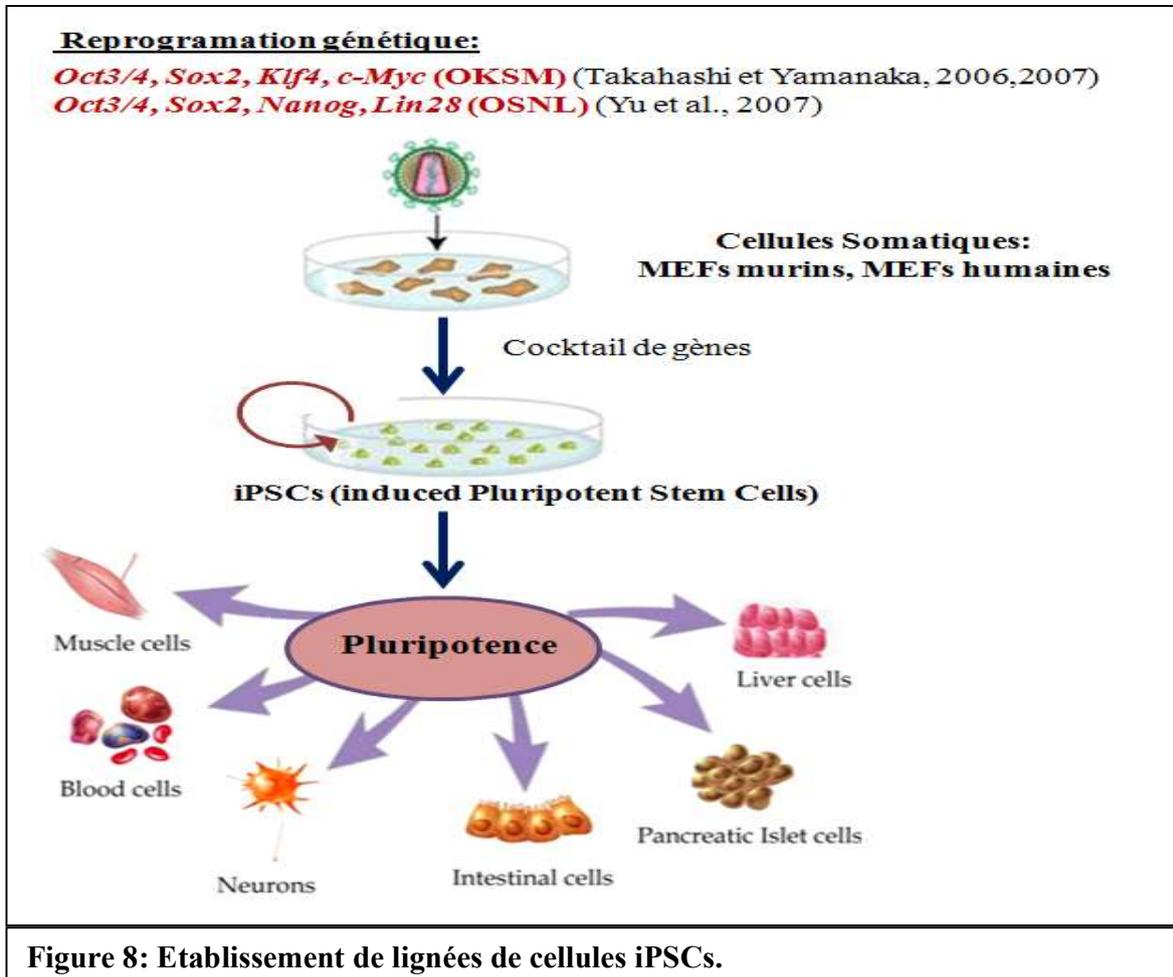
Il est toujours possible d'établir des EGCs, au-delà du stade E12.5, mais avec une fréquence moindre. Les EGCs semblent hériter des modifications épigénétiques présentes dans les PGCs dont elles sont issues rendant leur transmission germinale difficile, et la majorité des chimères obtenues présentent des anomalies squelettiques typiques de la présence de défauts de l'empreinte génomique (Labosky *et al.*, 1994). De plus, elles sont pluripotentes et sont indistinguables des ESCs en dehors de leur origine et dans certains cas, par la perte d'empreintes génomiques (Leitch and Smith, 2013).

## 1.2. Les Cellules souches pluripotentes induites (iPSCs)

Suite aux travaux de transfert nucléaire d'une cellule somatique dans l'ovocyte (NT-ES) (Briggs and King, 1952; Wilmut *et al.*, 1997), l'idée est née que le cytoplasme de l'ovocyte contient des facteurs permettant de reprogrammer la chromatine de cellules somatiques jusqu'à atteindre la totipotence (Gurdon and Byrne, 2003). En 2006, Yamanaka et son équipe, ont cherché à définir quels facteurs étaient nécessaires pour reprogrammer une cellule différenciée. En testant l'effet de plusieurs cocktails, ils ont déterminé le cocktail minimum suffisant constitué de 4 facteurs parmi les 24 sélectionnés, au début sur la base de leur rôle essentiel dans la régulation de la pluripotence et des modifications épigénétiques. Ainsi, la combinaison des facteurs *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* et *c-Myc* (OKSM) est suffisante pour reprogrammer des MEFs murins et humains en cellules iPSCs (Takahashi and Yamanaka, 2006; Takahashi *et al.*, 2007). Le groupe de James Thomson a également généré des lignées d'iPSCs humaines en utilisant une combinaison différente de facteurs: *Oct3/4*, *Sox2*, *Nanog* et *Lin28* (Yu *et al.*, 2007) (**Fig.8**). Par la suite, les techniques de reprogrammation ont subi plusieurs modifications dans le but d'atteindre une meilleure reprogrammation des iPSCs avec une meilleure efficacité.

Les cellules souches pluripotentes induites (induced Pluripotent Stem Cells, iPSCs), sont issues de cellules adultes de peau, du foie, de l'estomac ou d'autres cellules matures grâce à l'introduction de gènes capables de reprogrammer ces cellules pour les transformer en cellules qui ont toutes les caractéristiques de cellules souches embryonnaires pluripotentes.

Les iPSCs humaines ouvrent des perspectives prometteuses pour leur utilisation en thérapie ou comme modèle biologique surmontant ainsi les questions éthiques et le manque de tissu, tout en évitant le risque de rejet en raison de l'incompatibilité immunologique.



## 2. Les différents états de pluripotence

L'état fondamental (nommé encore état « ground ») est défini comme l'état dans lequel les cellules sont indépendantes de toute spécification développementale ou de restriction épigénétique et ont la capacité de s'auto-renouveler de manière complètement autonome. L'état fondamental existerait naturellement dans le développement embryonnaire des mammifères et serait représenté par les cellules de l'épiblaste précoce, mais il peut également être stabilisé en culture dans certaines conditions. Depuis longtemps, la pluripotence a été caractérisée et définie par les mESCs qui représentent le « Gold Standard » des cellules souches pluripotentes. Cependant, l'obtention plus récente des EpiSCs a permis de définir un autre état de pluripotence,

différant tant au niveau moléculaire que fonctionnel. On parle aujourd'hui de 3 états: l'état « ground » pour représenter les cellules de la masse cellulaire interne (ICM) du blastocyste, « l'état naïf » représenté par les mESCs et l'état amorcé (ou primed) représenté par les EpiSCs et les hESCs.

## 2.1. Etat fondamental ou état ground de la pluripotence

Les mESCs secrètent le facteur FGF4 de manière autocrine (Ma *et al.*, 1992) mais il n'est pas requis pour le maintien de l'auto-renouvellement (Burdon *et al.*, 1999). Au contraire, l'inhibition pharmacologique du récepteur au FGF4, ou l'inactivation du gène *Fgf4* (mESCs *Fgf4*<sup>-/-</sup>), rend les mESCs moins sensibles aux signaux de différenciation (Kunath *et al.*, 2007). De plus, les mESCs *Erk2*<sup>-/-</sup> sont réfractaires à la différenciation *in vitro* en neuroectoderme et mésoderme (Kunath *et al.*, 2007). Les auteurs concluent que la voie FGF4/ERK1/2 permet d'induire le passage des mESCs à l'état d'engagement, état nécessaire dans l'embryon pour initier les programmes de différenciation permettant le développement (Kunath *et al.*, 2007; Stavridis *et al.*, 2007). A l'inverse, l'inhibition de la voie FGF/ERK permet le maintien des mESCs dans un état proche de l'état « ground » de pluripotence.

L'inhibition des voies de signalisation MEK/ERK et glycogène synthase kinase-3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) par l'utilisation d'un mélange de trois inhibiteurs (3i: PD184353, PD173074/SU5402 et CHIR99021 respectivement) combinée avec l'activation de STAT3 par le LIF (3i/LIF), est suffisant pour promouvoir l'état « ground » de pluripotence des ESCs provenant de souris et de rats (Buehr *et al.*, 2008; Coronado *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2008; Ying *et al.*, 2008a).

En résumant, l'état « ground » peut être obtenu *in vitro*, en cultivant les mESCs en présence de 3i/LIF et 2i/LIF en présence de sérum (**Fig.9**) :

3i/LIF = FGF<sub>i</sub> (SU5402) + MEK<sub>i</sub> (PD184352) + GSK3 $\beta$ <sub>i</sub> (CHIR99021) + LIF

2i/LIF = MEK<sub>i</sub> (PD184352) + GSK3 $\beta$ <sub>i</sub> (CHIR99021) + LIF

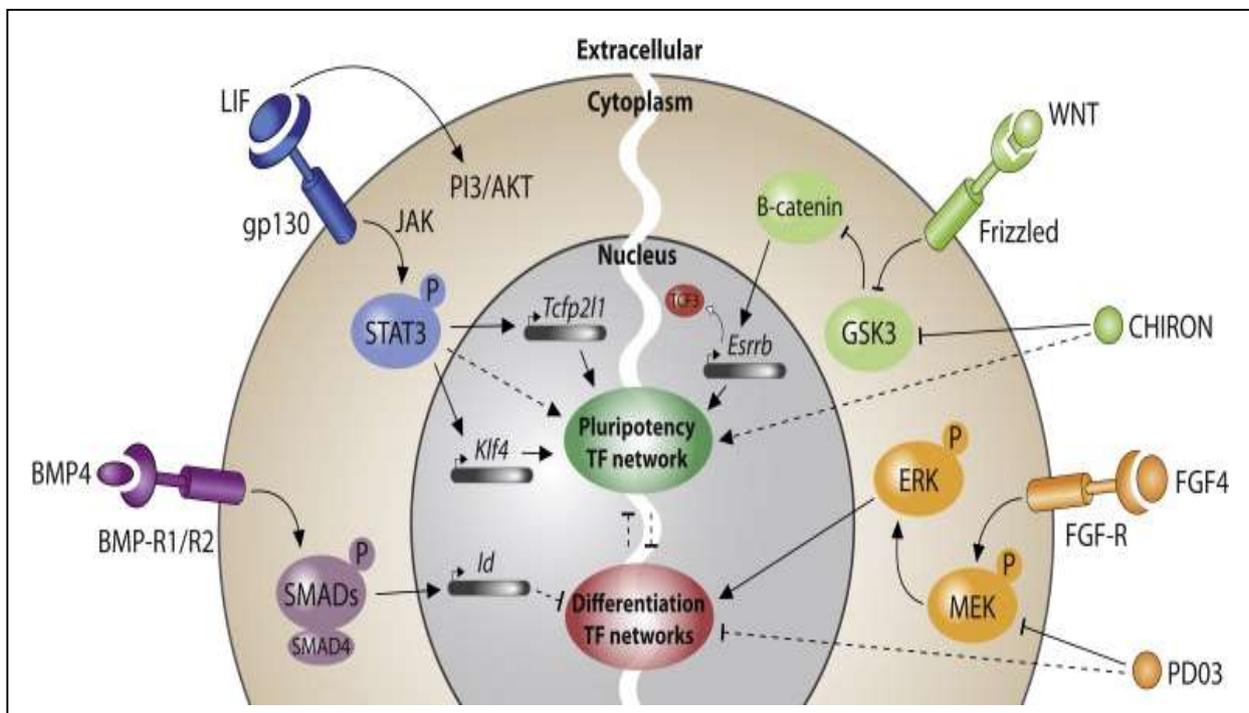
Aussi, les deux conditions, 3i/LIF et 2i/LIF, ont été appliquées avec succès pour la dérivation efficace de lignées mESCs compétentes pour coloniser la lignée germinale (50-70%) à partir de cellules souches non-permissives comme NOD, CBA et DBA (Hanna *et al.*, 2009; Nichols *et al.*, 2009a; Reinholdt *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2008).

De plus, l'utilisation d'un milieu chimiquement défini (sans sérum), N2B27, (Ying and Smith, 2003; Ying *et al.*, 2003a) supplémenté d'inhibiteurs chimiques spécifiques est aussi approprié pour la culture des cellules dans l'état « ground » :

3i/N2B27 = FGFi (SU5402) + MEKi (PD184352) + GSK3βi (CHIR99021) + N2B27

2i/ N2B27 = MEKi (PD184352) + GSK3βi (CHIR99021) + N2B27

Les cellules cultivées en milieu 2i/3i possèdent toutes les caractéristiques de cellules naïves et sont capables de produire des chimères et de coloniser la lignée germinale. Les cellules sont maintenues en culture sans cellules nourricières, sans sérum et sans LIF. De plus, ces travaux révèlent que les cellules *Stat3*<sup>-/-</sup> peuvent être cultivées dans ces conditions (Ying *et al.*, 2008b). Ceci semble montrer que les cellules sont indépendantes de tous signaux extérieurs et qu'elles possèdent un programme d'auto-renouvellement autonome. De même, ils concluent que, dans le milieu 2i/3i, les cellules s'auto-renouvellent à l'état « ground » de la pluripotence.



**Figure 9: Schéma simplifié de diverses cascades de signalisation qui renforcent ou antagonisent l'état « ground » de Pluripotence (milieu 2i+LIF):** BMP4 est présent dans le sérum et fonctionne via les protéines SMADs pour activer les gènes *Id*. La signalisation LIF affecte de nombreuses voies mais agit principalement par la phosphorylation médiée par JAK/STAT3, qui active *Tcfp211* et *Klf4*. La voie canonique Wnt bloque des signalisations conduisant à l'activité de GSK3β et à la stabilisation de la β-caténine, qui à son tour abroge la répression de gènes de pluripotence dont *Esrrb* médiée par TCF3. L'inhibiteur CHIRON imite étroitement la signalisation Wnt en inhibant la GSK3β. La signalisation FGF active la voie MAPK menant à la phosphorylation de la MEK, qui à son tour phosphoryle et active ERK. ERK activé favorise la transition vers l'état « primed », qui est donc bloqué par l'inhibiteur de MEK, le PD03. Les flèches pleines indiquent une activation, les barres montrent l'inhibition ou le blocage de l'activité cible, la ligne solide implique une cible directe ou une cible connue en aval, et la ligne pointillée indique un effet indirect ou présumé. Photo issue de Hackett and Surani, 2014.

## 2.2. Etat naïf de la pluripotence

### 2.2.1 Origine et établissement de l'état naïf de la pluripotence

Le développement embryonnaire est une progression dynamique et l'auto-renouvellement n'apparaît pas rapidement dans l'embryon précoce de mammifères. Cela soulève la question: que sont exactement les cellules ES?

La capacité des ESCs à coloniser un blastocyste renforce l'idée que les modifications subies dans la culture doivent être réversibles et que les ESCs sont fonctionnellement équivalentes aux cellules de l'embryon précoce (état « ground »). En 1997, il avait été montré que l'efficacité de dérivation des lignées mESCs était fortement augmentée si on utilisait l'épiblaste du blastocyste péri-implantatoire (E4.5) au lieu de l'ICM du blastocyste à E3.5 (Brook and Gardner, 1997). L'efficacité observée avec l'épiblaste E4.5 peut atteindre 100% ce qui permet de penser que l'épiblaste de l'embryon E4.5 est le véritable tissu fondateur des mESCs. Alors que les cellules de l'ICM (E3.5) peuvent donner naissance à des cellules ESCs dans le milieu sérum+LIF et très facilement dans 2i+LIF (Nichols *et al.*, 2009a, 2009b). Les cellules ES ressemblent à l'épiblaste naïf à E4.5 (aussi appelé ectoderme primitif, PrE) (Brook and Gardner, 1997; Nichols and Smith, 2011, 2012). L'analyse de signatures moléculaires des cellules confirme cette hypothèse. Il a été montré que seul un petit nombre de cellules participe à l'établissement d'une lignée (Buehr *et al.*, 2003).

Il a été suggéré que les cellules embryonnaires peuvent subir une reprogrammation transcriptionnelle et/ou épigénétique pour acquérir l'auto-renouvellement (Tang *et al.*, 2010). Tang et son groupe ont analysé le transcriptome des cellules de l'ICM à E3.5 et de l'épiblaste à E4.5 par la technique "Single-Cell RNA seq", puis ils ont comparé les données obtenues avec celles de mESCs en culture (Tang *et al.*, 2010). Ils ont montré que, lors de la dérivation en milieu FBS/LIF, des changements importants s'opéraient et que les cellules suivaient un programme commun. Les gènes *Ifitm3*, *Blimp1*, *Prdm14* et *Vasa*, dont l'expression est associée à l'engagement précoce dans le lignage germinale, étaient fortement activés durant les premières phases de la dérivation. Ils ont proposé l'idée de l'existence d'une transition simple et directe entre les cellules de l'ICM et les mESCs *in vitro* en passant par un état transitoire ressemblant à celui des PGCs avant de se stabiliser en cellules mESCs (Tang *et al.*, 2010). Leurs résultats indiquent

que la majorité des cellules de l'ICM passerait par un état transitoire "PGCs-like" avant de devenir des mESCs.

En résumé, les cellules de l'épiblaste précoce (ou épiblaste naïve à E4.5 de blastocyste tardif) seraient à l'origine des mESCs dont la stabilisation en culture passe par un état transitoire "PGCs-like".

## 2.2.2 Etat naïf de la pluripotence, un état métastable et hétérogène

L'état naïf de pluripotence est celui des mESCs dérivées de l'épiblaste précoce du stade pré-implantatoire de blastocyste, qui s'auto-renouvellent dans des conditions standard de culture (FBS/BMP4 + LIF) (Ying *et al.*, 2003a). Bien que la culture des mESCs semble homogène, différentes analyses ont mis en évidence une « hétérogénéité cellulaire » aussi bien au niveau ARN que protéique (Garter 2008; Toyooka *et al.*, 2008). De plus, des analyses plus récentes effectuées avec les techniques d'analyses transcriptomiques de cellules isolées « Single-Cell analysis » (Herberg *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2014), ont montré qu'il existe différentes sous-populations de cellules caractérisées par l'expression de marqueurs comme *Rex1* (*Zfp42*) (Garter 2008; Toyooka *et al.*, 2008), *Stella* (*Dapp3*) (Garter 2008; Hayashi *et al.*, 2008), *Pecam1* (platelet endothelial Cell adhesion molecule-1) (Furusawa *et al.*, 2004; Garter 2008), *Zscan4* (marqueur des mESCs pluripotentes jouant un rôle clé dans la stabilité du génome dans les cellules ES en régulant l'allongement des télomères) (Falco *et al.*, 2007; Garter 2008; Zalzman *et al.*, 2010) et *Nanog* (Chambers *et al.*, 2007; Herberg *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2007). Par contre, l'expression d'*Oct4* est stable et homogène dans toutes ces analyses.

Il ressort de ces travaux qu'il existe des sous-populations positives et négatives pour ces marqueurs qui seraient fonctionnellement différentes. Cependant, l'état de ces sous-populations n'est pas stable et définitif. Au contraire, les cellules fluctuent spontanément d'un état à l'autre. Ceci a engendré les notions de métastabilité (Silva and Smith, 2008) ou équilibre dynamique de l'état naïf (Hayashi *et al.*, 2008) (**Fig.10**). Quelques exemples de fonctionnalités différentes de ces sous-populations sont donnés ci-dessous :

- *Rex1*: les mESCs *Oct4*<sup>+</sup>/*Rex1*<sup>+</sup> expriment les facteurs de transcription de la pluripotence naïve à des niveaux 5 à 10 fois plus élevés que les cellules *Oct4*<sup>+</sup>/*Rex1*<sup>-</sup> qui expriment certains marqueurs de différenciation précoce comme *Fgf5*, *Sox17* et *T* (*Brachyury*) (Toyooka *et al.*, 2008). De plus, seules les cellules *Rex1*<sup>+</sup> (ou *Rex1*<sup>high</sup>) ont la capacité de former des embryons chimères (état

« ground »), alors que les cellules *Rex1*<sup>-</sup> (ou *Rex1*<sup>low</sup>) sont plus proches de l'engagement vers la différenciation (Herberg *et al.*, 2014).

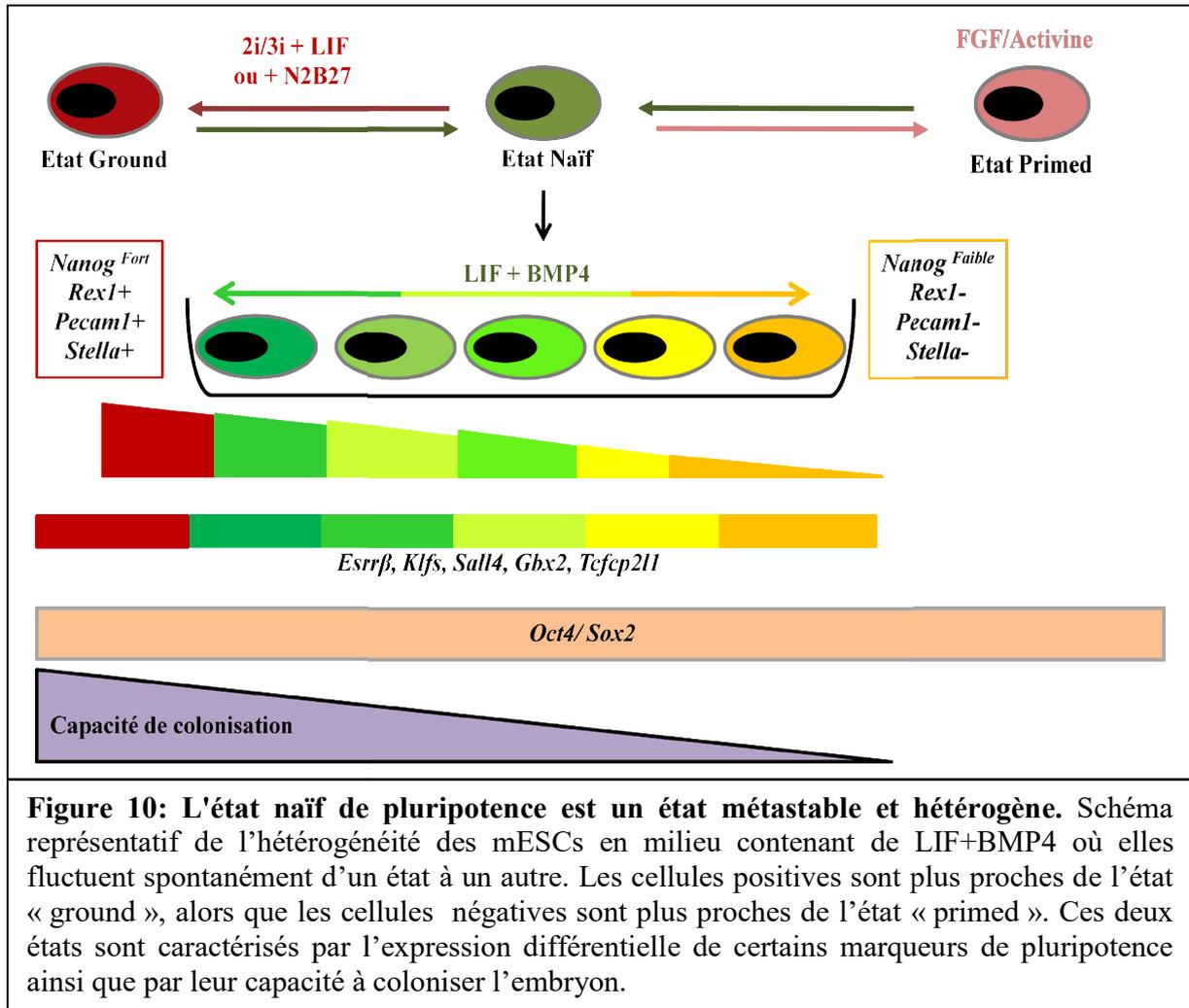
- *Stella*: le profil de méthylation ainsi que la capacité de différenciation des cellules *Stella*<sup>+</sup> et *Stella*<sup>-</sup> sont différents (Hayashi *et al.*, 2008). Les cellules *Stella*<sup>-</sup> portent moins de marques épigénétiques activatrices (H3K9Ac, H3K4me3) sur les gènes de pluripotence. De plus, la sous-population *Stella*<sup>-</sup> se différencie plus facilement et plus rapidement *in vitro* que les cellules *Stella*<sup>+</sup>. Elles pourraient donc être plus sensibles aux signaux de différenciation.

- *Pecam1*: Les cellules *Pecam1*<sup>+</sup> colonisent plus efficacement l'embryon que les cellules *Pecam1*<sup>-</sup> (Furusawa *et al.*, 2004).

- *Zscan4*: Seulement 5% des cellules expriment le gène *Zscan4* (Zalzman *et al.*, 2010). Les mESCs *Zscan4*<sup>+</sup> ont une élongation de télomères plus rapide et présentent une capacité accrue de produire des chimères après injection dans le blastocyste (Amano *et al.*, 2013).

- *Nanog*: l'expression de *Nanog* fluctue au cours de temps formant deux sous-populations de mESCs, *Nanog*<sup>high</sup> (ou *Nanog*<sup>+</sup>) et *Nanog*<sup>low</sup> (ou *Nanog*<sup>-</sup>) (Chambers *et al.*, 2007; Herberg *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2007). Comme dans l'embryon précoce, les mESCs *Nanog*<sup>low</sup> expriment plus fortement des marqueurs d'endoderme primitive PrE comme *Gata6* (Singh *et al.*, 2007) et ont une sensibilité accrue aux signaux de différenciation en comparaison aux cellules *Nanog*<sup>high</sup> (Chambers *et al.*, 2007; Herberg *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2007). De plus, lors de retrait du LIF, la population *Nanog*<sup>low</sup> se différencie préférentiellement en PrE, ce qui s'explique par le fait que *Nanog* réprime directement l'expression de *Gata6* (Singh *et al.*, 2007). On peut conclure que le niveau d'expression de *Nanog* influence la stabilité des mESCs, et que les mESCs ayant une expression de *Nanog* élevée se trouveraient donc dans un état « ground » de pluripotence.

De manière générale, les cellules négatives pour les marqueurs décrits ci-dessus présentent un statut comme celui observé à l'état d'engagement dont l'expression des gènes de pluripotence est plus faible et l'expression des marqueurs de différenciation précoce est fort. L'état d'engagement est connu comme un état spontanément réversible. Alors que les cellules positives pour ces marqueurs sont moins sensibles aux signaux extracellulaires et sont donc plus proches de l'état « ground » de pluripotence.



L'étude du cycle cellulaire des cellules dans les différents états a permis de montrer que les mESCs dans l'état naïf prolifèrent rapidement avec une phase G1 de moins de 2h (Savatier *et al.*, 1994). Cette courte durée est associée à un mécanisme unique de régulation du cycle cellulaire, qui est mis en évidence par l'absence de MAPK, de la cycline D, et du contrôle pRB (Jirmanova *et al.*, 2002; Savatier *et al.*, 1996; White and Dalton, 2005), par l'absence d'une voie p53-p21 fonctionnelle en réponse à la lésion d'ADN (Aladjem *et al.*, 1998), par la transcription active de gènes cibles *E2f*, et une forte activité de la cycline E-CDK2 et cycline complexe A-CDK2 à travers le cycle cellulaire (Stead *et al.*, 2002; White and Dalton, 2005). Lors de la différenciation, la longueur des phases du cycle cellulaire change de façon drastique. La phase G1 est rallongée avec mise en place des points de contrôle, p53 et RB-dépendants. Une phase G1 courte permet une prolifération rapide et un échappement aux signaux de différenciation auxquelles les cellules restent sourdes tant que la transition G1/S est rapide (Burdon *et al.*, 2002; Kapinas *et al.*, 2013).

Le système FUCCI (Sakaue-Sawano *et al.*, 2008) permet de taguer les cellules en phase G1 ou en G2/M à l'aide de protéines fluorescentes vertes ou rouges (connues pour être dégradées dans chacune des phases du cycle). En utilisant ce système, le groupe de P. Savatier a identifié précisément les sous-populations de cellules en condition de pluripotence ou de différenciation précoce. En présence de LIF, 10,4% des cellules sont dans la phase G1 précoce, 9,4% progressent vers la transition G1/S et 74,8% sont en phase S (Coronado *et al.*, 2013). La fonction du LIF est d'accélérer la transition à travers la phase G1 et ainsi de protéger les cellules ES des signaux de différenciation indésirables. Le résultat du retrait de LIF est l'augmentation de cette fenêtre de temps en G1 comme une opportunité pour les signaux de différenciation de jouer un rôle sur les cellules. Le mécanisme moléculaire de cette nouvelle fonction du LIF reste à explorer.

### 2.2.3 Plasticité et hétérogénéité de l'état naïf

Les lignées de mESCs établies dans l'état naïf fluctuent entre l'état ground et l'état d'engagement en fonction des conditions de culture (LIF+ sérum ou LIF+ 2i ou 3i). Autrement dit, elles fluctuent entre différents états plus ou moins avancés, proches des stades de l'épiblaste pré-implantatoire. Cette fluctuation détermine un état de plasticité cellulaire avec des points de non retour. **C'est cette plasticité que nous avons souhaité étudier de manière détaillée dans ce travail de thèse.**

La durée de dissolution de l'état naïf de pluripotence est de moins de 24h dans le stade pré-implantatoire de l'embryon de souris permettant, par la suite, la mise en place de l'état « d'egg-cylinder » puis la spécification des cellules germinales et la gastrulation. La vitesse et l'efficacité de cette transition suggère un programme moléculaire déterminant. Cependant, les mESCs passent à l'état plus engagé de la différenciation, ou état primed, associé à des fluctuations dans l'expression de Nanog et d'autres facteurs de transcription (Kalmar *et al.*, 2009; MacArthur and Lemischka, 2013). Cette idée a été initialement émise à partir des observations de cellules cultivées dans du milieu en présence de sérum+LIF (**Fig.11A**) dans lequel les cellules présentent une expression mosaïque de Nanog et d'autres facteurs de transcription (Chambers *et al.*, 2007; Niwa *et al.*, 2009; Wray *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2014). Ces observations conduisent à l'idée que, dans l'état naïf, les différentes sous-populations de cellules correspondraient à différents stades du développement embryonnaire.

Une étude de "Single-cell profiling" de l'expression de 96 marqueurs de pluripotence et de lignage a montré que les cellules cultivées en 2i/LIF sont moins hétérogènes que celles cultivées en sérum/LIF (MacArthur and Lemischka, 2013; Xu *et al.*, 2014). De plus, la signature moléculaire des mESCs en 2i/LIF est stable et plus proche de celle des cellules de l'épiblaste E4.5 que de celles des cellules de l'ICM avec une quasi absence d'expression des marqueurs de lignage (Dunn *et al.*, 2014; Faddah *et al.*, 2013; Filipczyk *et al.*, 2013; Marks *et al.*, 2012; Wray *et al.*, 2010) (voir aussi la **Fig.1A**).

Les ESCs en 2i (**Fig.11B**) ne présentent aucun retard appréciable dans la différenciation *in vitro* ou *in vivo*, ce qui suggère que l'hétérogénéité dynamique observée dans le sérum n'est pas intrinsèque à l'identité ou à la potentialité des ESCs. Suite au retrait de 2i du milieu de culture, les mESCs semblent subir une progression unidirectionnelle du développement, ce qui est cohérent avec le comportement des cellules au stade d'épiblaste péri-implantatoire de l'embryon (Marks and Stunnenberg, 2014; Marks *et al.*, 2012).

La transition des mESCs vers l'état d'engagement ou primed n'exige pas des inducteurs exogènes, mais à noter qu'elles expriment FGF4 et régulent positivement NODAL. La perte des ESCs de leurs caractéristiques n'est pas un événement instantané. Cependant, jusqu'à 24h, toutes les cellules s'auto-renouvellent avec la même efficacité observée au temps zéro lors la restauration de la formation des colonies avec 2i +LIF, même s'il y a une repression importante des facteurs de pluripotence pendant ce temps. Une période de retrait plus prolongée entre 24h et 72h réduit progressivement la capacité de l'auto-renouvellement (Betschinger *et al.*, 2013; Boeuf *et al.*, 2001; Duval *et al.*, 2000). Ainsi, la phase précoce de sortie de l'état naïf est réversible jusqu'à ce que les cellules atteignent un point où leur identité est éteinte en permanence (Boeuf *et al.*, 2001; Kalkan and Smith, 2014; Mathieu *et al.*, 2012) (**Fig.12**). Cependant, les cellules atteignent le point de transition à différents moments après le retrait de 2i.

La signalisation LIF joue un rôle clé dans la réversibilité des mESCs, les cellules de la phase réversible tardive répondent mal à 2i seul, alors que 2i+LIF a la capacité de rétablir complètement l'état ground de la pluripotence (Yang *et al.*, 2010a). Les gènes cibles de LIF/STAT3 tels que *Tfcp2l1* et *Klf4* sont des médiateurs plausibles dans ce contexte parce que les deux ont des activités puissantes de réversion (Guo *et al.*, 2009; Martello *et al.*, 2012; Ye *et al.*, 2013).

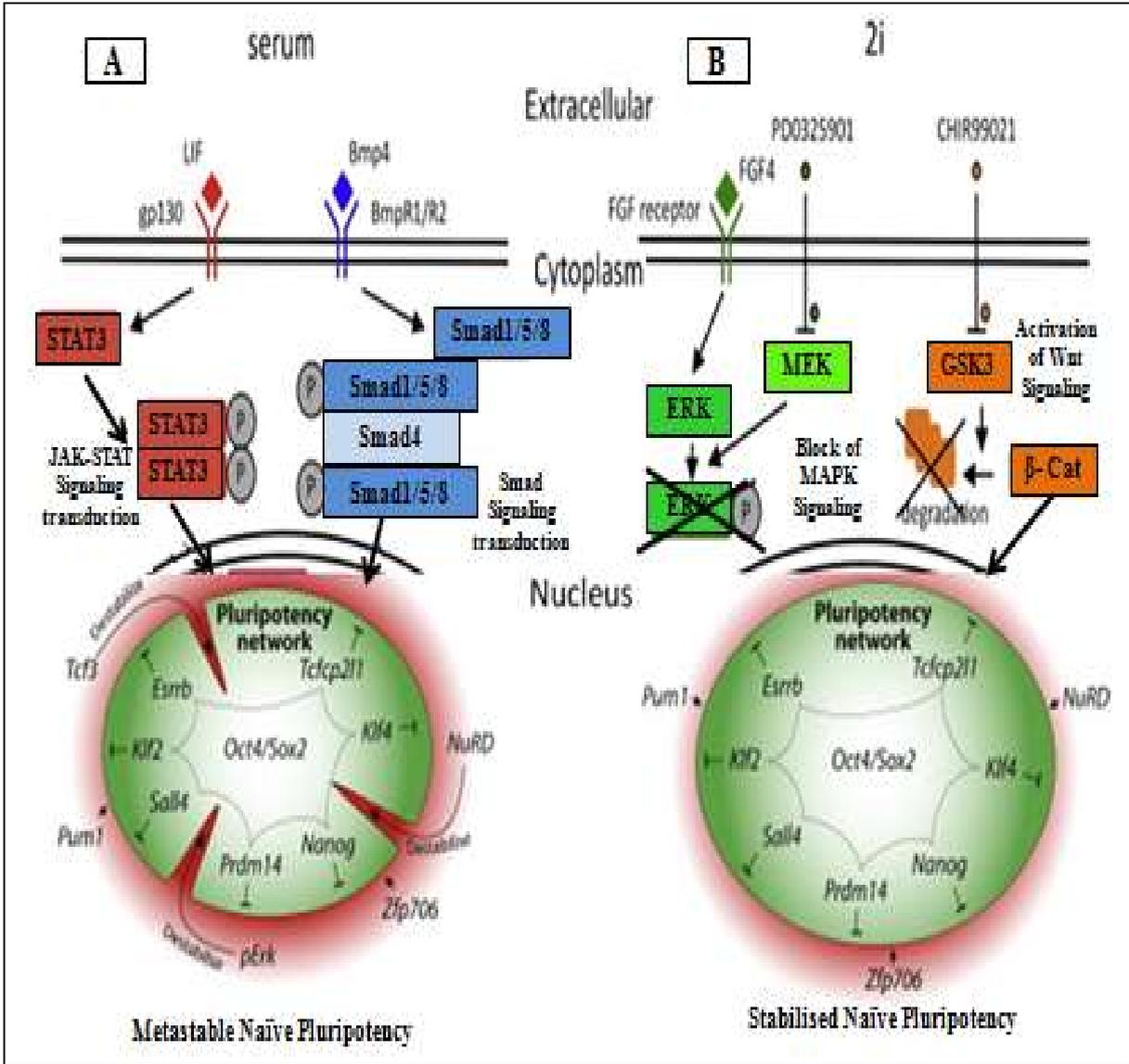
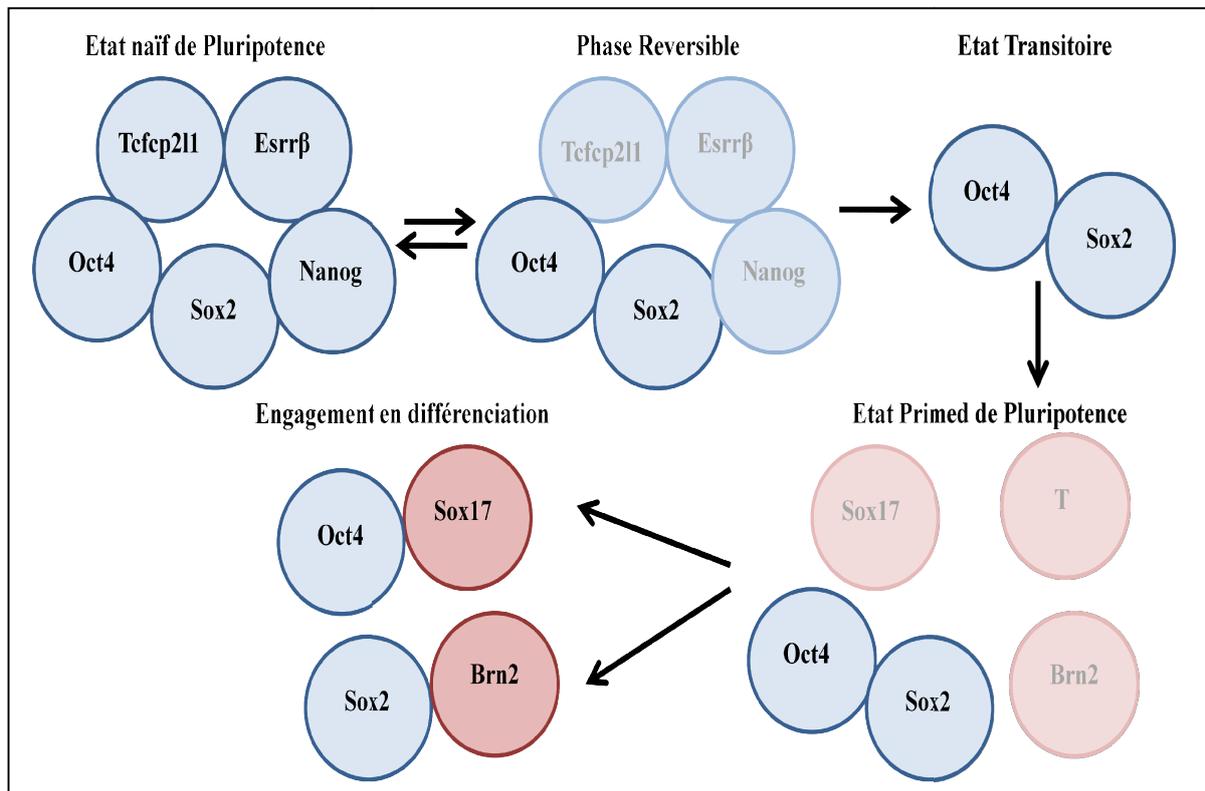


Figure 11: Voies de signalisation activées en (A) sérum/LIF+BMP4 ou (B) en 2i. Photo adaptée de Marks and Stunnenberg et de Hackett and Surani, 2014.



**Figure 12: Progression de l'état naïf des ESCs à l'état d'engagement en différenciation.** La phase initiale est réversible jusqu'à ce que les facteurs de l'état naïf soient entièrement dissipés (représentés en bleu clair). Les cellules atteignent alors un point de transition caractérisé par l'absence de facteurs naïfs ou marqueurs de lignage avec une présence continue d'Oct4 et Sox2. Les cellules de la phase de transition surexpriment les marqueurs de lignage (représentés en rouge clair) en réponse à des signaux externes (FGF, Nodal, Wnt) et passent à l'état primed. Les cellules primed pluripotentes quittent finalement l'état pluripotent et entrent définitivement dans les voies de lignage. Les progéniteurs neuroectodermes (Sox2 et Brn2 positif) et mesendodermes (Oct4 et Sox17 positif) sont représentés. Photo issue de Martello and Smith, 2014.

### 2.3. Etat engagé ou primed de la pluripotence

Lors de l'établissement des hESCs en 1998, elles étaient présentées comme l'équivalent des mESCs puisqu'elles étaient dérivées à partir du même stade embryonnaire (Thomson *et al.*, 1998). Cependant, de nombreuses études ont souligné l'existence de différences tant moléculaires que fonctionnelles entre les mESCs et les hESCs que l'on attribuait alors à des différences d'espèces (Dahéron *et al.*, 2004; Gerami-Naini *et al.*, 2004). L'établissement des EpiSCs chez la souris a permis de définir un nouvel état de pluripotence et de classer les cellules souches pluripotentes en trois groupes ground, naïf et primed. Ce dernier comprend les ESCs/iPSCs

obtenues chez toutes les espèces, à l'exception des ESCs de souris sauf si elles sont cultivées dans le milieu 2i/LIF.

Les EpiSCs de souris représentent l'état primed de la pluripotence, sur la base de l'expression de marqueurs spécifiques de lignage et sur leur prédisposition pour la différenciation (Kojima *et al.*, 2014; Tsakiridis *et al.*, 2014). Elles sont établies à partir de l'épiblaste post-implantatoire au stade egg-cylinder (E5.5-E6.5) (Brons *et al.*, 2007; Tesar *et al.*, 2007). Une analyse globale transcriptomique a montré que les EpiSCs sont plus proches de l'épiblaste tardif (E5.5) dont elles dérivent, que de l'ICM du blastocyste (Brons *et al.*, 2007; Tesar *et al.*, 2007). Mais il est possible de fabriquer des lignées EpiSCs à partir de l'ICM d'embryons pré-implantatoires (E3.5) (Najm *et al.*, 2011). Pour cela, les chercheurs ont utilisé un milieu de culture à base de KOSR (15%) et de FBS (5%) et ont effectué leur dérivation sur les MEFs sans facteur de croissance ajouté. Ils ont observé une formation de deux types de colonies, plates et en dôme. Les colonies en dômes cultivées dans un milieu de culture favorable pour atteindre l'état naïve de la pluripotence forment des lignées de cellules mESCs. Alors que les colonies plates produisent des lignées dont les caractéristiques moléculaires sont semblables à celles des cellules EpiSCs dérivées à partir de l'épiblaste post-implantatoire (Najm *et al.*, 2011). Ces travaux montrent que les conditions de culture sont essentielles pour stabiliser les cellules de l'ICM à l'état naïf ou primed.

#### **2.4. Caractérisation intrinsèque des états naïfs et primed de la pluripotence**

Les facteurs de pluripotence sont définis comme des produits de gènes qui directement et spécifiquement soutiennent le maintien de l'identité de la cellule ES. De ce point de vue, des gènes qui remplissent des fonctions générales dans les processus de base, comme le métabolisme, le cycle cellulaire ou la transcription, ne sont pas admissibles en tant que facteurs de pluripotence, même s'ils peuvent être essentiels pour la propagation de cellules ES. Les facteurs de pluripotence sont considérés comme un groupe restreint qui en combinaison, définissent et décident de l'état de la cellule ES, alors que des « house keeping » gènes fournissent les moyens par lesquels l'état se propage.

### 2.4.1 Le noyau de la pluripotence

Le noyau de la pluripotence commun à toutes les cellules souches pluripotentes et qui permet de maintenir ces dernières en auto-renouvellement et d'assurer leur pluripotence est constitué des gènes *Oct4*, *Sox2* et *Nanog*. Ils représentent le cœur de régulation du réseau de pluripotence et sont exprimés par toutes les cellules pluripotentes connues à l'heure actuelle.

- i. **OCT4** (Octamer-binding transcription factor 4), aussi connu comme OCT3 ou POU5F1 (POU domain class 5 transcription factor 1) est le gène codant pour un facteur de transcription à homéodomaine de la famille POU (Pit, Oct et Unc) et représente le facteur central du noyau de pluripotence. C'est le premier facteur de transcription identifié et caractérisé en tant que régulateur de la pluripotence (Okamoto *et al.*, 1990; Schöler *et al.*, 1991; Zeineddine *et al.*, 2014). OCT4 est exprimé dans des ovocytes et des embryons précoces jusqu'aux stades précoces des somites et il est maintenu par la suite exclusivement dans les cellules de lignées germinales. En absence d'OCT4, les cellules de l'ICM se spécialisent normalement, mais perdent leur identité et se différencient en trophoblaste (Nichols *et al.*, 1998). *Oct4* a été le premier gène « rhéostat » identifié dont le taux d'expression régule le devenir des cellules : une réduction de moitié du niveau d'expression du gène *Oct4* induit une perte de la pluripotence et une différenciation des mESCs en trophoblaste. A l'inverse, une augmentation de seulement deux fois du niveau d'expression d'*Oct4* induit une différenciation en endoderme primitif et mésoderme (Niwa *et al.*, 2000). Ces études ont de plus montré qu'OCT4 joue un double rôle dans l'auto-renouvellement et la différenciation et que son niveau d'expression doit être étroitement régulé pour maintenir la pluripotence (Karwacki-Neisius *et al.*, 2013; Radziszewska *et al.*, 2013). Les études de Karwacki-Neisius ont montré que l'effet dose de l'expression d'OCT4 agit aussi sur l'hétérogénéité d'expression de *Nanog* (Karwacki-Neisius *et al.*, 2013). Plusieurs lignées d'ESC *Oct4*<sup>+/-</sup> ont un profil d'expression unimodale de *Nanog*<sup>high</sup> et manquent de cellules indifférenciées *Nanog*<sup>low</sup>. Cet effet d'OCT4 sur *Nanog* est en accord avec le fait qu'OCT4 se lie à un site octamère consensus centré, -176 pb en amont du site d'initiation de la transcription de *Nanog* (Chambers *et al.*, 2003; Loh *et al.*, 2006) pour le réguler positivement (Kuroda *et al.*, 2005; Rodda *et al.*, 2005). Ainsi, l'hétérogénéité de *Nanog* induite par OCT4 peut être bloquée par un traitement avec des inhibiteurs de FGFR, MEK, ou GSK3β.

- ii. Le facteur de transcription SOX2 [SRY-related HMG-box (High Mobility Group) gene 2] est également essentiel pour l'auto-renouvellement des ESCs. L'inactivation de SOX2 dans les ESCs a pour résultat la formation de trophoblaste, il phénotypique la suppression d'OCT4 (Masui *et al.* 2007). SOX2 est un partenaire d'OCT4 (Ambrosetti *et al.*, 1997): il interagit physiquement avec la protéine OCT4 (van den Berg *et al.*, 2010; Pardo *et al.*, 2010), se lie à l'ADN avec OCT4 aux niveaux des éléments *Oct/Sox* (Chen *et al.*, 2008) et régule positivement la transcription d'*Oct4* (Masui *et al.*, 2007). Cependant, *Sox2* est beaucoup plus largement exprimé qu'*Oct4* et il est nécessaire à la mise en place des cellules de l'ICM (Avilion *et al.*, 2003). Le KO de *Sox2* n'est létal pour l'embryon qu'après le stade post-implantatoire car les mRNAs maternels compensent provisoirement l'absence de son expression zygotique (Avilion *et al.*, 2003). Lors de la dérivation de l'ICM d'embryon *Sox2*<sup>-/-</sup>, les cellules obtenues se différencient spontanément en cellules géantes du trophoctoderme (Avilion *et al.*, 2003; Masui *et al.*, 2007). En plus de l'épiblaste pré- et post-implantatoire, SOX2 est exprimée dans le trophoctoderme (Keramari *et al.*, 2010) et plus tard, dans toutes les cellules neurectodermiques et endodermiques ainsi que dans divers tissus épithéliaux. La surexpression de SOX2 prédispose à la différenciation des cellules ES, ce qui suggère que, comme OCT4, les niveaux d'expression SOX2 devraient être contrôlés pour le maintien d'auto-renouvellement (Kopp *et al.*, 2008).
- iii. L'autre cible coregulée identifiée plus tard est le gène codant pour NANOG. Nanog est un facteur de transcription à homéodomaine. L'expression de NANOG *in vivo* est limitée dans l'ICM, à l'état naïf de la pluripotence, par rapport à OCT4 et SOX2 (Silva *et al.*, 2009); il est à nouveau exprimé exclusivement à l'état de « l'egg-cylinder » juste avant et pendant la gastrulation et il est présent dans les PGCs.
- Il permet la spécification des cellules en épiblaste (Chambers *et al.*, 2003). En effet, dans l'embryon de souris *Nanog*<sup>-/-</sup>, toutes les cellules de l'ICM forment du PrE exprimant *Gata4/6*, au détriment de l'épiblaste (Mitsui *et al.*, 2003). La surexpression de *Nanog* dans les ESCs leur confère la capacité d'auto-renouvellement à une densité clonale même en l'absence de LIF (Chambers *et al.*, 2003). La perte de *Nanog* déstabilise les cellules pluripotentes à la fois *in vitro* et *in vivo* déterminé par la diminution de la capacité de formation des colonies par des cellules *Nanog*<sup>-/-</sup> ESCs (Chambers *et al.*, 2007) et par l'échec des embryons *Nanog*<sup>-/-</sup> de générer l'épiblaste (Mitsui *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2009).
- Néanmoins, les cellules *Nanog*<sup>-/-</sup> ESCs peuvent conserver leur pluripotence en présence de 2i/LIF. NANOG n'est pas une cible directement activée par STAT3 et il semble agir en parallèle avec le

LIF. Cette idée est renforcée par le fait que NANOG partage de nombreuses cibles communes avec STAT3, l'effecteur principal de la voie LIF (Bourillot *et al.*, 2009).

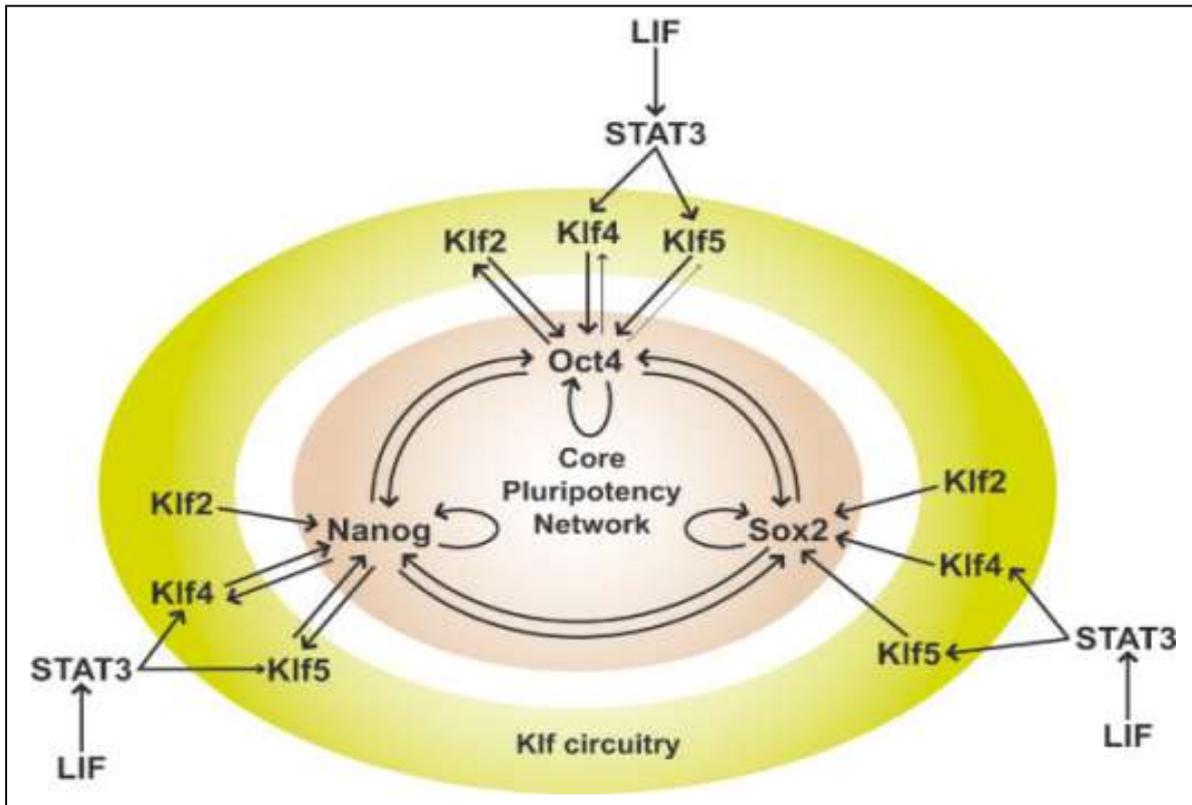
En résumé, les facteurs OCT4, SOX2 et NANOG s'auto-activent et s'activent mutuellement formant une boucle de rétrocontrôle positive qui régule l'auto-renouvellement et permet le maintien de la pluripotence dans l'embryon, ainsi que dans les ESCs (**Fig.13**). Ces trois facteurs clés forment le noyau de la pluripotence (Young, 2011) et ce concept est largement accepté. Cependant, il ne suffit pas à lui seul pour expliquer les propriétés observées des cellules ES. En effet, des études d'occupation de l'ensemble du génome montrent que seulement une partie de promoteur de *Nanog* est co-occupé par OCT4/SOX2 (Loh *et al.*, 2006; Marson *et al.*, 2008). En outre, les études de profil de l'expression globale des gènes après knockdown soit d'*Oct4* soit de *Nanog* montrent des réponses transcriptionnelles distinctes (Loh *et al.*, 2006; Nishiyama *et al.*, 2013).

#### 2.4.2 Le réseau de la pluripotence naïve

Dans les mESCs, le noyau de la pluripotence constitué par les facteurs de transcription OCT4, SOX2 et NANOG est renforcé et soutenu par plusieurs autres facteurs. Une série de facteurs de transcription a été identifiée comme spécifiques de l'état naïf des mESCs et ils sont réprimés à l'état d'épiblaste post-implantatoire et au début de la différenciation des ESCs.

- i. KLF2, KLF4 et KLF5 appartiennent à la famille des Kruppel-Like Factors, et sont essentiels à l'auto-renouvellement des mESCs (Jiang *et al.*, 2008; Parisi *et al.*, 2008). *Klf4* est un des facteurs clé du cocktail de reprogrammation (Takahashi and Yamanaka, 2006), et a pu être remplacé par *Klf2* ou *Klf5* tout en conservant la même efficacité (Feng *et al.*, 2009; Nakagawa *et al.*, 2008). La surexpression des trois gènes *Klfs* permet le maintien des mESCs en absence de LIF (Aksoy *et al.*, 2014; Hall *et al.*, 2009; Niwa *et al.*, 2009) alors que leurs inhibitions conjuguées entraînent la différenciation, mais également une diminution de la prolifération de ces cellules (Jiang *et al.*, 2008). Ces résultats suggèrent qu'il existe une redondance fonctionnelle entre les différents KLFs (Jiang *et al.*, 2008). Mais les régulateurs de KLF5 ont été comparés avec ceux de KLF2 et KLF4 permettant de montrer que KLF5 régule l'expression d'un ensemble unique de gènes qui le distingue des autres membres KLFs.

Ces résultats soutiennent la notion que chaque membre KLF pourrait jouer un rôle spécifique dans le maintien de l'état pluripotent (Bourillot and Savatier, 2010; Parisi *et al.*, 2010). *Klf4* est une cible de la voie LIF/STAT3 (Bourillot *et al.*, 2009; Trouillas *et al.*, 2009a, 2009b), alors que *Klf2* est activé par OCT4. De plus, KLF5 maintient les ESCs dans l'état indifférencié par sa liaison directe aux promoteurs de gènes *Nanog* et *Oct3/4* tout en régulant leurs transcriptions (Parisi *et al.*, 2008) (**Fig.13**). *Klf2*, *Klf4* et *Klf5* sont fortement exprimés dans les mESCs, et très faiblement dans les EpiSCs (Hall *et al.*, 2009; Parisi *et al.*, 2008).



**Figure 13: Le réseau régulateur de l'état naïf de pluripotence.** Ce réseau joue un rôle clé dans l'autorenouvellement des mESCs, il comprend le noyau de pluripotence formé d'OCT4, SOX2 et NANOG. Ces trois facteurs s'auto-activent et s'activent mutuellement. Ce noyau de pluripotence et les KLFs sont fortement interconnectés : (i) KLF2, KLF4 et KLF5 activent l'expression de *Nanog*, *Sox2*, et *Oct4*, (ii) *Klf2* est activé par OCT4, et (iii) *Klf4* et *Klf5* sont activés par NANOG. En outre, *Klf4* et *Klf5* - mais pas *Klf2* - sont régulés par STAT3. *Klf4* et *Klf5* relient donc les régulateurs extrinsèques au noyau de pluripotence. Photo issue de Bourillot and Savatier, 2010.

- ii. SALL4 est un facteur de transcription à doigt de zinc impliqué dans le maintien des mESCs dans l'état naïf de la pluripotence (Sakaki-Yumoto *et al.*, 2006; Yuri *et al.*, 2009). Ce facteur semble aussi avoir un rôle positif sur la reprogrammation somatique en cellules iPSCs. Son inhibition diminue l'efficacité de reprogrammation alors que sa surexpression l'augmente (Tsubooka *et al.*,

2009). SALL4 active OCT4 et NANOG et forme un hétéro-complexe avec ses derniers (Yang *et al.*, 2008). Enfin, il existe une boucle de rétrocontrôle positive entre OCT4 et SALL4 (Yang *et al.*, 2010b; Yuri *et al.*, 2009).

- iii. GBX2 (Gastrulation Brain homoeobox2) et TCFCP211 (transcription factor CP2-like1, précédemment connu sous le nom CRTR2) sont des facteurs de transcriptions (Martello *et al.*, 2013; Tai and Ying, 2013) dont les gènes sont la cible de la voie LIF/STAT3 (Bourillot *et al.*, 2009; Martello *et al.*, 2013; Tai and Ying, 2013; Trouillas *et al.*, 2009b). Leur surexpression permet le maintien de l'auto-renouvellement des mESCs en absence de LIF. De plus, GBX2 améliore l'efficacité de reprogrammation de MEFs en miPSCs d'un facteur 3 (Tai and Ying, 2013). TCFCP211, exprimé dans l'épiblaste pré-implantatoire et régulé négativement autour de l'implantation (Pelton *et al.*, 2002), est rapidement réprimé lors de la différenciation des ESCs (Ivanova *et al.*, 2006; Leeb *et al.*, 2014). La surexpression de *Tcfcp211* à des niveaux d'expression endogène récapitule entièrement les effets du LIF sur l'auto-renouvellement des mESCs. Inversement, la régulation négative de *Tcfcp211* altère l'auto-renouvellement des mESCs en réponse au LIF, indiquant que l'activité TCFCP211 ne peut pas être compensée par d'autres cibles de STAT3 (Martello *et al.*, 2013; Ye *et al.*, 2013).
- iv. ESRR $\beta$  (Estrogene-Related Nuclear Receptor  $\beta$ ) est un récepteur nucléaire Orphelin qui joue également un rôle crucial dans la pluripotence. Il peut remplacer KLF4 dans le cocktail de reprogrammation, notamment en activant le gène *Klf4* endogène (Feng *et al.*, 2009). *Nanog* (Pereira *et al.*, 2006) et *Esrr $\beta$*  (Martello *et al.*, 2012) sont des cibles réprimées par TCF3. La diminution ou l'absence d'*Esrr $\beta$*  bloque l'effet de l'inhibition de GSK3 $\beta$ , alors que sa surexpression mime le phénotype de l'inhibition de la GSK3 $\beta$  ou des cellules *Tcf3*<sup>-/-</sup> (Martello *et al.*, 2012). Ces résultats indiquent qu'*Esrr $\beta$*  est l'une des cibles principales de la voie GSK3 $\beta$ /TCF3 dans le maintien de l'auto-renouvellement des mESCs. *Esrr $\beta$*  est également la cible directe de NANOG la plus activée (Festuccia *et al.*, 2012). La surexpression de *Nanog* permet de maintenir les mESCs en absence du LIF (Chambers *et al.*, 2003). C'est également le cas pour la surexpression d'*Esrr $\beta$*  et cela même dans les mESCs *Nanog*<sup>-/-</sup> (Festuccia *et al.*, 2012). A l'inverse, la surexpression de *Nanog* dans les cellules *Esrr $\beta$* <sup>-/-</sup> ne permet pas de maintenir l'auto-renouvellement en absence de LIF. Comme NANOG (Chambers *et al.*, 2007), ESRR $\beta$  n'est pas indispensable à l'autorenouvellement des mESCs en présence de LIF (Festuccia *et al.*, 2012;

Martello *et al.*, 2012). Ceci montre que l'inhibition de GSK3 $\beta$  et le LIF stabilise la pluripotence des mESCs par des mécanismes parallèles (Martello *et al.*, 2012; Nichols and Smith, 2012).

De manière générale, les acteurs présentés ici, jouent un rôle clef dans le maintien de l'auto-renouvellement et la stabilisation de la pluripotence des mESCs. De plus, la surexpression de la plupart de ces facteurs permet d'améliorer la reprogrammation des cellules somatiques en iPSCs chez la souris (Martello *et al.*, 2013).

### **2.4.3 Les marqueurs de l'état primed de la pluripotence**

Il existe plusieurs marqueurs spécifiques de l'état primed de la pluripotence. Ces marqueurs sont classiquement utilisés pour discriminer les états naïf et primed. Les gènes du réseau de pluripotence naïve comme *Rex1*, *Dax1*, *Pecam1*, *Gbx2*, *Tbx3*, *Blimp1*, *Stella*, *Klf2* et *Klf4* (Bao *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2009; Brons *et al.*, 2007; Tesar *et al.*, 2007) sont peu ou pas exprimés dans les EpiSCs et les hESCs. En revanche, elles expriment des marqueurs de l'épiblaste post-implantatoire, ainsi que des gènes de différenciation précoce tel que *Fgf5*, *Otx2*, *Eomes*, *Foxa*, *Brachyury (T)*, *Gata6*, *Sox17* et *Cereberus1 (Cer1)* (Brons *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2009; Najm *et al.*, 2011; Tesar *et al.*, 2007).

Les EpiSCs expriment aussi les facteurs du noyau de la pluripotence. Toutefois, l'expression d'OCT4 dans les EpiSCs est sous la dépendance du proximal enhancer (PE), par opposition au distal enhancer (DE), qui est activé dans les ESCs naïves. Des lignées de cellules ES exprimant la GFP sous contrôle des éléments PE ou DE d'OCT4 sont très utilisées pour établir une distinction entre les états naïf et primed.

## **2.5. Caractéristiques extrinsèques des états naïf et primed de la pluripotence**

### **2.5.1 Les voies de signalisation induites par le LIF**

En présence de LIF, les mESCs peuvent être cultivées en l'absence des MEFs. Le LIF permet l'activation de 3 cascades de signalisation: (i) la voie principale JAK1/STAT3/SOCS3

(Boeuf *et al.*, 1997; Niwa *et al.*, 1998), (ii) la voie SHP2/RAS/MAPK (Burdon *et al.*, 1999) et (iii) la voie PI3K (Paling *et al.*, 2004) (**Fig.14**).

- i. Voie JAK1/STAT3/SOCS3: (Janus Associated Kinase 1/Signal Transducer and Activator of factor 3/Suppressor of cytokine signaling 3).

Dans les mESCs, une fois recrutée par le récepteur LIF, la protéine STAT3 est phosphorylée au niveau de deux résidus: le résidu Ser 727 par ZIPK (Zipper Interacting Protein Kinase) et le résidu Tyr 705 par les JAKs (Boeuf *et al.*, 1997; Sato *et al.*, 2004). Ces phosphorylations permettent la formation de complexes homo- ou hétérodimériques, qui seront transloqués dans le noyau. STAT3 peut ainsi assurer son rôle de facteur de transcription par l'intermédiaire de sa fixation à l'ADN (Watanabe *et al.*, 2006). En effet, ces complexes de protéines STAT3 phosphorylées permettent alors la transcription de gènes impliqués dans:

- le maintien de l'état indifférencié de ces cellules et la répression de cette voie de signalisation (Cartwright *et al.*, 2005) qui joue un rôle de rétrocontrôle. Les répresseurs induits sont: la protéine SOCS3 (Suppressor of Cytokine Signaling 3) et la protéine PIAS3 (Protein Inhibitor of Activated Stat3). La protéine SOCS3 inhibe la voie STAT3 de deux manières, en s'associant d'une part par son domaine SH2 aux protéines JAKs phosphorylées, ce qui entraîne une inhibition de l'activité catalytique des JAKs et d'autre part aux tyrosines phosphorylées du récepteur au LIF, empêchant ainsi l'activation des effecteurs en aval de cette voie (Duval *et al.*, 2000; Forrai *et al.*, 2006; Hilton, 1999; Krebs and Hilton, 2000). La protéine PIAS3 fonctionne comme une E3 SUMO ligase (Small Ubiquitin-related Modifier ligase) et inhibe cette voie de signalisation par sumoylation du facteur de transcription STAT3, empêchant ainsi la fixation à l'ADN des dimères de STAT3 (Kotaja *et al.*, 2002; Schmidt and Müller, 2002).

Ainsi, la voie JAK1/STAT3, essentielle au maintien de la pluripotence, est fortement contrôlée et son activation est maximale 10 à 30 minutes après la fixation du LIF sur son récepteur (Boeuf *et al.*, 1997, 2001; Matsuda *et al.*, 1999; Niwa *et al.*, 1998; Trouillas *et al.*, 2009a). Cependant, contrairement aux mESCs (représentatif de l'état naïf), les EpiSCs et les hESCs (représentatif de l'état primed) sont dépendantes des voies de signalisation ACTIVINE et FGF et ne répondent pas à la voie LIF/STAT3 (Brons *et al.*, 2007; Dahéron *et al.*, 2004; Li and Ding, 2010; Tesar *et al.*, 2007; Vallier *et al.*, 2005) (**Fig.15**).

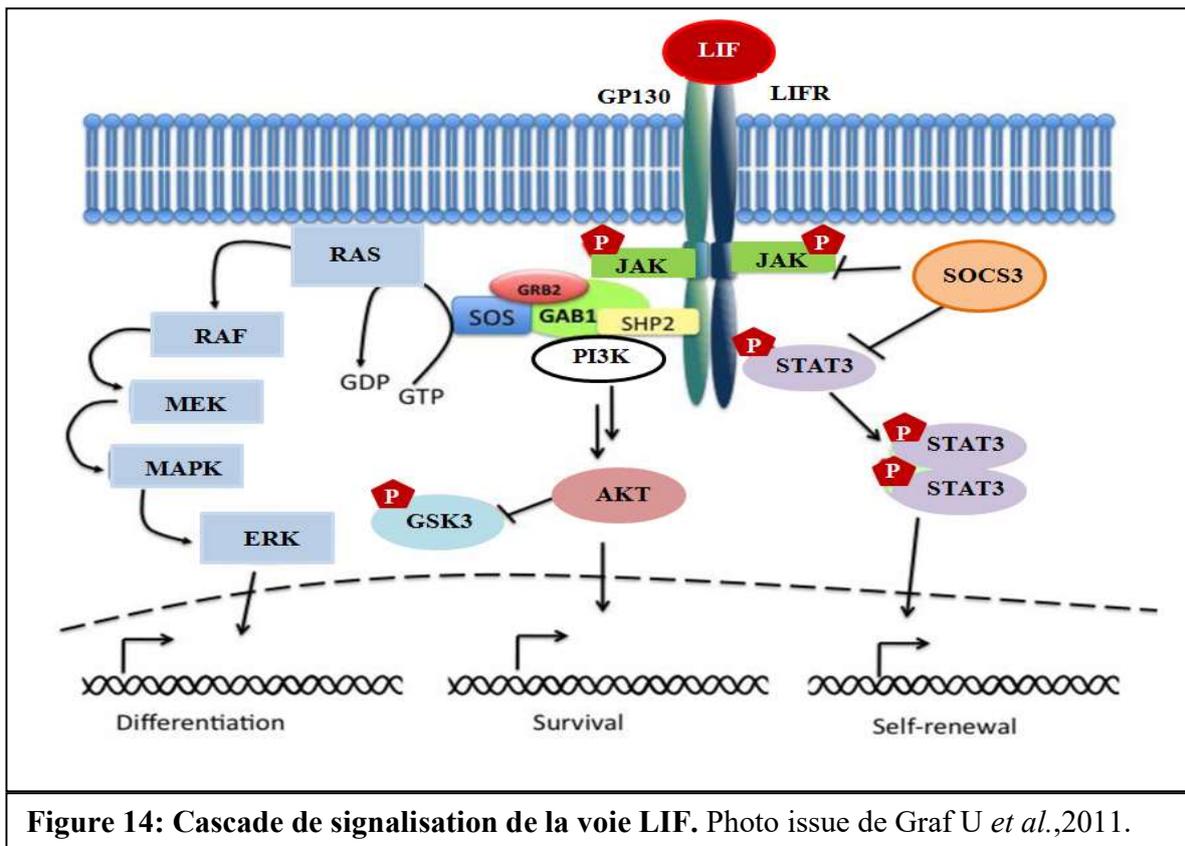
ii. Voie SHP2/RAS/MAPK (Src Homology/ RAt Sarcoma/ Mitogen Activated Protein Kinase).

Le LIF n'est pas la seule molécule permettant l'activation de cette voie de signalisation. En effet, cette voie est également contrôlée par différentes molécules, entre autres des facteurs de croissance et des hormones. Elle est connue pour jouer un rôle dans la régulation du cycle cellulaire, la prolifération, la différenciation, la survie et la mort des cellules (Malumbres and Barbacid, 2003). Cette voie a été également étudiée dans le contexte de l'oncogenèse puisque sa dérégulation est une des premières causes de cancers.

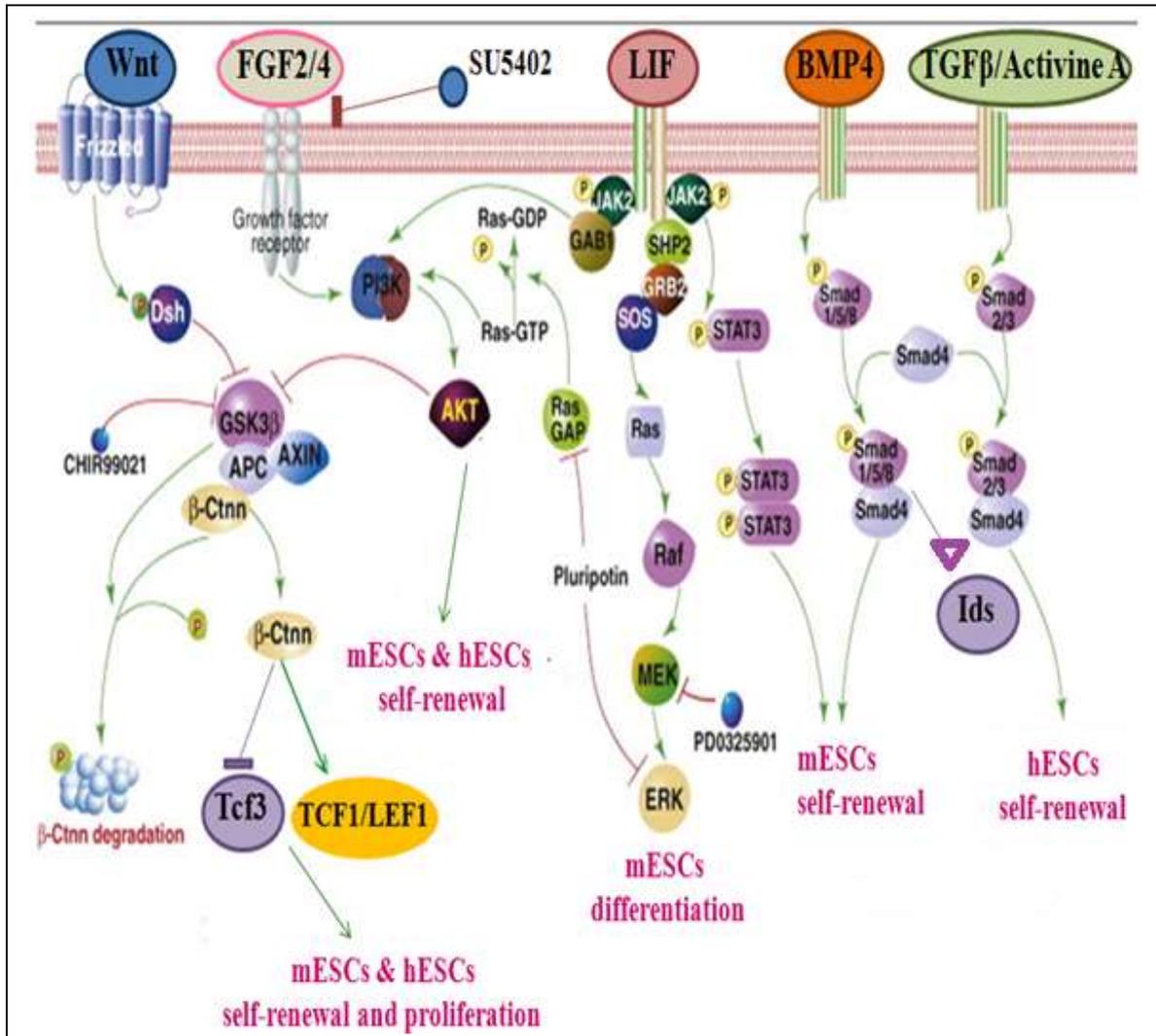
Dans les mESCs, comme pour l'activation de la voie JAK1/STAT3, la voie MAPK est activée par le recrutement des composants de signalisation sur le récepteur LIF activé (Boeuf *et al.*, 2001; Schaper *et al.*, 1998). Les deux sous-unités du récepteur contiennent des sites qui une fois phosphorylés, peuvent recruter la phosphatase SHP2 (Schiemann *et al.*, 1997). Ces sites sont le résidu Tyr 759 dans la sous-unité gp130 (Anhuf *et al.*, 2000; Duval *et al.*, 2000; Stahl *et al.*, 1995) et Tyr 974 dans LIFR $\beta$  (Bartoe and Nathanson, 2000). SHP2 activée induit la signalisation RAS/RAF qui conduit à l'activation de MAPK et finalement, l'activation des activateurs transcriptionnels comme ELK (Neel *et al.*, 2003). Comme indiqué ci-dessus, SOCS3 se lie également à la pY759 de gp130 et donc son induction par STAT3 conduit à l'inhibition de la cascade de signalisation MAPK (Lehmann *et al.*, 2003).

iii. Voie PI3K: (Phosphatidyl-Inositol 3 Kinase). Ces kinases, messagers secondaires intracellulaires hétérodimériques, sont composées d'une sous-unité régulatrice (P55 et P85) contenant un domaine SH2 et d'une sous-unité catalytique (P110). Ces protéines, une fois activées, phosphorylent le PIP2 (Phosphoinositol (3,4) biphosphate) afin de générer du PIP3 (Phosphoinositol (3,4,5) triphosphate) ce qui active la Sérine/Thréonine Kinase AKT. AKT phosphoryle alors une cible essentielle, la protéine GSK3 $\beta$  qui est alors inactivée. Ainsi, des facteurs contrôlés négativement par la GSK3 $\beta$  sont libérés (entre autre la  $\beta$ -caténine), transloqués au noyau et peuvent alors assurer le maintien de l'état naïf des mESCs. De plus, il a été montré qu'une forme constitutivement active d'AKT permet de maintenir l'état naïf des mESCs en l'absence de LIF, démontrant ainsi que cette voie de signalisation est suffisante pour maintenir la pluripotence des mESCs (Watanabe *et al.*, 2006). Cette voie possède un régulateur négatif, à savoir l'enzyme PTEN (Phosphatase and TENsin homolog) qui déphosphoryle notamment PIP3. La PI3K est aussi responsable de l'activation de la voie PIK3/AKT/mTOR qui maintient l'auto-renouvellement en activant TBX3 et TFE3 qui, eux, stimulent l'expression de *Nanog* et *Esrr $\beta$*  (Betschinger *et al.*, 2013; Niwa *et al.*, 2009).

La comparaison de la voie de MAPK aux deux voies JAK1/STAT3 et PI3K, ainsi qu'avec les autres voies impliquées dans l'autorenouvellement des mESCs met en évidence des contrastes intéressants. Bien que le LIF stimule l'activation des trois voies, l'inhibition de la cascade MAPK, que ce soit sur le plan pharmacologique ou génétique (par repression des activités ERKs) conduit à l'augmentation de l'auto-renouvellement des mESCs (Burdon *et al.*, 1999; Meloche *et al.*, 2004). Cela implique que la signalisation MAPK est généralement nécessaire à la différenciation, plutôt qu'au maintien de la pluripotence et même qu'elle est induite par le LIF (Duval *et al.*, 2004, 2006; Graf *et al.*, 2011).



**Figure 14: Cascade de signalisation de la voie LIF.** Photo issue de Graf U *et al.*, 2011.



**Figure 15: Voies de signalisation régulant les états naïf et primed de pluripotence.** Les mESCs (représentatif de l'état naïf) dépendent des voies JAK1/Stat3, PI3K/AKT activées par le LIF, des voies BMP4/Smad1,5,8 et Wnt/β-caténine. Les EpiSCs et les hESCs (représentatif de l'état primed) sont dépendantes des voies de signalisation ActivineA/Smad2,3, PI3K/Akt activée par le FGF et Wnt/β-caténine. Photo adaptée de Li and Ding, 2010.

## 2.5.2 Synergie avec la voie LIF

- i. La voie BMP4: En absence de sérum, le LIF réduit mais n'empêche pas la différenciation des mESCs dans la voie neurectodermique (Ying and Smith, 2003). La même équipe a également montré que l'ajout de BMP4 pouvait remplacer le FBS en prévenant la différenciation des mESCs (Ying *et al.*, 2003b). La voie BMP4/SMAD1,5,8 (Bone Morphogenetic Protein/ Small Mothers Against Decapentaplegic) est une deuxième voie de signalisation extrinsèque intervenant dans le maintien de l'auto-renouvellement des mESCs en activant les gènes *Id* (Inhibitor of differentiation) qui bloquent la différenciation en neurectoderme. Les mESCs ont pu être cultivées dans un milieu basal (N2B27) en absence de FBS et MEFs, par l'ajout de LIF et BMP4. Le modèle suivant est proposé: la voie LIF/STAT3 prévient la différenciation des cellules en mésoderme et endoderme (Bourillot *et al.*, 2009) alors que la voie BMP4/SMAD/ID bloque la différenciation en neurectoderme (Ying *et al.*, 2003b). Ces deux facteurs de croissance (LIF et BMP4) sont nécessaires et suffisants pour promouvoir l'auto-renouvellement des mESCs (**Fig.15**).
  
- ii. La voie WNT: La troisième voie de signalisation extrinsèque intervenant dans le maintien de l'auto-renouvellement des mESCs implique la famille de la voie WNT (Wingless-Type mmtv integration site family). Dans les mESC, sa fixation sur son récepteur membranaire, FZD (Frizzled) inhibe la phosphorylation de la  $\beta$ -Caténine ( $\beta$ -CAT) par la GSK3 $\beta$ , empêchant ainsi la dégradation de la  $\beta$ -Caténine par le protéasome. La  $\beta$ -Caténine peut ainsi être transloquée au noyau, et s'associer au complexe TCF/LEF (T Cell specific transcription Factor/ Lymphoid Enhancer binding Factor 1) afin d'activer la transcription de gènes cibles (Cadigan and Liu, 2006; Moon *et al.*, 2002). L'inhibition chimique spécifique de GSK3 $\beta$  mime l'activation de la voie WNT et permet au complexe  $\beta$ -CAT/TCF d'activer les gènes de la pluripotence *Oct4*, *Nanog* et *Rex1*. L'activation de la voie WNT/ $\beta$ -CAT est suffisante pour maintenir les mESCs en auto-renouvellement (Sato *et al.*, 2004). Une étude plus récente confirme ces résultats en montrant que le complexe  $\beta$ -CAT/TCF1 active directement *Oct4* (Yi *et al.*, 2011) (**Fig.15**).

TCF3 est le facteur de la famille TCF/LEF le plus exprimé dans les mESCs (Pereira *et al.*, 2006). Des travaux ont montré que TCF3 favorise la différenciation en réprimant directement l'expression de *Nanog* et *Esrr $\beta$*  (Martello *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2006). D'autres travaux ont mis en évidence que la  $\beta$ -CAT en inhibant l'action de *Tcf3* (*Tcf3*<sup>-/-</sup>) mime l'activation de la voie

WNT par l'inhibition chimique de la GSK3 $\beta$  (Pereira *et al.*, 2006; Yi *et al.*, 2011). Au contraire, l'absence de  $\beta$ -cat ( $\beta$ -cat<sup>-/-</sup>) annule l'effet positif de l'inhibition de la GSK3 $\beta$  sur l'auto-renouvellement (Wray *et al.*, 2011). Ces résultats laissent penser que l'action de la voie WNT passerait en inhibant le TCF3 par la  $\beta$ -CAT (Wray *et al.*, 2011). La voie WNT/ $\beta$ -CAT semble jouer un rôle de soutien de l'auto-renouvellement des mESCs en stabilisant le noyau de la pluripotence par une voie parallèle au LIF qui implique notamment NANOG et ESRR $\beta$ .

Ainsi, l'axe LIF/STAT3 renforce l'état naïf par l'induction d'une série de facteurs de transcription, TCF3/TCF3L1 apparaissant jouer un rôle central. Cependant, *Tcfcp2l1* est également une cible de la répression par TCF3 et son expression est induite par GSK3i (Martello *et al.*, 2013; Ye *et al.*, 2013). Notamment, ni 2i ni LIF ne régule directement OCT4, SOX2 ou SALL4, un autre facteur clé de la pluripotence (Sakaki-Yumoto *et al.*, 2006; Yuri *et al.*, 2009).

## 2.6. Caractéristiques fonctionnelles des états naïf et primed de la pluripotence

Les EpiSCs et les mESCs diffèrent par la morphologie des colonies, l'expression des gènes, y compris les micro-ARNs, l'inactivation du chromosome X, ainsi que les voies de signalisation contrôlant l'auto-renouvellement. Ces voies constituent un critère important permettant de différencier les cellules des états naïf et primed. Cependant, la capacité de coloniser un embryon et de générer une chimère est la caractéristique fonctionnelle la plus marquante qui diverge entre ces deux états.

Cependant, Jin Young Joo *et al.* ont récemment réussi à obtenir avec succès des populations homogènes d'EpiSCs (appelées F4-EpiSCs) avec une capacité efficace de formation des chimères en les cultivant dans un milieu supplémenté de FGF4 en absence de d'ACTIVINE et de bFGF (Joo *et al.*, 2014). Le choix de FGF4 était motivé par les faits suivants : (i) FGF4 est un facteur autocrine qui favorise l'auto-renouvellement des hESCs (Mayshar *et al.*, 2008), (ii) FGF4 est important pour la prolifération de l'ICM de blastocyste et d'embryon post-implantatoire de souris (Feldman *et al.*, 1995) et (iii) l'expression de *Fgf4*, régulée par OCT4 et SOX2 (Rodda *et al.*, 2005), est présente de manière limitée dans les embryons au cours de développement et est censée jouer un rôle clé dans la survie et la structuration embryonnaire (Brons *et al.*, 2007; Greber *et al.*, 2010). Ces F4-EpiSCs présentent des niveaux d'expression de *Rex1* et *Nanog* très faible, avec un niveau d'*Oct4* comparable aux ESCs mais expriment aussi des niveaux plus élevés

de marqueurs épiblastiques, comme *Cer1*, *Eomes*, *Fgf5*, *Sox17*, et *T*. Les promoteurs des gènes *Stella* et *Dppa5* sont complément méthylés et donc inactifs. En outre, les F4-EpiSCs sont capables de se différencier en trois feuilletts embryonnaires et forment efficacement des tératomes et des embryons chimériques (21,4%), mais sans contribution à la lignée germinale (Joo *et al.*, 2014). On peut donc les considérer comme intermédiaires entre l'état naïf et primed.

## **2.7. Caractéristiques métaboliques des états naïf et primed de la pluripotence**

Les mécanismes moléculaires qui contrôlent l'auto-renouvellement et la différenciation sont étroitement liés à l'état métabolique des cellules dans leur niche environnante. Le métabolisme comprend d'une part les réactions d'anabolisme, voie de biosynthèse des métabolites essentiels permettant la construction et le renouvellement tissulaire, et d'autre part le catabolisme, voie de dégradation qui s'accompagne de la production d'énergie chimique sous forme d'adénosine triphosphate (ATP), communément appelée métabolisme énergétique. L'homéostasie énergétique est assurée par deux voies majoritaires de synthèse d'ATP, la glycolyse, qui produit 2 ATP (dégradation enzymatique régulée du glucose en pyruvate) et la phosphorylation oxydative (OXPHOS) qui produit 36 ATP et a donc un rendement énergétique bien supérieur à la glycolyse. Etant donné leur nature hautement proliférative, le métabolisme énergétique des ESCs est particulièrement dépendant de la glycolyse pour soutenir la croissance et la division cellulaire (Burgess *et al.*, 2014). Elles se caractérisent par une forte expression des acteurs impliqués dans la consommation du glucose, aussi bien les transporteurs de glucose (GLUT1 et GLUT3) que les enzymes glycolytiques (Ito and Suda, 2014). Les hESCs présentent une activité glycolytique qui se traduit par une forte production de lactate (Varum *et al.*, 2011). De plus, une augmentation du flux de métabolites vers les voies qui dérivent de la glycolyse telles que la voie des Pentoses Phosphates (PP) permet de soutenir la prolifération par la synthèse rapide des nucléotides (Ito and Suda, 2014).

Dans le modèle hESCs, la différenciation *in vitro* s'accompagne d'une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la biogénèse mitochondriale et l'OXPHOS (Prigione and Adjaye, 2010), et l'inhibition de leur chaîne respiratoire mitochondriale n'altère pas le maintien de la pluripotence (Varum *et al.*, 2009). Bien que l'activité glycolytique soit élevée, l'OXPHOS reste tout de même fonctionnelle et active dans les mESCs. La majorité des mitochondries des mESCs présente un phénotype immature avec un nombre de copies d'ADN mitochondriale

(ADNmt) significativement plus faible, une répartition péri-nucléaire et une morphologie sphérique aux crêtes mitochondriales peu développées. Au contraire, les mitochondries des EpiSCs et hESCs se distribuent de façon homogène dans le cytoplasme, sont plus allongées et contiennent de nombreuses crêtes ainsi qu'une matrice dense. Toutefois, les mESCs possèdent une capacité respiratoire mitochondriale plus élevée que les cellules au stade de développement plus tardif telles que les hESCs ou les EpiSCs (Zhou *et al.*, 2012), données qui traduisent le caractère énergétique bivalent des mESCs.

Le métabolisme bioénergétique est étroitement lié aux mécanismes de régulation épigénétique. En effet, les métabolites intermédiaires (l'ATP, l'acétylCoA,...) servent de substrats pour les modifications post-traductionnelles de l'ADN et des histones (acétylation, méthylation, glycosylation...) qui modulent l'expression des gènes impliqués dans le contrôle de l'état de pluripotence et la maturation des ESCs (Jang *et al.*, 2012).

## **2.8. L'état intermédiaire de la pluripotence**

### **2.8.1 Isolement des IESC**

Comme nous l'avons vu précédemment, les mESCs sont hétérogènes en culture et fluctuent entre différents états se situant entre l'état ground et primed de la pluripotence. C'est cette capacité de fluctuation d'un état mature vers un état plus immature que l'on nomme "Plasticité cellulaire".

Une étude récente décrit la stabilisation des cellules dans un état intermédiaire (Chang and Li, 2013). Pour cela, les mESCs sont cultivées dans un milieu sans LIF, supplémenté en ACTIVINE A. Après 25 passages, les cellules sont capables de former des colonies de cellules indifférenciées aussi bien en présence d'ACTIVINE A qu'en présence de LIF. Aucune colonie ne peut se former en absence de l'un ou de l'autre de ces facteurs (Chang and Li, 2013). Ces cellules sont appelées IESCs (ESCs intermédiaires) et sont donc dépendantes de l'ACTIVINE A tout en gardant leur capacité de réponse au LIF. Cette double dépendance est aussi vérifiée par la sensibilité des cellules à l'inhibition du récepteur de l'ACTIVINE (SB43) qui induit une diminution rapide de l'expression de *Nanog* et de la différenciation.

### 2.8.2 Les caractéristiques moléculaires

Les IESCs partagent des caractéristiques des deux états, naïf et primed. Comme les mESCs, elles forment des colonies en dômes compactes, elles sont permissives à la dissociation par la trypsine, et possèdent une forte activité AP. Elles expriment *Oct4*, *Sox2* et *SSEA1*. Au contraire, elles n'expriment pas le marqueur *Otx2* (exprimé très précocement dans le développement dès 3,5 jours après la fécondation (Kimura *et al.*, 2001)) (Chang and Li, 2013).

Une analyse transcriptomique montre que les IESCs expriment un cluster de gènes qui inclut des marqueurs des ESCs et des EpiSCs mais avec des niveaux d'expression intermédiaires entre ESCs et EpiSCs. Par exemple, les niveaux d'expression de *Rex1*, *Stella*, *Pecam1*, *Klf4*, *Nanog*, *Fbx15* et *Tbx3* sont inférieurs à ceux décrits dans les mESCs, mais aussi supérieurs par comparaison avec ceux des EpiSCs. A l'inverse, les cellules expriment certains marqueurs de l'état primed comme *Fgf5*, *Brachyury*, *Nodal*, *Pitx2*, *Otx2*, *Gata6*, *Foxa2* et *Lefty*, à un niveau plus faible que dans les EpiSCs. Une analyse des modifications d'histones H3K4me3 et H3K27me3 montre aussi un profil intermédiaire (Chang and Li, 2013).

Si l'on pouvait techniquement analyser en temps réel le passage ESCs/EpiSCs, on caractériserait probablement un continuum d'états intermédiaires avec des nouveaux « checkpoint » de non retour d'un état à l'autre, ceci étant une propriété clé de ces cellules souches.

**Un des objectifs de notre travail a été de caractériser les états intermédiaires des cellules cultivées sans LIF et de déterminer leur point de non retour.**

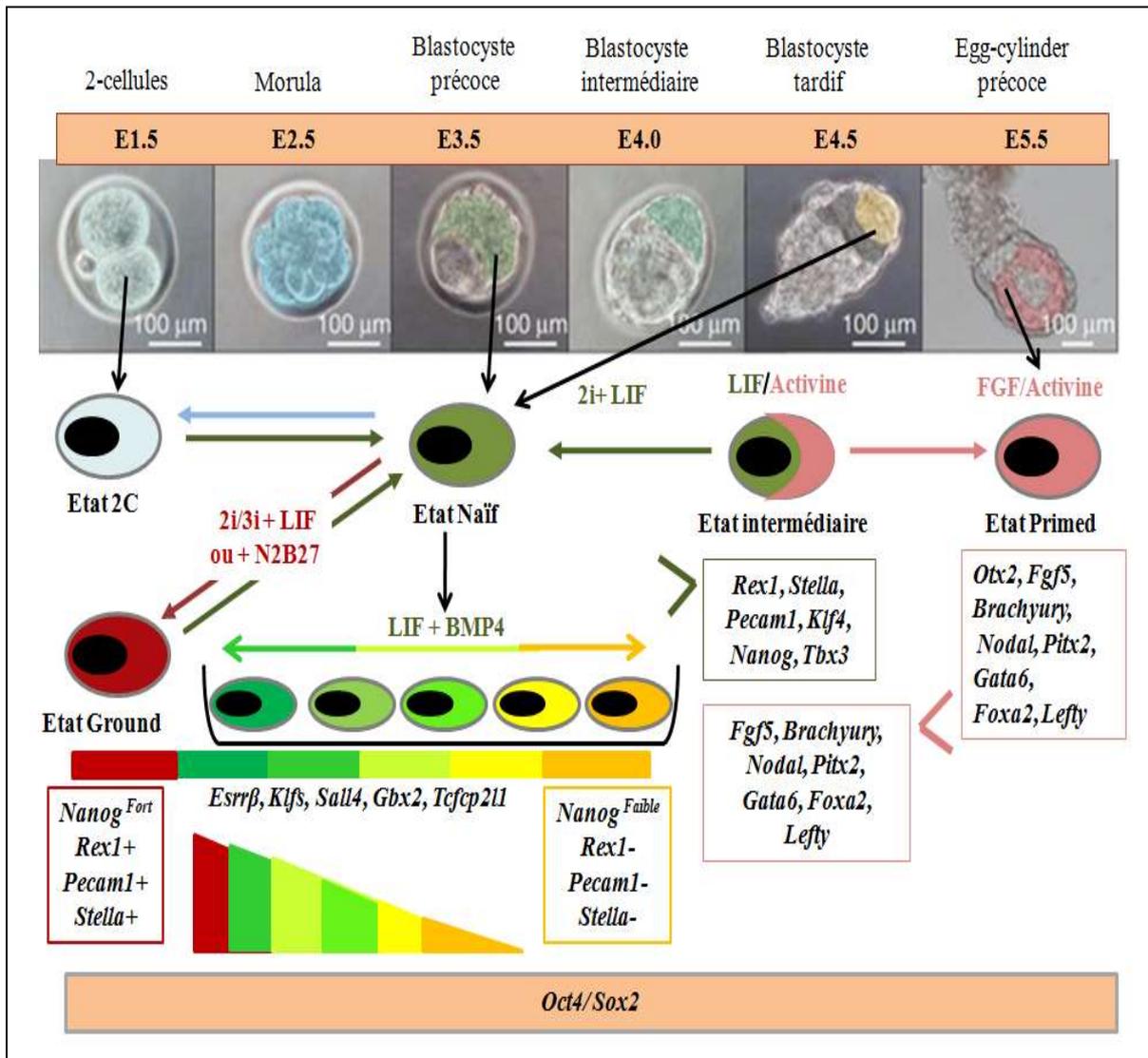
### 2.8.3 Les caractéristiques fonctionnelles

Les IESCs sont capables de produire des corps embryoides (EBs) et de former des tératomes. Au niveau des EBs, la cinétique d'expression des marqueurs de différenciation est proche de celle des EpiSCs, ce qui montre que les IESCs sont plus proches de l'engagement en différenciation (Chang and Li, 2013). Enfin, la capacité des IESCs de coloniser l'ICM a été prouvée par la formation des chimères qui s'agrègent avec des morulas. Au stade blastocyste, 33% d'embryons colonisent l'ICM avec les IESCs et 55% avec les mESCs. Ces résultats montrent que les IESCs sont dotées d'une capacité de formation des chimères (Chang and Li, 2013).

Une autre étude a identifié un nouvel état transitoire des mESCs en culture, qui est associé, au niveau transcriptionnel, à l'état des blastomères de l'embryon de souris au stade 2-Cellules (2C) (Macfarlan *et al.*, 2012). Cet état est appelé « état transitoire 2C ».

Ces phases transitoires avec des propriétés uniques *in vitro* semblent être à l'origine des mESCs naïfs et des EpiSCs en fonction des conditions de culture utilisées. Par exemple, diverses combinaisons et/ou les concentrations de PD03, CHIR (PD03 et CHIR sont des inhibiteurs de GSK3 $\beta$ ), BMP4, et LIF pourraient engendrer des cellules pluripotentes distinctes, avec des propriétés différentes de bona-fide ESCs (état ground) dans 2i/LIF (ou 2i) (Boroviak *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2015; Najm *et al.*, 2011).

D'après ces différents travaux et au fur et à mesure de l'identification des cytokines et facteurs modulant l'état des cellules, on peut imaginer que l'on saura figer, *in vitro*, tous les états intermédiaires des cellules qui fluctuent entre les états naïf et primed (Fig.16). L'établissement de protocoles expérimentaux *in vitro* mimant ces transitions est essentiel pour une meilleure caractérisation des acteurs clés qui permettent cette plasticité cellulaire.



**Figure 16: Modèle de différents états de pluripotence et qui sont présents dans le développement de l'embryon de souris.** Photos d'embryons issues de Boroviak *et al.* 2014.

## 2.9.2 La plasticité cellulaire: Balance entre les mESCs naïves et les EpiSCs primed

Avec la découverte et la dérivation des EpiSCs de souris (Brons *et al.*, 2007; Tesar *et al.*, 2007), une étape importante a été franchie dans le domaine des cellules souches pour la caractérisation de la pluripotence humaine et murine. L'isolement des EpiSCs murines, qui ont été dérivées et cultivées dans des conditions de culture similaire aux cellules hESCs, a permis de mieux comprendre l'origine développementale des hESCs. Ces travaux ont aussi élargi la notion de l'état de pluripotence non pas comme un "seul état" mais comme un « gradient des états » (Kuijk *et al.*, 2012).

En parallèle, ce point de vue des « différents grades » de l'état de pluripotence ressort également de l'observation que les mESCs ne sont pas une population homogène de cellules. Au lieu de cela, les mESCs sont dans un état métastable transitant de l'état naïf à l'état primed en fonction des conditions de culture (Chambers *et al.*, 2007; Hayashi *et al.*, 2008). Il existe toujours une controverse à propos de la signification biologique de cette hétérogénéité dans la culture. Certains soutiennent que ces états transitoires peuvent refléter la variété intrinsèque qui permet aux mESCs de réagir rapidement aux signaux de différenciation hétérogène et qui permettrait le « lignage priming » (Abranches *et al.*, 2014; Silva and Smith, 2008). Comme discuter précédemment, des études du profil transcriptionnel et de la méthylation de l'ADN par « Single cell », ont mis en lumière l'importance de l'hétérogénéité (Grün *et al.*, 2014; Smallwood *et al.*, 2014).

D'une façon générale, le passage des mESCs en EpiSCs est appelé « Conversion » alors que celui de l'état primed à l'état naïf est appelé « Réversion ».

### 2.9.1 La Conversion : état naïf vers état primed (ICM/mESCs vers EpiSCs)

Il est possible de dériver des mESCs et des cellules EpiSCs à partir de l'ICM d'un blastocyste à E3.5 (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981; Najm *et al.*, 2011). L'obtention d'un type ou l'autre des cellules dépend des conditions de culture et principalement, des facteurs de croissance qui soutiennent l'auto-renouvellement des cellules à l'état naïf (LIF/BMP4) ou à l'état primed

(ACTIVINE/FGF). La conversion de l'ICM en cellules EpiSCs est rapide et efficace (Najm *et al.*, 2011).

Les colonies ressemblant aux EpiSCs sont incapables de se maintenir dans les conditions FBS/LIF. Ces résultats indiquent que la conversion de l'ICM en EpiSCs intervient au cours des premiers jours de culture en absence de LIF. En effet, la transition de l'état naïf en primed, suite au retrait du LIF, est encore caractérisée par le changement du devenir des cellules, basé sur un test d'apoptose (Boeuf *et al.*, 2001) et par un changement du statut du cycle cellulaire (Coronado *et al.*, 2013). L'efficacité de conversion est supérieure à l'efficacité de réversion de l'épiblaste tardif en mESC. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que les EpiSCs représentent un état de développement plus avancé que l'ICM, qui continuerait son développement *in vitro* pour se stabiliser au stade EpiSCs en présence de facteurs adéquat (FGF/ACTIVINE, par exemple).

La conversion des mESC en cellules EpiSCs est très efficace. Ainsi, lorsqu'elles sont placées dans le milieu de culture des cellules EpiSCs, la majorité des mESC se convertissent spontanément en cellules EpiSCs en seulement quelques passages (Guo *et al.*, 2009).

NANOG dirige la transcription d'une cohorte de régulateurs de pluripotence au stade pré-implantatoire qui sont exprimés de manière différentielle entre les ESCs et les EpiSCs comme *Esrrb*, *Klf4*, *Klf5*, *Rex1* et *Tbx3*. Les cellules ES surexprimant *Nanog* résistent à la différenciation en EpiSCs, et retiennent, bien qu'à des niveaux réduits, l'expression de marqueurs de cellules souches embryonnaires après des passages répétés en milieu ACTIVINE/FGF (Osorno and Chambers, 2011). De plus, des concentrations élevées de NANOG dans les mESC stabilisent la pluripotence, même en présence de signaux de différenciation, tels que l'acide rétinoïque, le 3-méthoxy-benzamide ou l'ACTIVINE/FGF (Chambers *et al.*, 2003; Osorno and Chambers, 2011).

Récemment, deux facteurs de transcription TCF15 (Id-regulated Transcription factor 15) et FLCN (Tumor Suppressor folliculin) ont été identifiés pour la transition ES vers les EpiSCs. TCF15, dont l'expression est dépendante de FGF4, est exprimé dans l'embryon à E4.5 et il est spécifiquement associé aux cellules primed. Dans l'épiblaste juste avant l'implantation, il réprime *Nanog* (Davies *et al.*, 2013). FLCN, avec ses partenaires d'interaction FNIP1/2, entraîne la différenciation en limitant la localisation nucléaire et l'activité du facteur de transcription bHLH TEF3 (Betschinger *et al.*, 2013). Les ESCs *Flcn*<sup>-/-</sup> résistent à la différenciation même en présence d'ACTIVINE A, de FGF4 et de BMP4 ou 10% FBS. Inversement, une localisation nucléaire forcée de TEF3 dans les ESCs permet de résister aux conditions de différenciation. De plus, des

études de « Genome-wide location » et des analyses fonctionnelles ont montré que TEF3 régule *Esrrβ*. Ces résultats permettent d'identifier un rhéostat intrinsèque de la cellule pour déstabiliser l'état naïf de la pluripotente et permettre l'engagement de la lignée FLCN-FNIP1/2 à la progression vers l'épiblaste au cours du développement *in vivo* (Betschinger *et al.*, 2013).

## 2.9.2 La Réversion: état primed vers état naïf (Epiblaste/EpiSCs vers mESC)

De nombreux travaux ont démontré qu'il est possible de reprogrammer des cellules EpiSCs en cellules naïves, équivalentes aux mESCs. Les premières études ont montré que cette réversion survient spontanément dans les cultures d'épiblastes post-implantatoires. Elle peut être mise en évidence grâce à un système de sélection approprié (comme l'expression de la GFP sous le contrôle de l'enhancer distale du gène *Oct4*, DE-Oct4, spécifique de l'état naïf). L'épiblaste dérivé de souris transgéniques DE-Oct4 est mis en culture dans un milieu supplémenté avec FBS et du LIF. Après 2 à 5 semaines de culture, sont présentes des colonies de cellules GFP+ qui donnent ensuite naissance à des lignées de mESCs « révertées » (rESCs), en tous points similaires aux lignées dérivées d'un ICM-E3.5 (Bao *et al.*, 2009).

D'autres approches plus complexes ont permis de « réverter » les EpiSCs en mESCs, en surexprimant, par exemple, *Nanog* et ses cibles (efficacité, 10%) (Festuccia *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2009) ou en surexprimant *Klf4* (Guo *et al.*, 2009; Hall *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2009) ou de *Klf2* (Hall *et al.*, 2009) couplée à la culture avec 2i/LIF (efficacité de 0,2 à 2%). Enfin, plusieurs études ont montré le rôle clé de la voie LIF/STAT3 dans la réversion des EpiSCs en mESCs. La protéine de fusion STAT3-ERT2 exprimée dans des ES cultivées en 2i/LIF supplémenté avec le tamoxifène est suffisante pour réaliser cette réversion (Yang *et al.*, 2010a). Aussi, la réversion peut être stimulée par la surexpression des gènes cibles de la voie LIF/STAT3, y compris les deux effecteurs majeurs comme *Tcfcp2l1* (Martello *et al.*, 2013) et *Gbx2* (Tai and Ying, 2013).

A noter que la surexpression de ces facteurs n'est nécessaire que d'une manière transitoire, comme pour la reprogrammation somatique, une fois que les cellules ont atteint l'état naïf, elles acquièrent une indépendance aux transgènes et peuvent être maintenues en culture après extinction ou excision de ces derniers.

### III. Le LIF: Leukemia Inhibitor Factor

#### A. Historique et Généralités

##### 1. Historique

L'activité biologique du LIF a été décrite pour la première fois en 1969 par le groupe d'Ichikawa. Celui-ci décrivait une activité biologique, issue de milieu conditionné d'embryons, capable d'inhiber la prolifération cellulaire et d'induire la différenciation en macrophages de la lignée murine myéloïde leucémique M1 (Ichikawa, 1969; Metcalf, 2003; Trouillas *et al.*, 2009a). Cette activité biologique a ensuite été appelée D-factor (Differentiation-factor), et partiellement purifiée par le même groupe à partir de milieu conditionné d'embryons (Maeda *et al.*, 1977) ou à partir de liquide d'ascites (Okabe *et al.*, 1977). Sa purification complète est obtenue en 1984 (Tomida *et al.*, 1984).

Par la suite, de nombreuses études ont conduit à sa purification et à son clonage (Abe *et al.*, 1986; Godard *et al.*, 1988; Hilton *et al.*, 1988; Koopman and Cotton, 1984; Moreau *et al.*, 1988; Smith and Hooper, 1987). Parmi ces laboratoires, trois ont découvert et cloné simultanément la cytokine LIF alors caractérisée par ses activités biologiques variées sur i) la prolifération des cellules T humaines adultes (HILDA) (Moreau *et al.*, 1988), ii) le maintien de la pluripotence des cellules ES (DIF) (Smith *et al.*, 1992) et iii) l'induction de la différenciation de cellules leucémiques (Gough *et al.*, 1988). Le LIF a donc été caractérisé comme une cytokine pléiotrope (effets pléiotropes, de *pléo* signifiant plusieurs et *tropos* signifiant changement) présentant des effets biologiques divers et opposés: pro ou anti-différenciateur et pro ou anti-apoptotique en fonction du type et de maturité cellulaire (Mathieu *et al.*, 2012; Shellard *et al.*, 1996; Taupin *et al.*, 1998; Trouillas *et al.*, 2009a).

Les orthologues du LIF ont été caractérisés chez la souris, le porc, l'ovine (Willson *et al.*, 1992), le bovin (Piedrahita *et al.*, 1997), le rat (Takahama *et al.*, 1998), le kangourou (Cui and Selwood, 2000), le vison (Song *et al.*, 2000) et aussi le xénope (résultats non publiés de l'équipe de Pierre Thiébaud, Bordeaux).

## 2. Généralités sur le LIF

La cytokine LIF est une protéine glycosylée de 37 à 62 kDa en fonction de son degré de glycosylation (Gascan *et al.*, 1989; Simpson *et al.*, 1988). Cette glycoprotéine monomérique de 180 acides aminés appartient à la famille des cytokines de l'interleukine-6 (IL-6) qui comprend IL-11, IL-27, CNTF (Ciliary Neurotrophic growth factor), CT1 (Cardiotrophin1), CLC (Cardiotrophin-like cytokine), et OSM (Oncostatin) (Heinrich *et al.*, 2003; Lehmann *et al.*, 2003; Murakami *et al.*, 2004; Rousseau *et al.*, 2008, 2010). Le gène codant pour cette molécule est localisé sur le chromosome 11 chez la souris et sur le chromosome 22 chez l'homme (Gough *et al.*, 1988; Sutherland *et al.*, 1989).

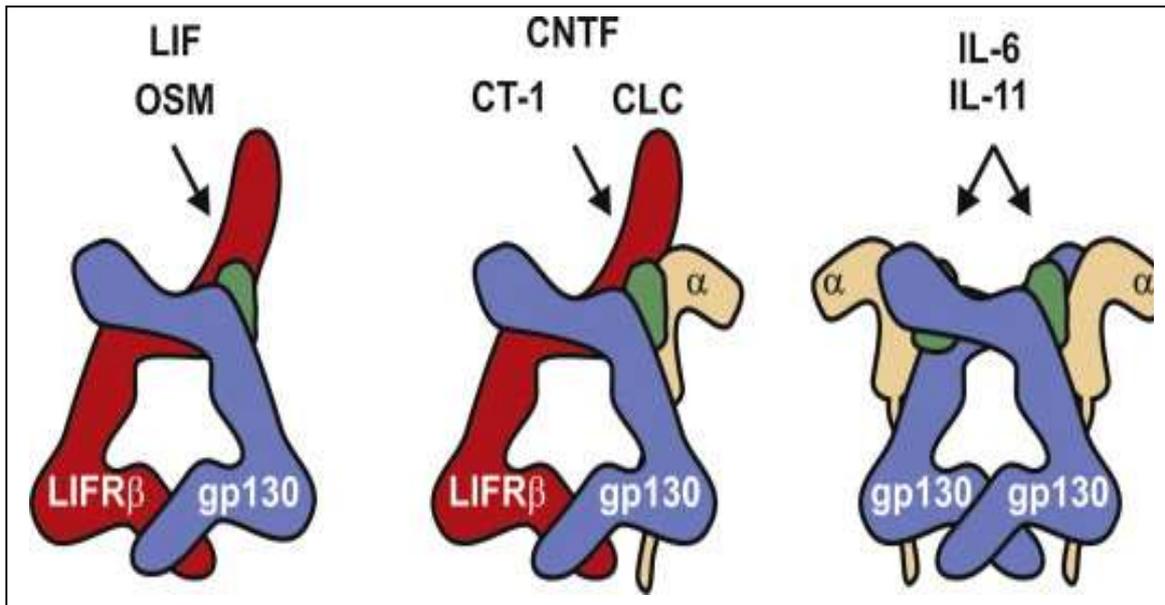
Le LIF existe sous 3 formes: (i) une forme sécrétée (soluble) appelée LIF-D, (ii) une forme liée à la matrice extracellulaire, LIF-M et (iii) une forme interne iLIF ou LIF-T (Haines *et al.*, 1999; Rathjen *et al.*, 1990). Les isoformes LIF-D et LIF-M sont des transcrits alternatifs de leur premier exon responsable de leur localisation. L'isoforme LIF-T est une protéine tronquée due à l'absence de codon AUG dans le premier exon et à l'initiation de la traduction au premier codon AUG de l'exon 2. L'expression de ces trois transcrits est régulée de manière indépendante et spatio-temporelle pendant l'embryogenèse et la vie adulte. En effet, le cerveau adulte n'exprime que la forme LIF-M et l'intestin néonatal n'exprime que la forme LIF-D alors que le LIF-T est exprimé de manière assez élevée dans le foie (Robertson *et al.*, 1993). Le rôle spécifique de ces différentes formes du LIF n'est pas encore complètement élucidé mais c'est le LIF soluble qui maintient la pluripotence des mESCs *in vitro* et c'est donc celui qui est étudié dans ce travail de thèse.

Le LIF est produit : (i) *in vitro* par de nombreuses lignées de cellules différenciées, telles que les cellules de l'endomètre, les fibroblastes, les hépatocytes, les ostéoblastes, les monocytes, les macrophages, les lymphocytes T activés et les cellules tumorales (Baumann and Wong, 1989; Liu *et al.*, 1999; Taupin *et al.*, 1998; Tomida, 1997; Trouillas *et al.*, 2009a), mais également (ii) *in vivo* par l'utérus où son expression est maximale lors des processus implantatoires, puis ensuite au niveau du stade « egg-cylinder », et par les cellules différenciées du trophoctoderme (Nichols *et al.*, 1996; Song *et al.*, 2000; Stewart *et al.*, 1992).

## B. LIF et son récepteur : gp130 et gp190

Le LIF et les autres membres de la famille de l'IL-6 activent une cascade de signalisation à travers la sous-unité commune gp130 (Gearing *et al.*, 1992). Le complexe de signalisation entre l'IL-6 et son récepteur est un hexamère qui se compose de deux molécules : gp130 et IL-6 récepteur alpha (IL-6R $\alpha$ ) (Boulanger *et al.*, 2003; Chow *et al.*, 2001). L'assemblage hexamérique est nécessaire pour la transactivation des tyrosines kinases de la famille des JAKs (Matadeen *et al.*, 2007). D'autre part, le complexe de signalisation du LIF avec son récepteur est un trimère (skiniotis 2008) qui est constitué du LIF lié à une molécule de gp130 ainsi que d'une seconde sous-unité du récepteur appelé LIFR ou gp190 ou LIFR $\beta$  (Gearing *et al.*, 1991). Ces deux sous-unités n'ont pas une activité catalytique intrinsèque. Le récepteur LIF est constitué d'un domaine extracellulaire composé de trois domaines de type FN-III (Fibronectine de type III) formant "le pied" des deux sous-unités et deux domaines de liaison à la cytokine CBMs (Cytokine Binding Modules) séparés par un domaine de type immunoglobuline (Ig-like). Le domaine intracellulaire est constitué de trois modules nécessaires pour interagir avec des facteurs de transcription, des kinases et des phosphatases (Auernhammer and Melmed, 2000). La gp130 a une architecture similaire à gp190 (Xu *et al.*, 2010). De plus, le LIF se lie avec une haute affinité à un hétérodimère déjà préformé de la gp190 qui forme ensuite un hexamère fonctionnel avec la chaîne gp130 (Boulanger *et al.*, 2003). Ces deux sous-unités sont produites *in vivo* par les cellules de l'ICM du blastocyste au moment de son implantation (Nichols *et al.*, 1996).

Enfin, le récepteur du LIF, LIFR $\beta$ , est effectivement partagé entre cinq cytokines: LIF, OSM, CT-1, CNTF et CTC. L'ensemble de ces cytokines agit via un hétérodimère gp130/gp190 (Boulanger and Garcia, 2004). Les trois derniers exigent également un récepteur de "chaîne alpha" (CNTFR $\alpha$ ) pour former un complexe quaternaire afin d'initier la signalisation. La cytokine OSM, comme le LIF, peut agir via un simple dimère gp130/LIFR $\beta$  (Nicola and Babon, 2015) (**Fig.17**).



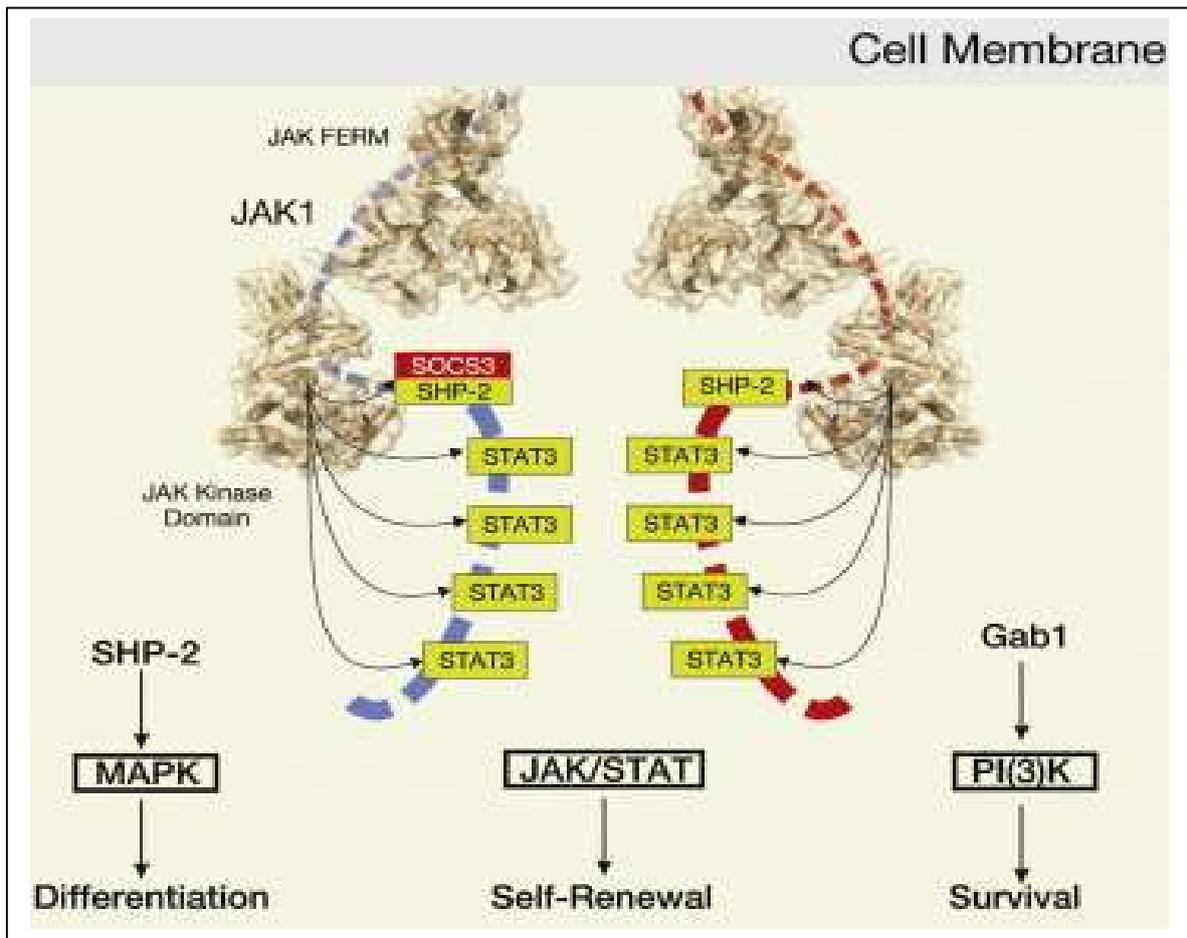
**Figure 17: La signalisation LIF et son récepteur hétérodimérique.** Les deux chaînes du récepteur LIF (LIFR $\beta$  et gp130) sont partagées par d'autres cytokines de la famille d'IL-6. LIF et OSM se lient à gp130 et LIFR $\beta$ . CNTF, CT-1 et CLC se lient au même hétérodimère avec l'aide d'une chaîne alpha du récepteur spécifique (CNTF $\alpha$ ). IL-6 et IL-11 se lient au récepteur qui se compose de deux chaînes de gp130 et de deux chaînes alpha spécifiques (IL-6Ra et l'IL-11Ra, respectivement). Photo issue de Nicola and Babon, 2015.

### C. La signalisation LIF

La fixation du LIF sur son récepteur induit l'activation de gp130 et gp190, qui s'hétérodimérisent permettant ainsi le rapprochement de leur domaine intracellulaire et un changement conformationnel. Suite à celui-ci les tyrosines kinases sous-membranaires telles que les JAKs associées de manière constitutive au récepteur sont activées par phosphorylation (Stahl *et al.*, 1994). Les JAKs activées vont alors phosphoryler le récepteur au niveau de résidus tyrosines (Ihle and Kerr, 1995). Les tyrosines phosphorylées servent alors de site d'ancrage pour des protéines à domaine SH2, comme les STATs permettant ainsi l'activation en aval de divers effecteurs.

Il y a quatre membres de la famille JAK (JAK1, JAK2, JAK3, TYK2). Des expériences de surexpression ont initialement montré que le récepteur du LIF est capable de lier au moins trois des quatre membres de la famille JAK (JAK1, JAK2 et TYK2) (Stahl *et al.*, 1994). Toutefois, des études de KO révèlent que la signalisation LIF est fortement abrogée en absence de JAK1 mais pas JAK2 ou TYK2, ce qui suggère qu'il est le membre dominant de la famille JAK dans des conditions physiologiques (Chung *et al.*, 2006; Ernst *et al.*, 1996; Rodig *et al.*, 1998; Takahashi

*et al.*, 2008). JAK1 activé initie alors une cascade de phosphorylation des tyrosines qui stimulent trois voies de signalisation distinctes (**Fig.18**): la voie JAK1/STAT (Stahl *et al.*, 1994), MAPK (Thoma *et al.*, 1994) et PI3K (Oh *et al.*, 1998). Ces différentes voies de signalisation ont un rôle à la fois: (i) dans le maintien des mESCs dans un état de pluripotence (via les voies JAK et PI3K), mais également (ii) dans la survie, (iii) dans la prolifération (via la voie STAT1), (iv) dans l'atténuation en rétrocontrôle de son propre signal (via les protéines SOCSs et les PIASs), et enfin (v) dans la différenciation des cellules.



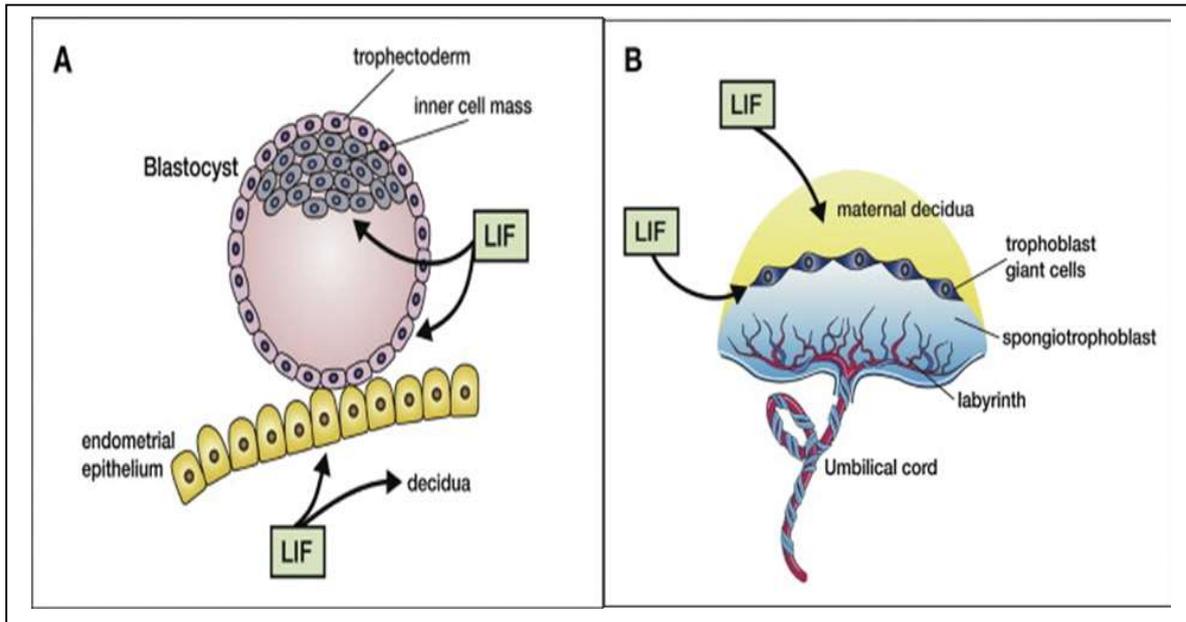
**Figure 18: Signalisation LIF:** Le LIF, suite à sa fixation sur son récepteur, stimule différentes voies de signalisation: JAK1/STAT, MAPK et PI3K. Les deux chaînes du récepteur LIF (LIFRβ et gp130) sont fixées sur JAK1, la tyrosine kinase qui initie la cascade de signalisation. JAK1 phosphoryle cinq tyrosines sur chaque sous-unité du récepteur, quatre d'entre elles sont des sites pour la stimulation de facteur de transcription STAT3 tandis que la cinquième est un site de fixation pour SHP2 (qui stimule la voie MAPK) et SOCS3 (qui régule négativement à la fois la voie JAK1/STAT et la voie MAPK). La cytokine pléiotropique LIF présente des rôles différentiels dépendants du type et de la maturité cellulaire. Dans les mESCs, le LIF assure la survie et l'autorenouvellement. Photo issue de Nicola and Babon, 2015.

## D. LIF et le développement embryonnaire

Afin d'explorer le rôle du LIF dans le développement embryonnaire (**Fig.19**), des mESC *Lif*<sup>-/-</sup> ont été générées. De manière étonnante, ces cellules conservent leur pluripotence *in vitro*, mais également *in vivo*. En effet, un blastocyste KO pour le gène *Lif* (*Lif*<sup>-/-</sup>), implanté dans une souris pseudo-gestante (souris *Lif*<sup>+/+</sup> ou souris *Lif*<sup>-/-</sup> recevant des injections intravaginales de LIF), se développe normalement jusqu'au stade adulte. Toutefois, les souris *Lif*<sup>-/-</sup> présentent une perte de motoneurones, une diminution des cellules gliales et une altération des oligodendrocytes (Bugga *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2000; Holtmann *et al.*, 2005; Moon *et al.*, 2002; Stewart *et al.*, 1992). En revanche, les blastocystes d'une souris *Lif*<sup>-/-</sup> ne parviennent pas à s'implanter dans une souris pseudo-gestante *Lif*<sup>-/-</sup> ne recevant pas d'injections intravaginales de LIF (Stewart *et al.*, 1992). Le LIF a donc une fonction non redondante au cours de l'implantation du blastocyste au niveau de l'endomètre utérin, c'est pourquoi le LIF est considéré comme « la cytokine de la nidation » chez la souris (Chen *et al.*, 2000; Croy *et al.*, 1991; Trouillas *et al.*, 2009a). Des études ont également montré que certaines femmes stériles n'expriment pas le LIF, mais également une des cibles de cette cytokine à savoir STAT3, au niveau de la paroi utérine. Aussi le LIF peut être utilisé comme indicateur de l'infertilité féminine (Dimitriadis *et al.*, 2007; Mikolajczyk *et al.*, 2007). L'utilisation pharmacologique du LIF pour palier à ce déficit a fait l'objet d'essais cliniques, mais n'a pour l'instant pas été couronnée de succès (Brinsden *et al.*, 2009).

## E. LIF et les ESCs

Comme mentionné précédemment, le LIF permet de maintenir les mESCs *in vitro* dans un état pluripotent naïf et stimule leur auto-renouvellement. Le LIF est aussi important pour induire les processus de réversion des ESCs humaines de leur état « primed » vers l'état « naïf ». Les voies de signalisation stimulées par le LIF et qui sont responsables de l'auto-renouvellement des mESCs sont les voies JAK1/STAT3/SOCS3, SHP2/RAS/MAPK et PI3K (**voir le paragraphe II-E.2.5- Caractéristiques extrinsèques des états naïf et primed de la pluripotence**).



**Figure 19: LIF dans la reproduction.** La cytokine LIF produite par les glandes de l'endomètre (et éventuellement par le blastocyste) agit sur l'épithélium de l'endomètre pour le rendre réceptif à l'attachement du blastocyste, et sur le stroma pour la décidualisation et le rendre prêt pour l'implantation et le développement du placenta (A). Le LIF agit également sur l'ICM du blastocyste pour maintenir sa totipotence au cours de la diapause, et sur le trophoblaste pour induire une invasion trophoblastique dans l'endomètre. Le LIF est important pour la formation de la decidua maternelle et son activité est essentielle pour la formation de cellules géantes trophoblastiques (B). De même, il est nécessaire à la formation d'une structure correcte de la couche de labyrinthe dans laquelle les vaisseaux sanguins de la mère et du fœtus entrent en contact. Photo issue de Nicos A. Nicola and Babon, 2015.

Comme le facteur des cellules souches (SCF), le LIF est un stimulateur de la prolifération des cellules germinales primordiales embryonnaires (les progéniteurs des gamètes) dans des cultures primaires sur des MEFs (Matsui *et al.*, 1991) et peut être utilisé pour maintenir l'auto-renouvellement et la pluripotence des cellules germinales embryonnaires (Leitch *et al.*, 2013). Vu que les souris mâles *Lif<sup>-/-</sup>* sont fertiles et que les blastocystes des femelles se développent normalement quand elles sont transplantées dans un hôte normal, le LIF ne semble pas jouer un rôle critique dans le développement normal des gamètes mâles et femelles.

En résumé, les voies de signalisation induites par le LIF sont semblables dans la plupart des types de cellules, y compris l'activation des voies JAK1/STAT3, PI3K/AKT et MAPK. Les effets différentiels du LIF peuvent en partie résulter (i) de niveaux et de durée d'activation différentiels

des trois voies JAK1/STAT3/SOCS3, MAPK et PI3K qui ont des effets différents, voire opposés sur la pluripotence et la différenciation, (ii) des états différents de la chromatine qui aboutissent à une activation génique différentielle au même signal, (iii) et effet combiné avec d'autres cytokines. De plus, il a été montré que dans des cellules où le LIF a des effets opposés (comme les mESC et la lignée M1), ce sont des membres différents de familles de gènes semblables qui sont induits. Par exemple, dans la lignée M1 c'est *JunD* puis *Socs1* alors que dans les mESC ce sont *JunB* puis *Socs3* qui sont induits par la cascade LIF/STAT3. De plus, le temps d'induction des cibles est discriminant (induction transitoire ou persistante) (Trouillas *et al.*, 2009a).

Le LIF a donc des effets différentiels physiologiques (Akita *et al.*, 1997; Austin and Burgess, 1991; Barnard *et al.*, 1994; Deverman and Patterson, 2012; Ishibashi *et al.*, 2009; Metcalfe, 2011; Walker *et al.*, 2010; Yano *et al.*, 1998; Yoshida *et al.*, 1993) mais aussi pathologiques dans plusieurs modèles de cellules souches (embryonnaires et adultes) et le cancer (Chen *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 1999, 2013; Maruta *et al.*, 2009; McKenzie and Szepietowski, 2004; Peñuelas *et al.*, 2009; Quaglino *et al.*, 2007; Sims and Johnson, 2012; Tomida, 1997; Wu *et al.*, 2015; Wysoczynski *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2014) (**Tableau-1**).

**Dans nos études, nous nous sommes intéressés aux effets du LIF sur les cellules souches embryonnaires murines (mESCs) pour étudier la pluripotence et la plasticité cellulaire dépendantes du LIF.**

## A- Fonctions physiologiques

- a) Remodelage de la moelle osseuse en agissant sur les cellules stromales pour améliorer leur différenciation en ostéoblastes lors de la formation osseuse et inhiber la production d'ostéoblastes inhibitrice, la sclérostine, par les ostéocytes (Walker EC *et al.*, 2010).
- b) Agit sur l'hypophyse antérieure pour améliorer la différenciation de précurseurs en corticotropes et stimuler la sécrétion de l'ACTH de corticotropes en synergie avec la CRH (corticotropin-releasing hormone) produite par les neurones hypothalamiques (Yano H *et al.*, 1998; Akita S *et al.*, 1997).
- c) Augmente l'autorenouvellement des NSCs, stimule la production, la survie et la maturation des neurones, des astrocytes GFAP+ et des cellules gliales, switche le choix des neurotransmetteurs des neurones sensoriels (de noradrénaline à l'acétylcholine) (Yoshida T *et al.* 1993). *In vivo*, l'introduction du LIF (par l'intermédiaire d'un vecteur d'adénovirus dans le cerveau) stimule la prolifération de cellule précurseur d'oligodendrocytes, et ainsi la remyélinisation des axones par les oligodendrocytes dans l'hippocampe (Deveman BE et Patterson PH, 2012). Dans les souris *Lif*<sup>-/-</sup>, il a été observé une réduction de myélinisation dans les régions du cerveau (Bugga L *et al.*, 1998) et un retard dans la production d'oligodendrocytes dans le nerf optique (Ishibashi T *et al.*, 2009).
- d) Stimule, *in vitro*, la prolifération des myoblastes mais inhibe leur différenciation en myotubes (Austin L et Burgess AW, 1991), et après une blessure, la régénération du muscle squelettique est renforcée par l'introduction de LIF, *in vivo* (Barnard W *et al.*, 1994).
- e) Favorise la différenciation des cellules T régulateurs (Treg) en induisant l'expression de facteur de transcription Foxp3, et en inhibant la différenciation des cellules pro-inflammatoire Th17 (Metcalf SM, 2011).

## B- Fonctions pathologiques

- a) Induit la production de cytokines pro-inflammatoires et des protéases impliquées dans la dégradation du cartilage. Cela suggère un rôle important du LIF dans la progression de statut inflammatoire et de la destruction du cartilage vu dans la polyarthrite rhumatoïde (Sims NA *et al.* 2012).
- b) Induit la survie de cancers du sein (Quagliano A *et al.* 2007), de la peau et du nasopharynx. Les niveaux élevés du LIF sont en corrélation avec la récurrence et la résistance tumorale (Liu SC *et al.* 2013).
- c) Induit la survie des cellules cancéreuses colorectales et régule négativement p53 en activant la voie protéolytique MDM2 ce qui confirme les effets de LIF sur la chimio- et radio-résistance (Yu H *et al.* 2014). De plus, l'expression de LIF dans ces cellules a été induite par des niveaux bas d'oxygène et par le facteur de transcription HIF2 $\alpha$  (Wu L *et al.* 2015).
- d) Stimule la croissance, inhibe la différenciation et induit les métastases dans une variété de tumeurs *in vitro* et *in vivo*, comme les Choriocarcinomes (Tomida, 1997), les médulloblastomes (Liu *et al.*, 1999), les Rhabdomyosarcomes (Wysoczynski M *et al.*, 2007), les mélanomes (McKenzie RC *et al.*, 2004; Maruta S *et al.*, 2009). Aussi, il induit l'autorenouvellement et l'oncogenèse *in vivo* du cellules initiatrices de gliomes (Penuelas S *et al.*, 2009), mais il est encore difficile de démontrer un rôle direct de LIF dans la tumorigenèse.
- e) LIF (et plus précisément LIFR) inhibe les métastases dans le cancer du sein humain par la voie Hippo-YAP. La perte de LIFR est associée à un mauvais pronostic et il est identifié comme un nouveau suppresseur de métastases (Chen D *et al.* 2012).

Tableau-1: Exemple de fonctions physiologique (A) et pathologique (B) du LIF.

## IV. La MMP1 (Matrix MetalloProteinase 1)

### A. Généralités

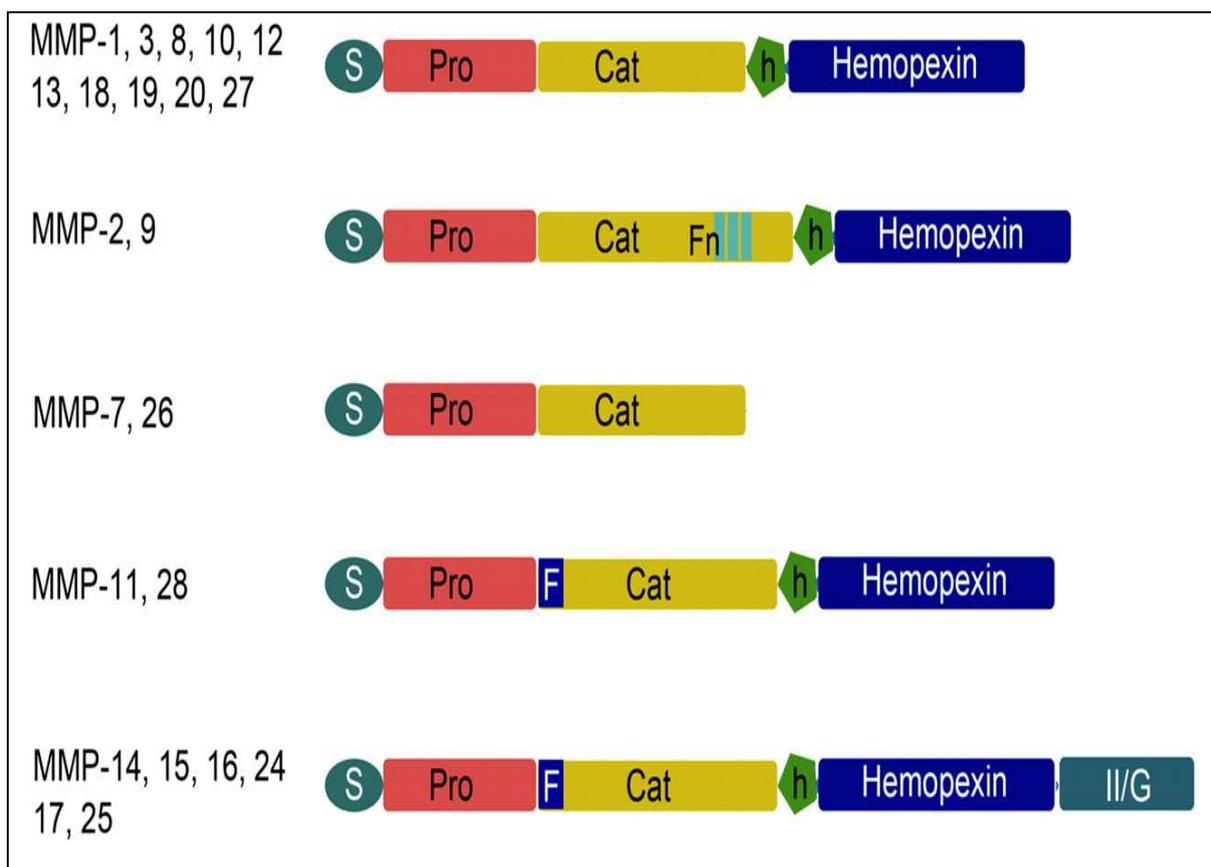
Les MMPs (Matrix metalloproteinases) appartiennent à la superfamille des « metzincines » qui est caractérisée par la présence d'un motif très conservé de fixation du zinc au niveau du site catalytique (endopeptidases dépendentes du zinc). Ces protéines sont présentes dans le milieu extracellulaire de divers tissus. À ce jour, 26 MMPs sont connues et partagent un grand nombre de similitudes structurelles et fonctionnelles. Cependant, elles diffèrent dans leurs spécificités de substrat et sont nommées en fonction du substrat qu'elles dégradent (collagénases, gélatinases) ou d'autres paramètres [stromélysines, matrilysines et MMPs associées à la membrane (MT-MMP)] (Egeblad and Werb, 2002).

Toutes les MMPs possèdent un signal peptide en N-terminal (ou domaine « pré ») qui dirige la sécrétion de ces enzymes dans le réticulum endoplasmique (où le domaine « pré » est clivé) puis hors de la cellule. Ainsi, la plupart des MMPs sont constitutivement sécrétées après leur synthèse, sauf les MT-MMPs qui possèdent un domaine transmembranaire et sont exprimées à la surface de la cellule. Le domaine « pré » est suivi d'un domaine « pro » qui maintient l'enzyme dans un état latent jusqu'à son clivage et l'activation consécutive de l'enzyme. Après le domaine « pro » se trouve le site catalytique de l'enzyme qui contient le domaine de liaison au zinc. A l'exception des MMP 7, 26 et 23, toutes les MMPs possèdent un domaine homologue à l'hémopexine connecté au site catalytique par une liaison peptidique (Tan and Liu, 2012) (**Fig.20**). Ce domaine modifie l'affinité de l'enzyme pour certains substrats, influence sur son activité protéolytique et régule également la liaison des TIMPs (Tissue Inhibitors of MetalloProteinases), les inhibiteurs extracellulaires des MMPs. Comme d'autres enzymes protéolytiques, les MMPs sont tout d'abord synthétisées et sécrétées comme des proenzymes (ou zymogènes). Leur activation extracellulaire est initiée par des MMPs préalablement activées ou par des protéases à spécificité sérine qui clivent le lien peptidique retenant le domaine « pro ».

Les MMPs sont impliquées dans les processus de dégradation physiologique de la matrice extracellulaire (MEC) (Bäck *et al.*, 2010; Przybyla *et al.*, 2013; Przybylowska *et al.*, 2006), mais aussi dans l'invasion des cellules tumorales au-delà de leur tissu d'origine et contribuent donc largement à la formation des métastases du cancer, à l'angiogenèse et à la tumorigenèse (Chen *et*

*al.*, 2011; González-Arriaga *et al.*, 2012). Les MMPs sont aussi des biomarqueurs potentiels pour les maladies inflammatoires comme la maladie de IBD (Inflammatory bowel disease) (Pedersen *et al.*, 2009). De plus, leur expression est induite par l'hypoxie dans certains types de cancers (Lin *et al.*, 2008; Nakayama, 2013). Récemment, l'implication de MMP1 dans le maintien de l'auto-renouvellement des mESCs a permis de mettre en lumière un des mécanismes d'action des cellules nourricières sur lesquelles sont entretenues les mESCs ou les hESCs (Przybyla *et al.*, 2013).

**Dans mon projet de thèse, j'ai donc inclus l'étude des effets de MMP1 comme nouveau facteur de microenvironnement sur la plasticité cellulaire des mESCs.**

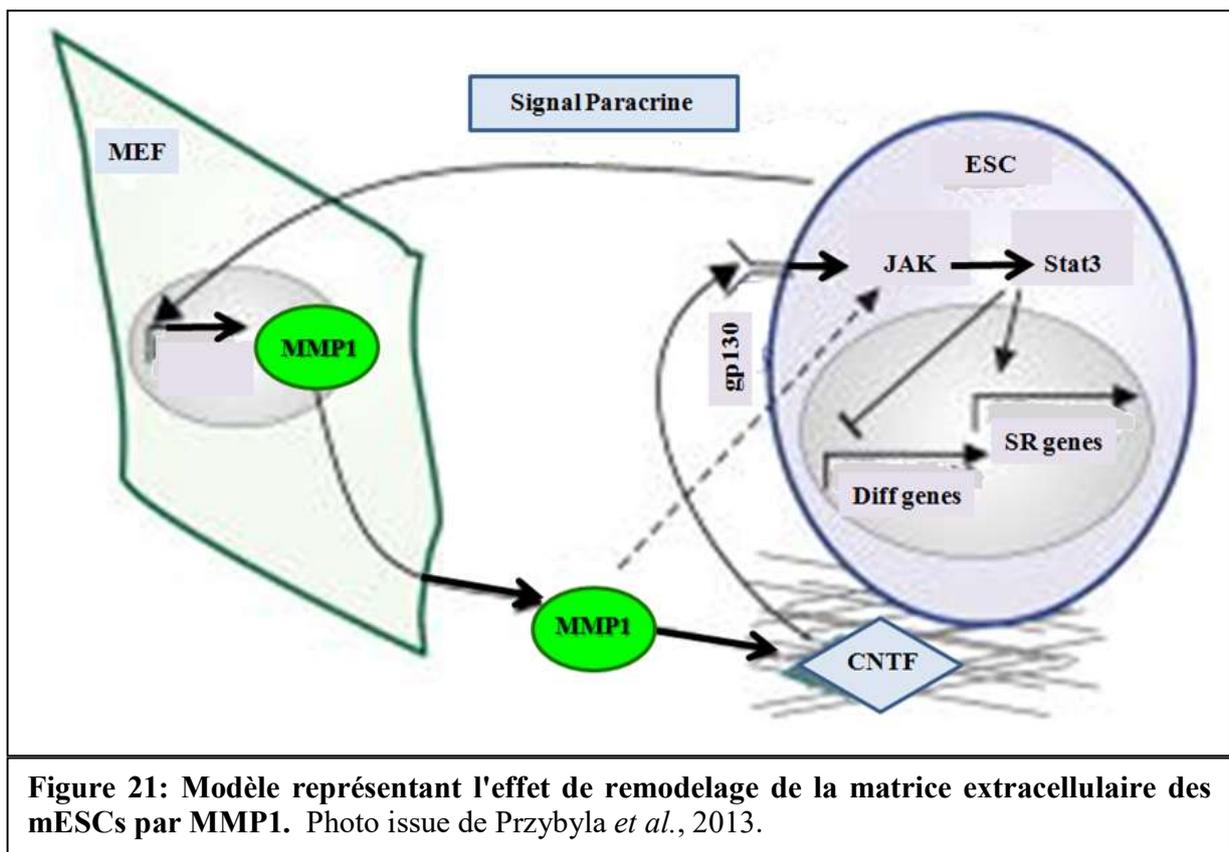


**Figure 20: Structure en domaine de la famille métalloprotéinase matricielle (MMP).** Les MMPs sont structurellement composées de domaines modulaires similaires. La présence ou l'absence de ces domaines, ainsi que leur spécificité de substrat, ont été utilisés pour classer les MMPs en plusieurs sous-groupes. **S:** peptide signal; **Pro:** prodomaine; **Cat:** domaine catalytique; **h:** région charnière; **F:** site de clivage sensible au furin; **Fn:** domaine de répétition de la fibronectine; **II:** domaine transmembranaire de type II; **G:** glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchor. Photo issue de Tan RJ *et al.*, 2012.

## B. MMP1 et les ESCs

L'interaction entre les cellules souches embryonnaires (ESCs) et leur matrice extracellulaire (MEC) influe sur leur état d'auto-renouvellement et leur état de différenciation. Il a été montré que le remodelage de la matrice extracellulaire par MMP1 est important pour le maintien de l'état d'auto-renouvellement des ESCs même en absence de la sécrétion des cytokines solubles par voie autocrine. La MEC agit comme un réservoir de facteurs de croissance et de cytokines (comme le CNTF) et son remodelage permet le relargage de ces protéines de signalisation (Przybyla *et al.*, 2013).

Le CNTF sécrété par les mESCs et capté par la MEC est relargué suite au remodelage de cette dernière par MMP1 provenant des MEFs qui sont activées par voie paracrine par les mESCs (Fig.21). MMP1 maintient alors l'auto-renouvellement des mESCs par l'activation, via CNTF, de la cascade de signalisation gp130/JAK1/STAT3 (Przybyla *et al.*, 2013).

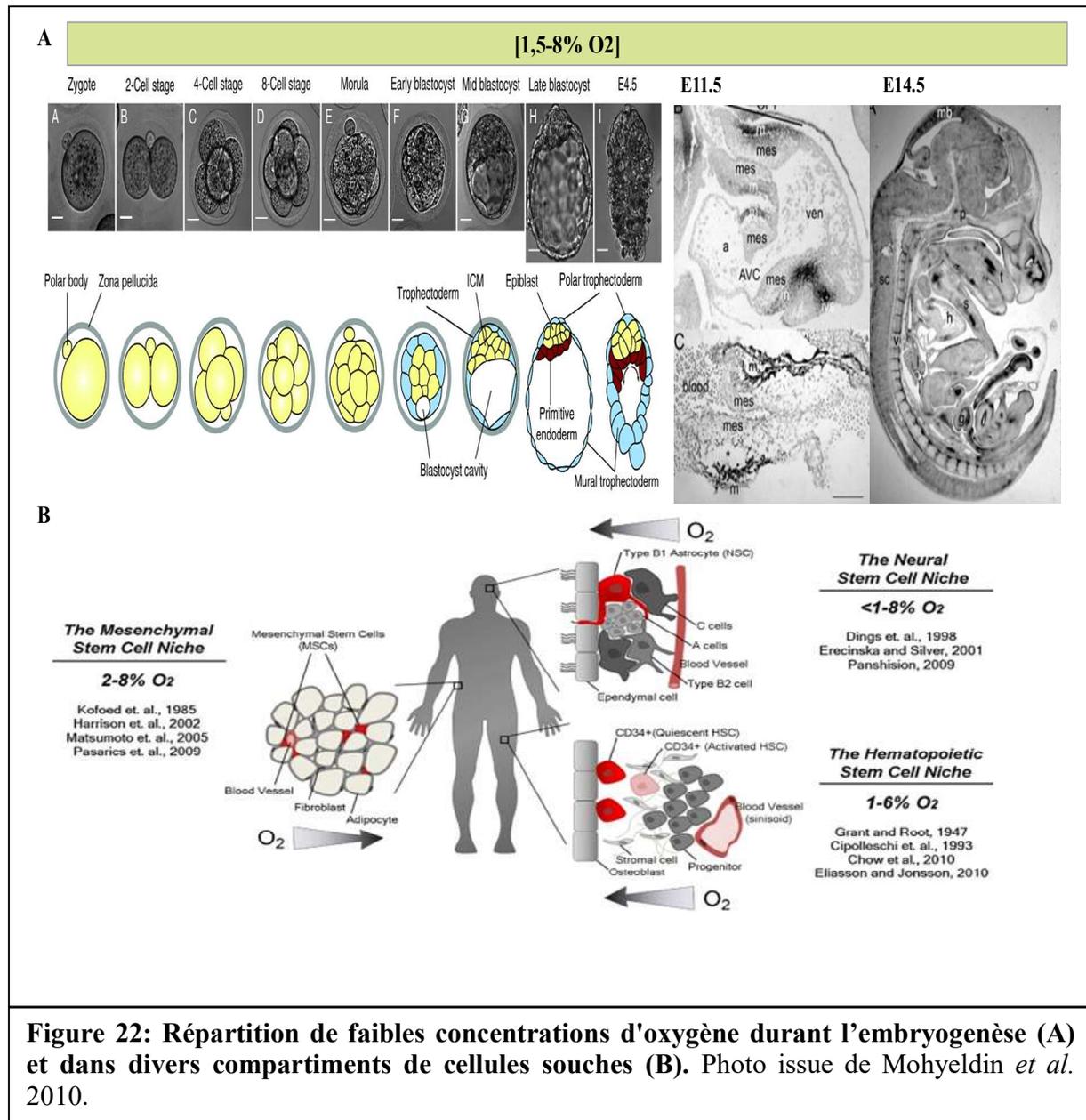


## V. Hypoxie

### A. Généralités

Dans la plupart des organismes vivants, et notamment chez les mammifères, la concentration d'oxygène varie, dans les différents tissus, entre 0 et 14% dans les organes les plus irrigués. Les caractéristiques d'auto-renouvellement et de pluripotence des cellules souches dépendent de l'équilibre de signaux complexes dans leur microenvironnement dont la  $[O_2]$  est une des composantes importantes (**Fig.22**) (Davy and Allsopp, 2011; Mohyeldin *et al.*, 2010). Jusqu'à présent, les effets de l'hypoxie entre le maintien de la pluripotence et l'initiation de la différenciation sont controversés et probablement liés aux  $[O_2]$  utilisées ainsi qu'au protocole de maintien des cellules en hypoxie (dans des chambres spéciales avec ou sans choc normoxique pendant l'expérience).

De nombreux exemples ont démontré que la réponse cellulaire est différente en fonction de la  $[O_2]$ . Il peut donc être considéré comme un abus de langage l'utilisation du terme hypoxie pour une concentration d'oxygène qui est en réalité physiologique. Il serait plus rigoureux d'utiliser des termes tels que « physioxie » ou encore « normoxie *in situ* » quand on parle de faibles concentrations d' $O_2$ . Par conséquent, les expériences à 21% d'oxygène, peuvent être assimilées à une concentration « hyperoxique » (Ivanovic, 2009). Cependant et par simplicité pour notre étude, nous utiliserons les termes de normoxie et hypoxie pour les expériences faites respectivement à  $[O_2]$  atmosphérique ou à des  $[O_2] < 5\%$  respectivement.



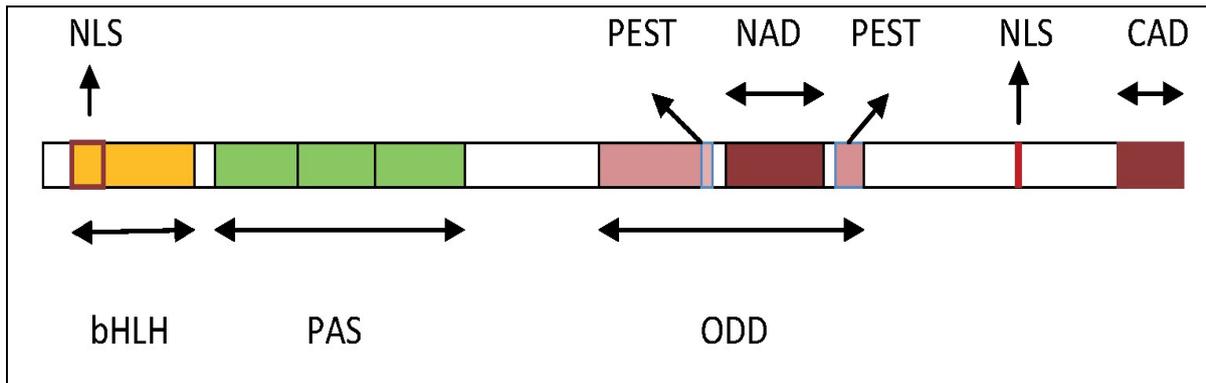
## B. Le complexe HIF

Le complexe HIF (Hypoxia Inducible Factor) est présent dans toutes les cellules de mammifères étudiées à ce jour et si l'on remonte dans l'échelle de l'évolution, on le retrouve jusque chez le nématode *C. elegans* et la drosophile *D. melanogaster*. HIF a été isolé pour la première fois en 1993 et ses composantes protéiques ont été identifiées en 1995 (Wang and Semenza, 1995). HIF est activé de manière exponentielle à mesure que diminue la pression en oxygène dans des cultures cellulaires (Maxwell, 2005). En outre, HIF peut être efficacement

activé par les chélateurs du fer et certains métaux de transition comme le cobalt (II). En normoxie, la quantité de HIF détectable dans les cultures cellulaires est variable. Des expériences génétiques (modèles de souris KO *Hif1*<sup>-/-</sup>) ont démontré que ce gène est capital pour le développement normal des mammifères en régulant l'expression des gènes impliqués dans l'érythropoïèse, l'apoptose et la prolifération.

Les HIFs sont des facteurs de transcription hétérodimériques composés de sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ . Ces deux sous-unités sont des protéines de base hélice-boucle-hélice (bHLH) (Hewitson *et al.*, 2002; Wang and Semenza, 1995). HIF1 est un hétérodimère constitué de la sous-unité HIF1 $\alpha$  de 120 kDa (826 acides aminés) qui complexe avec la sous-unité HIF1 $\beta$  de 91 à 94 kDa (deux isoformes de 774 et 789 acides aminés; (Wang *et al.*, 1995). Il existe trois isoformes de sous-unités  $\alpha$  codées par différents gènes (HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$  et HIF3 $\alpha$ ) et deux isoformes de sous-unités  $\beta$  (HIF1 $\beta$  et HIF2 $\beta$ ) (Zagórska and Dulak, 2004). HIF2 $\alpha$  (également appelé Endothelial PAS domain protein1, EPAS1), facteur HIF1-like (HLF), HIF1-related factor (HRF)) partage une identité de séquence de 48% avec HIF1 $\alpha$  et il hétérodimérise avec ARNT pour activer la transcription des gènes cibles (Tian *et al.*, 1997).

HIF3 $\alpha$  diffère de HIF1 $\alpha$  (**Fig.23**) et de HIF2 $\alpha$  par l'absence du domaine d'activation C-terminal requis pour la liaison des co-activateurs (Szablowska-Gadomska *et al.*, 2011). Ainsi, HIF3 $\alpha$  est incapable de recruter des régulateurs co-transcriptionnels et la machine basale de transcription des gènes cibles. HIF1 $\alpha$  régule principalement l'expression des gènes glycolytiques (Hu *et al.*, 2003), tandis que HIF2 $\alpha$  est le principal régulateur de l'érythropoïétine induite par l'hypoxie dans les tissus qui expriment à la fois HIF1 $\alpha$  et HIF2 $\alpha$  (Rankin *et al.*, 2007; Warnecke *et al.*, 2004). HIF2 $\alpha$  a également été montré pour favoriser la progression du cycle cellulaire dans les cellules hypoxiques de carcinomes rénales (Gordan *et al.*, 2007). Peu de données sont connues concernant les gènes cibles de HIF3 $\alpha$ .

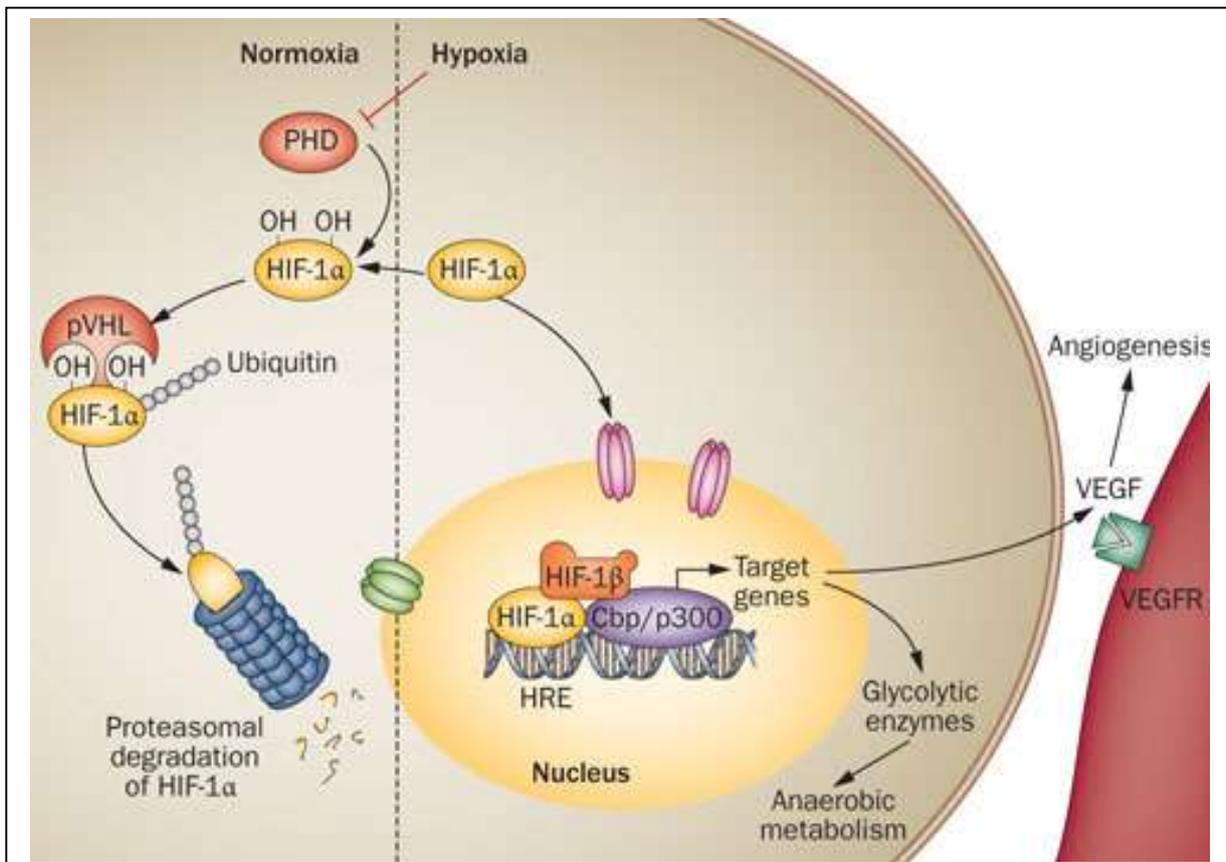


**Figure 23: Structure de HIF1 $\alpha$ :** La partie N-terminale de HIF-1 $\alpha$  contient un domaine bHLH, proche de PAS (PAS-A et PAS-B), puis le domaine ODD (Oxygen-dependant degradation). Le domaine ODD comprend deux séquences PEST-like (P- proline, E- acide glutamique, S- sérine, T- thréonine) qui confèrent une durée de vie courte à HIF-1 $\alpha$  (dans 21% d'O<sub>2</sub>, sa demi- vie est d'environ 5 min) et est suivie par sa dégradation. HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$  contiennent deux domaines de transactivation qui sont responsables de l'activité transcriptionnelle. L'un est situé dans la partie N-terminale de l'hétérodimère appelé N-TAD (NAD) et le second est dans la partie C-terminal appelé C-TAD (CAD). L'activité de la CAD peut être inhibée par FIH (factor inhibiting HIF)-asparaginyle hydroxylase. HIF-1 $\alpha$  est transporté dans le noyau grâce aux NLS (nuclear localisation signal). Photo issue de Szablowska-Gadomska *et al.*, 2011.

### C. Mécanisme de régulation de HIF1 $\alpha$ par l'oxygène

La régulation par l'oxygène de HIF1 $\alpha$  et de HIF2 $\alpha$  s'opère via l'hydroxylation enzymatique (Ivan *et al.*, 2001; Lando *et al.*, 2002). Les enzymes utilisent l'oxygène moléculaire pour modifier des résidus cibles d'acides aminés très spécifiques. Ces modifications permettent alors la destruction des co-activateurs transcriptionnels et préviennent leur recrutement. Ces enzymes, les HIF hydroxylases, appartiennent à une famille hétérogène d'enzymes qui contiennent du fer dans leur site actif et utilisent l'oxygène moléculaire et le 2-oxoglutarate (Schofield and Ratcliffe, 2004). La destruction de HIF1 $\alpha$  est rendue possible par l'hydroxylation ciblée de l'un ou l'autre des deux résidus propyl (Tuckerman *et al.*, 2004) des prolyl hydroxylases PHD1, PHD2 ou PHD3. HIF1 $\alpha$  contient beaucoup de Prolines dans le domaine ODD qui sont reconnues et hydroxylées par les PHD (domaine prolyl hydroxylase). PHD catalyse cette réaction en ajoutant de l'oxygène aux résidus Pro et les convertir en 4-hydroxyproline (Berra *et al.*, 2006; Maxwell, 2005). Dans les conditions normoxiques, HIF1 $\alpha$  est ubiquitinylée et dégradée par le protéasome (Kallio *et al.*, 1999) via la protéine Von Hippel-Lindau (pVHL), suppresseur de tumeur. Celle-ci se lie à la sous-unité hydroxylée de HIF1 $\alpha$  et contribue ainsi à sa dégradation (Fandrey *et al.*, 2006).

Dans les conditions hypoxiques, HIF1 $\alpha$  est stabilisée et s'accumule du fait de l'inactivation des prolyl hydroxylase (Ivan *et al.*, 2001). De plus, le facteur inhibiteur de HIF (FIH identifié comme asparaginyl hydroxylase) est bloqué. HIF1 $\alpha$ , après stabilisation subit une translocation du cytoplasme vers le noyau et la dimérisation avec HIF1 $\beta$  se produit grâce au domaine bHLH et une partie du domaine PAS (Per-AHR-ARNT-Sim) (Bárdos and Ashcroft, 2005). Le complexe de HIF1 (HIF1 $\alpha$  + HIF1 $\beta$ ) se lie à la séquence d'ADN spécifique nommée HRE (5'-TACGTG-3', Hypoxia Responsive Element) (Maes *et al.*, 2012; Wenger, 2002) (**Fig.24**). La reconnaissance de HRE se fait à travers le domaine de base (extrémité N-terminale) de HIF1 $\alpha$  et HIF1 $\beta$  (Fandrey *et al.*, 2006).



**Figure 24: HIF1 $\alpha$  entre Normoxie et Hypoxie.** En normoxie, les résidus proline spécifiques (Pro402 et Pro564) de HIF-1 $\alpha$  sont hydroxylés, conduisant à sa dégradation médiée par pVHL protéosomale, une ubiquitine ligase E3. En hypoxie, HIF-1 $\alpha$  est stabilisée, et agit comme un facteur de transcription qui se lie aux séquences HRE pour induire l'expression d'une multitude de gènes cible comme *Vegf*, ce qui favorise l'angiogenèse, et de gènes impliqués dans le métabolisme anaérobie. Photo issue de Maes C., *et al.* 2012.

## E. Les cibles de l'hypoxie

La protéine HIF1 $\alpha$  permet l'activation directe d'un grand nombre de gènes par l'intermédiaire des séquences promotrices HRE, et notamment de gènes impliqués dans le métabolisme pour maintenir l'énergie, le pH et l'homéostasie rédox comme il a été montré dans les cellules de la moelle osseuse (Rey *et al.*, 2011). La protéine HIF1 $\alpha$  active le gène codant pour la protéine GLUT1 (Glucose Transporter 1) afin d'augmenter le taux de glucose qui sera transformé en lactate suite à l'augmentation simultanée de l'expression de l'enzyme LDHA (Lactate dehydrogenase A). L'augmentation de l'acide lactique est alors régulée par l'activation de l'expression de la protéine MTC4 (Mitochondrial Tricarboxylate Carrier 4), protéine membranaire qui permet l'élimination de l'acide lactique. D'autres protéines activées par HIF1 $\alpha$  jouent un rôle important dans les mécanismes impliqués dans l'augmentation de la production d'ATP et la diminution de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) : PDK1 (Pyruvate dehydrogenase Kinase) diminue la respiration mitochondriale en même temps que la glycolyse est induite, COX4I2 (Cytochrome C Oxidase) augmente la consommation d'O<sub>2</sub>, la production d'ATP, la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et l'activation de Caspace-3 et joue un rôle crucial dans l'optimisation de la respiration mitochondriale à des faibles [O<sub>2</sub>] (Fukuda *et al.*, 2007). Enfin, l'augmentation de l'expression de la protéine BNIP3 (BCL2/adenovirus E1B 19 KDa interacting protein 3), qui est un effecteur de l'autophagie mitochondriale, permet d'augmenter la survie des cellules exposées à des faibles [O<sub>2</sub>]. BNIP3 entre en compétition avec le complexe protéique BECLIN1-BCL2 et forme le complexe BNIP3-BCL2 afin d'inhiber la protéine anti-apoptotique BCL2 (Zhang *et al.*, 2008). De plus, HIF1 $\alpha$  maintient l'homéostasie de pH intracellulaire par l'intermédiaire de CAR9 (Carbonic Anhydrase 9) et NHE1 (Sodium-hydrogen exchanger) en facilitant le transport transmembranaire de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> et la diffusion de H<sup>+</sup> et CO<sub>2</sub> (Swietach *et al.*, 2007).

## F. Hypoxie et les ESCs

Avant l'implantation dans l'utérus, l'embryon n'est pas vascularisé. Il ne reçoit donc que très peu, voire pas du tout d'oxygène, ce qui rend adéquat l'étude des mESCs à des concentrations faibles d'O<sub>2</sub>, inférieures à 5%, de l'ordre de 3%. C'est pourquoi depuis quelques années, de nombreuses études portent sur cette problématique, avec néanmoins quelques controverses dans le domaine des mESCs. Une première publication, en 2007, a postulé que

l'hypoxie (1% d'O<sub>2</sub>) provoquait la mort et la différenciation des mESCs par inhibition de la voie LIF/STAT3 par l'intermédiaire de la protéine HIF1 $\alpha$  (Jeong *et al.*, 2007). En effet, HIF1 $\alpha$  inhiberait l'expression du gène codant pour la protéine gp190 (LIFR) par liaison aux séquences répressives rHRE (repressive Hypoxic Response Element) de son promoteur et ainsi provoquerait une inhibition de la phosphorylation de la voie STAT3. Partageant la même idée, une autre équipe a publié que l'hypoxie (1% d'O<sub>2</sub>) provoquait une différenciation vasculaire, en inhibant l'expression d'*Oct4*, là encore par la liaison d'HIF1 $\alpha$  sur les séquences rHRE de son promoteur et à l'inverse, en activant l'expression de *Vegf* (Vascular Endothelial Growth Factor), gène impliqué dans la vascularisation, par la liaison d'HIF1 $\alpha$  aux séquences activatrices HRE de son promoteur (Lee *et al.*, 2012). Récemment, une étude a montré que l'hypoxie (à 1% O<sub>2</sub> et pas 3% O<sub>2</sub>) favorise la différenciation des mESCs en endoderme définitif et des cellules pulmonaires distales (Pimton *et al.*, 2015).

A l'inverse, Ying et son groupe en 2008 ont montré que l'hypoxie (5% d'O<sub>2</sub>) améliore la survie clonale des mESCs après l'inhibition de la voie GSK3 $\beta$  et de la voie MAPK/ERK (Ying *et al.*, 2008a). En 2010, une étude a montré que l'hypoxie (1.5% d'O<sub>2</sub>) provoquait une augmentation de la survie des cellules par intervention de la voie WNT/ $\beta$ -CAT, modulée par le complexe HIF1 $\alpha$ /HIF2 $\alpha$  dans les cellules pluripotentes, complexe qui activerait l'expression de la protéine LEF1 (Lymphoid Enhancer-binding Factor 1) (Mazumdar *et al.*, 2010). La même année, il a été publié que l'hypoxie (2% d'O<sub>2</sub>) induit la différenciation des mESCs (état naïf) en cellules primed, mais n'affecte pas les cellules cultivées dans un état immature, dit "ground" (Fernandes TG *et al.* 2010). De plus, le maintien de l'état pluripotent des mESCs en hypoxie (2% d'O<sub>2</sub>) exige une synergie entre la voie LIF/STAT3 et la voie WNT/ $\beta$ -CAT, ainsi qu'une inhibition de la GSK-3 $\beta$  et de la voie MEK/ERK (Barbosa *et al.*, 2012).

D'une manière générale, l'effet de l'hypoxie sur les cellules souches n'est pas un effet controversé mais plutôt un effet différentiel dépendant de divers facteurs: (i) la hiérarchie de caractère souche, (ii) le type cellulaire choisi au cours de développement: effets pléiotropes (iii) la [O<sub>2</sub>] et la durée d'exposition, (iv) l'équilibre entre les voies de signalisation inducteurs et inhibiteurs de la pluripotence/différenciation à différentes [O<sub>2</sub>] et (v) la stabilisation de sous-unités HIFs et leurs interactions avec les voies de signalisation et les gènes spécifiques des étapes cellulaires.

**Ces dernières années, l'idée que l'adaptation à l'hypoxie est un processus actif a émergé, c'est pourquoi l'étude des mécanismes de plasticité en conditions hypoxiques demeure un**

**aspect essentiel dans la compréhension des cellules souches embryonnaires murines que nous avons donc abordé dans notre étude.**

## **VI. Quelles sont les applications de la recherche sur les cellules souches (SCs)?**

Les cellules souches présentent un intérêt dans deux domaines : le domaine de la recherche fondamentale et le domaine de la santé.

### **A. Intérêts pour la recherche fondamentale**

La compréhension des mécanismes responsables du développement cellulaire et tissulaire est certainement l'un des défis les plus importants que les chercheurs ont à relever, tant les mécanismes moléculaires qui permettent la différenciation de cellules souches ou de progéniteurs vers un type de cellules spécialisées est complexe.

De plus, l'étude des étapes précoces du développement humain est compliquée par l'accès à des ressources biologiques qui se limite, lorsque ces recherches sont autorisées, à des études anatomiques et biochimiques réalisées par dissection d'embryons malades après avortement. Cependant, la quantité d'informations accumulées en biologie du développement a été possible grâce à l'utilisation de modèles d'animaux, en particulier la souris et en complément avec l'utilisation de lignées cellulaires surtout les mESCs et les hESCs.

Les mESCs par leur capacité de contribution à la lignée germinale, ont permis de générer des lignées des souris mutées qui ont permis d'appréhender le rôle des gènes au cours du développement embryonnaire: par exemple le KO de la E-Cadhérine (E-Cad) a permis d'établir le rôle important de ce gène dans la formation de blastocyste par sa fonction d'adhésion lors de la compaction des cellules (au stade 8 cellules) (Cockburn and Rossant, 2010). Le KO du LIF a permis de montrer son rôle essentiel dans l'implantation de blastocyste (Escary *et al.*, 1993; Stewart *et al.*, 1992) et la maturation des neurones (Tomida and Saito, 2004). De plus les études sur les ESCs ont permis d'identifier les facteurs et les mécanismes impliqués non seulement durant les stades précoces de développement mais également ceux qui régulent l'auto-renouvellement des cellules, la bascule auto-renouvellement/différenciation, les liens

apoptose/différenciation (Duval *et al.*, 2000, 2004, 2006), ainsi que ceux responsables de la progression du cycle cellulaire durant le développement (Stead *et al.*, 2002; White and Dalton, 2005).

Il est à noter aussi que c'est grâce aux études transcriptomiques et fonctionnelles d'expression spécifique des gènes dans les mESCs, que le cocktail de reprogrammation des cellules somatiques en iPSCs a été identifié.

## **B. Intérêts pour le domaine de la santé**

Dans le domaine de la médecine régénérative, le focus important est mis sur l'expansion des hPSCs (hESCs et hiPSCs) et leur différenciation homogène dirigée en cultures *ex vivo*, suivie d'une greffe. En ce sens, les hPSCs dérivées seraient transplantées en vue de réparer ou de remplacer les cellules perdues ou endommagées par la maladie et les blessures. Des essais cliniques utilisant des hESC sont en cours pour corriger des dégénérescences de la rétine avec des modèles hESC (Gonzalez-Cordero *et al.*, 2013; Schwartz *et al.*, 2012; Yanai *et al.*, 2015) et hiPSC (Borooah *et al.*, 2013; Sridhar *et al.*, 2013; Wright *et al.*, 2014). De plus, la faisabilité de la manipulation génétique dans les hPSCs a été démontrée avec plusieurs technologies, telles que la diminution d'expression de gènes (knockdown) avec les siRNA et la correction de gènes en utilisant la recombinaison homologe, combinée à des outils plus récents tels les systèmes TALENs/CRISPR/cas9 (Zhu *et al.*, 2014). On pourra donc, à terme, réaliser de la réparation cellulaire avec des cellules génétiquement corrigées pour un gène responsable de maladie monogénique (ex : myopathie de Duchesne ou mucoviscidose...).

La preuve de principe a été établie chez la souris atteinte d'anémie falciforme (Hanna *et al.*, 2007). Les hiPSCs sont une source potentielle de cellules pour la reconstruction tissulaire à long terme. Par exemple, les cellules précurseurs hématopoïétiques greffées peuvent être générés à partir des iPSCs (Doulatov *et al.*, 2013) offrant potentiellement de nouvelles sources de cellules pour la reconstitution de cellules pour les patients cancéreux hématologiques après le traitement. L'utilisation de cellules iPSCs dérivées des cellules somatiques ouvre donc la possibilité de transplantation autologue ou de banques de tissus qui peuvent couvrir un large spectre de la population telle que le projet Cell Stock iPSCs au Japon.

## VII. Objectifs de travail

Mon travail a consisté à **l'étude des mécanismes de plasticité des mESCs** grâce à un test mis au point au laboratoire et à déterminer **l'effet des paramètres environnementaux (MMP1 et hypoxie)** sur la pluripotence et la plasticité des mESCs.

De plus, j'ai effectué une **analyse comparative entre les mESCs et les miPSCs** (murine induced pluripotent stem cells). Ceci afin de déterminer si toutes les propriétés des ESCs sont retrouvées dans les iPSCs de manière à déterminer si elles pourraient être un bon outil thérapeutique.

Enfin, j'ai construit des **vecteurs d'expression dans lesquels une forme de l'EGFP à demi-vie courte (d2EGFP) est sous le contrôle de promoteurs strictement sensible au LIF**. Ceci afin d'avoir un outil performant de criblage. En effet, cet outil permettra de :

- 1) **Caractériser la plasticité des mESCs** par cytométrie en flux et ainsi effectuer une analyse plus rapide que la RT-qPCR pour identifier de nouveaux acteurs de la plasticité cellulaire.
- 2) **Etudier le devenir de cellules fluorescentes triées** dans le test de plasticité cellulaire et ainsi **limiter l'hétérogénéité cellulaire** et déterminer précisément l'effet du LIF sur une population plus homogène poussée sans LIF pendant 1 à 5 jours puis réinduites par le LIF.

# MATERIELS ET METHODES

## I. Culture cellulaire

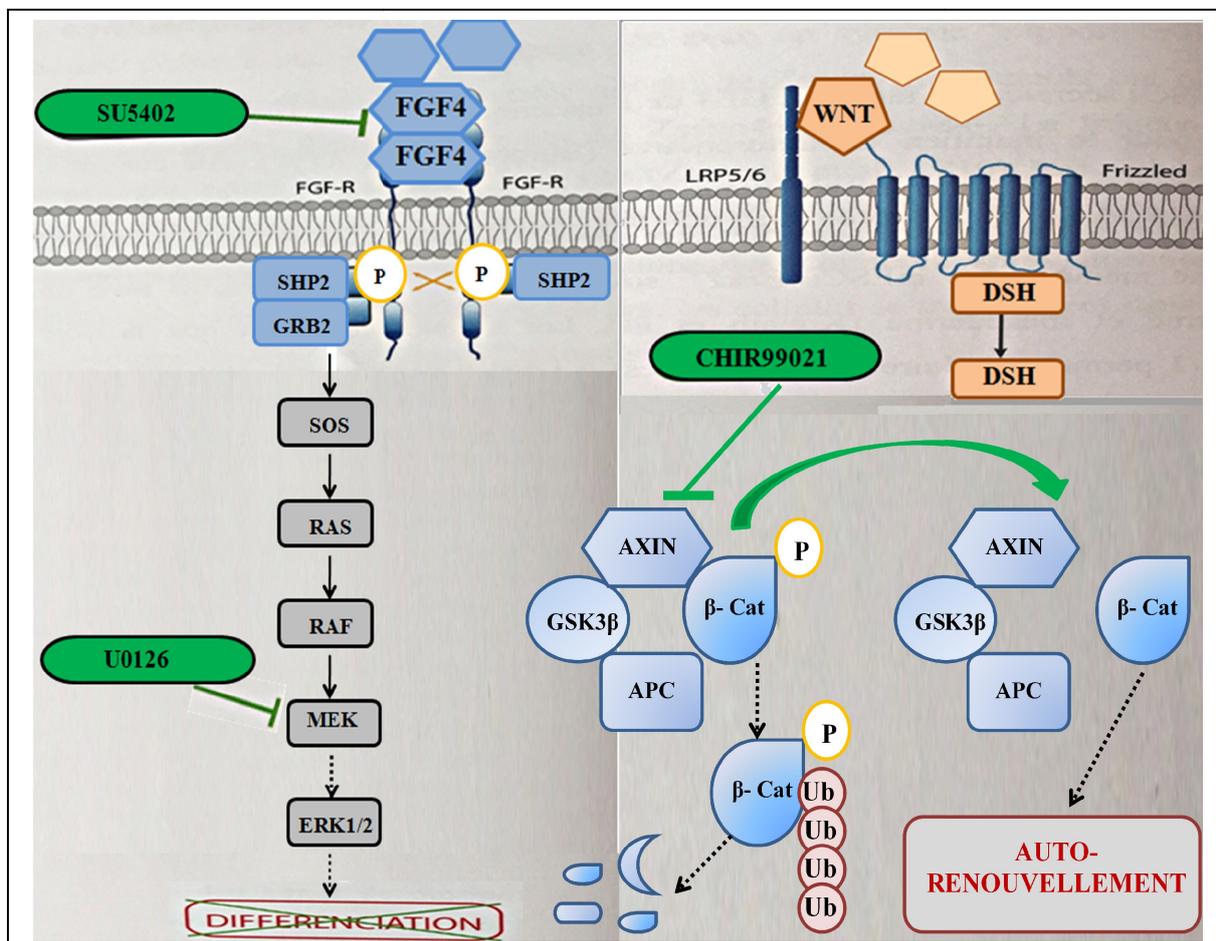
### A. Entretien des cellules

La lignée de mESCs CGR8 (obtenue par le laboratoire d'A. Smith, UK) et le clone cellulaire miPSCs (obtenu par le laboratoire de F. Moreau Gaudry, Unité 1035, INSERM, Bordeaux) sont cultivés dans des plaques 6 puits préalablement gélatinées (0.2% gélatine) afin de permettre l'adhésion cellulaire. Les mESCs et les miPSCs sont maintenues dans du milieu de culture composé de DMEM-Glutamax (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma Aldrich), complété par un antibiotique (Gentamycine 400µg/mL, Gibco Invitrogen), un agent antioxydant, le 2β Mercaptoéthanol (0,1mM, Sigma-Aldrich) et 10% de « Serum Replacement Medium ». Ceci correspond au milieu STEM+. Les mESCs et les miPSCs sont maintenues pluripotentes dans le milieu STEM+ en présence de LIF humain (10ng/mL) produit par la lignée CHO (Chinese Hamster Ovary), qui contient un plasmide exprimant cette cytokine. Les mESCs sont cultivées dans un incubateur à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 21% d'O<sub>2</sub> pour les études en Normoxie et 3% d'O<sub>2</sub> pour les études en Hypoxie (Hotte Biospherix). Pour ces expériences en Hypoxie, les cellules sont cultivées sur des falcons 12,5 cm<sup>2</sup> bouchés hermétiquement pour les observations faites sous microscope en normoxie. Les milieux de culture sont conditionnés pendant 1h dans l'enceinte de la hotte qui contient une chambre de travail à 3% et un incubateur où sont maintenues les cellules à 5% de CO<sub>2</sub> et 3% d'O<sub>2</sub>. Tous les deux jours, les cellules sont décollées par traitement à la trypsine et ensemencées dans du nouveau milieu complet (STEM+LIF) avec une dilution de 5 à 10 fois, en confinement hypoxique.

### B. Traitement des mESCs avec U0126, SU5402 et CHIR99021

L'inhibition des voies MAPK ERK1/2, FGF et GSK3β est réalisée en traitant les mESCs avec 0,4µM de l'inhibiteur U0126 (Cell Signaling Technology), 2µM de l'inhibiteur SU5402 (Calbiochem) et 3µM de l'inhibiteur CHIR99021 (Calbiochem) respectivement (Ying *et al.*, 2008c). Les inhibiteurs sont ajoutés au milieu de culture pré chauffé à 37°C et les milieux sont changés tous les jours. L'analyse de l'expression des gènes de pluripotence et de différenciation

ainsi que des marqueurs de lignage sont réalisées par RT-qPCR. L'inhibiteur U0126 bloque la voie MAPK en inhibant l'activité kinase des MEK1/2, conduisant à un défaut de phosphorylation d'ERK1/2. L'efficacité d'U0126 a été validée en détectant le niveau de phosphorylation d'ERK1/2 par Western Blot (avec l'anticorps anti-P-ERK1/2, Santa Cruz Biotechnology). Cette analyse a été réalisée sur des cellules déplétées en LIF pendant 1 jour puis ré-induites pendant 30 min en absence ou présence d'inhibiteur et a permis de constater que le traitement des cellules avec U0126 abolie la phosphorylation d'ERK1/2. Quant à l'inhibiteur SU5402, il inhibe l'activité tyrosine kinase de FGFR1 en interagissant avec le domaine catalytique de FGFR1 et il inhibe également la phosphorylation d'ERK1/2 induite par FGF. Enfin, le CHIR99021 induit une diminution de la phosphorylation de la  $\beta$ -caténine ( $\beta$ -cat) en simulant la signalisation canonique Wnt (Fig. 25).



**Figure 25:** Schéma représentant le mode d'action des 3 inhibiteurs (3i) sur les voies FGF/MAPK et Wnt/ $\beta$ -Caténine ( $\beta$ -Cat) dans les mESCs.

### **C. Mise en évidence de la Phosphatase Alcaline (AP)**

Le test AP permet de déterminer l'activité enzymatique de l'alcaline phosphatase en fonction de la métabolisation d'un produit qui apparaît rouge. Après fixation des cellules, l'activité de la phosphatase alcaline est détectée grâce à l'utilisation d'un kit commercialisé par la société Sigma-Aldrich™ (Référence 86R-1KT). Ce kit permet de révéler les cellules possédant une forte activité phosphatase alcaline (AP+). Les cellules pluripotentes possédant cette activité apparaissent en rouge, contrairement aux cellules différenciées qui apparaissent alors non colorées (AP-).

### **D. Analyse de la prolifération**

Afin de comparer la prolifération des cellules pendant 7 jours en normoxie et en hypoxie, nous avons effectué des comptages de cellules en utilisant un marqueur membranaire fluorescent. Chaque jour, les cellules sont préalablement diluées dans une solution de PBS–Bleu Trypan (0.1% (p/v) ; Invitrogen) et sont comptées. La division cellulaire peut aussi être suivie par cytométrie en flux après marquage des cellules avec un fluorochrome membranaire lipophile, le Vybrant DiD (1,1-Dioctadecyl-3,3,3,3-tetramethylindodicarbocyanine, Life Technologies). Après avoir décollés les cellules, celles-ci sont comptées, centrifugées (2 min, 2000 rpm à 37°C) et resuspendues dans du milieu DMEM + DiD (5µL de DiD/mL/Million de cellules) pendant 30 minutes à 37°C. Un premier lavage au DMEM (10mL) est réalisé. Après centrifugation (2 min, 2000rpm à 37°C), les cellules sont à nouveau lavées dans 5 mL de DMEM. Une partie des cellules est mise dans un tube afin de servir de point de référence (J0). Une nouvelle centrifugation (2 min, 2000 rpm à 37°C) permet de resuspendre une partie des cellules dans du STEM+, +LIF afin de les ensemercer dans des flasques gélatinées qui correspondront aux différents jours de l'expérience, et qui seront donc chaque jour décollées et passées en cytométrie. Chaque jour, des cellules non marquées servent de contrôle pour le réglage du cytomètre. En théorie, l'intensité de fluorescence de chaque cellule est divisée par deux à chaque division mitotique. Le cytomètre BD LSRFortessa (plateforme de cytométrie en flux de la SFR Transbiomed) permet de mesurer le pourcentage de cellules positives ainsi que l'Intensité Moyenne de Fluorescence (MFI) et la médiane de fluorescence selon les longueurs d'onde d'excitation et d'émission spécifiques du fluorophore DiD. Les cellules passent une à une devant un laser qui excite le DiD à 644nm, et celui-ci émet un signal à 665nm.

## **E. Test de la pluripotence : Capacité de différenciation *in vitro* en Corps Embryoïdes (EBs)**

Pour vérifier la pluripotence des mESCs en fonction des différents paramètres dans lesquels elles sont cultivées, plusieurs expériences sont possibles et notamment la différenciation *in vitro* par la formation d'EBs. Les mESCs sont ensemencées dans une boîte de pétri (utilisée en bactériologie) ne contenant pas de surface adhérente. Les cellules, cultivées dans un milieu sans LIF vont alors former des structures 3D qui vont mimer la gastrulation pendant 8 jours. Tous les deux ou trois jours, le milieu de culture est changé. Pour cela, les EBs sont décantés puis resuspendus délicatement, afin de ne pas altérer les structures, dans le milieu de culture. Le huitième jour, les EBs sont centrifugés et répartis sur des boîtes de cultures préalablement gélatinées où ils vont adhérer en présence de milieu STEM+. Dès le lendemain on voit, sous microscope, des fibres cardiaques battantes et on peut aussi facilement visualiser, après quelques jours, l'apparition de réseaux de neurones. Les cellules dans un état différencié peuvent être maintenues pendant une dizaine de jours avant d'être photographiées ou lysées afin d'extraire l'ARN et d'étudier l'expression des gènes et notamment des gènes de différenciation correspondant aux trois lignages.

## **F. Transfection cellulaire**

Les cellules sont cultivées sans antibiotique durant les 24 heures précédents la transfection. Les cellules sont transfectées en suspension à une densité cellulaire de  $5 \times 10^5$  cellules/puits avec différentes concentrations de plasmide purifié : 0,2µg; 0,6µg et 1µg en utilisant la lipofectamine2000™ (5µl, Invitrogen™, Référence 11668019) L'ADN et la lipofectamine sont dilués séparément dans 250 µL du milieu DMEM-Glutamax et incubés pendant 5 min à température ambiante. Puis la lipofectamine est combinée avec l'ADN. Ce mélange est homogénéisé et incubé à température ambiante pendant 20 min, afin de permettre la formation de complexes ADN-lipofectamine. Ces complexes sont ensuite répartis dans les différents puits. La quantité de LIF est ramenée à 10 ng/mL final dans le mélange de cellules en suspension.

## II. RT-qPCR

### A. Extraction d'ARN

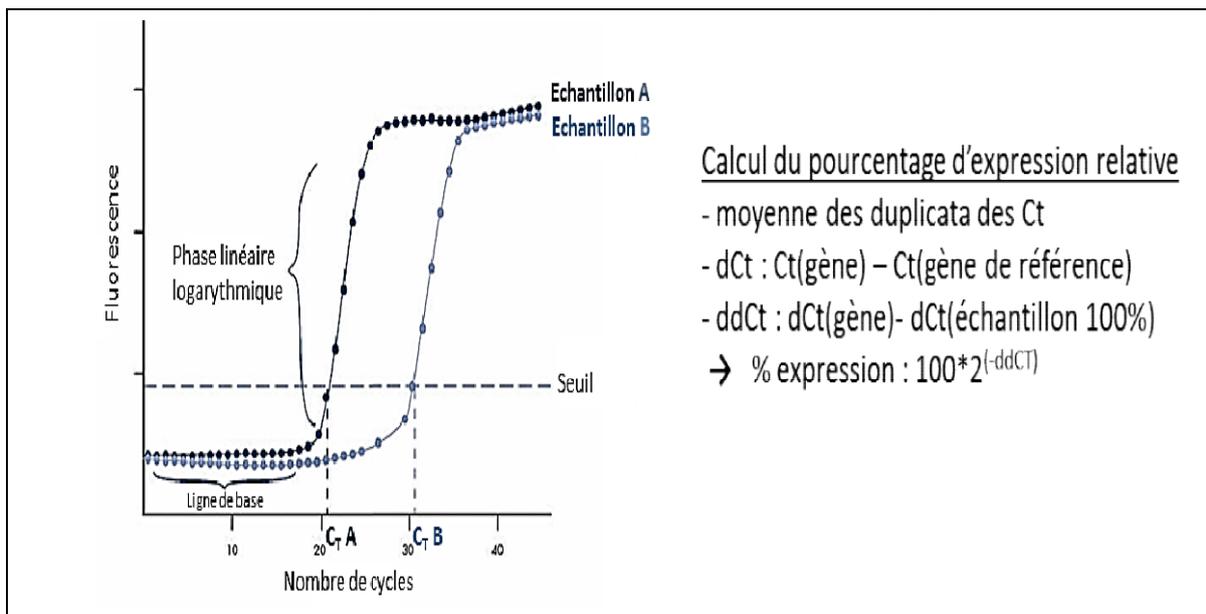
Les cellules adhérentes et confluentes sont rincées avec du PBS (1x), puis lysées dans une solution commercialisée sous le nom de TRI REAGENT® (Molecular Research Center inc, MRC, référence TR-118) à raison de 800µl/puits (plaque 6 puits). Le TRI REAGENT est une solution monophasique de phénol, guanidine isothiocyanate et d'autres composants facilitant l'isolation de différentes espèces d'ARN de grande et petite taille moléculaire utilisable pour isoler les ARN totaux d'échantillons de cellules et de tissus. Ce réactif de couleur rose-rouge permet le maintien de l'intégrité de l'ARN, grâce à la forte inhibition de l'activité RNase. Les ARN sont extraits et purifiés par l'action du chloroforme (2 min à température ambiante). Après centrifugation (12 000 rpm, 15 min à 4°C), la phase aqueuse contenant les ARN est précipitée avec un volume d'isopropanol (5 min à température ambiante), et de nouveau centrifugée (12 000 rpm, 10 min à 4°C). Les ARNs se retrouvent dans le culot et sont rincés avec de l'éthanol à 75% (7500 rpm, 10 min à 4°C), resuspendus dans de l'eau (dépourvue de RNase) et chauffés 10 min à 65°C. Les ARN sont dosés par spectrophotométrie et la qualité des ARN est vérifiée par électrophorèse en gel d'agarose (1,2%) dans du tampon TBE (Tris-Borate-EDTA) en chargeant 1µg d'ARN par puits.

### B. Transcriptase inverse (RT)

La " reverse transcription " ou " transcription inverse " (RT) consiste à synthétiser de l'ADN complémentaire (ADNc) à partir d'ARN. 1µg d'ARN est traité à l'aide d'un kit QuantiTect® Reverse Transcription (QIAGEN, référence 205311) qui permet d'éliminer les traces d'ADN génomique puis de réaliser la synthèse des ADNc par action de la transcriptase inverse pendant 20 min. Le protocole de RT suivi selon les recommandations du fabricant. Les ADNc obtenus sont alors dilués au 1/10<sup>e</sup> et sont prêts pour être amplifiés par la réaction de PCR quantitative (qPCR).

### C. Real Time Quantitative PCR (qPCR)

La qPCR ou quantitative Polymerase Chain Reaction, aussi appelée PCR en temps réel est une méthode particulière de réaction en chaîne de la polymérase, ayant pour but de mesurer la quantité initiale d'ADN, et plus précisément le nombre d'amplicon (portion d'ADN définie par un couple d'amorces). Son principe est basé sur la possibilité de suivre la quantité d'ADN présente dans la réaction à tout moment et non à la fin de la réaction. Pour chaque gène étudié, l'ADNc est mélangé à un couple d'amorces sens et anti-sens spécifiques du gène (0,1µM final) que l'on souhaite amplifier, ainsi qu'un agent intercalant fluorescent de l'ADN double brin, le Syber qPCR Premix Ex Taq (TAKRR420W, OZYME), qui permet la quantification. L'expression relative de chaque gène est quantifiée par le Ct (Cycle Threshold ou cycle seuil), qui correspond au nombre de cycle d'amplification nécessaire pour atteindre un seuil situé dans la phase linéaire de la PCR. L'expression de chaque gène est comparée par rapport à un gène de référence (échantillon qui établit le 100%) dont l'expression est constante et par rapport à une condition contrôle. Dans notre cas, c'est le gène *Hprt* (*Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase*) (**Fig. 26**).



**Figure 26: Exemple de courbe de qPCR et calcul du pourcentage d'expression.**  
(Courbe : [http://www.qiagen.com/resources/info/guidelines\\_rtqpcr/dataanalysis\\_sybr.aspx](http://www.qiagen.com/resources/info/guidelines_rtqpcr/dataanalysis_sybr.aspx))

Il est important de valider les couples d'amorces (spécifiques du gène d'intérêt) utilisées en qPCR. Pour ce faire, une courbe étalon pour chaque couple d'amorces a été obtenue en réalisant des dilutions croissantes de l'étape RT. En théorie, une série de dilution au 1/2 doit donner des

courbes d'amplification décalées d'un cycle de PCR à chaque fois. L'efficacité de la PCR peut être lue directement sur un graphe tracé par le logiciel d'analyse installé sur l'appareil de PCR en temps réel (CFX Manager Software with PrimePCR Assays, BIO-RAD). En effet, les Ct sont disposés sur un graphe en échelle logarithmique et l'équation de la régression linéaire passant par ces points donne l'efficacité (Coefficient directeur de la droite). Les amorces utilisées pour la PCR ont été obtenues grâce à la base de données Primer Bank (site: <http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>), et ont été synthétisées par la société Sigma-Aldrich® (site: [http://www.sigmaaldrich.com/configurator/servlet/DesignTool?prod\\_type=STANDARD](http://www.sigmaaldrich.com/configurator/servlet/DesignTool?prod_type=STANDARD)) (**Tableau-2**).

<b>Cibles</b>	<b>Séquences</b>	<b>Amplicon</b>	<b>PrimerID</b>
<i>Hprt</i>	Forward: ACCTTCATCGGAACTCCAAAG Reverse: ACTGTTAGGCTCAGGTGAACT	186	MMU59496
<i>Bnip3</i>	Forward: TCCTGGGTAGAACTGCACTTC Reverse: GCTGGGCATCCAACAGTATTT	103	6753198a1
<i>Car9</i>	Forward: TGCTCCAAGTGTCTGCTCAG Reverse: CAGGTGCATCCTCTTCACTGG	126	21314850a1
<i>COX4I2</i>	Forward: CTGCCCCGGAGTCTGGTAATG Reverse: CAGTCAACGTAGGGGGTTCATC	109	16716379a1
<i>Ldha</i>	Forward: TGTCTCCAGCAAAGACTACTGT Reverse: GACTGTACTTGACAATGTTGGGA	155	6754524a1
<i>Mtc4</i>	Forward: TCACGGGTTTCTCCTACGC Reverse: GCCAAAGCGGTTACACAC	167	13507630a1
<i>Pdk1</i>	Forward: GGA CTTCGGGTCAGTGAATGC Reverse: TCCTGAGAAGATTGTCGGGGA	122	27369966a1
<i>Socs3</i>	Forward: CGTTGTGAAGAGGCAGTAGC Reverse: ACAAAGCAGAACCCTCCATC	122	NM_007707
<i>bcl2</i>	Forward: ATGCCTTTGTGGA ACTATATGGC Reverse: GGTATGCACCCAGAGTGATGC	120	NG_009361.1

**Tableau-2: Séquences d'amorces (5'-3') utilisées en qPCR, en plus de celles données dans l'article publié dans PlosOne.**

La qPCR est réalisée dans des plaques 384 puits et s'effectue sur 3µl d'ADNc dilué au 1/10<sup>e</sup> dans un volume réactionnel (volume final : 10 µl) composé de : 5 µl de mix Takara, 0,3 µl de chaque amorce (sens et anti-sens) à 10 µM et 1,9 µl d'eau MilliQ®. Les échantillons testés sont

désposés au minimum en duplicat. La composition de la plaque se fait grâce à un robot (epMotion® 5073- Hardware manual, eppendorf, plateforme qPCR de la SFR Transbiomed) programmé via le PCR-assistant-software manual. Ce robot capable de distribuer les ADNc et les mix dans la plaque en suivant le plan de programmation établi.

Deux témoins seront réalisés afin de vérifier: (i) d'une part, l'absence d'ADN dans la préparation d'ARN (pour ce faire, l'ADNc sera remplacée par l'ARN en quantité identique) et (ii) d'autre part, l'absence de contamination du mélange réactionnel (pour ce faire, le mélange réactionnel sera déposé sans ADNc, ni ARN).

La qPCR est réalisée en utilisant un appareil dédié nommé CFX384 Touch™ Real-Time PCR Detection System du BIO-RAD. Le programme dure 2 heures. Il est constitué de 40 cycles successifs composés d'une phase de dénaturation à 95°C pendant 5 sec, suivi par une phase d'hybridation à 60°C pendant 24 sec, et enfin une phase de synthèse à 72°C pendant 20 sec. L'analyse des résultats s'effectue grâce au logiciel fourni avec l'appareil (CFX Manager Software with PrimePCR Assays, BIO-RAD).

### **III. Western Blot (WB)**

Les cellules sont lysées dans un tampon RIPA doux (1% Triton, 1% NP40 (Nonyl Phenoxyethoxyethanol 40) et 0,05% SDS (Sodium DodécylSulfate) dans du PBS (*Phosphate Buffered Saline* 1X). Extemporément, des inhibiteurs de protéases sont ajoutés (cocktail d'inhibiteur de protéases 1X (Sigma), inhibiteur de protéase Pefabloc (1mM), inhibiteur de phosphatase NaF (0,5M) et inhibiteur de tyrosine phosphatase, l'orthovanadate de sodium (1mM)). Les lysats protéiques sont centrifugés afin d'éliminer les débris cellulaires, mélangés à du bleu de charge et migrent dans des gels SDS-PAGE 10% ou 12% d'acrylamide en fonction de la taille des protéines étudiées. Le gel est alors transféré sur une membrane de nitrocellulose dans un tampon de transfert (5 mM Trizma Base, 37 mM Glycine, 20% EtOH, 0,07% SDS). Afin de vérifier que le transfert s'est déroulé correctement, la membrane est colorée par un colorant réversible de protéines, le rouge ponceau. La membrane est ensuite bloquée dans un tampon Odyssey (LicoR Compagny) pendant 1 heure. Les anticorps primaires sont utilisés selon le **Tableau-3**.

L'incubation avec l'anticorps primaire se fait sur la nuit à 4°C sous agitation dans le tampon Odyssey (LicoR Compagny). Après 2 rinçages en TBS1X 0.1% Tween20, l'anticorps

secondaire (1/20000<sup>e</sup>) couplé à un fluorophore, agit pendant 1 heure à l'abri de la lumière. Les membranes sont rincées 2 fois en TBS1X 0.1% Tween20 et 2 fois en TBS1X seul. Les protéines sont révélées et quantifiées grâce à l'appareil de lecture Odyssey et le logiciel d'analyse Image Studio.

Anticorps primaire	Taille	Hôte	Dilution	Référence
NANOG	35 kDa	Poly Rabbit	1/1000 <sup>e</sup>	abcam80892
OCT4	45 kDa	Poly Rabbit	1/1000 <sup>e</sup>	ab18976 Abcam
SOX2	34 kDa	Poly Goat	1/1000 <sup>e</sup>	sc-17320 Santa Cruz
P-STAT3	80 kDa	Mono Rabbit	1/1000 <sup>e</sup>	Cell Signaling 58E12
STAT3	88 kDa	Mono Rabbit	1/1000 <sup>e</sup>	abcam68153
Caspase 3	17 kDa et 35 kDa	Poly Rabbit	1/1000 <sup>e</sup>	Cell Signaling 9662S
JAM2	33 kDa	Mono Rabbit	1/500 <sup>e</sup>	abcam156586
ERK2	45 kDa	Poly Rabbit	1/5000 <sup>e</sup>	sc-154 Santa Cruz

**Tableau-3: Les anticorps primaires utilisés en Western Blot.** Mono (monoclonal), Poly (polyclonal). La taille des protéines est indiquée en kDa (kilo Daltons).

#### IV. Analyse de la fluorescence par cytométrie en flux

Dans notre étude, la cytométrie permet de mesurer simultanément plusieurs caractéristiques physiques de cellules isolées entraînées par un flux liquide, c'est-à-dire sa taille relative (FSC, Forward Scatter), sa granularité (SSC, Side Scatter) et son intensité relative de fluorescence. La cytométrie est donc définie comme la mesure (métrie) des propriétés (signaux) optiques émis par une cellule (cyto) transportée par un liquide (flux) coupant une source d'excitation lumineuse (laser). Les signaux recueillis sont relatifs aux propriétés optiques: (i) intrinsèques (liées à la taille, la structure et à l'auto-fluorescence des cellules) et (ii) induites de fluorescence (liées au

marquage spécifique). Classiquement, les cellules devant être analysées ou triées par un cytomètre en flux sont traitées de la manière suivante. Les cellules sont trypsinées, centrifugées et reprises dans 500 $\mu$ L de PBS1X. Des cellules de la lignée CGR8 n'exprimant aucune fluorescence sont utilisées comme contrôle négatif. Le pourcentage de cellules positives, la MFI et la Médiane de la fraction positive sont mesurés par le cytomètre en flux BD LSRFortessa (plateforme de cytométrie en flux de la SFR Transbiomed) selon des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission spécifiques du fluorophore GFP (Green Fluorescent Protein) ou YFP (Yellow Fluorescent Protein). Les cellules passent séparément devant un faisceau lumineux qui excite la GFP à 488nm et l'YFP à 514nm. Le fluorophore émet ensuite l'énergie absorbée à 633nm pour GFP et 527nm pour YFP.

# RESULTATS

## I. Mise en place du « Test de plasticité cellulaire »

### A. La mise au point du « Test de plasticité cellulaire »

Pour caractériser et distinguer les états cellulaires entre pluripotence et engagement en différenciation des mESCs, un test *in vitro* basé sur le suivi des cellules entrant en apoptose (caractéristique des cellules différenciées) avait été mis au point. Les cellules cultivées en absence de LIF pour des périodes différentes (entre 6h et 72h) sont ré-induites en présence de LIF avant d'être lysées par le tampon de Hirt pour extraire l'ADN et suivre le profil apoptotique des cellules. Par ce test, il avait été montré, pour la première fois, les possibilités du LIF d'induire la réversion des cellules engagées en différenciation avec un point de non retour, défini par ce test entre 36 et 48h (Boeuf *et al.*, 2001).

Ensuite, par une analyse transcriptomique extensive réalisée sur des cellules pluripotentes (+LIF) ou déplétées de LIF pendant 24 ou 48h et réinduites 30 min par le LIF, 3 signatures LIF ont été mises en évidence qui permettent à présent d'avoir un ensemble de gènes pour caractériser les états cellulaires. Les trois signatures de LIF sont (i) les gènes de la pluripotence « *Pluri* » comme *Ceacam 1*, *Mras*, *Esrrb*, *Rex1*, *Irak3* dont le niveau d'expression est fort dans les cellules pluripotentes et chute dans les 24h de retrait de cette cytokine (**Fig.27A et B**), et (ii) deux catégories de gènes « *Lifind* » dont le niveau d'expression relatif augmente suite à un ajout de LIF après une culture de 24h ou 48h sans cette cytokine :

- les gènes « *Spe-Lifind* » comme *Klf4* et *Klf5*, dont l'expression est induite par le LIF préférentiellement dans la phase d'engagement à 24h
- et les gènes « *Pleio-Lifind* » comme *JunB* et *Fos*, dont l'expression est induite par le LIF quelque soit l'état des cellules (engagement à 24h ou 48h) (Mathieu *et al.*, 2012; Trouillas *et al.*, 2009b).

De plus, grâce aux études transcriptomiques, différents gènes de différenciation précoce « *Diff* » ont été mis en évidence tels que *Lef1* et *Car4* dont l'expression augmente fortement dès le retrait du LIF (**Fig.27A et B**).

A noter que les gènes « *maîtres* » de la pluripotence *Oct4*, *Sox2* et *Nanog*, connus comme étant déterminants dans le maintien de la pluripotence des mESCs présentent une insensibilité au retrait du LIF durant les premiers jours et ceci est en corrélation avec les niveaux d'expression obtenus de ces facteurs par l'analyse protéique (Mathieu *et al.*, 2012). Ces résultats montrent

l'existence de deux phases d'engagement en différenciation une à 24h et une à 48h dans lesquelles la sensibilité des cellules aux effets de LIF n'est pas la même.

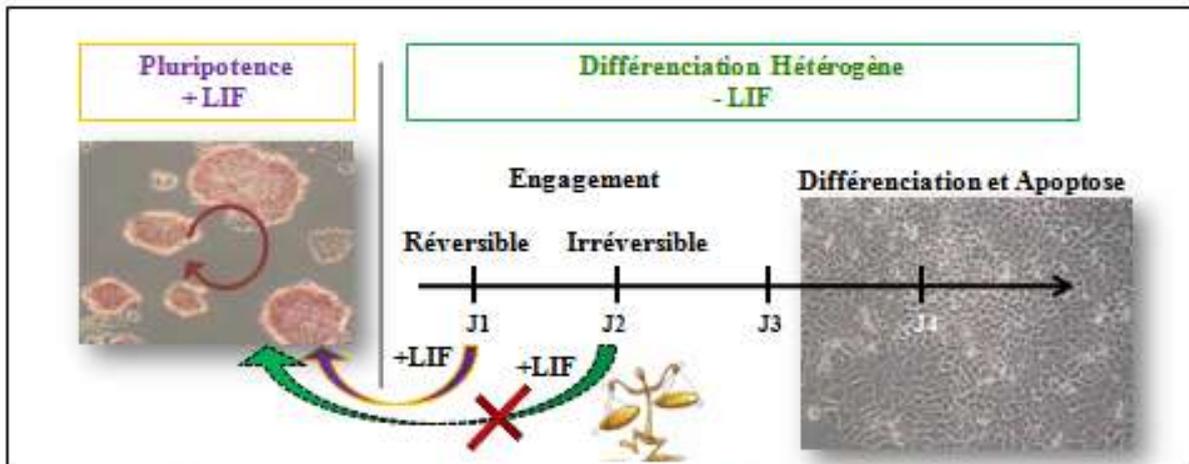
**La compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de la plasticité des ESC dépendante du LIF est au centre de ce travail de thèse.**

## **B. Caractérisation des phases du « Test de plasticité cellulaire »**

Dans notre contexte, le terme plasticité cellulaire signifie la capacité des mESCs de retourner à l'état de pluripotence après qu'elles se soient engagées dans les voies de différenciation précoces. Le test de plasticité cellulaire est un protocole qui comprend des cinétiques de retrait du LIF suivi par un rajout du LIF qui durent 4 jours (**Fig.27A**). Pour caractériser les cellules à chaque point expérimental, des analyses transcriptionnelles par RT-qPCR des gènes « *maîtres* », des marqueurs de pluripotence « *Pluri* » et des marqueurs de différenciation « *Diff* » sont effectuées. Ces analyses ont montré que l'expression des gènes « *Pluri* » chute dès le premier jour de retrait du LIF alors que celle des gènes « *Diff* » augmente. De plus, l'ajout du LIF après 1 jour de déplétion permet de restaurer l'expression de ces gènes à leur niveau en condition + LIF (donc **1 jour sans LIF correspond à la phase d'engagement réversible**). Par contre, cette restauration n'est pas ou beaucoup moins efficacement observée après 2 jours de retrait du LIF (donc à partir de **2 jours sans LIF les cellules sont en phase d'engagement irréversible**). Grâce à ce test, nous avons pu montrer qu'un des gènes *spe-Lifind* (*Klf5*) mais pas le gène *pleio-Lifind* (*JunB*) est impliqué dans la régulation de la plasticité. Nous avons aussi analysé l'impact de la voie PI3K et de facteurs environnementaux (MMP1 et l'hypoxie) sur la plasticité cellulaire.

Ces résultats sont détaillés dans l'article ci – joint qui est publié dans le journal Plos One.

**A- Test de Plasticité Cellulaire: *in vitro***



**B- Analyse de Microarray: Expression des marqueurs de pluripotence et de différenciation**

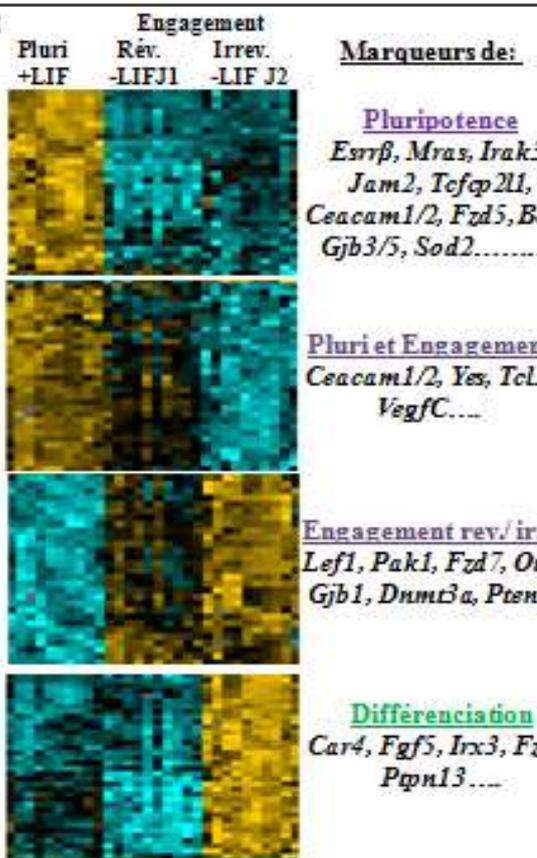
B-1



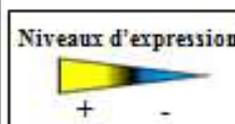
- ❖ Facteur de transcription: *Klf4, Klf5, Stat3, Esrrβ*
- ❖ Récepteur: *Frzd5*
- ❖ GTPases: *Mras*
- ❖ Enzyme Kinase: *Irak3*
- ❖ Marqueur d'adhésion: *Ceacam1, Gjb3/5, Jam2*

- ❖ Facteur de transcription: *Lef1*
- ❖ Enzyme Catalytique: *Car4*
- ❖ Enzyme Kinase: *Pak1*
- ❖ Marqueur d'adhésion: *Pcdh1*

B-2



**Figure 27: Etablissement du test de la plasticité dans le modèle des mESCs.** Les cellules mESC sont cultivées avec (+ LIF) ou sans LIF (-LIF) pendant 1 à 4 jours (J1 à J4) puis remises dans du milieu avec LIF après retrait selon les périodes indiquées (A). Les profils d'expression d'une sélection de marqueurs « Pluri » et « Diff » dans les conditions expérimentales indiquées (B1). Représentation « heatmap » d'une sélection de gènes exprimés en présence ou absence de LIF (d'après Trouillas M *et al.*, 2009) (B2). Les photos des cellules pluripotentes ou différenciées sont prises après une coloration de la phosphatase alcaline (rouge pour les cellules pluripotentes et non colorées pour les cellules différenciées). Pluri = état de Pluripotence; Eng. Rev. = état d'engagement réversible; Eng. Irrev. = état d'engagement Irréversible et Diff = état de Différenciation.



RESEARCH ARTICLE

# Murine Embryonic Stem Cell Plasticity Is Regulated through *Klf5* and Maintained by Metalloproteinase MMP1 and Hypoxia

Aya Abou Hammoud<sup>1,2,3</sup>, Nina Kirstein<sup>1,2<sup>¶a</sup></sup>, Virginie Mournetas<sup>1,2<sup>¶b</sup></sup>, Anais Darracq<sup>1,2</sup>, Sabine Broc<sup>1,2</sup>, Camille Blanchard<sup>1,2</sup>, Dana Zeineddine<sup>3</sup>, Mohamad Mortada<sup>3</sup>, Helene Boeuf<sup>1,2\*</sup>

**1** Univ. Bordeaux, CIRID, UMR5164, F-33 000 Bordeaux, France, **2** CNRS, CIRID, UMR 5164, F-33 000 Bordeaux, France, **3** Lebanese University, Beyrouth, Liban

<sup>¶a</sup> Current address: DNA Replication and Epigenetics group, Research Unit Gene Vectors, Helmholtz Zentrum München, German Research Center for Environmental Health, Munich, Germany

<sup>¶b</sup> Current address: I-STEM, CECS/Inserm UMR861, 91030 Evry, France

\* [helene.boeuf@u-bordeaux.fr](mailto:helene.boeuf@u-bordeaux.fr)



OPEN ACCESS

**Citation:** Hammoud AA, Kirstein N, Mournetas V, Darracq A, Broc S, Blanchard C, et al. (2016) Murine Embryonic Stem Cell Plasticity Is Regulated through *Klf5* and Maintained by Metalloproteinase MMP1 and Hypoxia. PLoS ONE 11(1): e0146281. doi:10.1371/journal.pone.0146281

**Editor:** Johnson Rajasingh, University of Kansas Medical Center, UNITED STATES

**Received:** July 20, 2015

**Accepted:** December 15, 2015

**Published:** January 5, 2016

**Copyright:** © 2016 Hammoud et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This work was funded by CNRS, University of Bordeaux, the SIRIC BRIO program, the Region Aquitaine, the INCA and the FR TransBiomed. A.A.H. had a fellowship from the foundation Hariri (Lebanon) under a Franco-Lebanese co-supervision between the University of Bordeaux and the Lebanese University. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## Abstract

Mouse embryonic stem cells (mESCs) are expanded and maintained pluripotent *in vitro* in the presence of leukemia inhibitory factor (LIF), an IL6 cytokine family member which displays pleiotropic functions, depending on both cell maturity and cell type. LIF withdrawal leads to heterogeneous differentiation of mESCs with a proportion of the differentiated cells apoptosing. During LIF withdrawal, cells sequentially enter a reversible and irreversible phase of differentiation during which LIF addition induces different effects. However the regulators and effectors of LIF-mediated reprogramming are poorly understood. By employing a LIF-dependent ‘plasticity’ test, that we set up, we show that *Klf5*, but not *JunB* is a key LIF effector. Furthermore PI3K signaling, required for the maintenance of mESC pluripotency, has no effect on mESC plasticity while displaying a major role in committed cells by stimulating expression of the mesodermal marker Brachyury at the expense of endoderm and neuroectoderm lineage markers. We also show that the MMP1 metalloproteinase, which can replace LIF for maintenance of pluripotency, mimics LIF in the plasticity window, but less efficiently. Finally, we demonstrate that mESCs maintain plasticity and pluripotency potentials *in vitro* under hypoxic/physioxic growth conditions at 3% O<sub>2</sub> despite lower levels of *Pluri* and *Master gene* expression in comparison to 20% O<sub>2</sub>.

## Introduction

During the last decades, mouse embryonic stem cells (mESCs) have been intensively studied to reveal genetic programs essential for control of pluripotency and early cell fate decisions. This led to the characterization of signaling pathways and transcription effectors essential for the maintenance of mESCs pluripotency. These include the leukemia inhibitory factor (LIF)/signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)/suppressor of cytokine signaling 3

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

(SOCS3) pathway, along with the 'Master genes' like Octamer 4 (*Oct4*), *Nanog*, SRY (sex determining region Y)-box 2 (*Sox2*) and estrogen-related receptor, beta (*Essrb*) [1–3]. Subsequently, cocktails of genes were identified that could drive reprogramming of many types of somatic cells (like fibroblasts, keratinocytes, hepatocytes or bone marrow-derived cells), from various species including Humans, to induced pluripotent stem cells (iPSCs), with potential applications in cell therapies and regenerative medicine [4–6].

The mESCs are derived from pre-implantation blastocysts and are maintained pluripotent *in vitro* in i) serum-containing medium with LIF, or ii) bone morphogenetic protein 4 (BMP4)/LIF medium, or iii) serum-free medium supplemented with LIF and cocktails of inhibitors for key signaling pathways [extracellular regulated kinase (ERK), fibroblast growth factor (FGF) and glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) inhibitors, 3i]. All these cell growth media maintain mESCs in a naive pluripotent state, the most immature *in vitro* state defined by the cells being capable of colonizing embryos and contributing to all cell types in the organism [7–10]. Human embryonic stem cells (hESCs), which are maintained pluripotent in the presence of FGF2 and activin A are closer to primed mouse epiblast stem cells (EpiSCs), a state more prone to differentiation and less stable than the naive state. However various studies have reported strategies to revert hESCs to a naive state by treatment with LIF, STAT3 and/or signaling pathway inhibitors [11–14].

The LIF-induced signaling cascade starts with activation of Janus kinase (JAK) phosphorylating phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), which induces the phosphorylation and activation of AKT serine/threonine kinase. AKT signaling leads to the activation of T-box 3 (*Tbx3*) expression, a transcription factor that induces the expression of pluripotency maintaining genes. Additionally, AKT inactivates GSK3 $\beta$  by phosphorylation preventing the ubiquitin-dependent degradation of Myc and inhibition of *Nanog* expression. GSK3 $\beta$  is also inhibited by the canonical wingless (Wnt) signaling pathway which acts in synergy with LIF to maintain the expression of pluripotency related genes [15–18].

Most stem cells are found in complex microenvironments, termed 'niches' which reside in low oxygen concentration ( $[O_2]$ ), [19,20]. mESCs are derived from embryos which also remain in 1.5–5%  $[O_2]$ . This low oxygen environment is physiologically normal, not only for ESCs but also for many other types of stem cells including neural stem cells (NSCs), hematopoietic stem cells (HSCs) and mesenchymal stem cells (MSCs) [21–23]. The effect of low  $[O_2]$  on ESCs fates remains controversial and poorly understood. Several reports have shown that low  $[O_2]$  inhibits differentiation and maintains pluripotency of hESCs [24–27] and improves clonal survival of mESCs, particularly when the GSK3 $\beta$  pathway is repressed [7,28,29]. Also the Wnt/ b-Catenin pathway is stimulated, under hypoxia in mESCs which could be differentiated into the three cell lineages *in vitro*, indicating that hypoxia did not alter their pluripotency [30,31]. Activation of the Notch signaling pathway by hypoxia stabilizes hypoxia induced factor 1 $\alpha$  (Hif1 $\alpha$ ), the major effector of early steps of hypoxia, maintains the undifferentiated state and thus enhances the generation of both human and mouse iPSCs [32]. In addition, hypoxia can also revert hESCs or iPSC-derived differentiated cells back to the stem cell-like state [33]. In contrast, other studies reported that low  $[O_2]$  facilitates the differentiation of mESCs by impairing LIF signaling [34]. In addition, hypoxia enhances differentiation of hESCs towards cardiomyocytes and chondrocytes [35,36] and stimulates vascular differentiation through HIF1 $\alpha$ -mediated repression of *Oct4* and activation of vascular endothelial growth factor (*Vegf*) [37].

Recently, the metalloproteinase MMP1, shown to degrade the extracellular matrix (ECM) of mESCs, came as another microenvironment component essential for maintenance of mESC pluripotency. Indeed, it was shown that MMP1, either secreted by feeder cells or added to cell culture medium could release the ECM-trapped ciliary neurotrophic factor (CNTF) cytokine which then activates the JAK/STAT3 pathway, as does LIF [38,39].

By various microarray analyses performed on pluripotent versus differentiated cells, the core pluripotency genes were characterized by specific knockdown strategies [40,41]. In such analysis, we defined a cluster of *Pluri* genes [including muscle and microspikes RAS (*Mras*), *Esrrb* and T cell lymphoma breakpoint 1 (*Tcl1*)] whose expression diminishes within the first day (d1) of LIF removal. Among these genes a particular subset, involved in cell adhesion and cell-cell contacts, had also been characterized (including carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (*Ceacam1*), gap junction protein beta 3 (*Gjb3*), gap junction protein beta 5 (*Gjb5*) and junction adhesion molecule 2 (*Jam2*). Furthermore, a cluster of early differentiation genes, named *Diff*, is induced starting d1 of LIF withdrawal (including lymphoid enhancer binding factor 1 (*Lef1*), carbonic anhydrase 4 (*Car4*) and protocadherin 1 (*Pcdh1*), [42]. In addition, we identified LIF-induced (*Lifind*) genes, whose expression is stimulated by very short LIF treatment after a period of LIF withdrawal of 1 or 2 days. There are two categories of *Lifind* genes: those expressed after LIF induction specifically in cells depleted of LIF for 24 hours (*speLifind*) like Kruppel-like factor 5 (*Klf5*) and those induced in a more general way, in immature as well as differentiated cells (*pleioLifind*) like *JunB*. [42–44]. *Klf5*, a transcription factor of the Kruppel gene family, well conserved upon evolution, has been shown to be essential for the derivation of mESCs from Inner Cell Mass (ICM) as well as for the maintenance of mESCs cell pluripotency *in vitro* [45–48]. *Klf5*<sup>-/-</sup> ES cells differentiates spontaneously at high frequency and in knock-down experiments an essential effect of *Klf5* to block specific mesodermal differentiation has been demonstrated. In reverse experiments it has been shown that overexpression of *Klf5* leads to LIF-independent self-renewal with high level of *Tcl1* expression and increased cell proliferation along with AKT phosphorylation and stimulation [45,46,49,50].

By studying early steps of differentiation initiated by LIF withdrawal, we have previously shown that cells enter commitment phases during which LIF plays differential roles. While at d1 of LIF depletion re-addition of LIF blocks differentiation and/or reverts cells towards a pluripotency state, at d2 and later, re-addition of LIF is less efficient in altering the differentiation process and blocking apoptosis [43,51]. To understand the molecular mechanisms involved in the regulation of this early LIF-dependent mESC plasticity we set up an *in vitro* test for studying the impact of genes and signaling pathways which could modulate these properties in mESCs. In addition, we analysed the effects of MMP1, a new stemness player, and of hypoxia in mESC plasticity. We discovered that *Klf5* but not *JunB* is acting on cell plasticity. We also show that MMP1 can replace LIF to a certain extent in the plasticity test and that mESCs remain plastic under hypoxic conditions, despite alterations in gene expression patterns.

## Materials and Methods

### Cell culture

The mESC line CGR8 (from A. Smith laboratory) was grown in 6 well plates coated with 0.2% gelatin under 7% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere at 37°C in Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma Aldrich (DMEM-glutamax) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, Dutscher) or 10% KnockOut™ Serum Replacement (SR), (Gibco), 0.1 mM β-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich), 400 μg/mL gentamicin (Gibco Invitrogen) in the presence of 10 ng/mL of human LIF. Cells were passaged every 2 or 3 days by trypsinization and resuspended in complete medium.

For experiments performed under hypoxia (3% O<sub>2</sub>), cultures were performed in cell chamber with O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> regulators (BioSpherix) under water saturated atmosphere.

## Embryoid bodies and differentiation procedures

mESCs were grown in bacterial Petri-dishes in DMEM glutamax supplemented with 10% SR for 8 days under normoxia or hypoxia (BioSpherix cell chamber). At d8, embryoid bodies (EBs) were plated in gelatin-coated flasks for 7 days under normoxia or hypoxia. Beating cardiomyocytes were detected the day after plating and the neuronal cells with dense networks were observed from 3 days after plating.

## Drug treatment (LY294002)

The analysis of the effect of the PI3K inhibitor LY294002 (Cell signaling) was done by pre-treating the cells with 50  $\mu$ M LY294002 during 1h before treatment with LIF. Then LIF induction was performed for 1 to 4 days in the presence of the drug added for the first 24h. The efficiency and specificity of the inhibitor was verified by Western blot analysis on Phospho-AKT (anti-Phospho-ser473 AKT from Cell signaling, data not shown).

## MMP1 treatment

Cells grown in complete medium were washed with PBS and incubated in medium without LIF in the presence of 100 ng/mL of recombinant human metalloproteinase 1 (MMP1; cat. 420–01, PeproTech). Medium was changed every day.

## Small interfering RNA transfection

Cells were depleted from antibiotics 24h before transfection. 20 nM of siRNAs targeting *Klf5* or *JunB* (ON-TARGET<sup>plus</sup> SmartPOOL (Dharmacon), and 5  $\mu$ L Lipofectamine 2000 (Invitrogen) were incubated separately in 250  $\mu$ L DMEM glutamax for 5 min at room temperature. Then, both solutions were gently mixed and incubated for another 20 min before being added to cell culture. As a control, the same concentration of siRNA [ON-TARGET<sup>plus</sup> Non-targeting Pool (Dharmacon)] was used. siRNA transfection was done on about  $5 \cdot 10^5$  cells in suspension in cell medium without antibiotics. The medium was changed 24h after transfection and medium with LIF was added for 3 days. To determine siRNA efficiency at the beginning of the induction process, the expression of each target gene was verified by RT-qPCR analysis after 1h of LIF induction. The knock-down was considered to be efficient when gene expression during LIF induction equals the level of expression in non-induced cells, which was the case for both studied genes (data not shown).

## RNA isolation and quantitative real-time PCR

For RNA isolation, 800  $\mu$ L of TRIzol reagent (Invitrogen) were added to the cells and RNAs were prepared according to the manufacturer's instructions. The reverse transcriptase (RT)/DNase step was performed with the QuantiTect Rev Transcription kit (Qiagen). Quantitative real time (q)-PCR was performed using the Applied Biosystems StepOne<sup>TM</sup> Real-Time PCR System in a 25  $\mu$ L reaction volume containing 5  $\mu$ L of cDNA (1:20 dilution of the reverse transcribed sample), 12.5  $\mu$ L of B-R SYBR<sup>®</sup> Green SuperMix for iQ (Quanta, BioSciences) and primers pair at a final concentration of 0.5  $\mu$ M. The PCR program included a denaturation step at 95°C for 10 min, an amplification step for 40 cycles (15 s at 95°C, 1 min at 60°C) and a final dissociation curve step in order to determine the specificity of the product. Samples were duplicated for each run. Quantification was done by calculating the  $2^{\Delta\Delta C_t}$  value. Data were normalized using the *Hprt* mRNA, known to remain constant in the experimental condition.

Statistical significance of differential gene expression was calculated from four or more independent experiments by using IBM SPSS Statistics 21 software.

## Protein cell lysates and Western blot

Cells were lysed in mild RIPA buffer [PBS 1x, 1% Triton-X-100 (Sigma), 1% NP-40 (Sigma), 0.05% SDS] supplemented with protease inhibitor cocktail (Sigma), 1 mM Pefabloc (Sigma), 40 $\mu$ M NAF, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> and centrifuged for 20 min at 15 000 g. Antibodies were diluted 1:1000 as follows: rabbit polyclonal anti-gp190 (Novus, NBP2-32070); rabbit monoclonal anti-Phospho-tyr705 STAT3 (D3A7, Cell Signaling); rabbit monoclonal Anti-STAT3 (ABCAM, Ab68153); rabbit polyclonal Anti-Oct4 (ABCAM, Ab18976); rabbit polyclonal anti-Nanog (ABCAM, Ab80892); goat polyclonal anti-Sox2 (Santa Cruz, sc-17320); Rabbit polyclonal Anti-Erk2 (Santa Cruz, sc-154). Primary antibody incubation was done overnight in a sealed plastic bag at 4°C with slight agitation in the Odyssey blocking buffer (LI-COR company). After washing with TBS 0,1% Tween (twice for 10 min), the membrane was incubated for 1 h with the fluorescent far-red coupled secondary antibody, in accordance with the primary antibody: IRDye 680RD goat (polyclonal) anti-rabbit IgG (H+L), (LI-COR) or IRDye 800RD goat (polyclonal) anti-mouse IgG (H+L), (LI-COR) or HRP-labeled anti-Goat (IgG (H+L) (Vector Laboratories), diluted 1:20 000 in Odyssey blocking buffer. After washing twice for 10 min with TBS 0.1% Tween and with TBS1x, membranes were revealed with the Odyssey<sup>FC</sup> (LI-COR) apparatus with the Image studio software as recommended by manufacturer. Quantification of the correct size band for each antibody was performed with the Odyssey<sup>FC</sup> (LI-COR) quantification image studio software.

## Flow cytometry

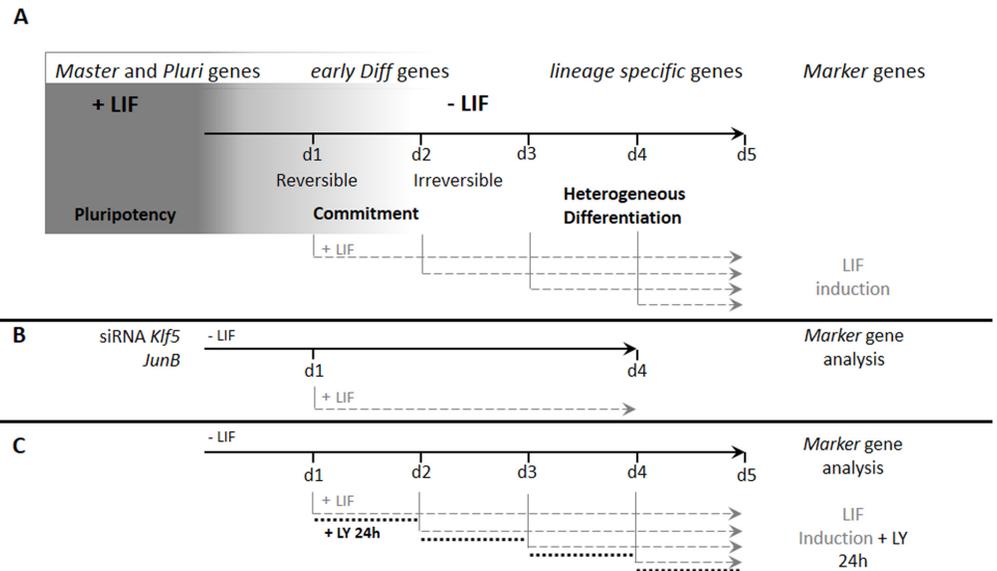
mESCs were grown in the presence or absence of LIF with or without LIF re-addition as indicated, as described in the [Fig 1](#), on a kinetic of 4 or 5 days. At the end point of the experiment, cells were trypsinized and the centrifugated pellets were washed in PBS 1X. 100 000 cells of each point were distributed in 96 round well plates. Cells were incubated in 50  $\mu$ L of primary anti-Ceacam1-Phycoerythrin antibody (Biolegend, BLE 134506, diluted 1/10), in PBS 1X, 0.5% BSA, 1mM EDTA for 30 min. at 4°C in dark. Cells were then washed twice with 250  $\mu$ L of PBS 1X and the resuspended pellets in PBS 1X were transferred in specific flow cytometry tubes and processed on the Fortessa cytometer (Becton Dickinson). Non labelled and isotype labelled cells were used as negative control. The percentage of positive cells and the MFI were obtained with the DIVA software BD Biosciences. The overlay “half off set graph” was displayed with the gated P1 population, with the Flow Jo software.

## Results

### Set up of a ‘Plasticity test’ in the mESC model

To characterize the behavior of mESCs during the first days of LIF withdrawal and to precisely determine how cells respond to LIF during the commitment phases, we set up an *in vitro* assay, hereafter referred to the ‘plasticity test’. In this test, cells were stimulated to differentiate by simple LIF withdrawal for 1 to 4 or 5 days and then LIF was reintroduced at different time points as depicted in [Fig 1A](#). Analysis of gene expression by RT-qPCR was performed at each time point of the experiment. This assay enabled us to study the effects of key genes by siRNA depletion as depicted in [Fig 1B](#), or signaling pathways by the use of chemical inhibitors, as depicted in [Fig 1C](#).

In this assay, we analyzed the expression profiles of the *Master* genes (*Oct4*, *Sox2* and *Nanog*) and of the newly identified *Pluri* (*Ceacam1*, *Mras* and *Esrrb*) and *Diff* (*Lef1*, *Car4* and *Pcdh1*) genes ([Fig 2](#)). The expression level of *Master* genes was not strongly regulated during the first days of LIF withdrawal as expected [[42,52](#)]. These genes were also highly expressed



**Fig 1. General scheme of the ‘mESC Plasticity Test’.** (A) mESCs maintained in pluripotency (+LIF) or cultivated without LIF for the indicated period of time in days (d1 to d5) are induced with LIF at different time points. (B) The effect of specific genes was tested by a siRNA strategy in which addition of siRNA was performed the first day of LIF withdrawal. (C) PI3K inhibitor LY was added for 24 hours to the committed or differentiated cells as indicated.

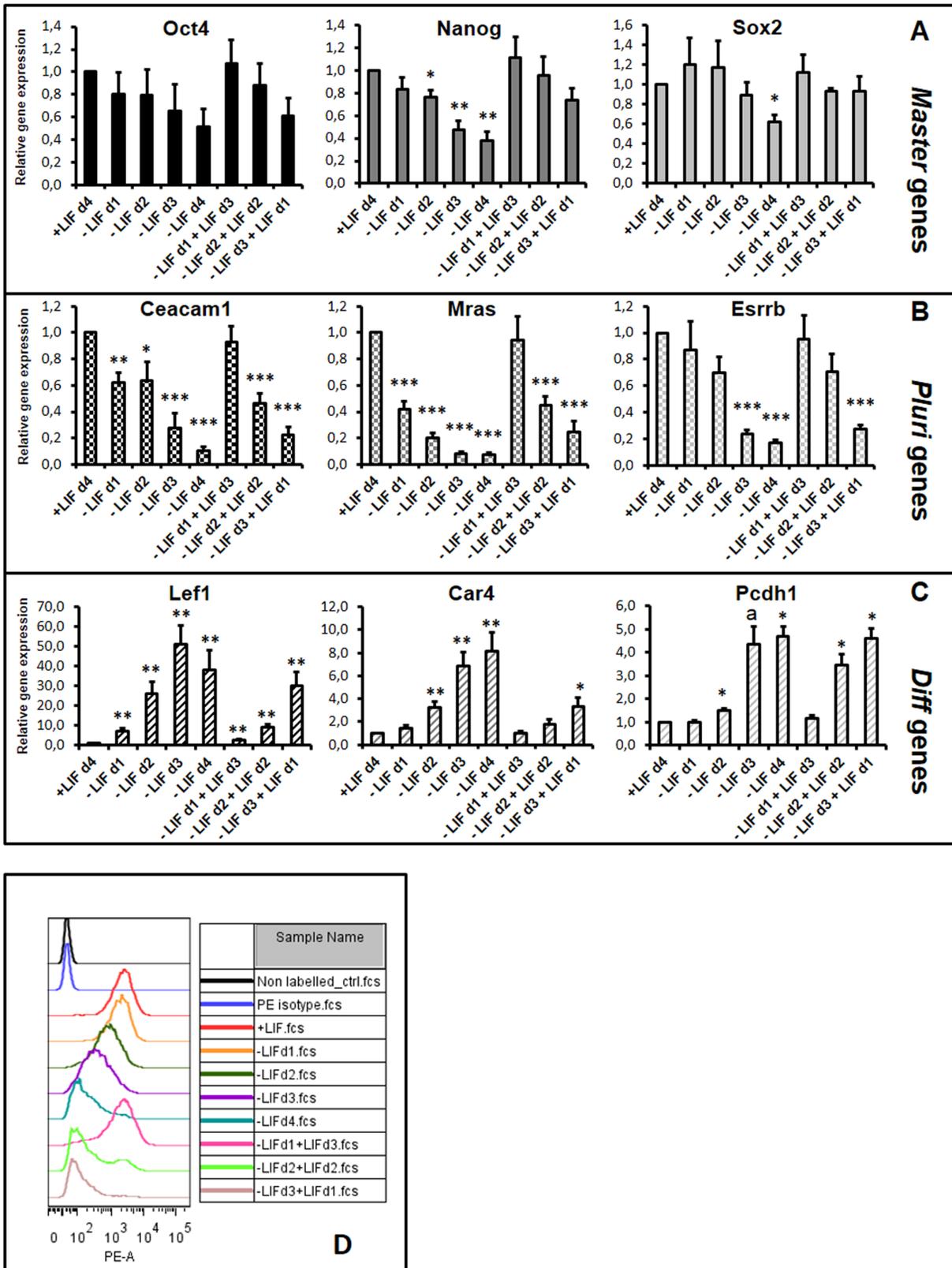
doi:10.1371/journal.pone.0146281.g001

after LIF reintroduction, up to d3 (Fig 2A). In contrast, the expression level of *Pluri* genes (known to decrease after one day of LIF withdrawal [42]), was re-established by LIF treatment at d1 but not restored or less efficiently re-established at d2 and d3 (Fig 2B). In addition, the expression level of the examined *Diff* genes was also regulated: their expression was stimulated upon LIF withdrawal and repressed upon LIF treatment at d1 but less efficiently at d2 and d3 (Fig 2C). Interestingly, the LIF effect observed after 4 days [(-LIFd1+LIFd3), Fig 2] started shortly after LIF addition [within the first 24h, (-LIFd1+LIFd1), S1 Fig], ruling out a selection process of LIF-resistant cells, enriched after 4 days of culture.

In addition to gene expression analysis by RT-qPCR we also analyzed endogenous protein expression by flow cytometry with an antibody raised against the membrane-associated protein Ceacam1 (encoded by the *Ceacam1* Pluri gene). Mean of Fluorescence Intensity (MFI) analysis of the bulk population (gated P1 cell population) revealed a global decrease of Ceacam1 expression, starting at d1 of LIF withdrawal with a continuous loss until the end of LIF kinetic starvation. Expression is regained at the -LIFd1+LIFd3 condition but not at -LIFd2+LIFd2, which follows the RNA profile (Fig 2D). This experiment indicates that, upon LIF withdrawal, there are no detectable resistant cells expressing higher level of Ceacam1 protein which could have remained and should be observed as a double peak in such analysis.

### The *Klf5* gene is involved in the regulation of the plasticity window

We previously identified two groups of genes induced by LIF (*speLifind* and *pleioLifind* genes) and postulated that some of the *speLifind* genes, induced by LIF preferentially at d1 but less at d2 after LIF withdrawal, could be involved in such reversion process [43]. As a proof of principle, by using siRNA strategy, we analyzed the impact of *Klf5* (*speLifind*) and *JunB* (*pleioLifind*) knockdown on cell plasticity as described in Fig 1B. The down-regulation of *Klf5* during LIF induction led to specific repression of the *Pluri* genes and induction of early *Diff* markers like *Lef1*, *Nestin* and *Brachyury* (*Brach*) (Fig 3A). In contrast, no effect on *Pluri* or *Diff* gene



**Fig 2. LIF has differential effects on mESC-derived cells, after d1, d2 or d3 of LIF starvation.** Cells were depleted from LIF or induced with LIF after a period of LIF depletion as indicated. After 4 days, expression of the selected genes (A) *Master genes*, (B) *Pluri genes* and (C) *Diff genes* was analyzed by RT-

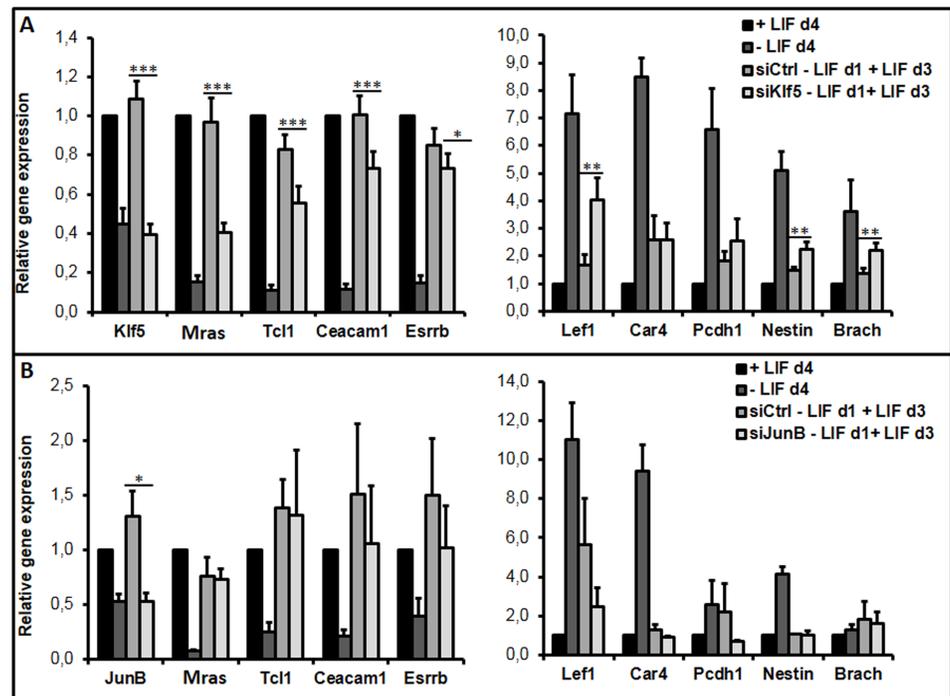
qPCR with *Hprt* used for normalization. Graphs represent the average level of expression and standard error of the mean (SEM) bars, calculated from 4 independent experiments. +LIF condition was arbitrarily set as 1. One sample t-test was performed for each condition versus the +LIF sample: \*p-value<0.05; \*\*p-value<0.01, \*\*\*p-value<0.001; a: p-value = 0.051; if not stated: not significant. (D) A representative experiment of flow cytometry, performed in the indicated conditions with the Ceacam-PE antibody, is presented: "off set graph" of the MFI of the total P1 gated cell population of each cell growth condition, with the Flo Jo software.

doi:10.1371/journal.pone.0146281.g002

expression was detected with *JunB* siRNA, although it efficiently repressed *JunB* expression (repression was 100% in the first hours of LIF induction and was at least of 50% after 4 days, at the end point of the experiment, (data not shown and Fig 3B). These results indicate that *Klf5* is involved in the LIF response at d1 while *JunB* does not regulate this process.

### PI3K does not regulate early commitment but it acts later for cell fate choices

LIF induces the PI3K pathway allowing the maintenance of mESCs pluripotency [15,16,52]. We investigated the effect of a specific PI3K inhibitor (LY294002 abbreviated LY) in the 'plasticity test' as described in Fig 1C. We analyzed gene expression at the end point of the kinetics (5 days) in the presence or absence of LY, added for 24 hours in cell medium at each point of the kinetics. PI3K inhibition had faint effects on the *Sox2* master gene while displaying no effects neither on *Oct4* nor on *Nanog*, *Pluri* and *early Diff* genes indicating that PI3K is not strongly involved in LIF-dependent cell plasticity (Fig 4A–4C). However, addition of the inhibitor at later time points (at d3 and d4 upon LIF withdrawal) led to changes in the expression of



**Fig 3. *Klf5* but not *JunB* disturbs the LIF-dependent plasticity in early committed cells.** Cells were depleted from LIF for 24 hours and either transfected with siControl (siCtrl) (A) siKlf5, or (B) siJunB and then induced with LIF for three days (d3). Graphs represent the average level of expression and SEM from 3 to 6 independent experiments. Paired sample t-test was performed to determine the significance of the difference in the expression levels observed with the non specific (siCtrl) versus specific siRNA: \*p-value<0.05; \*\*p-value<0.01, \*\*\*p-value<0.001; if not stated: not significant.

doi:10.1371/journal.pone.0146281.g003

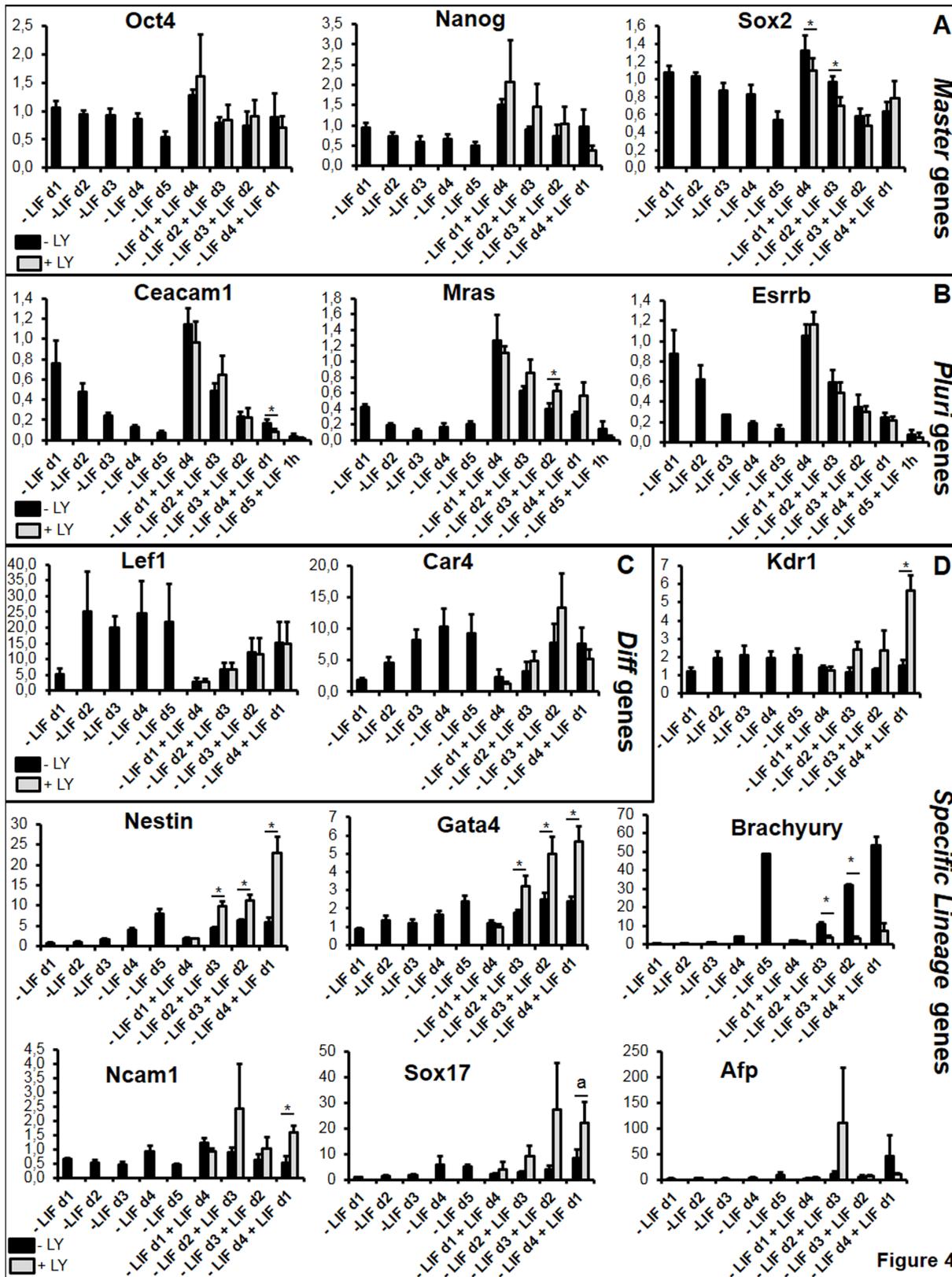


Figure 4

**Fig 4. PI3K does not regulate the LIF-dependent plasticity window but stimulates differentiation towards early mesoderm lineage while inhibiting ectoderm and endoderm differentiation processes.** Cells were depleted from LIF or induced with LIF in the presence of LY, for the first 24 hours as described in Fig 1C. After 5 days, expression of the selected genes (A) *Master* genes, (B) *Pluri* genes, (C) early *Diff* genes and (D) specific germ layer genes, was analyzed by RT-qPCR. Graphs represent the average level of expression and SEM from 4 independent experiments. Paired sample t-test was performed to evaluate the significance of the difference in the expression levels observed with or without LY: \*p-value<0.05; \*\*p-value<0.01, \*\*\*p-value<0.001; a: pvalue = 0.051; if not stated: not significant.

doi:10.1371/journal.pone.0146281.g004

some early lineage markers: while expression of *Nestin* and to less extent of *Ncam1* (ectoderm marker) and of *Gata4* (endoderm marker) was induced, the expression of *Brachyury* (early mesoderm marker) but not of *Kdr1* (late mesoderm marker) was strongly repressed. Thus, active PI3K seems to repress ectoderm and endoderm while inducing mesoderm during early onset of differentiation (Fig 4D).

### Slight variations in cell responses in Serum versus SR-containing medium

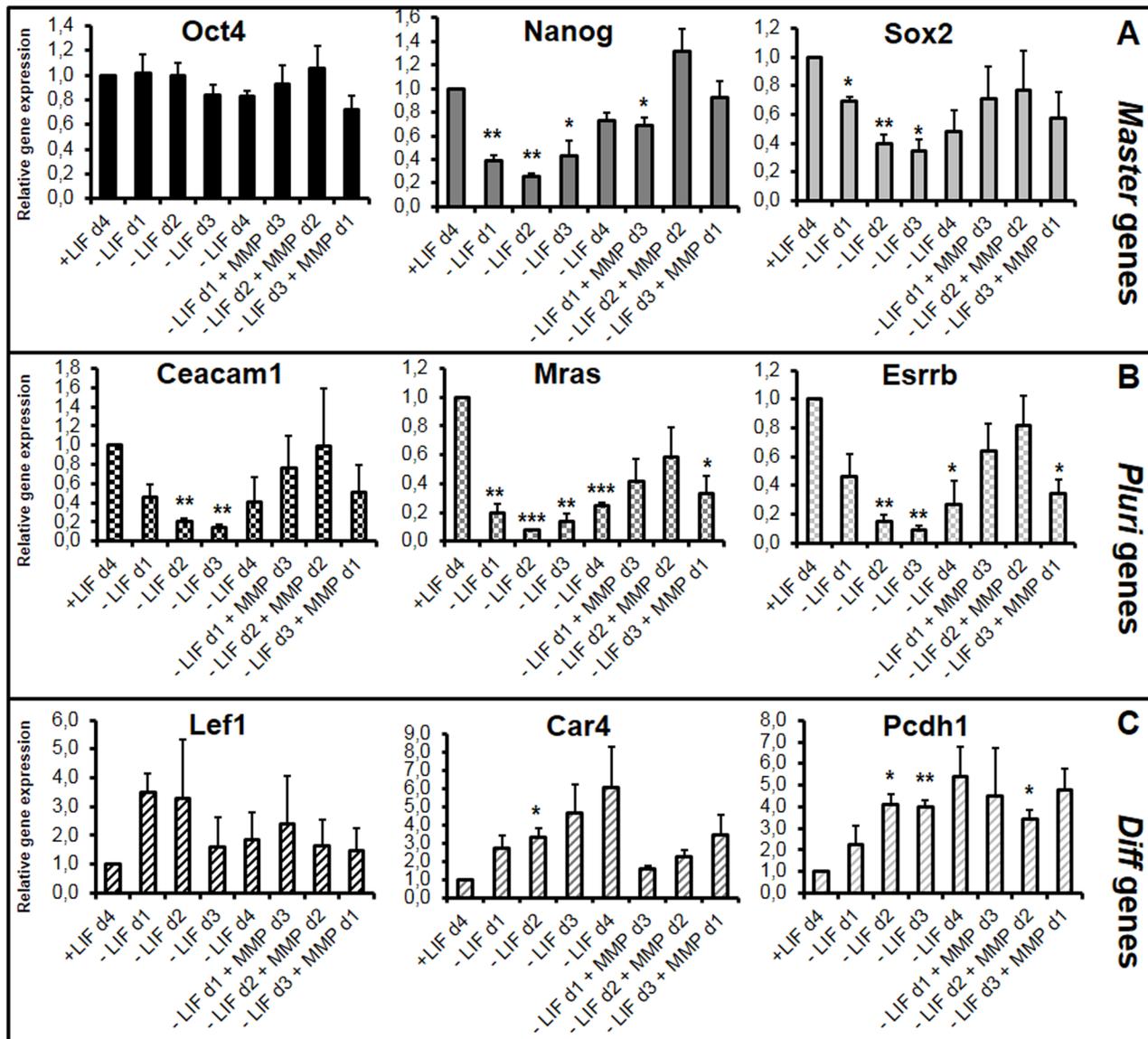
Since the behavior of mESCs can fluctuate depending on serum batches which have various effects on cell proliferation and pluripotency ([53] and our unpublished results), we also performed the 'plasticity test' in medium supplemented with the serum replacement (SR) compound instead of foetal calf serum. While similar results were found for *Pluri* gene expression (like *Ceacam1*, *Mras* and *Esrrb*), we observed that the plasticity window was slightly delayed with an effect of LIF extended up to d2 for *Diff* genes (S2 Fig). To reduce serum-side effects in our experiments, we performed all the following assays in medium supplemented with 10% SR rather than in medium containing serum.

### MMP1 is a novel stemness factor that regulates the plasticity window

We analyzed the impact of the MMP1 metalloproteinase, recently shown to be secreted by feeder cells and to degrade the extracellular matrix (ECM) of mESCs leading to the release of the ECM-trapped ciliary neurotrophic factor (CNTF) cytokine [39]. This LIF family member displays similar effects to LIF on mESCs, and maintains mESC pluripotency by inducing the JAK1/STAT3 pathway [39]. In our assay, we replaced LIF by MMP1 and observed cells remaining pluripotent for up to 11 days, as previously shown ([39] and our data not shown). In the 'plasticity test', MMP1 mimicked the LIF effect, however, with a less potent effect on the expression of *Diff* genes (Fig 5). Nevertheless, this experiment showed that MMP1-dependent remodeling of the extracellular matrix is involved in cell plasticity.

### Hypoxia maintains pluripotency and plasticity *in vitro* despite gene expression changes versus normoxia

We also analyzed the potential plasticity of mESCs grown under low O<sub>2</sub> (3%), which corresponds to physioxia (physiologic *in vivo*) conditions of pre-implantation embryos [7,54–57]. Cells were incubated at 3% O<sub>2</sub> in a dedicated hypoxic cell chamber and incubator with cell medium changed in the hypoxia chamber without normoxic shock during the entire experiment. Under continuous 3% O<sub>2</sub>, protein expression levels of the LIF receptor subunit (gp190) and of Phospho-tyr705-STAT3 were lower than under normoxia indicating an impairment of LIF signaling in these conditions as previously shown (Fig 6A, S3 Fig and [34]). In addition, we showed that the expression levels of Oct4, Sox2 and Nanog proteins were decreased upon hypoxia (Fig 6A and S3 Fig). In addition, protein expression levels and STAT3 phosphorylation decrease upon LIF withdrawal under normoxia (unless for Oct4), as expected, but also under hypoxia. This attests that LIF signalling is activated, even if weaker under hypoxia. Hypoxia



**Fig 5. MMP1 metalloproteinase partly mimics the LIF effect.** Cells were depleted from LIF for the indicated time and induced with 100 ng/mL of purified MMP1 as indicated. After 4 days, expression of the selected genes (A) *Master genes*, (B) *Pluri genes* and (C) *Diff genes* was analyzed by RT-qPCR. Graphs represent the average level of expression and SEM as depicted in Fig 2. One sample t-test was performed for each condition versus the +LIF sample: \*p-value<0.05; \*\*p-value<0.01; \*\*\*p-value<0.001; if not stated: not significant.

doi:10.1371/journal.pone.0146281.g005

also induced the expression of Hif1 $\alpha$  protein targets, like the BCL2/adenovirus E1B interacting protein 3 (*Bnip3*) and glucose transporter 1 (*Glut1*) genes, attesting that the Hif1 $\alpha$  protein was stabilized and active (Fig 6B). However, despite delayed cell growth compared to 20% O<sub>2</sub>, as previously observed [34], cells in 3% O<sub>2</sub> remained pluripotent as shown by morphological criteria (alkaline phosphatase staining, S4 Fig) and by their capacity to form embryoid bodies (EBs) and to differentiate into neurons and beating cardiomyocytes (data not shown). Analysis of expression levels of the three germ layer markers in our differentiation procedure (eight day-formed EBs followed by seven days of plated EBs) showed their efficient expression in both normoxia and hypoxia (Fig 6C). In addition, specific markers [neuronal like tubulin  $\beta$ 3 (*Tubb3/Tuj1*) and microtubule associated protein 2 (*Map2*), glial like glial fibrillary acidic

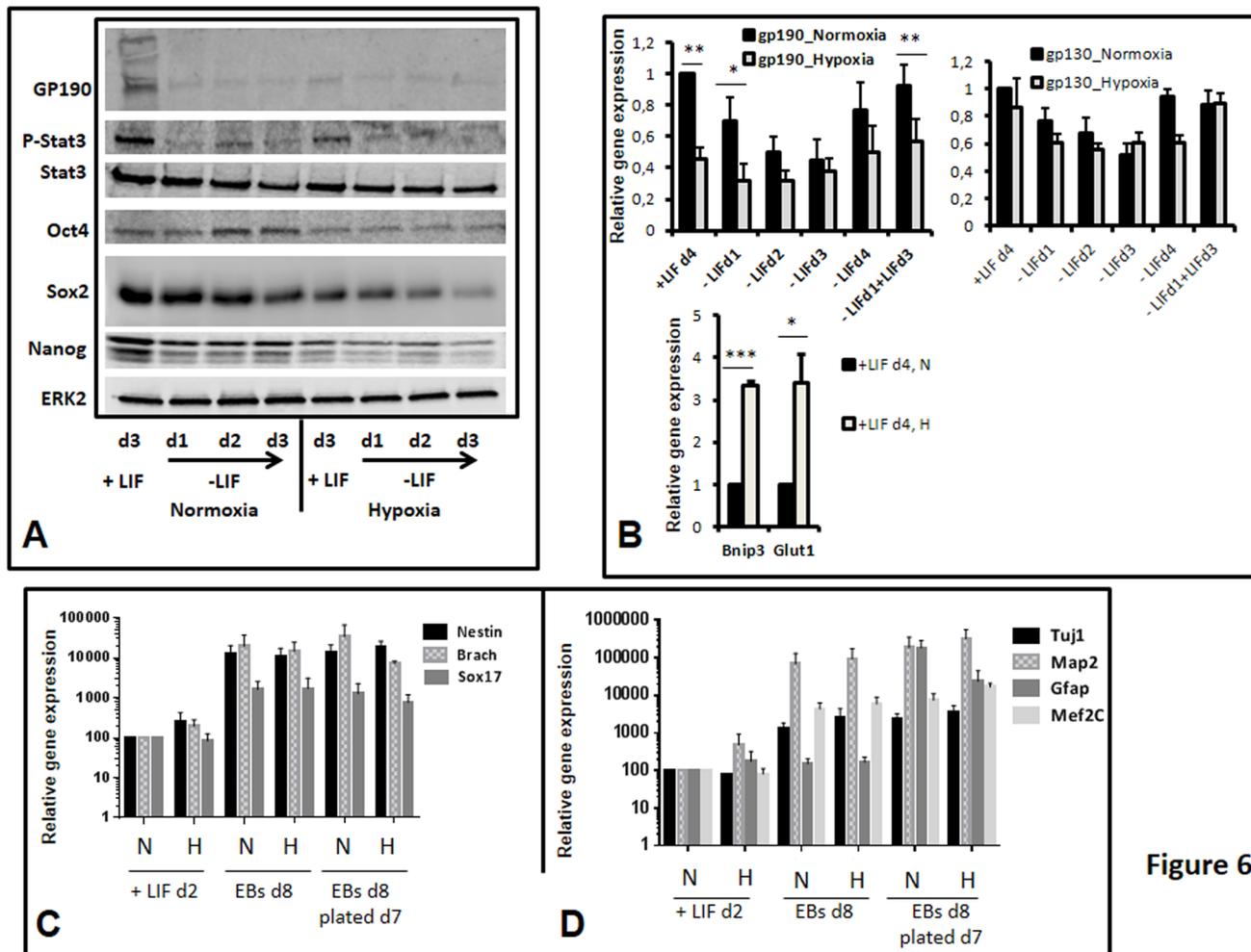
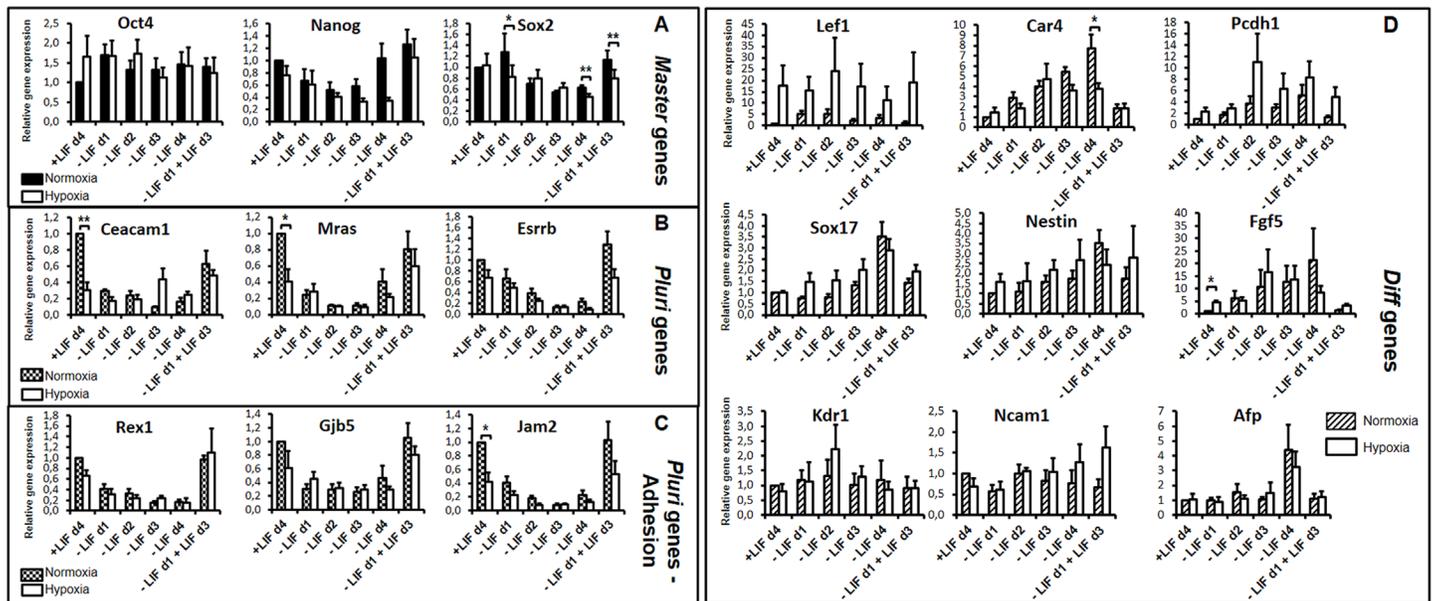


Figure 6

**Fig 6. mESCs grown under 3% O<sub>2</sub> have an impaired LIF signaling, express less 'pluripotency-involved' proteins but maintain pluripotency.** Cells were grown with (+LIF) or without LIF for 1 to 3 or 4 days under normoxia or hypoxia as indicated. (A) Protein cell lysates (60 μg) from cells grown under the indicated conditions were analyzed by Western blot. ERK2 was used as a loading control. A representative experiment is shown. Quantification of signals obtained with the different antibodies in the + LIF condition (n = 4) is provided in S3 Fig (B) Gene expression of the indicated genes was analyzed by RT-qPCR. Graphs represent the average level of expression and SEM as depicted in Fig 2 (n = 4). Paired sample t-test was performed to evaluate the significance of the difference in the expression levels observed in normoxia versus hypoxia: \*p-value<0.05; \*\*p-value<0.01, \*\*\*p-value<0.001; if not stated: not significant. (C) early lineage markers, (D) specific lineage markers in mESCs induced for *in vitro* differentiation under normoxia (20% O<sub>2</sub>, N) or hypoxia (3% O<sub>2</sub>, H). Gene expression was analyzed by RT-qPCR in cells grown for two days under N or H conditions (+LIFd2), in EBs at day 8 of their formation (EBs d8) and seven days after EBs plating. Y axis is in log scale.

doi:10.1371/journal.pone.0146281.g006

protein (*Gfap*) and cardiac like myocyte enhancer factor 2C (*Mef2c*) were highly expressed under hypoxia with comparable levels to the expression under normoxia highlighting the pluripotent state of the starting cells. Interestingly, we show that cells kept their plasticity potential under 3% O<sub>2</sub> conditions (Fig 7), despite lower Oct4, Nanog and Sox2 protein expression (Fig 6A and S3 Fig), lower expression of the *Pluri* genes (Fig 7B) and higher expression of *Lef1* and *Fgf5* in 3% O<sub>2</sub> compared to 20% O<sub>2</sub> (Fig 7D). Collectively, these results indicate that a novel equilibrium of gene expression and of post-translational regulation (as observed for Oct4, Nanog and Sox2) are established under low O<sub>2</sub> in pluripotent cells. However, the expression levels of lineage markers (SRY (sex determining region Y)-box 17 (*Sox17*), *Nestin*, *Kdr1*, *Ncam1* and *Afp* (Fig 7D) and also *Brachyury*, (data not shown) remained low in + LIF condition under 3% as well as 20% O<sub>2</sub> concentration, emphasizing the point that cells do not



**Fig 7. Hypoxia maintains cell plasticity with a novel equilibrium of *Pluri* and *early Diff* genes.** Cells grown under normoxia (N) or hypoxia (H) were depleted from LIF or induced with LIF after a period of LIF depletion as indicated. After 4 days, expression of the selected genes, (A) *Master*, (B) *Pluri*, (C) *Pluri Adhesion* and (D) *Diff* was analysed by RT-qPCR. Graphs represent the average level of expression and SEM as depicted in Fig 2 (n = 4). One sample t-test was performed for the +LIF condition and paired sample t-test was performed for the other conditions to evaluate the significance of the difference in the expression levels observed in normoxia versus hypoxia: \*p-value<0.05, \*\*p-value<0.01, \*\*\*p-value<0.001; if not stated: not significant.

doi:10.1371/journal.pone.0146281.g007

differentiate in the presence of LIF, under low O<sub>2</sub>, at least for the time in culture used here, up to four days.

## Discussion

Plasticity, which is a hallmark of stem cells, is defined in this study as the potential of committed cells to revert to a more immature state when grown in a particular environment. The characterization of regulators of this process is of major interest. For example, understanding the mechanism of the reversion of primed ESCs to the more immature naive state, is an essential step for future development of cellular therapies. Indeed, human ESCs or iPSCs are closer to primed than to naive states. Primed mouse EpiSCs can be reverted to the naive state of mESCs by exposure to LIF-STAT3 signaling, especially when cultured in the presence of signaling pathway inhibitors (e.g. 2i) or during transient expression of kruppel-like factor 4 (Klf4) or the myelocytomatosis oncogene (Myc) [58,59]. In Humans, the reversion of the naturally primed hESCs to naive state also involves the LIF-/STAT3 signaling pathway [11,12,14].

Here, we developed an *in vitro* assay showing that mESCs are equipped with a time-dependent window of plasticity during their early differentiation steps in which LIF or MMP1 metalloproteinase are essential. We characterized a differential effect of LIF on mESC-derived cells (either at a committed or differentiated state) and identified *Klf5*, a known pluripotency gene which blocks differentiation towards mesoderm lineage [50,60], as one of the factors controlling this effect. This new property of *Klf5* on modulating mESCs plasticity could be in link with its potentiality to reprogram somatic cells, a mechanism favoured by specific miRNAs [61,62] and to its role to govern homeostasis and oncogenesis in stem and transit-amplifying cells of the intestinal epithelia [63].

Other *speLifind* genes, mainly induced by LIF in the reversible window of cell differentiation, could also be essential effectors of plasticity rather than the *PleioLifind* genes and will deserve further investigation.

We observed serum batch-dependent variations in the plasticity window. Indeed serum composition fluctuates from batch to batch, probably including varying amounts of BMP2/BMP4, respectively involved in cardiomyocyte differentiation (BMP2) or maintenance of cell pluripotency in synergy with LIF (BMP4) [52,64]. To avoid the control of foetal calf serum (FCS) parameter for each serum batch change, we performed the plasticity test in the serum replacement medium in which cell differentiation occurs upon LIF withdrawal with less morphological differences than in serum medium (data not shown), but in which differentiated cells undergo apoptosis as previously shown under classical cell growth condition in FCS [65–67]. We observed that the plasticity window was slightly delayed with an effect of LIF extended up to d2 for some genes in the presence of SR containing medium. This is in agreement with a previous study demonstrating that cells in G1 were more prone to differentiate than cells in G2/M. Indeed, in this report it was shown, in a ‘LIF rescue assay’, that LIF regulates the extent of cell cycle phases up to d2 [68].

MMP1 was recently shown to maintain cell pluripotency by releasing trapped cytokine in the ECM. Our results demonstrated that MMP1 maintained also cell plasticity in committed cells up to d2, probably by CNTF delivery, a process which remains to be demonstrated in our assay. Whether ECM remodeling upon MMP1 activity could synergize with LIF during this process, remains also to be determined.

Since the starting population of mESCs is heterogeneous [69–71], there was a possibility that after one day of starvation, LIF addition could favor the clonal expansion of a sub-population of cells which are resistant to LIF withdrawal and remain pluripotent. However, when following protein expression encoded by one of the Pluri gene (*Ceacam1*) by flow cytometry analysis, we did not detect any residual resistant population which could have been observed by additional peak of fluorescence in LIF withdrawal kinetic, in such analysis (Fig 2D). Also, the fact that we observed an induction of *Pluri* genes and a repression of *Diff* genes after one day of treatment (in the -LIFd1+LIFd1 condition, as shown in S1 Fig) argues against a clonal expansion of resistant cells. In addition, in a ‘LIF rescue assay’, it has been shown that LIF reverts the differentiation-dependent increase of G1 phase up to d2 [57]. Moreover, the LIF effect is lost on cells differentiated for two days or more, stressing the point that LIF displays differential effects depending upon cell maturity and that there is a decisive step for commitment between two and three days of LIF withdrawal. Furthermore, EBs grown for more than 20 days *in vitro* can re-express *Oct4* and recover pluripotent properties, presenting another window of potential plasticity in the mESC model [72]. However, it has not been described whether this late effect is LIF-dependent, which could be a possibility since LIF is expressed in differentiated cells from day 6 and later ([42] and our unpublished results).

PI3K regulates developmental and physiologic processes during myogenesis and promotes growth and osteogenic differentiation of rat MSCs upon mechano-growth factor (MGF) activation [73,74]. We showed that the PI3K pathway is involved in mESC-derived cell choices and particularly in the expression of the key Brachyury early mesodermal marker, but not at early times of LIF-dependent plasticity. Since PI3K is known to maintain mESCs pluripotency [16,75], this result indicates that the mechanisms of pluripotency and plasticity, despite having common regulators like *Klf5*, are not similar. Further characterization of this LIF-dependent window of plasticity, by chemicals or siRNA library screenings, will require new tools as tagged cells sorted by gain or loss of a short life fluorescent protein expressed under the control of a LIF-dependent promoter (the *Pluri* genes *Ceacam 1*, *Esrrb* or early *Diff* gene like *Lef1*).

Classical cell growth cultures are far from being ideal, in particular because O<sub>2</sub> is much lower *in vivo* than in cell culture incubators (20%). However, studies of mESCs aiming at taking this parameter into consideration remain controversial and the outcome of hypoxia is poorly understood. The various O<sub>2</sub> levels (1 to 5% O<sub>2</sub>) and mESC lines, grown with or without feeders (D3 versus CGR8 for example) could explain differences in published reports. Also, avoiding normoxic shock during medium changes, by using a hypoxia cell chamber, is an important parameter to diminish technical variations in the effect of hypoxia (our unpublished observation). We showed in this study that under hypoxia, mESCs respond poorly to LIF, probably because of low expression of the specific LIF receptor subunit, gp190, as seen both at the RNA and protein levels. We showed that the level of STAT3 repressor, *Socs3*, is not changed between normoxia and hypoxia at the RNA level (data not shown), but we cannot rule out that a stabilized *Socs3* protein could be responsible for the low level of phospho-Tyr 705-STAT3 protein detected under hypoxia. We also observed that the level of Oct4, Nanog and Sox2 proteins was reduced under hypoxia compared to normoxia, despite similar RNA expression levels. This indicates hypoxia-dependent translational regulation in agreement with a recent report showing variation in mRNA translation under hypoxia in the adrenal gland pheochromocytoma PC12 model [76]. However, we showed that cells under hypoxia maintain *in vitro* pluripotent criteria. Indeed, they are able to form EBs that differentiate into the three mature germ layers and to neurons and beating cardiomyocytes. Also, we demonstrated that LIF-dependent cell plasticity is maintained under hypoxic conditions at d1. Whether this reversible state of cells could be maintained under hypoxia at later times after LIF withdrawal remains to be investigated. Though, we speculate that mESCs, which have been derived under 20% O<sub>2</sub>, adapted their potential to remain pluripotent and plastic by expressing *Master* and *Pluri* genes at higher levels than needed under physioxic conditions (3% O<sub>2</sub>). It will be of great interest to perform exhaustive transcriptomic and proteomic analyses in fresh mESCs directly derived under low O<sub>2</sub> and to compare them with data so far obtained under 20% O<sub>2</sub>. This might lead to characterization of new stemness factors that could operate in hypoxic niches in embryos.

In conclusion, we set up an *in vitro* test allowing to characterize the impact of cytokines (like LIF in this study), of genes (by siRNA strategy), of signalling pathways (by use of chemicals) and of various environmental parameters on mESCs plasticity. We unveiled a new property of *Klf5* to regulate this LIF-dependent effect which is not under strict control of the PI3K pathway. We also show that MMP1 can replace LIF to a certain extent in the plasticity test and that mESCs remain plastic under hypoxic conditions, despite alterations in gene expression patterns.

## Supporting Information

**S1 Fig. Gene modulation starts within the first 24h of LIF addition.** Cells were depleted from LIF or induced with LIF after a period of LIF depletion as indicated. After two days, RNA was extracted and expression of the selected genes was analyzed by RT-qPCR with *Hprt* used for normalization. Mean and SEM (Standard Error of Mean) bars were calculated from 4 independent experiments. +LIF condition was arbitrarily set as 1.  
(TIF)

**S2 Fig. Experiments in serum replacement versus FCS-containing medium slightly modulates the plasticity window.** Cells were depleted from LIF or induced with LIF after a period of LIF depletion as indicated. After 4 days, expression of the selected genes (A) *Master* genes, (B) *Pluri* genes and (C) *Diff* genes was analyzed. Graphs represent the average level of expression and SEM as depicted in Fig 2. One sample t-test was performed for each condition *versus* the

+LIF sample: \*p-value<0.05; \*\*p-value<0.01, \*\*\*p-value<0.001; if not stated: not significant. (TIF)

**S3 Fig. Quantification of Western blot experiments.** Graph represents the mean of ratio of normoxia versus hypoxia signals obtained in the +LIF condition for each antibody, as indicated, with normalization performed with the ERK2 protein as a loading control. n = 4. Quantification was performed with the Odyssey<sup>FC</sup> (LI-COR) quantification Image Studio software. (TIF)

**S4 Fig. mESCs maintain alkaline phosphatase activity and mESC-like morphology under hypoxia.** Pictures of mESCs grown with LIF under normoxia or hypoxia for four days and stained with the Alkaline phosphatase kit (Sigma-Aldrich, 86R-1KT). Scale bar is 100  $\mu$ M. (TIF)

**S5 Fig. List of primers used for RT-qPCR.** (DOCX)

## Acknowledgments

We thank all members of the “Pluripotency and early steps of differentiation” team at CNRS-UMR-5164-CIRID for their helpful insights and discussions and in particular A. Villacreces, V. Praloran and Z. Ivanovic for good advices and help with the experiments performed under hypoxia conditions. We thank X. Gauthereau for good advice and contribution concerning cell cultures and RT-qPCR experiments, V. Pitard and S. Gonzales for their good help concerning flow cytometry experiments and S. Daburon for providing supernatant of CHO cells overexpressing human LIF. We thank Austin Smith for the gift of the CGR8 cell line and JF Moreau and C Goding for careful reading of the manuscript.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AAH HB. Performed the experiments: AAH NK VM AD SB DZ CB. Analyzed the data: AAH NK VM AD SB DZ MM HB. Contributed reagents/materials/analysis tools: HB. Wrote the paper: AAH NK VM HB. Administrative and financial support: DZ MM HB.

## References

1. Trouillas M, Saucourt C, Guillotin B, Gauthereau X, Taupin J-L, Moreau J-F, et al. The LIF cytokine: towards adulthood. *Eur Cytokine Netw.* 2009; 20: 51–62. doi: [10.1684/ecn.2009.0148](https://doi.org/10.1684/ecn.2009.0148) PMID: [19541590](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19541590/)
2. Martello G, Smith A. The nature of embryonic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2014; 30: 647–675. doi: [10.1146/annurev-cellbio-100913-013116](https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100913-013116) PMID: [25288119](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25288119/)
3. Zeineddine D, Hammoud AA, Mortada M, Boeuf H. The Oct4 protein: more than a magic stemness marker. *Am J Stem Cells.* 2014; 3: 74–82. PMID: [25232507](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25232507/)
4. Takahashi K, Okita K, Nakagawa M, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nat Protoc.* 2007; 2: 3081–3089. doi: [10.1038/nprot.2007.418](https://doi.org/10.1038/nprot.2007.418) PMID: [18079707](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18079707/)
5. Aoi T, Yae K, Nakagawa M, Ichisaka T, Okita K, Takahashi K, et al. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science.* 2008; 321: 699–702. doi: [10.1126/science.1154884](https://doi.org/10.1126/science.1154884) PMID: [18276851](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18276851/)
6. Inoue H, Nagata N, Kurokawa H, Yamanaka S. iPS cells: a game changer for future medicine. *EMBO J.* 2014; 33: 409–417. doi: [10.1002/emboj.201387098](https://doi.org/10.1002/emboj.201387098) PMID: [24500035](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24500035/)
7. Ying Q-L, Wray J, Nichols J, Batlle-Morera L, Doble B, Woodgett J, et al. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature.* 2008; 453: 519–523. doi: [10.1038/nature06968](https://doi.org/10.1038/nature06968) PMID: [18497825](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18497825/)
8. Niwa H. Mouse ES cell culture system as a model of development. *Dev Growth Differ.* 2010; 52: 275–283. doi: [10.1111/j.1440-169X.2009.01166.x](https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2009.01166.x) PMID: [20148924](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20148924/)

9. Vallier L, Mendjan S, Brown S, Chng Z, Teo A, Smithers LE, et al. Activin/Nodal signalling maintains pluripotency by controlling Nanog expression. *Dev Camb Engl*. 2009; 136: 1339–1349. doi: [10.1242/dev.033951](https://doi.org/10.1242/dev.033951)
10. Tesar PJ, Chenoweth JG, Brook FA, Davies TJ, Evans EP, Mack DL, et al. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature*. 2007; 448: 196–199. doi: [10.1038/nature05972](https://doi.org/10.1038/nature05972) PMID: [17597760](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17597760/)
11. Gafni O, Weinberger L, Mansour AA, Manor YS, Chomsky E, Ben-Yosef D, et al. Derivation of novel human ground state naive pluripotent stem cells. *Nature*. 2013; 504: 282–286. doi: [10.1038/nature12745](https://doi.org/10.1038/nature12745) PMID: [24172903](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24172903/)
12. Theunissen TW, Powell BE, Wang H, Mitalipova M, Faddah DA, Reddy J, et al. Systematic identification of culture conditions for induction and maintenance of naive human pluripotency. *Cell Stem Cell*. 2014; 15: 471–487. doi: [10.1016/j.stem.2014.07.002](https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.07.002) PMID: [25090446](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25090446/)
13. Takashima Y, Guo G, Loos R, Nichols J, Ficiz G, Krueger F, et al. Resetting transcription factor control circuitry toward ground-state pluripotency in human. *Cell*. 2014; 158: 1254–1269. doi: [10.1016/j.cell.2014.08.029](https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.08.029) PMID: [25215486](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25215486/)
14. Chen H, Aksoy I, Gonnot F, Osteil P, Aubry M, Hamela C, et al. Reinforcement of STAT3 activity reprogrammes human embryonic stem cells to naive-like pluripotency. *Nat Commun*. 2015; 6: 7095. doi: [10.1038/ncomms8095](https://doi.org/10.1038/ncomms8095) PMID: [25968054](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25968054/)
15. Storm MP, Kumpfmüller B, Thompson B, Kolde R, Vilo J, Hummel O, et al. Characterization of the Phosphoinositide 3-Kinase-Dependent Transcriptome in Murine Embryonic Stem Cells: Identification of Novel Regulators of Pluripotency. *Stem Cells*. 2009; 27: 764–775. doi: [10.1002/stem.3](https://doi.org/10.1002/stem.3) PMID: [19350676](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19350676/)
16. Welham MJ, Kingham E, Sanchez-Ripoll Y, Kumpfmüller B, Storm M, Bone H. Controlling embryonic stem cell proliferation and pluripotency: the role of PI3K- and GSK-3-dependent signalling. *Biochem Soc Trans*. 2011; 39: 674–678. doi: [10.1042/BSOT0390674](https://doi.org/10.1042/BSOT0390674) PMID: [21428960](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21428960/)
17. Ogawa K, Nishinakamura R, Iwamatsu Y, Shimosato D, Niwa H. Synergistic action of Wnt and LIF in maintaining pluripotency of mouse ES cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 343: 159–166. doi: [10.1016/j.bbrc.2006.02.127](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.02.127) PMID: [16530170](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16530170/)
18. Sui L, Bouwens L, Mfopou JK. Signaling pathways during maintenance and definitive endoderm differentiation of embryonic stem cells. *Int J Dev Biol*. 2013; 57: 1–12. doi: [10.1387/ijdb.120115ls](https://doi.org/10.1387/ijdb.120115ls) PMID: [23585347](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23585347/)
19. Mohyeldin A, Garzón-Muvdi T, Quiñones-Hinojosa A. Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. *Cell Stem Cell*. 2010; 7: 150–161. doi: [10.1016/j.stem.2010.07.007](https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.07.007) PMID: [20682444](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20682444/)
20. Guitart AV, Debeissat C, Hermitte F, Villacreces A, Ivanovic Z, Boeuf H, et al. Very low oxygen concentration (0.1%) reveals two FDCP-Mix cell subpopulations that differ by their cell cycling, differentiation and p27KIP1 expression. *Cell Death Differ*. 2011; 18: 174–182. doi: [10.1038/cdd.2010.85](https://doi.org/10.1038/cdd.2010.85) PMID: [20671746](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20671746/)
21. Brunet de la Grange P, Vlaski M, Duchez P, Chevaleyre J, Lapostolle V, Boiron J-M, et al. Long-term repopulating hematopoietic stem cells and “side population” in human steady state peripheral blood. *Stem Cell Res*. 2013; 11: 625–633. doi: [10.1016/j.scr.2013.04.003](https://doi.org/10.1016/j.scr.2013.04.003) PMID: [23651585](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23651585/)
22. Vlaski M, Negroni L, Kovacevic-Filipovic M, Guibert C, Brunet de la Grange P, Rossignol R, et al. Hypoxia/hypercapnia-induced adaptation maintains functional capacity of cord blood stem and progenitor cells at 4°C. *J Cell Physiol*. 2014; 229: 2153–2165. doi: [10.1002/jcp.24678](https://doi.org/10.1002/jcp.24678) PMID: [24912010](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24912010/)
23. Li L, Candelario KM, Thomas K, Wang R, Wright K, Messier A, et al. Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) is required for neural stem cell maintenance and vascular stability in the adult mouse SVZ. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2014; 34: 16713–16719. doi: [10.1523/JNEUROSCI.4590-13.2014](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4590-13.2014)
24. Ezashi T, Das P, Roberts RM. Low O<sub>2</sub> tensions and the prevention of differentiation of hES cells. *Proc Natl Acad Sci U A*. 2005; 102: 4783–8.
25. Närvä E, Pursiheimo J-P, Laiho A, Rahkonen N, Emani MR, Viitala M, et al. Continuous hypoxic culturing of human embryonic stem cells enhances SSEA-3 and MYC levels. *PLoS One*. 2013; 8: e78847. doi: [10.1371/journal.pone.0078847](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078847) PMID: [24236059](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24236059/)
26. Petruzzelli R, Christensen DR, Parry KL, Sanchez-Elsner T, Houghton FD. HIF-2 $\alpha$  regulates NANOG expression in human embryonic stem cells following hypoxia and reoxygenation through the interaction with an Oct-Sox cis regulatory element. *PLoS One*. 2014; 9: e108309. doi: [10.1371/journal.pone.0108309](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108309) PMID: [25271810](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25271810/)
27. Hawkins KE, Sharp TV, McKay TR. The role of hypoxia in stem cell potency and differentiation. *Regen Med*. 2013; 8: 771–782. doi: [10.2217/rme.13.71](https://doi.org/10.2217/rme.13.71) PMID: [24147532](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24147532/)

28. Barbosa HSC, Fernandes TG, Dias TP, Diogo MM, Cabral JMS. New insights into the mechanisms of embryonic stem cell self-renewal under hypoxia: a multifactorial analysis approach. *PLoS One*. 2012; 7: e38963. doi: [10.1371/journal.pone.0038963](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038963) PMID: [22701736](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22701736/)
29. Fernandes TG, Diogo MM, Fernandes-Platzgummer A, da Silva CL, Cabral JMS. Different stages of pluripotency determine distinct patterns of proliferation, metabolism, and lineage commitment of embryonic stem cells under hypoxia. *Stem Cell Res*. 2010; 5: 76–89. doi: [10.1016/j.scr.2010.04.003](https://doi.org/10.1016/j.scr.2010.04.003) PMID: [20537975](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20537975/)
30. Mazumdar J, O'Brien WT, Johnson RS, LaManna JC, Chavez JC, Klein PS, et al. O2 regulates stem cells through Wnt/ $\beta$ -catenin signalling. *Nat Cell Biol*. 2010; 12: 1007–1013. doi: [10.1038/ncb2102](https://doi.org/10.1038/ncb2102) PMID: [20852629](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20852629/)
31. Powers DE, Millman JR, Huang RB, Colton CK. Effects of oxygen on mouse embryonic stem cell growth, phenotype retention, and cellular energetics. *Biotechnol Bioeng*. 2008; 101: 241–254. doi: [10.1002/bit.21986](https://doi.org/10.1002/bit.21986) PMID: [18727033](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18727033/)
32. Yoshida Y, Takahashi K, Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Hypoxia enhances the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2009; 5: 237–241. doi: [10.1016/j.stem.2009.08.001](https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.08.001) PMID: [19716359](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19716359/)
33. Mathieu J, Zhang Z, Nelson A, Lamba DA, Reh TA, Ware C, et al. Hypoxia induces re-entry of committed cells into pluripotency. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2013; 31: 1737–1748. doi: [10.1002/stem.1446](https://doi.org/10.1002/stem.1446)
34. Jeong C-H, Lee H-J, Cha J-H, Kim JH, Kim KR, Kim J-H, et al. Hypoxia-inducible factor-1 alpha inhibits self-renewal of mouse embryonic stem cells in Vitro via negative regulation of the leukemia inhibitory factor-STAT3 pathway. *J Biol Chem*. 2007; 282: 13672–13679. doi: [10.1074/jbc.M700534200](https://doi.org/10.1074/jbc.M700534200) PMID: [17360716](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17360716/)
35. Niebruegge S, Bauwens CL, Peerani R, Thavandiran N, Masse S, Sevaptisidis E, et al. Generation of human embryonic stem cell-derived mesoderm and cardiac cells using size-specified aggregates in an oxygen-controlled bioreactor. *Biotechnol Bioeng*. 2009; 102: 493–507. doi: [10.1002/bit.22065](https://doi.org/10.1002/bit.22065) PMID: [18767184](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18767184/)
36. Koay EJ, Athanasiou KA. Hypoxic chondrogenic differentiation of human embryonic stem cells enhances cartilage protein synthesis and biomechanical functionality. *Osteoarthr Cartil OARS Osteoarthr Res Soc*. 2008; 16: 1450–1456. doi: [10.1016/j.joca.2008.04.007](https://doi.org/10.1016/j.joca.2008.04.007)
37. Lee S-W, Jeong H-K, Lee J-Y, Yang J, Lee EJ, Kim S-Y, et al. Hypoxic priming of mESCs accelerates vascular-lineage differentiation through HIF1-mediated inverse regulation of Oct4 and VEGF. *EMBO Mol Med*. 2012; 4: 924–938. doi: [10.1002/emmm.201101107](https://doi.org/10.1002/emmm.201101107) PMID: [22821840](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22821840/)
38. Przybyla LM, Voldman J. Attenuation of extrinsic signaling reveals the importance of matrix remodeling on maintenance of embryonic stem cell self-renewal. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109: 835–840. doi: [10.1073/pnas.1103100109](https://doi.org/10.1073/pnas.1103100109) PMID: [22215601](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22215601/)
39. Przybyla LM, Theunissen TW, Jaenisch R, Voldman J. Matrix remodeling maintains embryonic stem cell self-renewal by activating Stat3. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2013; 31: 1097–1106. doi: [10.1002/stem.1360](https://doi.org/10.1002/stem.1360)
40. Ivanova N, Dobrin R, Lu R, Kotenko I, Levorse J, DeCoste C, et al. Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference. *Nature*. 2006; 442: 533–8. PMID: [16767105](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16767105/)
41. Ding L, Paszkowski-Rogacz M, Nitzsche A, Slabicki MM, Heninger AK, Vries I de, et al. A genome-scale RNAi screen for Oct4 modulators defines a role of the Paf1 complex for embryonic stem cell identity. *Cell Stem Cell*. 2009; 4: 403–15. doi: [10.1016/j.stem.2009.03.009](https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.03.009) PMID: [19345177](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19345177/)
42. Trouillas M, Saucourt C, Guillotin B, Gauthereau X, Ding L, Buchholz F, et al. Three LIF-dependent signatures and gene clusters with atypical expression profiles, identified by transcriptome studies in mouse ES cells and early derivatives. *BMC Genomics*. 2009; 10: 73. doi: [10.1186/1471-2164-10-73](https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-73) PMID: [19203379](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19203379/)
43. Mathieu M-E, Saucourt C, Mournetas V, Gauthereau X, Thézé N, Praloran V, et al. LIF-dependent signaling: new pieces in the Lego. *Stem Cell Rev*. 2012; 8: 1–15. doi: [10.1007/s12015-011-9261-7](https://doi.org/10.1007/s12015-011-9261-7) PMID: [21537995](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21537995/)
44. Mathieu M-E, Fauchoux C, Saucourt C, Soulet F, Gauthereau X, Fédou S, et al. MRAS GTPase is a novel stemness marker that impacts mouse embryonic stem cell plasticity and *Xenopus* embryonic cell fate. *Dev Camb Engl*. 2013; 140: 3311–3322. doi: [10.1242/dev.091082](https://doi.org/10.1242/dev.091082)
45. Bourillot P-Y, Savatier P. Krüppel-like transcription factors and control of pluripotency. *BMC Biol*. 2010; 8: 125. doi: [10.1186/1741-7007-8-125](https://doi.org/10.1186/1741-7007-8-125) PMID: [20875146](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20875146/)
46. Ema M, Mori D, Niwa H, Hasegawa Y, Yamanaka Y, Hitoshi S, et al. Kruppel-like factor 5 is essential for blastocyst development and the normal self-renewal of mouse ESCs. *Cell Stem Cell*. 2008; 3: 555–67. doi: [10.1016/j.stem.2008.09.003](https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.09.003) PMID: [18983969](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18983969/)

47. Gao Y, Cao Q, Lu L, Zhang X, Zhang Z, Dong X, et al. Kruppel-like factor family genes are expressed during *Xenopus* embryogenesis and involved in germ layer formation and body axis patterning. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat.* 2015; 244: 1328–1346. doi: [10.1002/dvdy.24310](https://doi.org/10.1002/dvdy.24310)
48. McConnell BB, Yang VW. Mammalian Krüppel-like factors in health and diseases. *Physiol Rev.* 2010; 90: 1337–1381. doi: [10.1152/physrev.00058.2009](https://doi.org/10.1152/physrev.00058.2009) PMID: [20959618](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20959618/)
49. Nandan MO, Yang VW. The role of Krüppel-like factors in the reprogramming of somatic cells to induced pluripotent stem cells. *Histol Histopathol.* 2009; 24: 1343–1355. PMID: [19688699](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19688699/)
50. Parisi S, Cozzuto L, Tarantino C, Passaro F, Ciriello S, Aloia L, et al. Direct targets of Klf5 transcription factor contribute to the maintenance of mouse embryonic stem cell undifferentiated state. *BMC Biol.* 2010; 8: 128. doi: [10.1186/1741-7007-8-128](https://doi.org/10.1186/1741-7007-8-128) PMID: [20875108](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20875108/)
51. Boeuf H, Merienne K, Jacquot S, Duval D, Zeniou M, Hauss C, et al. The ribosomal S6 kinases, cAMP-responsive element-binding, and STAT3 proteins are regulated by different leukemia inhibitory factor signaling pathways in mouse embryonic stem cells. *J Biol Chem.* 2001; 276: 46204–11. PMID: [11581263](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11581263/)
52. Schulz H, Kolde R, Adler P, Aksoy I, Anastassiadis K, Bader M, et al. The FunGenES database: a genomics resource for mouse embryonic stem cell differentiation. *PLoS One.* 2009; 4: e6804. doi: [10.1371/journal.pone.0006804](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006804) PMID: [19727443](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19727443/)
53. Orlando L, Sanchez-Ripoll Y, Foster J, Bone H, Giachino C, Welham MJ. Differential Coupling of Self-Renewal Signaling Pathways in Murine Induced Pluripotent Stem Cells. *Androutsellis-Theotokis A, editor. PLoS ONE.* 2012; 7: e30234. doi: [10.1371/journal.pone.0030234](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030234) PMID: [22291922](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22291922/)
54. Guitart AV, Hammoud M, Dello Sbarba P, Ivanovic Z, Praloran V. Slow-cycling/quiescence balance of hematopoietic stem cells is related to physiological gradient of oxygen. *Exp Hematol.* 2010; 38: 847–851. doi: [10.1016/j.exphem.2010.06.002](https://doi.org/10.1016/j.exphem.2010.06.002) PMID: [20547202](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20547202/)
55. Ivanovic Z. Hypoxia or in situ normoxia: The stem cell paradigm. *J Cell Physiol.* 2009; 219: 271–275. doi: [10.1002/jcp.21690](https://doi.org/10.1002/jcp.21690) PMID: [19160417](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19160417/)
56. Carreau A, El Hafny-Rahbi B, Matejuk A, Grillon C, Kieda C. Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *J Cell Mol Med.* 2011; 15: 1239–1253. doi: [10.1111/j.1582-4934.2011.01258.x](https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01258.x) PMID: [21251211](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21251211/)
57. Jež M, Rožman P, Ivanović Z, Bas T. Concise review: the role of oxygen in hematopoietic stem cell physiology. *J Cell Physiol.* 2015; 230: 1999–2005. doi: [10.1002/jcp.24953](https://doi.org/10.1002/jcp.24953) PMID: [25655806](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25655806/)
58. Bao S, Tang F, Li X, Hayashi K, Gillich A, Lao K, et al. Epigenetic reversion of post-implantation epiblast to pluripotent embryonic stem cells. *Nature.* 2009; 461: 1292–5. doi: [10.1038/nature08534](https://doi.org/10.1038/nature08534) PMID: [19816418](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19816418/)
59. Guo G, Yang J, Nichols J, Hall JS, Eyres I, Mansfield W, et al. Klf4 reverts developmentally programmed restriction of ground state pluripotency. *Dev Camb Engl.* 2009; 136: 1063–1069. doi: [10.1242/dev.030957](https://doi.org/10.1242/dev.030957)
60. Aksoy I, Giudice V, Delahaye E, Wianny F, Aubry M, Mure M, et al. Klf4 and Klf5 differentially inhibit mesoderm and endoderm differentiation in embryonic stem cells. *Nat Commun.* 2014; 5: 3719. doi: [10.1038/ncomms4719](https://doi.org/10.1038/ncomms4719) PMID: [24770696](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24770696/)
61. Feng B, Jiang J, Kraus P, Ng J-H, Heng J-CD, Chan Y-S, et al. Reprogramming of fibroblasts into induced pluripotent stem cells with orphan nuclear receptor Esrrb. *Nat Cell Biol.* 2009; 11: 197–203. doi: [10.1038/ncb1827](https://doi.org/10.1038/ncb1827) PMID: [19136965](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19136965/)
62. Lu D, Davis MPA, Abreu-Goodger C, Wang W, Campos LS, Siede J, et al. MiR-25 regulates Wwp2 and Fbxw7 and promotes reprogramming of mouse fibroblast cells to iPSCs. *PLoS One.* 2012; 7: e40938. doi: [10.1371/journal.pone.0040938](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040938) PMID: [22912667](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22912667/)
63. Nakaya T, Ogawa S, Manabe I, Tanaka M, Sanada M, Sato T, et al. KLF5 regulates the integrity and oncogenicity of intestinal stem cells. *Cancer Res.* 2014; 74: 2882–2891. doi: [10.1158/0008-5472.CAN-13-2574](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2574) PMID: [24626089](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24626089/)
64. Doss MX, Winkler J, Chen S, Hippler-Altenburg R, Sotiriadou I, Halbach M, et al. Global transcriptome analysis of murine embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Genome Biol.* 2007; 8: R56. PMID: [17428332](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17428332/)
65. Duval D, Malaise M, Reinhardt B, Kedinger C, Boeuf H. A p38 inhibitor allows to dissociate differentiation and apoptotic processes triggered upon LIF withdrawal in mouse embryonic stem cells. *Cell Death Differ.* 2004; 11: 331–341. PMID: [14685156](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14685156/)
66. Duval D, Trouillas M, Thibault C, Dembele D, Diemunsch F, Reinhardt B, et al. Apoptosis and differentiation commitment: novel insights revealed by gene profiling studies in mouse embryonic stem cells. *Cell Death Differ.* 2006; 13: 564–75. PMID: [16311515](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16311515/)

67. Trouillas M, Saucourt C, Duval D, Gauthereau X, Thibault C, Dembele D, et al. Bcl2, a transcriptional target of p38alpha, is critical for neuronal commitment of mouse embryonic stem cells. *Cell Death Differ.* 2008; 15: 1450–1459. doi: [10.1038/cdd.2008.63](https://doi.org/10.1038/cdd.2008.63) PMID: [18437159](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18437159/)
68. Coronado D, Godet M, Bourillot P-Y, Taponnier Y, Bernat A, Petit M, et al. A short G1 phase is an intrinsic determinant of naive embryonic stem cell pluripotency. *Stem Cell Res.* 2013; 10: 118–131. doi: [10.1016/j.scr.2012.10.004](https://doi.org/10.1016/j.scr.2012.10.004) PMID: [23178806](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23178806/)
69. Carter MG, Stagg CA, Falco G, Yoshikawa T, Bassey UC, Aiba K, et al. An in situ hybridization-based screen for heterogeneously expressed genes in mouse ES cells. *Gene Expr Patterns.* 2008; 8: 181–98. doi: [10.1016/j.gexp.2007.10.009](https://doi.org/10.1016/j.gexp.2007.10.009) PMID: [18178135](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18178135/)
70. Toyooka Y, Shimosato D, Murakami K, Takahashi K, Niwa H. Identification and characterization of subpopulations in undifferentiated ES cell culture. *Development.* 2008; 135: 909–18. doi: [10.1242/dev.017400](https://doi.org/10.1242/dev.017400) PMID: [18263842](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18263842/)
71. Chambers I, Silva J, Colby D, Nichols J, Nijmeijer B, Robertson M, et al. Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature.* 2007; 450: 1230–4. PMID: [18097409](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18097409/)
72. Attia WA, Abd El Aziz OM, Spitkovsky D, Gaspar JA, Dröge P, Suhr F, et al. Evidence for self-maintaining pluripotent murine stem cells in embryoid bodies. *Stem Cell Rev.* 2014; 10: 1–15. doi: [10.1007/s12015-013-9472-1](https://doi.org/10.1007/s12015-013-9472-1) PMID: [24022811](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24022811/)
73. Matheny RW, Riddle-Kottke MA, Leandry LA, Lynch CM, Abdalla MN, Geddis AV, et al. Role of phosphoinositide 3-OH kinase p110β in skeletal myogenesis. *Mol Cell Biol.* 2015; 35: 1182–1196. doi: [10.1128/MCB.00550-14](https://doi.org/10.1128/MCB.00550-14) PMID: [25605332](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25605332/)
74. Tong Y, Feng W, Wu Y, Lv H, Jia Y, Jiang D. Mechano-growth factor accelerates the proliferation and osteogenic differentiation of rabbit mesenchymal stem cells through the PI3K/AKT pathway. *BMC Biochem.* 2015; 16: 1. doi: [10.1186/s12858-015-0031-z](https://doi.org/10.1186/s12858-015-0031-z) PMID: [25588515](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25588515/)
75. Paling NRD, Wheadon H, Bone HK, Welham MJ. Regulation of embryonic stem cell self-renewal by phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling. *J Biol Chem.* 2004; 279: 48063–48070. doi: [10.1074/jbc.M406467200](https://doi.org/10.1074/jbc.M406467200) PMID: [15328362](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15328362/)
76. Andreev DE, O'Connor PB, Zhdanov AV, Dmitriev RI, Shatsky IN, Papkovsky DB, et al. Oxygen and glucose deprivation induces widespread alterations in mRNA translation within 20 minutes. *Genome Biol.* 2015; 16: 90. doi: [10.1186/s13059-015-0651-z](https://doi.org/10.1186/s13059-015-0651-z) PMID: [25943107](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25943107/)

## II. « Test de Plasticité » effectué sur mESCs et miPSCs en parallèle

### A. Différences entre mESCs et miPSCs dans le test de plasticité

De part de nombreux critères, morphologiques et fonctionnels il a été largement documenté que les miPSCs présentent un comportement similaire aux ESCs. Cependant du fait de différences en fonction de l'origine des cellules somatiques utilisées (mémoire épigénétique) qui pourraient altérer la fonction des miPSCs, nous avons souhaité déterminer le comportement de 2 clones miPSCs dans le test de plasticité réalisé sur 4 jours (comme décrit dans **Fig.27A**).

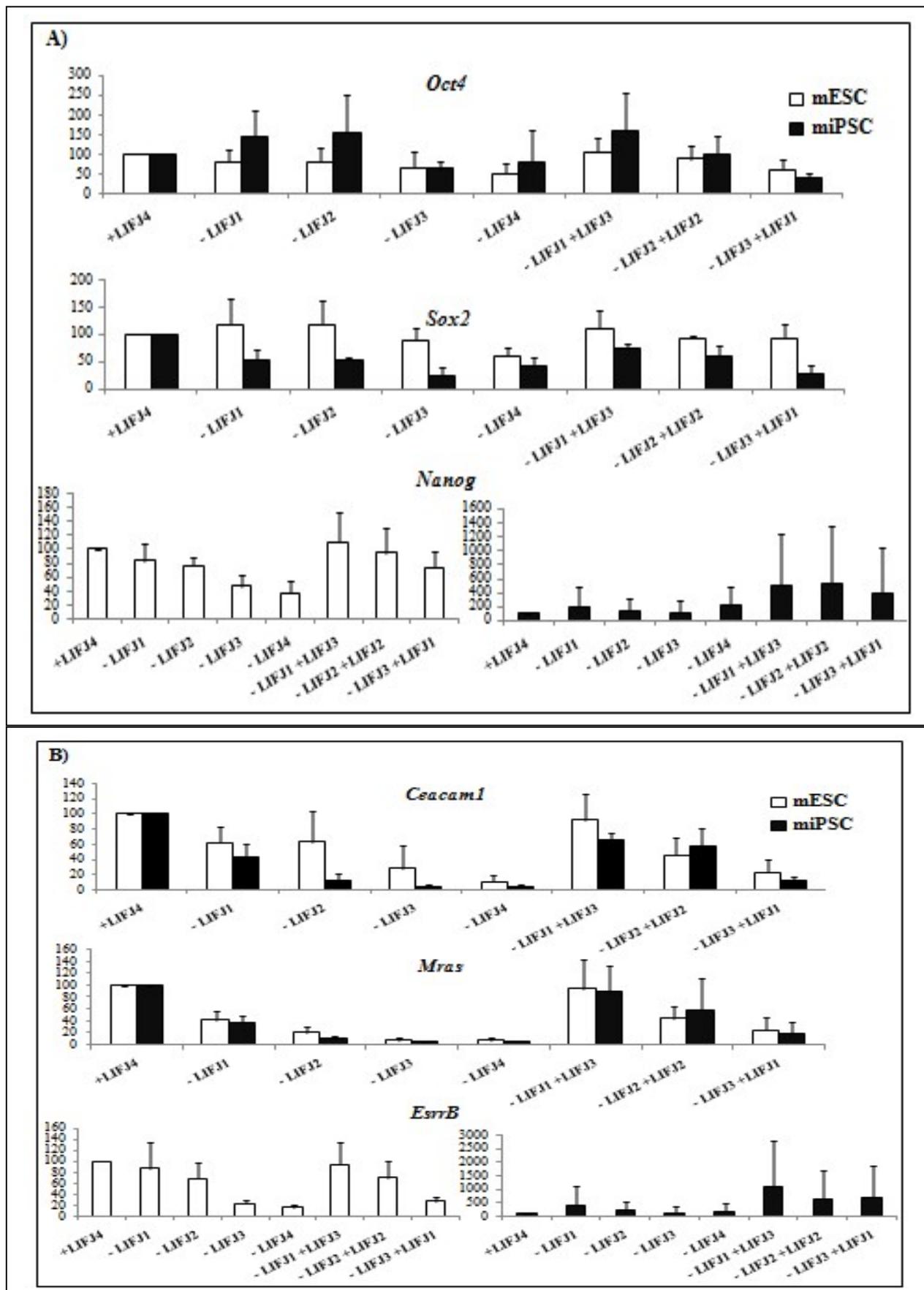
L'étude transcriptionnelle des gènes « maîtres » montre que l'expression d'*Oct4* et de *Sox2* ne varie pas au cours de la cinétique du retrait et du rajout du LIF dans les mESCs et les miPSCs mais que *Nanog* est mieux régulé dans les mESC que dans les miPSC (**Fig.28A**).

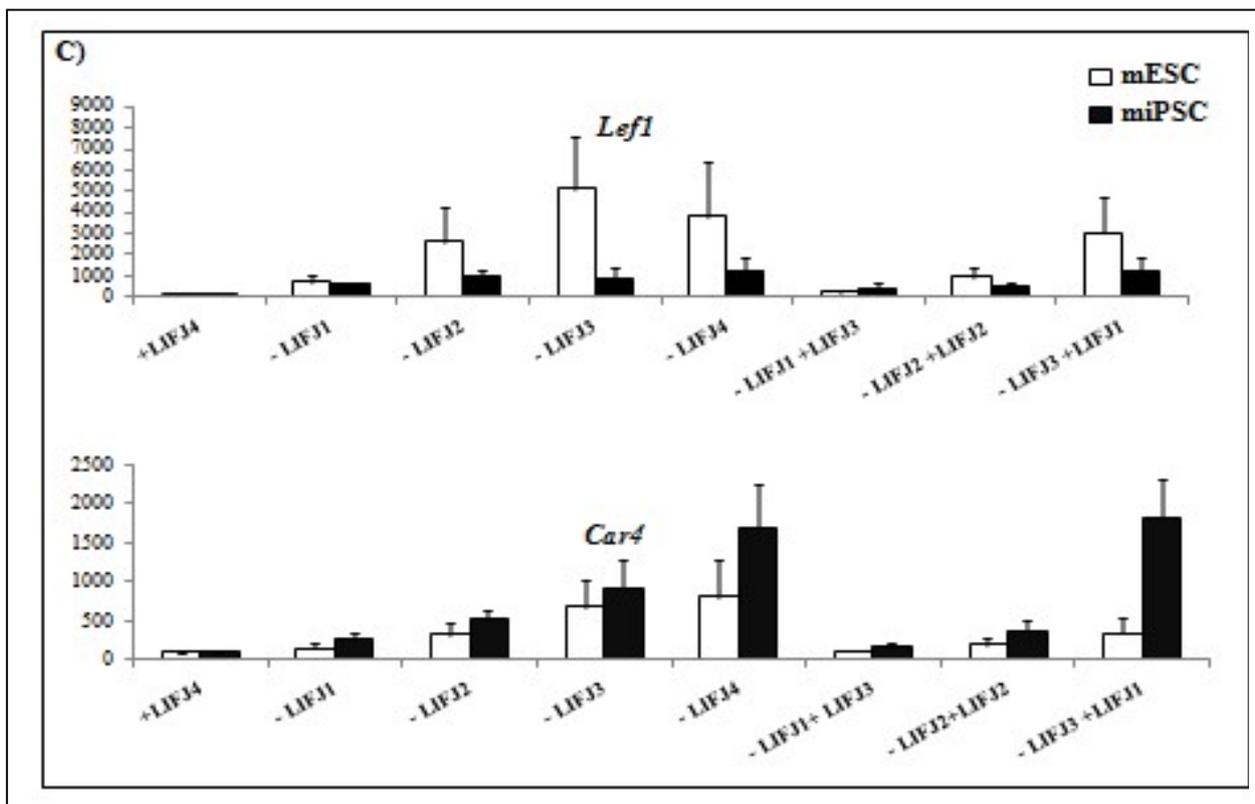
Concernant les gènes « Pluri » (**Fig.28B**), *Ceacam1* et *Mras* présentent un profil d'expression similaires dans ces 2 lignées alors que le niveau d'expression d'*Esrrβ* (régulé par le LIF dans les mESC) ne varie pas dans les miPSCs quelques que soient les conditions.

Quant aux gènes « Diff » (**Fig.28C**), *Lef1* et *Car4*, leurs expressions évoluent de manière identique en augmentant progressivement lors du retrait du LIF durant 4J et en diminuant fortement au rajout du LIF après J1 de retrait. Leur expression reste élevée au cours de la réinduction après J2 et J3 de retrait ce qui est cohérent avec l'état différencié des mESC et miPSC dans cette phase. A noter que les niveaux de base de *Lef1* et *Car4* sont similaires dans les deux lignées.

D'après ces résultats, on peut conclure que la plasticité cellulaire est conservée dans les miPSCs de manière similaire aux mESC mais qu'il y a des différences d'expression, entre autre d'*Esrrβ* et de *Nanog*, entre les mESC et les miPSCs où l'expression de ces gènes semble être indépendante du LIF.

Une analyse plus exhaustive, réalisée avec d'autres clones de miPSC, pourrait être importante pour confirmer ces différences.





**Figure 28: Similarité transcriptionnelle entre les mESCs et les miPSCs dans le test de plasticité.** Les mESC et miPSC sont cultivées en présence (+ LIF) ou absence de LIF pendant 1 à 4 jours (- LIFJ1, -LIFJ2, -LIFJ3 et -LIFJ4) et remises dans du milieu avec LIF comme indiqué. Les graphes représentent l'expression relative des gènes « *maîtres* » (A), « *Pluri* » (B) et « *Diff* » (C) mesurée par RT-qPCR avec *Hprt* comme gène de référence et le 100% fixé sur les points +LIF.

### III. Impact des facteurs de l'environnement : MMP1 et Hypoxie sur la pluripotence et la plasticité des mESCs.

#### A. MMP1

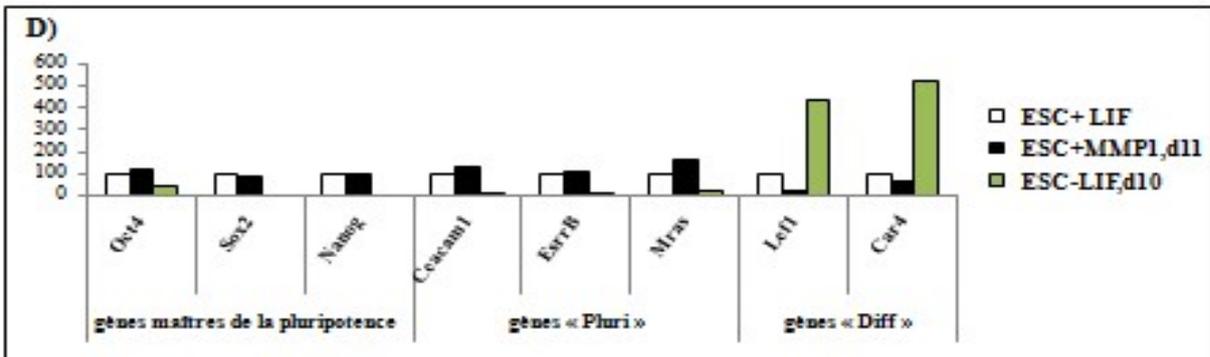
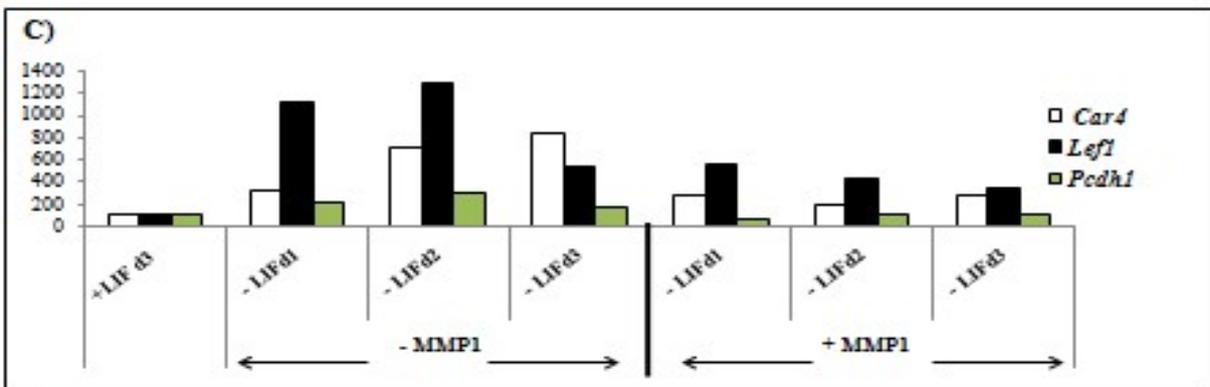
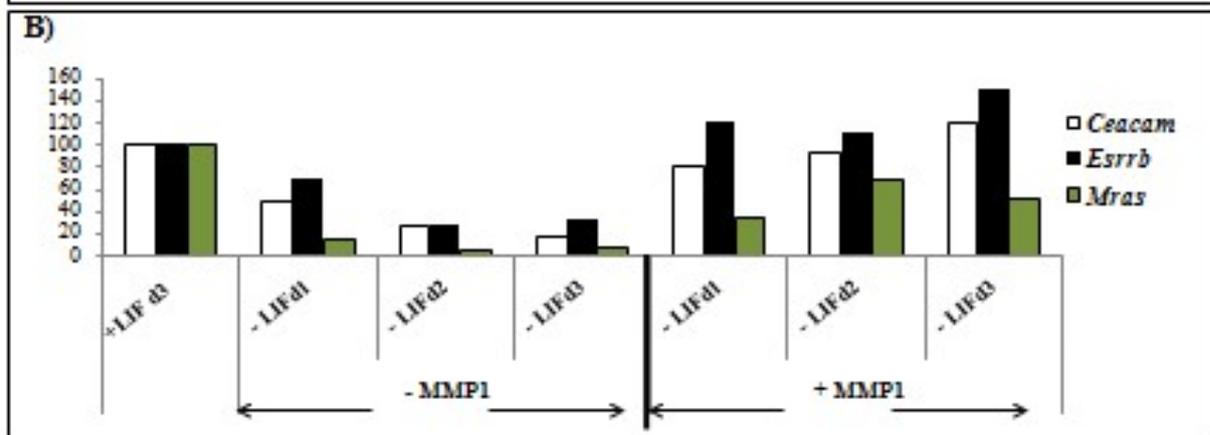
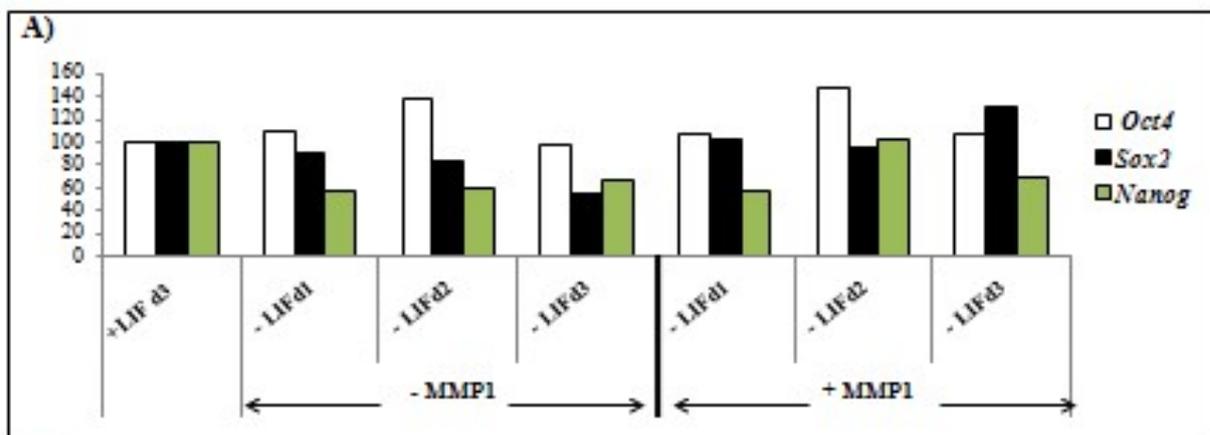
##### 1. Validation de MMP1

Au vu des nouvelles propriétés publiées de MMP1 sur le maintien en pluripotence des mESCs (Przybyla *et al.*, 2013), nous avons voulu savoir si MMP1 a des effets sur la plasticité des mESCs.

Pour valider l'effet de MMP1, les mESCs (lignées CGR8 et E14WT) ont été cultivées dans du milieu complet (+ LIF) et sans LIF pour 3 jours en absence de MMP1 (- LIFJ1, - LIFJ2, - LIFJ3)

ou en présence du MMP1 à 100 ng/mL (- LIFJ1 + MMP1, - LIFJ2 + MMP1, - LIFJ3 + MMP1). L'analyse transcriptionnelle montre que MMP1 n'a pas d'effet sur l'expression des gènes « *maîtres* » de la pluripotence (**Fig.29A**). Par contre, l'effet de MMP1 est observé par une expression plus élevée de marqueurs « *Pluri* » (**Fig.29B**) et une expression plus faible de marqueurs de différenciation précoce « *Diff* » (**Fig.29C**) en condition sans LIF et avec MMP1. Ces résultats valident que MMP1 peut mimer l'effet du LIF sur le maintien de la pluripotence des mESCs.

De plus, nous avons observé un effet à long terme sur la pluripotence de nos cellules (11 jours) et montré par l'analyse transcriptionnelle que l'expression d'*Oct4* et des marqueurs de pluripotence « *Pluri* » avec MMP1 est similaire à celle observée en présence de LIF. Aussi, l'effet de MMP1 à J11 est observé par une expression faible de marqueurs de différenciation précoce « *Diff* » surtout *Lef1* (**Fig.29D**). Le profil d'expression de différents marqueurs avec MMP1 est cohérent avec le profil observé en +LIF (gènes « *Pluri* » élevés et gènes « *Diff* » diminués) et en -LIF (gènes « *Pluri* » diminués et gènes « *Diff* » élevés) ce qui nous permet de conclure que l'effet de MMP1 sur la pluripotence est aussi conservé à long-terme.

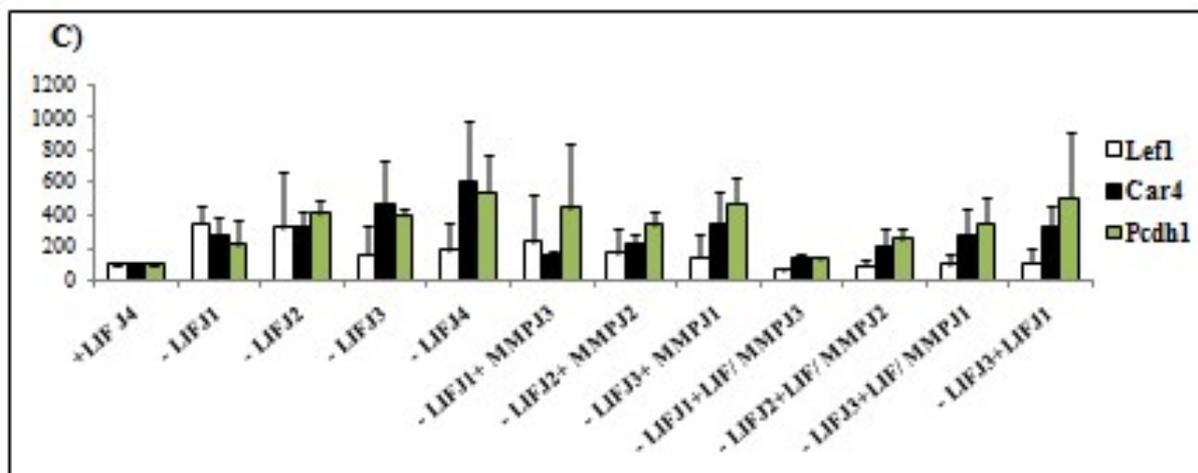
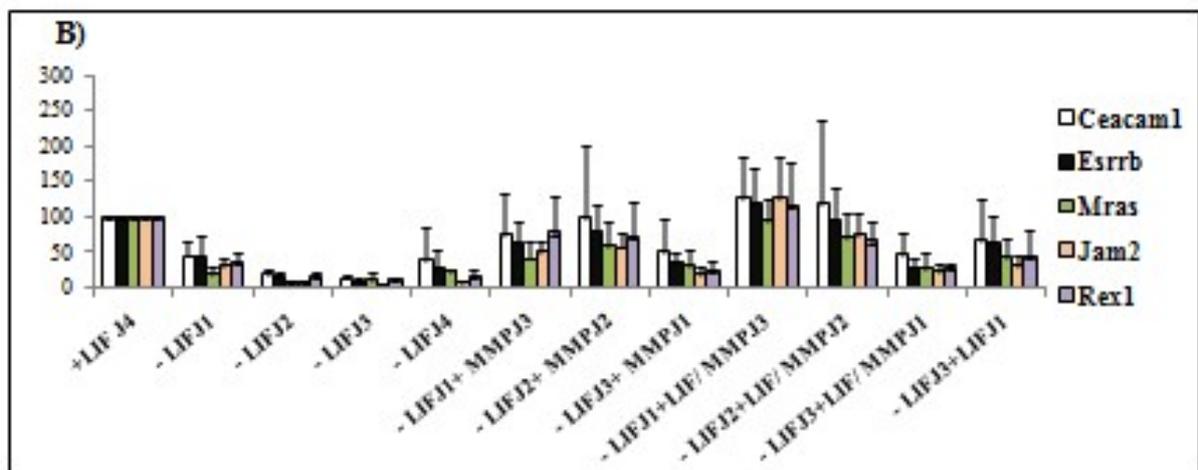
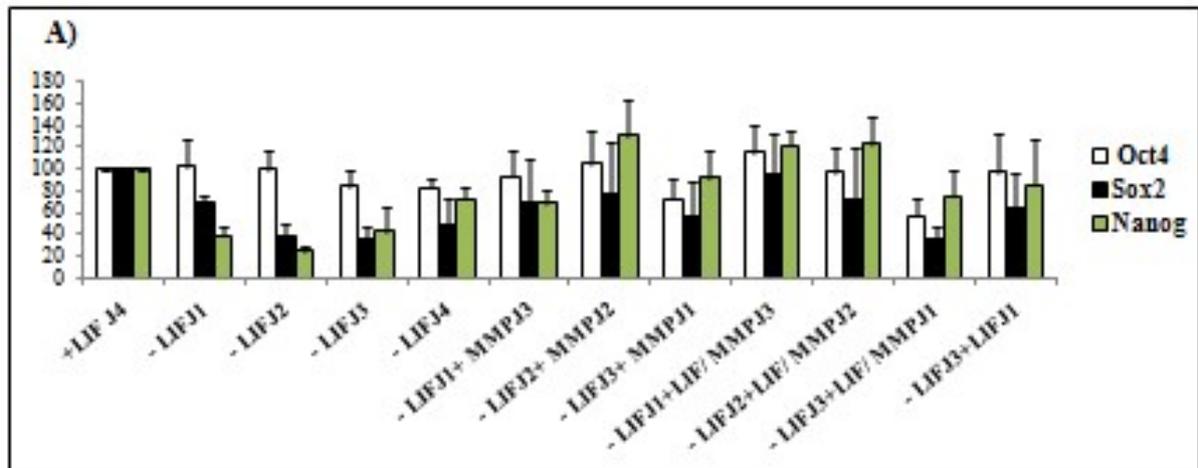


**Figure 29: MMP1 maintient la pluripotence des mESCs.** Analyse par RT-qPCR de l'expression des « gènes maîtres » de la pluripotence (A), des gènes « *Pluri* » (B) et des gènes de différenciation précoce « *Diff* » (C) après culture des mESC avec et sans LIF pendant 3 jours en absence et en présence de MMP1 comme indiqué (n=1). Les cellules mESCs sont cultivées en présence de LIF (+LIF) ou en absence de LIF pour 10 jours (-LIF, J10) et en absence de LIF et en présence de MMP1, 100 ng/mL, pour 11 jours (+MMP1, J11) (D). Les graphes représentent l'expression relative de chaque gène mesurée par RT-qPCR avec *Hprt* comme gène de référence et le 100% fixé sur les points +LIF.

## 2. Etude de l'impact de la combinaison LIF/MMP1 sur la pluripotence et plasticité des mESCs

Nous avons aussi testé l'effet combinatoire de ces deux facteurs pour déterminer s'il existe un effet additif de ces deux protéines. Pour tester l'effet combinatoire LIF/MMP1, les mESCs (CGR8) sont cultivées avec (+ LIF) et sans LIF (- LIFJ1, - LIFJ2, - LIFJ3, - LIFJ4) et en réinduction avec LIF/MMP1 après retrait du LIF (- LIFJ1 + LIF/MMP1 J3, - LIFJ2 + LIF/MMP1 J2, - LIFJ3 + LIF/MMP1 J1) sur une cinétique de 4 jours.

L'analyse transcriptionnelle montre un effet similaire de LIF/MMP1 semblable à celui observé en MMP1 seule pour les gènes « *maîtres* » de la pluripotence (Fig.30A) et les gènes « *Pluri* » (Fig.30B) à J1 et J2 de réinduction mais un effet faible à J3 de réinduction en comparaison avec LIF seul (article) ou MMP1 seule. Ceci montre qu'il y a un effet combinatoire du LIF/MMP1 sur la plasticité des mESC à J1 et J2 et qu'à J3 les cellules semblent sécréter une protéine induite par MMP1 qui s'oppose à l'effet du LIF. De plus, on a observé un effet important du LIF/MMP1 sur le blocage d'expression des gènes « *Diff* » (Fig.30C) à J1, J2 et J3 de réinduction en comparaison avec LIF seul (article) et MMP1 seule.

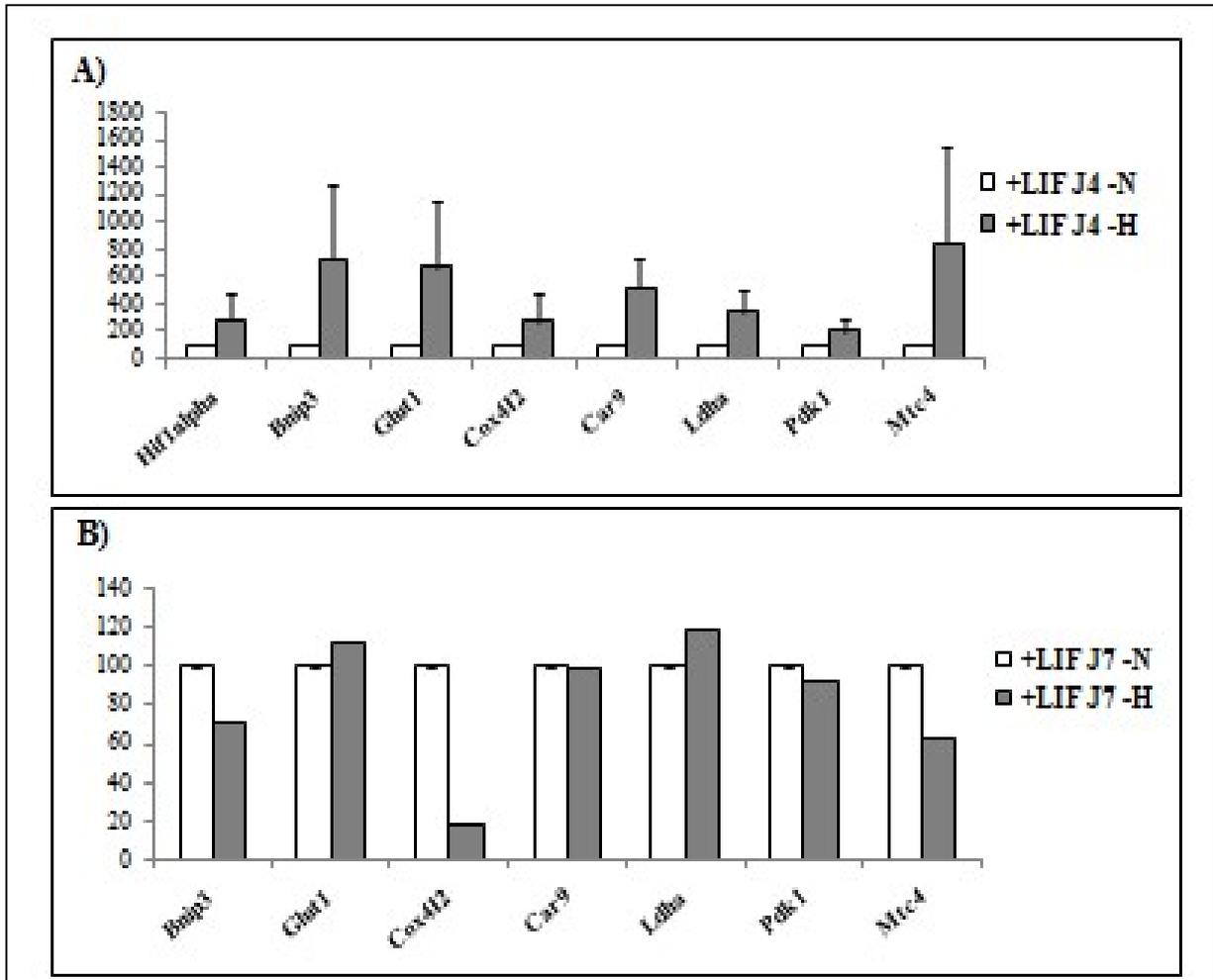


**Figure 30: Effets combinés du LIF et de MMP1 sur la plasticité des mESCs.** Les cellules mESCs sont cultivées avec (+ LIF) ou sans LIF (-LIF) pendant 1 à 4 jours (J1 à J4) et sont remise dans un milieu avec LIF ou MMP1 ou LIF+MMP1 comme indiqué. Les graphes représentent l'expression relative de chaque gène mesurée par RT-qPCR avec *Hprt* comme gène de référence et le 100% fixé sur les points +LIF. « gènes maîtres » (A), gènes « Pluri » (B) et gènes de différenciation précoce « Diff » (C) (n=3).

## B. Hypoxie

### 1. Analyse de l'expression de *Hif1 $\alpha$* et de ses gènes cibles dans nos expériences à [3% O<sub>2</sub>]

Dans le but de vérifier nos conditions de culture à [3% O<sub>2</sub>], nous avons analysé l'expression de différents gènes cibles de HIF1 $\alpha$ . La protéine HIF1 $\alpha$  permet l'activation directe d'un grand nombre de gènes par l'intermédiaire des séquences promotrices HRE, et notamment de gènes impliqués dans le métabolisme pour maintenir l'énergie, le PH et l'homéostasie rédox comme il a été montré dans les cellules de la moelle osseuse (Rey *et al.*, 2011). En raison de la difficulté de la détection de la protéine HIF1 $\alpha$  par Western Blot pour des raisons techniques inconnues, nous avons validé les conditions hypoxiques de nos expériences par la détection de l'expression du gène *Hif1 $\alpha$*  et de ses cibles directes par RT-qPCR. Nous avons montré qu'après 4 jours de culture à [3% O<sub>2</sub>] l'expression de *Hif1 $\alpha$*  est induite de 3 à 5 fois plus par rapport à [20% O<sub>2</sub>] et s'accompagne par une augmentation de l'expression de ses cibles directes : *Bnip3*, *Glut1*, *Cox4I2*, *Car9*, *Ldha*, *Pdk1* et *Mtc4* ce qui confirme qu'à cette concentration d'oxygène la protéine HIF1 $\alpha$  est stabilisée, active et se lie aux promoteurs de ces différents gènes (Rey *et al.*, 2011) (**Fig.31A**). En revanche, après 7 jours de culture en hypoxie, même si ces résultats ne proviennent que d'une seule expérience et sont donc à prendre avec précaution, les gènes cibles de HIF1 $\alpha$  ne sont plus induits (**Fig.31B**). Ces résultats, s'ils sont reproductibles, pourraient permettre de conclure que la protéine HIF1 $\alpha$  serait effectrice de l'hypoxie seulement dans les premiers jours de l'exposition à [3% O<sub>2</sub>] et que lors de périodes plus prolongées, d'autres HIFs comme HIF2 $\alpha$  pourraient entrer en jeu.



**Figure 31: Validation des conditions de faible concentration d'oxygène à [3% O<sub>2</sub>] par RT-qPCR.** L'expression de HIF1 $\alpha$  et de ses cibles est analysée après 4 jours (n=4) (A) ou après 7 jours de culture (n=1) (B) en présence de LIF en Normoxie (N pour 20% O<sub>2</sub>) et en Hypoxie (H pour 3% O<sub>2</sub>). Les graphes représentent l'expression relative de chaque gène mesurée par RT-qPCR avec *Hprt* comme gène de référence et le 100% fixé sur les points +LIF en normoxie.

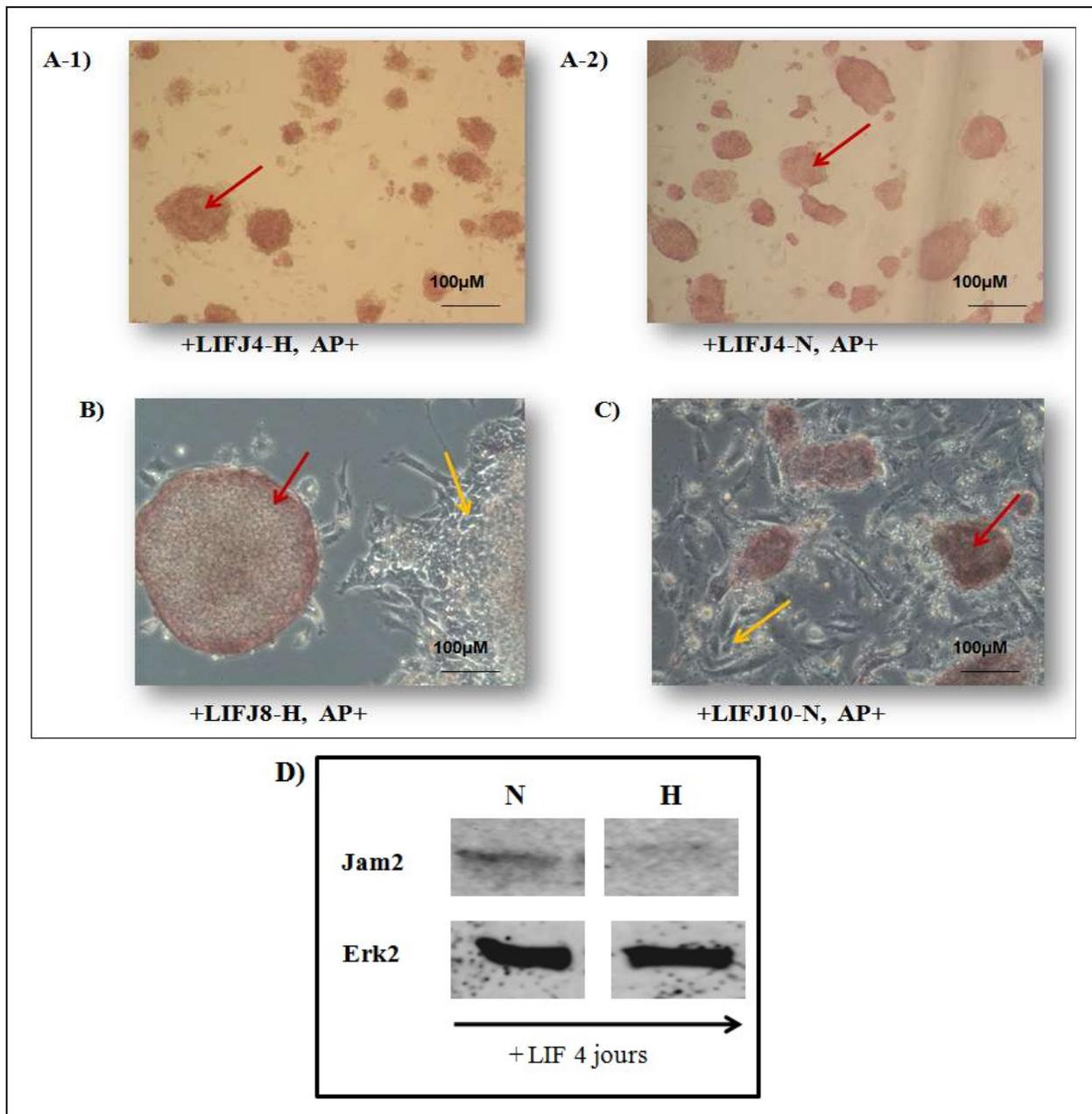
Suite aux résultats publiés dans l'article, nous avons continué le travail sur l'étude comparatif de l'état cellulaire des mESC (CGR8) cultivées à [3% O<sub>2</sub>] et [20% O<sub>2</sub>].

## 2. Analyse morphologique des cellules cultivées à [3% O<sub>2</sub>] et [20% O<sub>2</sub>] pendant des périodes différentes

Les cellules (CGR8) sont cultivées en [3% O<sub>2</sub>] et en [20% O<sub>2</sub>] pendant 4 jours puis les cellules sont colorées pour révéler la phosphatase alcaline (AP). Si dans les deux conditions on

observe des cellules à activité AP forte (cellules rouges), on observe aussi une différence morphologique des mESCs en fonction de la concentration d'oxygène. Les cellules cultivées à [3% O<sub>2</sub>] présentent des clusters cellulaires moins compacts par rapport à ceux observés à [20% O<sub>2</sub>] (**Fig.32A-1 et A-2**). Ceci indique que bien que restant apparemment indifférenciées (sur le critère AP) les cellules en hypoxie ont moins de contacts inter-cellulaires qu'en normoxie. Nous avons alors montré, par Western Blot, que l'expression du marqueur d'adhésion Jam2 est diminuée en hypoxie (**Fig.32D**). Nous avons voulu voir si cette différence morphologique persistait après des temps de culture plus longs. Nous avons donc cultivé les cellules à [3% O<sub>2</sub>] pendant 8 jours (en ensemençant 2 fois plus de cellules) et pendant 10 jours à [20% O<sub>2</sub>], sans les diluer (**Fig.32B et C**). Bien qu'à [20% O<sub>2</sub>] la coloration AP persiste, on observe un peu de différenciation spontanée. En revanche à [3% O<sub>2</sub>], deux populations distinctes de cellules apparaissent: des cellules différenciées non colorées (AP-, flèches Jaunes), et des cellules indifférenciées, rose foncé (AP+, flèches rouges) qui correspondent à des colonies cellulaires pluripotentes.

En conclusion, l'hypoxie à court terme semble maintenir la pluripotence des mESCs avec une morphologie moins compacte. Alors qu'à long terme la culture en hypoxie semble permettre à la fois le maintien de la pluripotence d'une large partie de cellules et la différenciation d'une sous-population largement réprimée par la voie LIF en normoxie (**article**).



**Figure 32: Différence morphologique des mESCs entre [3% O<sub>2</sub>] et [20% O<sub>2</sub>] pendant les temps indiqués par le test de la Phosphatase Alcaline (AP).** Les cellules sont cultivées à [3% O<sub>2</sub>] (+LIFJ4-H) (A-1) ou à [20% O<sub>2</sub>] (+LIFJ4-N) (A-2) pendant 4 jours en présence de LIF. Cellules cultivées à [3% O<sub>2</sub>] pendant 8 jours (+LIFJ8-H) (B) ou à [20% O<sub>2</sub>] pendant 10 jours (+LIFJ10-N) (C) en présence du LIF. Analyse par Western Blot de l'expression de la protéine Jam2 (33 kDa) à [3% O<sub>2</sub>] (H) et [20% O<sub>2</sub>] (N) après 4 jours de culture (D). ERK2, protéine dont le taux d'expression ne varie pas dans ces conditions est utilisée ici comme contrôle de charge. **Flèches rouges** : cellules indifférenciées (AP+); **Flèches jaunes** : cellules différenciées (AP-).

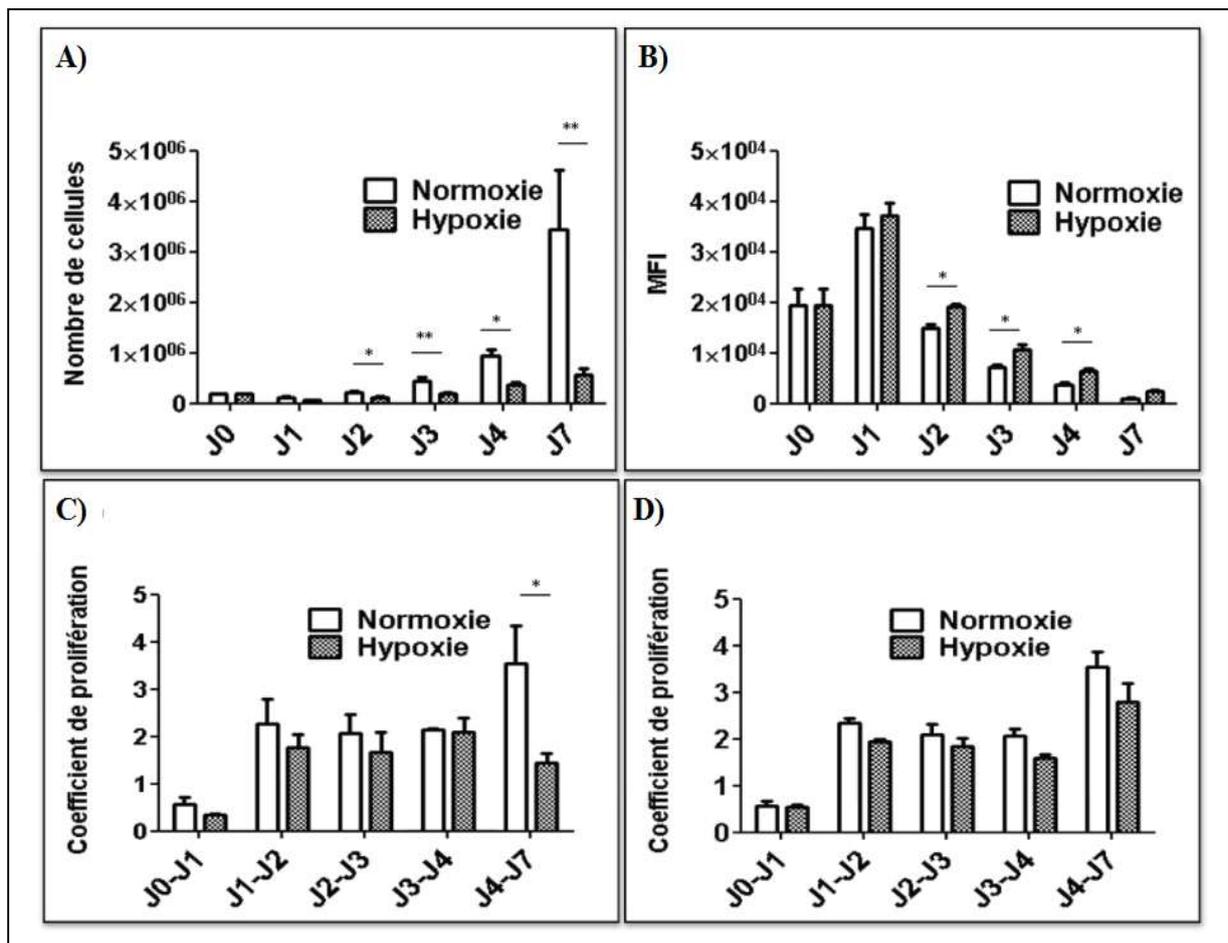
### 3. Ralentissement de la prolifération des mESCs cultivées à [3% O<sub>2</sub>]

Dans le but de caractériser la prolifération cellulaire, nous avons utilisé, en parallèle, une technique de comptage cellulaire et une technique de cytométrie en flux, reposant sur l'introduction d'un intercalant lipophile membranaire fluorescent, le DiD.

A J0, 200 000 cellules sont ensemencées et mises en [3% O<sub>2</sub>] et [20% O<sub>2</sub>] (**Fig.33A**). A J1, lors du comptage on observe une diminution du nombre de cellules qui semble être plus important à [3% O<sub>2</sub>] et qui peut être dû à un problème d'adhésion des cellules ou à un choc d'oxygénation lors de la mise en culture sous cette faible concentration. Suite à une expérience pour exclure l'une ou l'autre des hypothèses (données non montrées), nous avons observé que cette diminution du nombre de cellules après 1 jour, provenait certainement d'un stress dû à un choc d'oxygénation lors du passage des cellules de 20% à 3% d'O<sub>2</sub>.

Entre 2 à 4 jours de culture (J2-J4), la différence de prolifération entre [3% O<sub>2</sub>] et [20% O<sub>2</sub>] se stabilise (**Fig.33A**). Le nombre de cellules reste 2 fois plus important à [20% O<sub>2</sub>]. En revanche après 7 jours de prolifération, l'écart se creuse, il y a en moyenne 6 fois plus de cellules à [20% O<sub>2</sub>]. Lorsque l'on compare les résultats du comptage cellulaire aux résultats de l'intensité moyenne de fluorescence (MFI) de ces mêmes cellules, mesurées par cytométrie en flux, on observe une augmentation de la fluorescence à 1 jour qui peut correspondre aux cellules qui continuent à incorporer le DiD pendant 24 heures (**Fig.33B**). Les MFI des cellules à [3% O<sub>2</sub>] sont supérieures à celles des cellules à [20% O<sub>2</sub>].

Cependant, lorsque l'on compare les coefficients de prolifération calculés par rapport aux comptages des cellules (**Fig.33C**) ou par rapport aux MFI (**Fig.33D**), on obtient 2 résultats différents après 4 jours de culture. Alors que le comptage indique que les cellules à [20% O<sub>2</sub>] prolifèrent 2,5 fois plus que les cellules à [3% O<sub>2</sub>], les résultats de la cytométrie indiquent que la différence de prolifération n'est pas significative. On peut donc supposer que le produit DiD continue d'être incorporé par les cellules lorsque certaines cellules meurent ou se divisent en relâchant des molécules. Si tel est le cas, alors la MFI ne reflète pas complètement la prolifération de manière fidèle et cette méthode n'est pas adéquate pour les cellules ES murines.

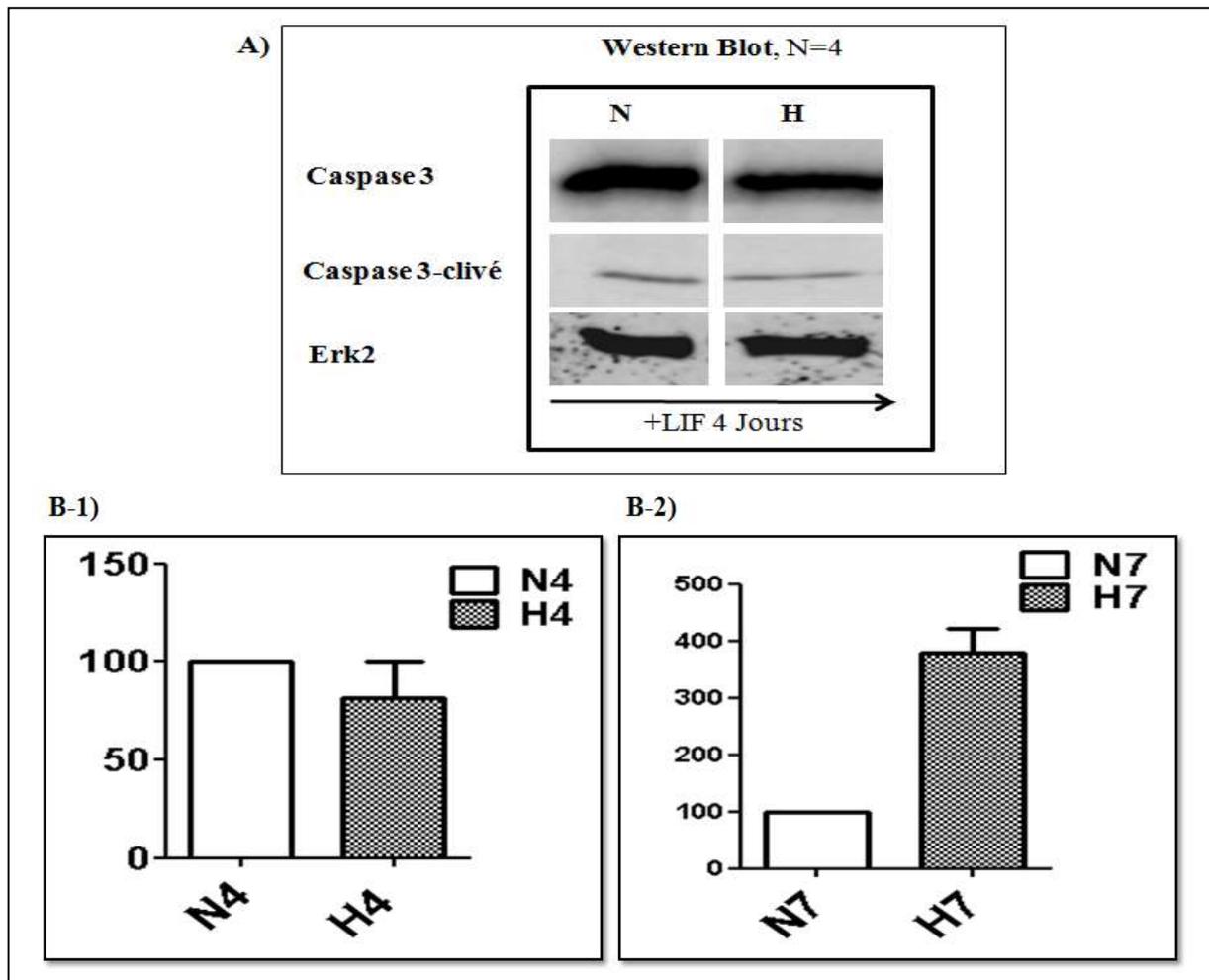


**Figure 33: Les cellules à [3% O<sub>2</sub>] prolifèrent moins vite que les cellules cultivées à [20% O<sub>2</sub>].** La prolifération est déterminée par comptage cellulaire (A) ou par cytométrie en flux (B). Le coefficient de prolifération est établi suite au comptage des cellules (C) ou par mesure de la MFI (Mean of Fluorescence Intensity) (D), (n=3). J0 – J7 : Nombre de jours de culture. \* : p-value < 0.05, \*\* : p-value < 0.001. t-test réalisé après normalisations par rapport à J0 (Expériences réalisées avec Marine Labat, stagiaire Master 2 Recherche, 2015).

En se basant sur le comptage cellulaire, nous pouvons conclure que les cellules prolifèrent d'une manière plus lente à [3% O<sub>2</sub>]. Ce faible taux de prolifération en faible concentration d'O<sub>2</sub> peut être dû soit à une augmentation de l'apoptose, soit à un ralentissement du cycle cellulaire. De manière à déterminer si l'hypoxie induit l'apoptose, nous avons analysé l'expression de la forme clivée de la protéine pro-apoptotique Caspase-3 par Western blot (Fig.34A) et l'expression du gène anti-apoptotique *Bcl-2* par RT-qPCR (Fig.34B) entre [3% O<sub>2</sub>] et [20% O<sub>2</sub>]. Après 4 jours de culture, le taux d'expression de la Caspase-3 diminue à [3% O<sub>2</sub>] alors que la quantité de forme clivée ne varie pas, suggérant qu'il y a un peu plus d'apoptose en hypoxie (non détectée en microscopie) (Fig.34A). De plus, *Bcl2* a une expression similaire quelque soit la concentration

d'oxygène pendant 4 jours (**Fig.34B-1**). En revanche pour des temps de cultures supérieures, on observe une augmentation de l'expression de *Bcl2*, qui est connue pour augmenter dans les cellules différenciées (Trouillas *et al.*, 2008), (**Fig.34B-2**). L'augmentation de l'expression de *Bcl2* à des temps longs, indique qu'une partie des cellules se différencient, concordant avec ce que l'on observe en culture, au microscope (**Fig.32B**).

En conclusion, l'analyse de l'expression de *Bcl2* et de la Caspase 3 ont permis de déterminer que la diminution du nombre de cellules à [3% O<sub>2</sub>] n'est pas due à une apoptose accrue mais plutôt à un ralentissement de prolifération. De plus, une augmentation de *Bcl2* après 7 jours de culture à [3% O<sub>2</sub>] peut indiquer la présence de plusieurs populations cellulaires: une population cellulaire différenciée qui exprime *Bcl2* et identifiable morphologiquement, et une population cellulaire qui prolifère et qui n'exprime pas *Bcl2*, avec une morphologie de type pluripotente.

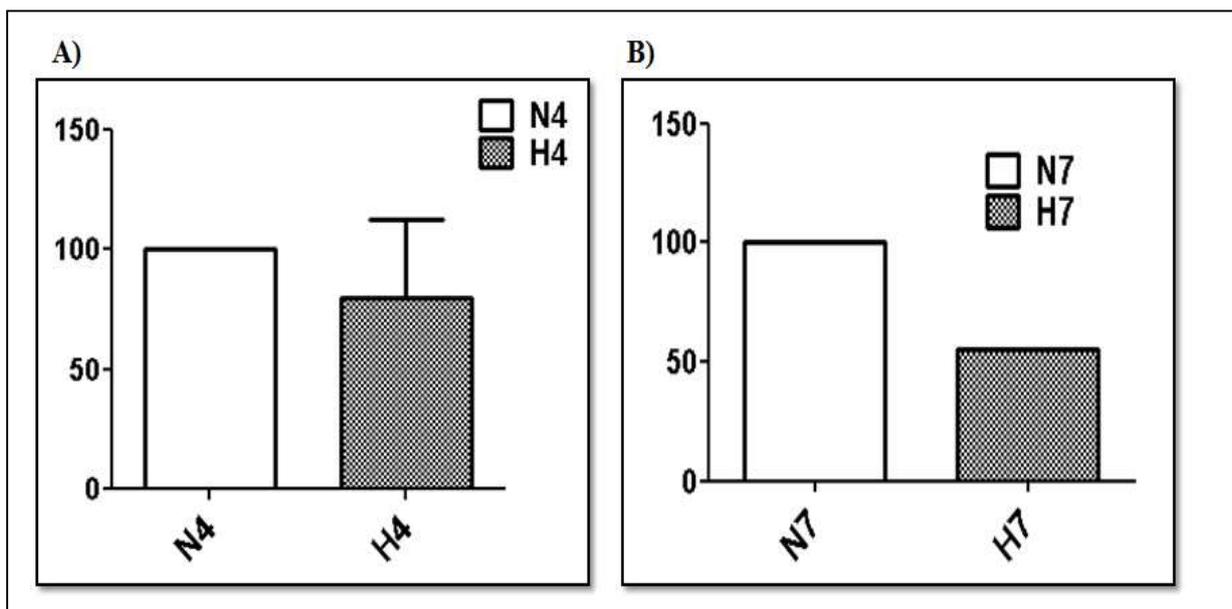


**Figure 34: Ralentissement de prolifération et présence de plusieurs populations cellulaires à [3% O<sub>2</sub>].** Analyse par western Blot de la Caspase 3 sous forme pro-caspase 3 non active (34kDa) et sous forme clivée active (17kDa), sur des cellules cultivées pendant 4 ou 7 jours en normoxie (N) ou hypoxie (H) (A). Expression mesurée par RT-qPCR du gène *Bcl2* après 4 jours (B-1) ou 7 jours de culture (B-2) (n=2). N4/H4 : 4 jours de culture à [3% O<sub>2</sub>] (H) ou à [20% O<sub>2</sub>] (N). N7/H7 : 7 jours de culture à [3% O<sub>2</sub>] (H) ou à [20% O<sub>2</sub>] (N).

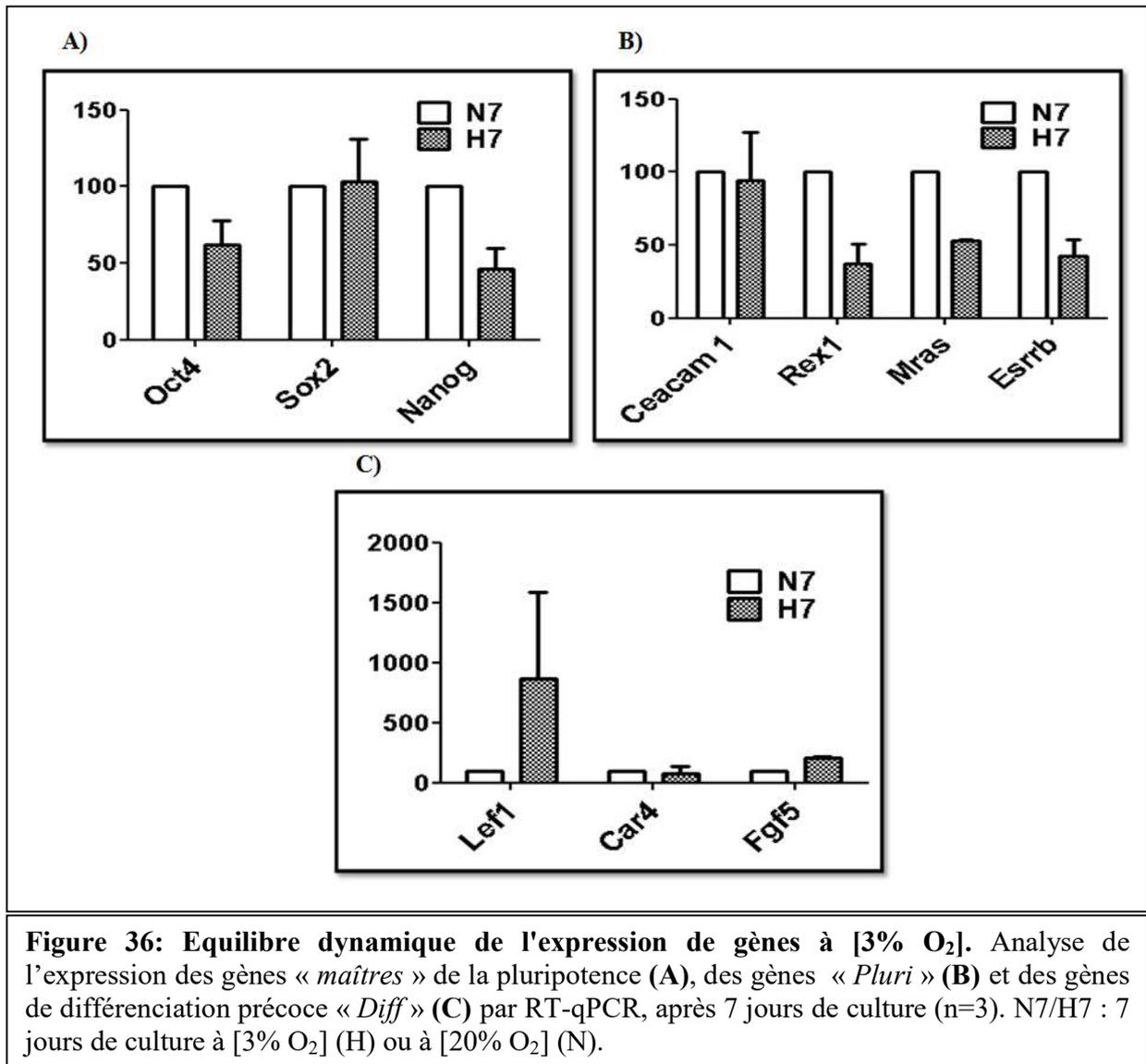
#### 4. Atténuation de la voie de signalisation LIF ?

Nous avons montré qu'à [3% O<sub>2</sub>] pendant 4 jours, il y a une atténuation de la voie de signalisation LIF (diminution de la phosphorylation de STAT3 sur Tyr705 et faible expression des gènes « *Pluri* » (voir **résultats article**, Jeong *et al.*, 2007). Pour expliquer cette atténuation, nous avons analysé l'expression du gène codant pour la protéine SOCS3, qui est activée par la voie LIF et qui agit comme un inhibiteur. Nous souhaitons déterminer si cette voie de rétrocontrôle ne serait pas induite directement par l'hypoxie ce qui expliquerait l'atténuation de la

voie LIF à [3% O<sub>2</sub>]. Après 4 jours à [3% O<sub>2</sub>], l'expression de *Socs3* ne varie pas (**Fig.35A**) tandis que son expression chute de moitié après 7 jours de culture (**Fig.35B**) ce qui exclue l'hypothèse que la répression de la voie LIF est due à une augmentation de la transcription du gène *Socs3*. De plus, pour confirmer que l'atténuation de la voie LIF s'étend jusqu'à 7 jours de la culture des mESCs à [3% O<sub>2</sub>], on a analysé l'expression des gènes « *maîtres* », des gènes « *Pluri* » et des gènes « *Diff* » et on a observé une diminution, quasiment de moitié d'*Oct4* et *Nanog* alors que *Sox2* augmente (**Fig.36A**). Excepté *Ceacam1* dont l'expression ne varie plus, les gènes *Rex1*, *Mras* et *Esrrb* semblent encore plus réprimés après 7 jours de culture (**Fig.36B**). Quand aux gènes de différenciation précoce, leur expression semble similaire après 4 ou 7 jours (**Fig.36C**). On peut supposer que si de nouvelles voies entrent en jeu, pour permettre aux cellules de s'adapter après une exposition à long terme sous faibles concentrations d'O<sub>2</sub>, l'expression du gène *Socs3* est alors réprimée pour éventuellement ne plus diminuer la voie LIF.

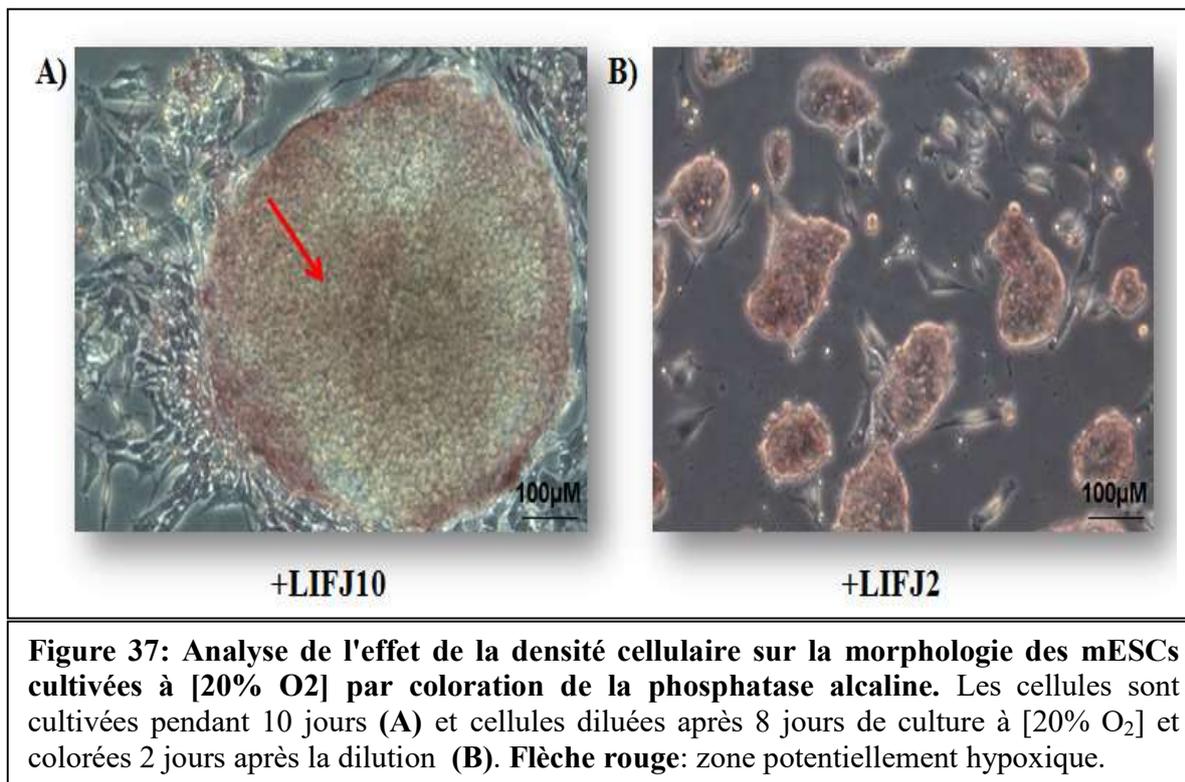


**Figure 35: Stabilité de l'expression du gène répresseur de la voie LIF, *Socs3* avec une chute de son expression de moitié après 7 jours de culture.** Analyse de l'expression de *Socs3* (n=3) par RT-qPCR en N4/H4 : 4 jours de culture à [3% O<sub>2</sub>] (H-hypoxie) ou à [20% O<sub>2</sub>] (N-normoxie) (A). Expression de *Socs3* (n=1). N7/H7 : 7 jours de culture à [3%O<sub>2</sub>] (H-hypoxie) ou à [20% O<sub>2</sub>] (N-normoxie) (B).



## 5. Mise en évidence d'un mécanisme à l'origine de l'Hétérogénéité des mESCs ?

Au cours de nos expériences, nous avons observé que la dilution des cellules avait un fort impact sur la morphologie et sur l'expression des gènes. Morphologiquement, les cellules à confluence sont beaucoup plus hétérogènes que cellesensemencées fraîchement, qui forment des colonies cellulaires beaucoup plus petites et plus homogènes (Fig.37). De plus, nous avons montré que les cellules non diluées pendant 4 joursensemencées à forte confluence expriment de manière importante les gènes cibles de HIF1 $\alpha$  par rapport aux cellules diluées fraîchement. Nous avons aussi observé une augmentation d'expression de *Lef1* (comme montré en hypoxie, voir nos résultats et Mazumdar *et al.*, 2010).



**Figure 37: Analyse de l'effet de la densité cellulaire sur la morphologie des mESCs cultivées à [20% O<sub>2</sub>] par coloration de la phosphatase alcaline.** Les cellules sont cultivées pendant 10 jours (A) et cellules diluées après 8 jours de culture à [20% O<sub>2</sub>] et colorées 2 jours après la dilution (B). **Flèche rouge:** zone potentiellement hypoxique.

Ces résultats nous mettent sur la piste de l'hypothèse suivante : est ce que l'hétérogénéité des cellules ES ne serait pas due à la présence de zones hypoxiques qui seraient alors éliminées à chaque dilution des cellules (résultats confidentiels, non encore publiés).

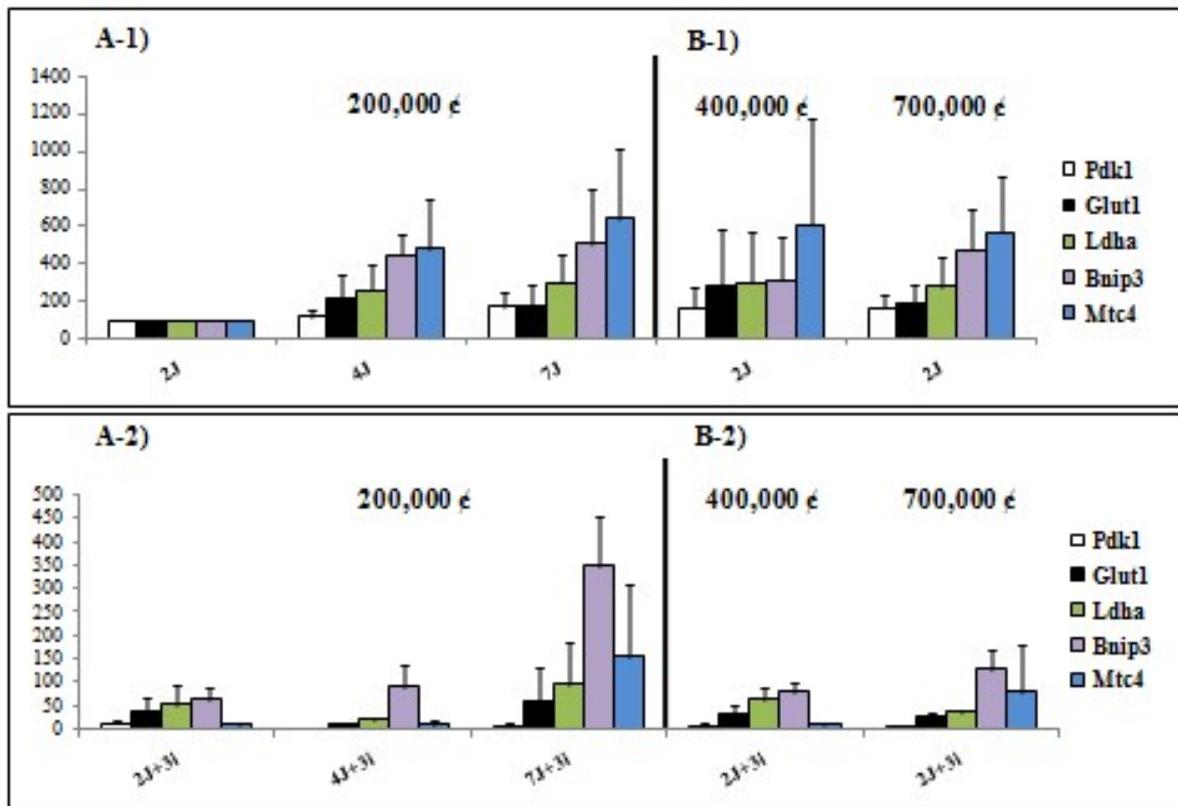
Le paragraphe expérimental qui suit détaille les nouvelles expériences que nous avons menées pour étayer cette hypothèse.

Les cellules ont été cultivées à [20% O<sub>2</sub>] pendant 2 jours, 4 jours et 7 jours à différentes concentrations cellulaires (J2, J4 et J7). Nous avons observé que l'expression des gènes cibles de HIF1 $\alpha$  est beaucoup plus élevée dans les cellules à J4 et J7 que dans les cellules à J2 (**Fig.38i A-1, B-1**). Nous n'avons pas observé de variation de l'expression transcriptionnelle des gènes « *maîtres* » de la pluripotence quelque soit la condition (**Fig.38ii A-1, B-1**), comme attendu, alors que l'expression des gènes « *Pluri* » augmentent légèrement en contradiction avec les profils d'expression observés en hypoxie (**Fig.38iii A-1, B-1**). Bien que l'expression des gènes « *Pluri* » ne soit pas similaire à celle observée à [3% O<sub>2</sub>] ceci n'exclut pas la présence des zones hypoxiques. En effet à [20% O<sub>2</sub>] la voie LIF est toujours active quelque soit la confluence cellulaire. On peut expliquer ce profil par le concept de « réponse d'adaptation » de ces cellules

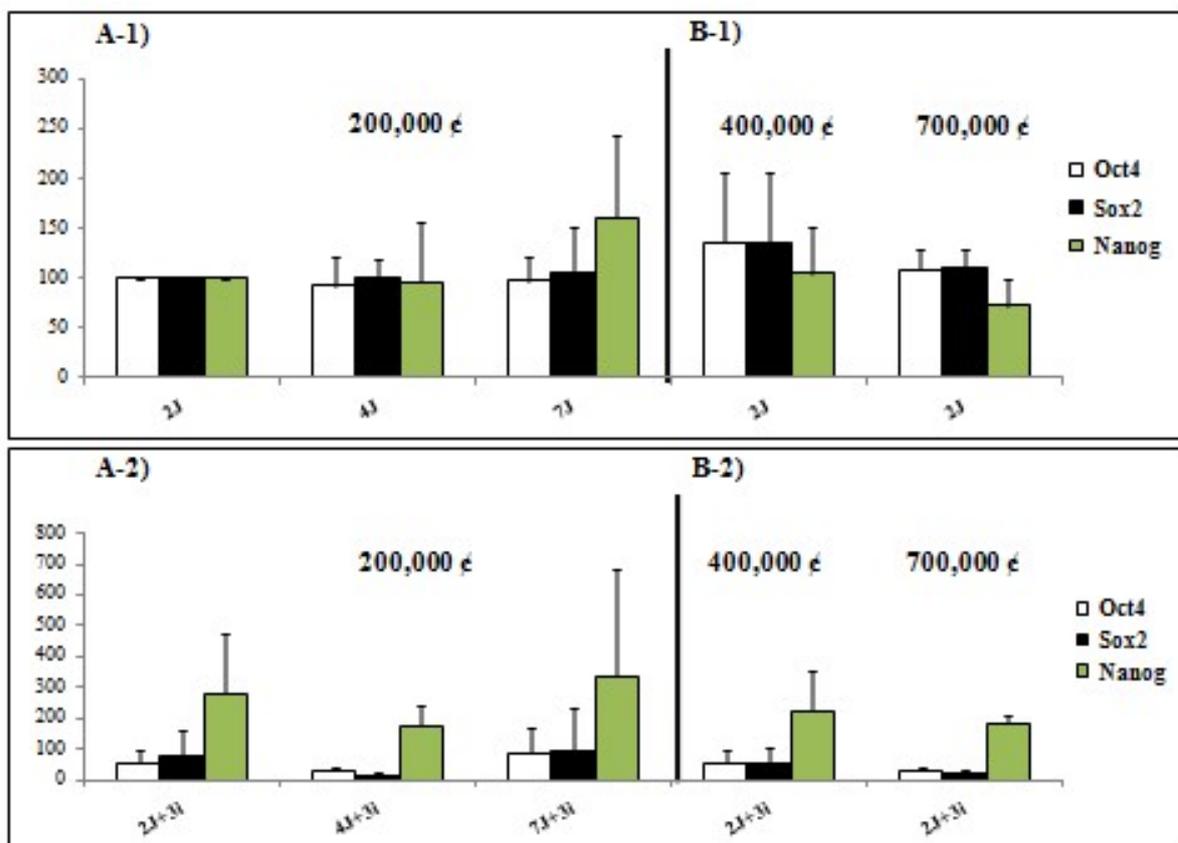
qui exigent des niveaux élevés de gènes « *Pluri* » pour qu'elles restent pluripotentes. Quant aux gènes « *Diff* », leur expression est plus forte en fonction de la densité cellulaire et plus particulièrement, *Lefl* qui présente le même profil que celui observé à [3% O<sub>2</sub>] (**Fig.38iv A-1, B-1**).

D'après ces résultats, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'au fur et à mesure de la croissance des cellules qui poussent en amas de plus en plus compacts, des zones hypoxiques apparaissent créant donc une hétérogénéité dès 4 jours de culture. En se référant aux études qui montrent que l'hétérogénéité cellulaire est supprimée lorsqu'on cultive les mESCs en milieu 3i [inhibiteurs de la voie MAPK (Mitogen-activated protein Kinase), inhibiteurs de GSK3 $\beta$  (Glycogen Synthase Kinase 3  $\beta$ ) et inhibiteurs de la voie FGF (Fibroblast Growth Factor)] en présence de LIF (Ying et al, 2008; Nichols *et al.*,2009; Niwa *et al.*,2015), nous avons testé notre hypothèse en effectuant le même protocole que précédemment avec et sans 3i à J2, J4 et J7. Si la présence des zones à faibles concentrations d'O<sub>2</sub> est l'une des causes de l'hétérogénéité des cellules mESCs, on devrait avoir une chute d'expression des cibles de HIF1 $\alpha$  en présence des 3 inhibiteurs. C'est ce que nous avons observé : l'expression des cibles de HIF1 $\alpha$  comme *Pdk1*, *Glut1*, *Ldha*, *Bnip3* et *Mtc4* chute quelque soit la condition liée à la densité cellulaire ou au temps de culture (J2+3i, J4+3i, J7+3i) (**Fig.38i A-2, B-2**). Concernant les gènes « *maîtres* » comme *Oct4* et *Sox2* (**Fig.38ii A-2, B-2**), les gènes « *Pluri* » comme *Ceacam1*, *Esrr $\beta$*  et *Rex1* (**Fig.38iii A-2, B-2**) et les gènes « *Diff* » comme *Lefl* et *Car4* (**Fig.38iv A-2, B-2**), leur expression ne varie pas en comparant les points J2, J4 et J7 avec et sans 3i. Par contre, *Nanog* et *Jam2* présentent le même profil d'expression avec augmentation plus importante de l'expression de *Jam2* en présence de 3i surtout à J4 et J7. Ce résultat avec *Jam2* nous permet de l'ajouter aux groupes des marqueurs dans les mESCs possédant une expression hétérogène mais ceci serait à confirmer par des études plus précises par hybridation *in situ* et par une analyse quantitative par single-cell. L'expression de *Pcdh1* augmente juste aux points J2+3i et J2+3i avec 7x10<sup>5</sup>cellules, et ne varie pas au niveau des autres points. Les données obtenues avec et sans inhibiteurs peuvent être considérées comme une base importante pour continuer l'étude de la vérification du lien entre la présence des zones à faible concentration d'O<sub>2</sub> et l'hétérogénéité des mESC. Il serait par exemple très intéressant d'analyser le niveau d'expression protéique de NANOG par immunomarquage à J2, J4 et J7 en présence et absence de 3i pour déterminer si les zones hypoxiques corrént avec une faible expression de *Nanog* (comme montré en hypoxie, voir **article en révision**).

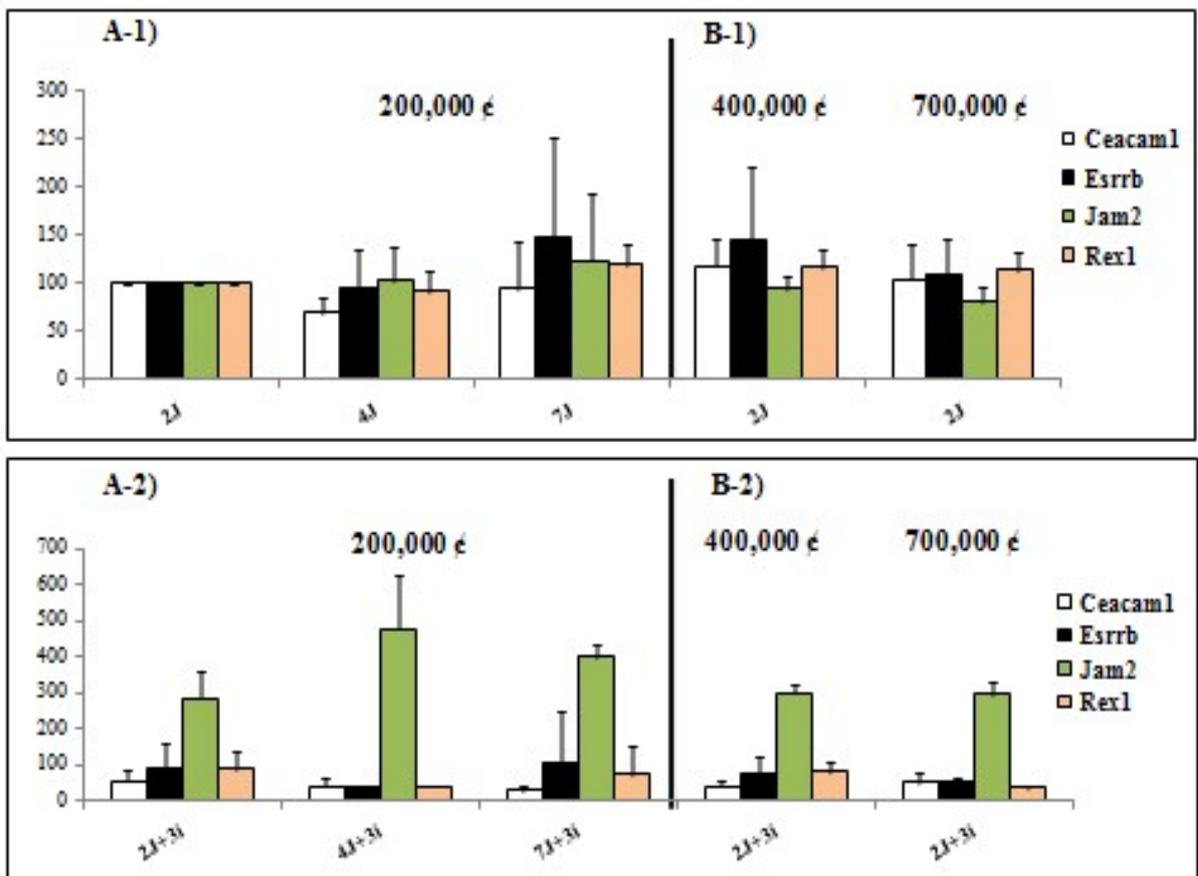
i



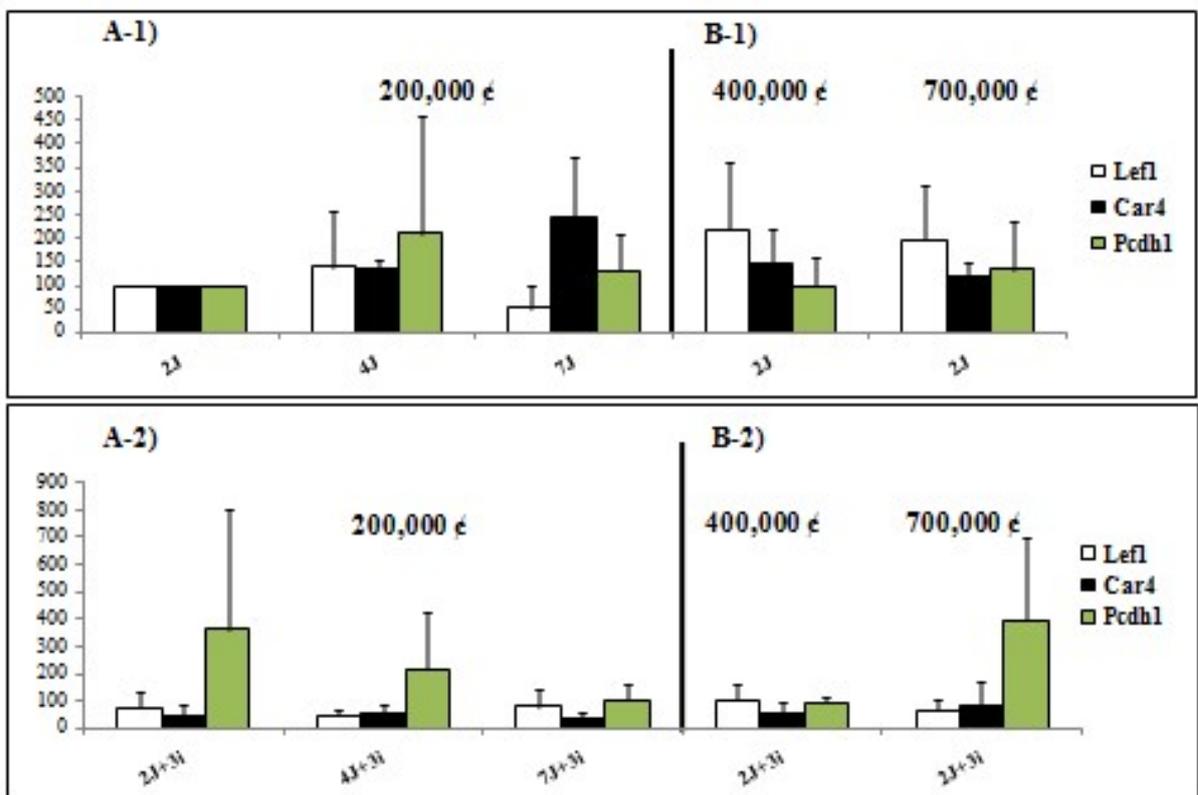
ii



iii



iv



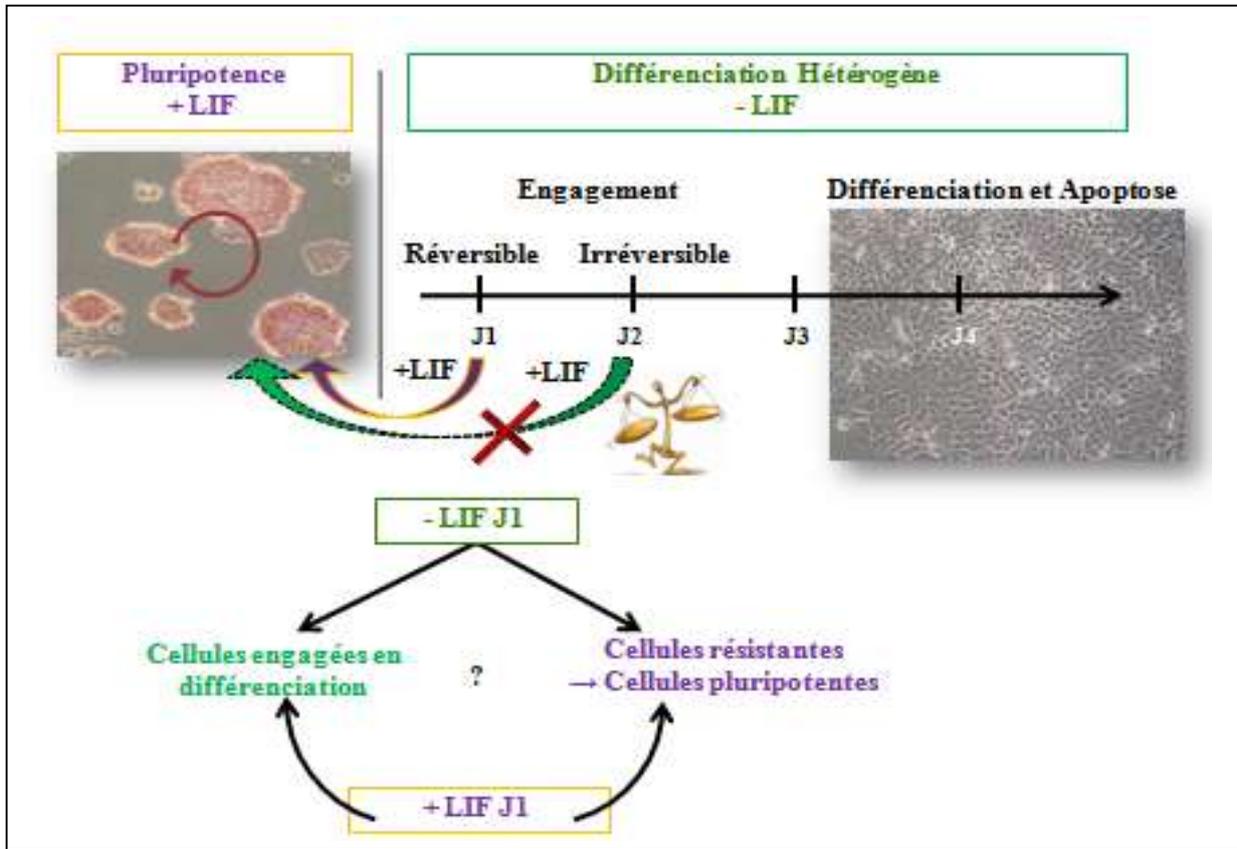
**Figure 38: Lien entre hétérogénéité et présence des zones hypoxiques.** Analyse de l'expression des gènes cibles de HIF1 $\alpha$  (i), des « gènes *maîtres* » (ii), des gènes « *Pluri* » (iii), des gènes de différenciation précoce « *Diff* » (iv), dans des cellules cultivées 2 jours, 4 jours et 7 jours (ensemencement de  $2 \times 10^5$  cellules) avec (A-2) et sans 3i (A-1). Effets du temps et à différentes densités cellulaires ( $4 \times 10^5$  cellules ou  $7 \times 10^5$  cellules) avec (B-2) et sans 3i (B-1). Culture en présence de LIF à [20% O<sub>2</sub>] (N). Les expériences sans 3i sont à n=7 alors que les expériences avec 3i sont à n=3. Les 3i (i pour inhibiteurs) : **U0126**, inhibiteur de la voie MAPK (Mitogen-activated protein Kinase) ; **CHIR**, inhibiteur de GSK3 $\beta$  (Glycogen Synthase Kinase 3  $\beta$ ) et **SU5402**, inhibiteur de la voie FGF (Fibroblast Growth Factor).

#### IV. Mise au point d'un outil de criblage par cytométrie de flux: Construction des vecteurs d'expression dans lesquels une forme de l'EGFP à demi-vie courte (d2EGFP) est sous le contrôle de promoteurs strictement sensible au LIF.

Les travaux de Niwa H 2007, Garter 2007 et Toyooka 2008, ont montré par l'analyse des profils d'expression globaux de plusieurs marqueurs, la présence de différents types de cellules (sous-populations) au sein des cellules mES à l'état indifférencié. La présence de populations hétérogènes de mESCs à l'état indifférencié en présence de LIF, rend complexe la caractérisation des effets différentiels du LIF au cours des phases d'engagement réversible et irréversible. Il est possible dans nos travaux que le retrait et le rajout du LIF n'ait pas le même effet sur toutes ces sous-populations d'où l'importance de travailler avec des populations homogènes (Fig.39). De plus, pour établir les mécanismes moléculaires à l'origine de la plasticité cellulaire à l'aide de criblages de banques de siRNA ou de chimiothèque de manière rapide et efficace, un outil d'analyse par cytométrie en flux est essentiel. Les lignées fluorescentes cultivées en présence et en absence de LIF pourront ainsi être triées et restimulées par le LIF.

Des expériences ont été effectuées sur deux lignées cellulaires : la lignée ORG9 (Toyooka *et al.*, 2008) dans laquelle l'ADN codant l'EGFP est inséré dans le premier exon du gène *Rex1* (Fig.40C), et la lignée Tomato que nous avons établi: l'ADN codant Tomato est sous contrôle du promoteur miR302-367 (plasmide obtenue grâce à une collaboration avec le laboratoire de F. Moreau-Gaudry - et B. Cardinaud) exprimé principalement dans les cellules souches embryonnaires humaines et les cellules de l'épiblaste murin (Jouneau *et al.*, 2012). Nous nous sommes basés sur le fait que l'expression de la luciférase sous contrôle du promoteur du miR302/367 humain, dans les mESCs, diminuait au cours de la différenciation (Barroso-del Jesus *et al.*, 2009). De plus, il a été montré que la transfection du miR302-367 murin pouvait se

substituer au cocktail de reprogrammation OSKM (*Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc*) pour reprogrammer des cellules somatiques murines et humaines avec une plus grande efficacité et en s'affranchissant des risques d'intégration du vecteur viral (Anokye-Danso *et al.*, 2011).

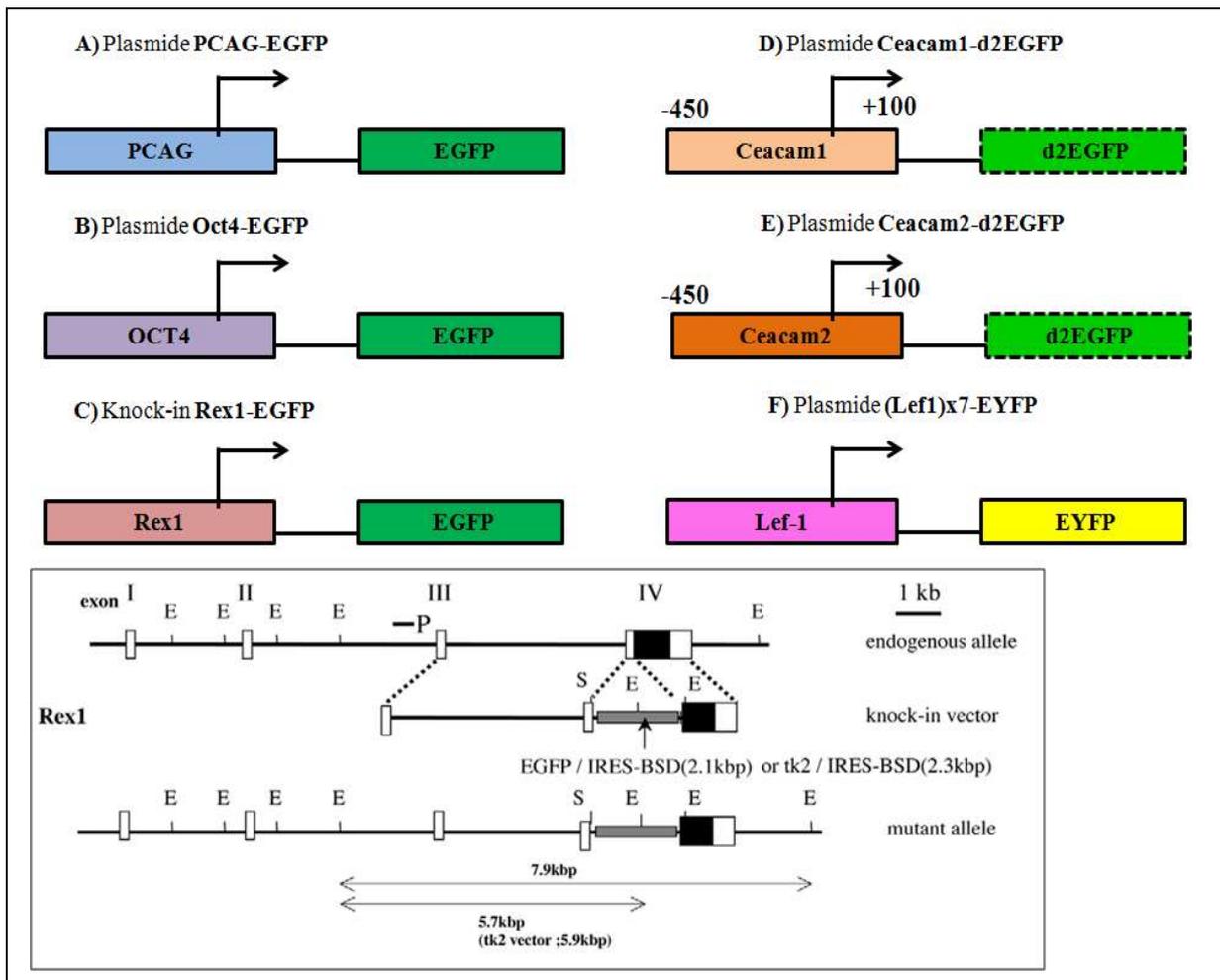


**Figure 39: Schéma indiquant la présence potentielle de sous-populations de mESC à J1 du retrait de LIF.**

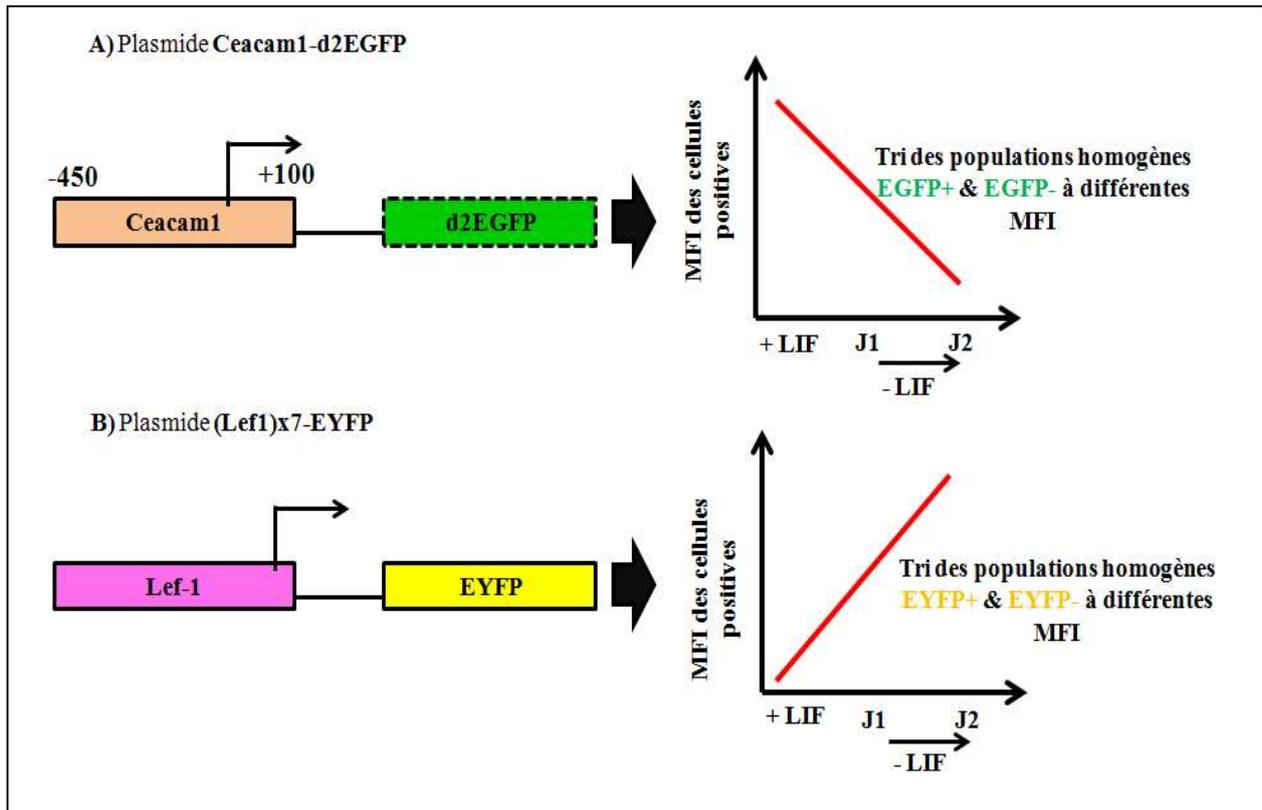
Cependant, ces deux constructions ne nous ont pas permis de caractériser l'effet du LIF au cours des phases d'engagement de différenciation à J1 et J2 car nous avons observé une diminution de l'EGFP ou de la Tomato qu'à partir de J2/J3 pour Rex1 et J4 pour mir302. Ces protéines, EGFP et Tomato ont une demi-vie de plus de 24h et sont donc trop stables pour notre étude.

Nous avons alors construit des vecteurs d'expression dans lesquels la protéine EGFP déstabilisée (d2EGFP, demi-vie de 2h) est sous contrôle des promoteurs Ceacam1 ou Ceacam2, régulés par le LIF. Les promoteurs Ceacam1 ou Ceacam2 (environ 550 bp) ont été sous-clonés à partir des plasmides Ceacam1 et Ceacam-2-luciférase obtenus par Mikael Sigvardsson, Månsson *et al.*, 2007). Nous avons aussi utilisé une construction exprimant EYFP sous le contrôle du promoteur Top-Flash contenant 7 sites de liaisons de LEF-1 [(LEF-1)x7] dans le but de trier des

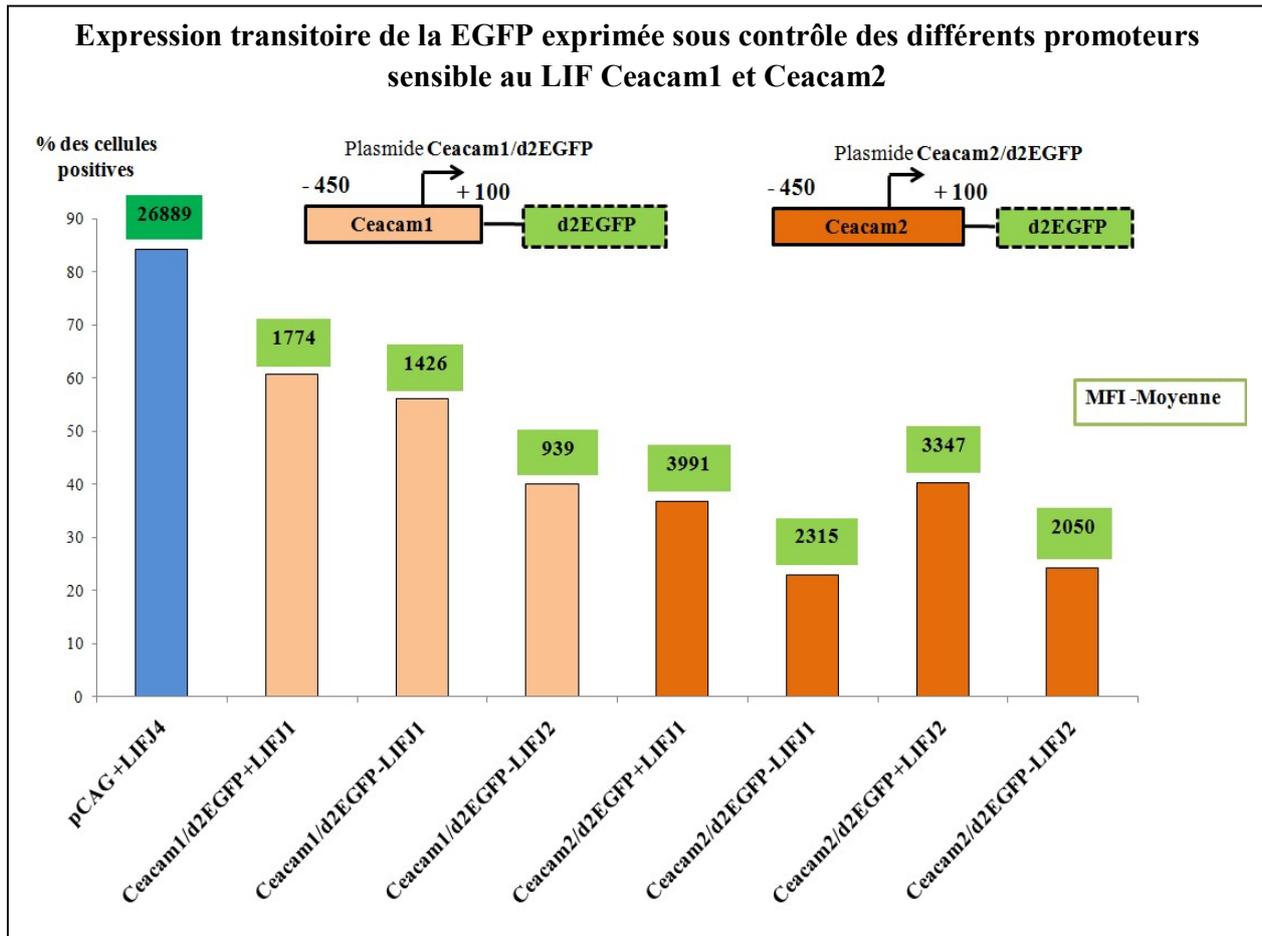
populations homogènes : EGFP<sup>+</sup> et EGFP<sup>-</sup> ou EYFP<sup>+</sup> et EYFP<sup>-</sup> à différentes intensités de fluorescence (MFI-Mean Fluorescence Intensity) (**Fig.41**). La validation de ces constructions a été effectuée dans les mESC par transfection transitoire sur une cinétique de 2 jours (**Fig.40D et F**) avec 0,6 µg d'ADN, validé comme condition optimale d'expression régulée. Dans ces expériences, on a aussi utilisé, comme contrôle positif, pour mesurer l'efficacité de transfection, le plasmide PCAG-EGFP (promoteur : Enhancer CMV+β-actin, 1 µg) et le plasmide Oct4-EGFP (1 µg), non régulé pendant un retrait du LIF à court terme (**Fig.42 et nos résultats non présentés**).



**Figure 40: Représentation des plasmides utilisés pour les expériences de cytométrie en flux :** Plasmide PCAG-EGFP (**A**) pour l'expression constitutive de la EGFP (promoteur fort indépendant du LIF, Enhancer CMV+β-actin, utilisé comme contrôle de la transfection) ; plasmide Oct4-EGFP (**B**), expression indépendante du LIF ; Rex1-EGFP, lignée OCRG9: KnockIn-EGFP dans le promoteur de *Rex1* (Toyooka et al, 2008) (**C**) ; plasmide Ceacam1-d2EGFP (**D**) (EGFP déstabilisée à une demi-vie de 2h), plasmide Ceacam2-d2EGFP (**E**) (promoteurs ceacam1 et 2, dépendant du LIF (Mansson, M. Sigvardsson et al, 2007) et plasmide (Lef1)x7-EYFP (Sussman, 2002, Biotechniques, 32, 1000-1002) (**F**).



**Figure 41: Outil de caractérisation de la plasticité des mESC par cytométrie en flux.** Graphes représentant les régulations attendues des promoteurs Ceacam1 (A) et Lef-1 (B) en présence (+ LIF) et en absence du LIF pendant 1 à 2 jours (-LIFJ1, - LIFJ2). Les cellules fluorescentes pourraient être utilisées dans le test de plasticité avec mesure de la MFI dans les différentes conditions expérimentales.



**Figure 42: Analyse de la régulation des promoteurs Ceacam1 et 2:** Les cellules mESC cultivées avec (+ LIF) ou sans LIF (-LIF) pendant 1 à 2 jours (J1 et J2) après transfection (avec la lipofectamine 2000) avec 0.6 µg des plasmides comme indiqué. pCAG-EGFP est utilisé comme contrôle de transfection (efficacité de transfection à 80%). Le % de cellules positives et la moyenne d'intensité de fluorescence (MFI) sont indiqués. Expériences réalisées avec Camille Blanchard, Ingénieur d'étude du laboratoire.

Finalement, cet outil nous permettra de :

- caractériser la plasticité des mESCs et
- mettre en évidence le rôle des facteurs régulant la phase d'engagement en présence de LIF en étudiant :
  - 1) l'implication des voies de signalisation par l'observation de l'effet des inhibiteurs chimiques de ces voies et
  - 2) le rôle de différents gènes en déterminant l'effet causé par leur extinction via la méthode des siRNA.

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

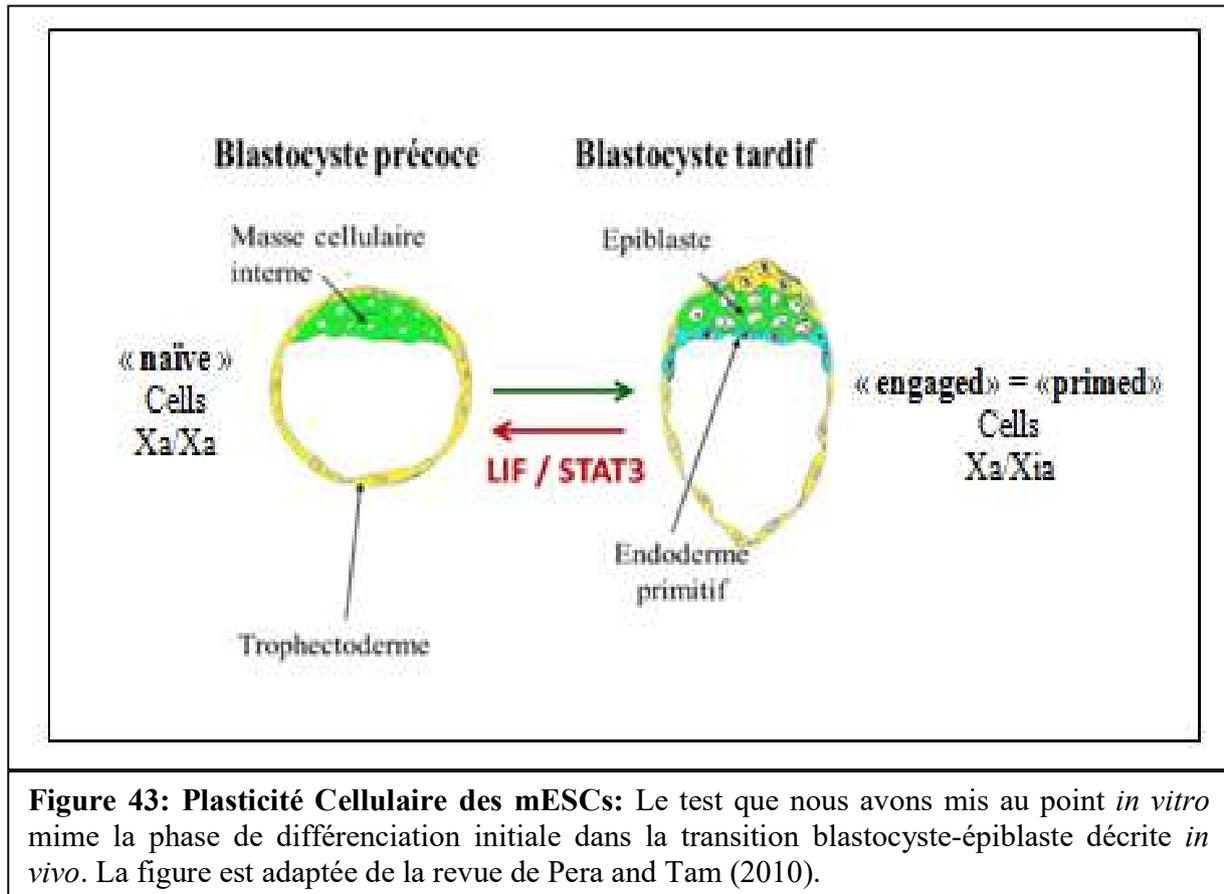
Les cellules souches ne sont pas dans un état statique, mais au contraire, sont dans un état dynamique ce qui leur permet de répondre à de multitudes de signaux environnementaux qui vont i) les préserver (auto-renouvellement) ou ii) induire leur différenciation. Cette dynamique se reflète dans la plasticité des populations de cellules souches pluripotentes *in vitro* en réponse à des manipulations de l'environnement de culture cellulaire. Bien que les embryons de mammifères montrent un développement finement régulé, les mécanismes qui permettent aux populations de cellules pluripotentes et extra-embryonnaires de répondre en évitant tout stress et tout dommage suite à des changements de leur environnement, ne sont pas bien définis.

### I. Mise en place du « Test de plasticité cellulaire »

#### A. Quel est l'intérêt de l'établissement du « Test de plasticité cellulaire » ?

Ce test permet d'avoir un modèle *in vitro* qui mime les premières étapes de différenciation correspondant, *in vivo*, à la transition blastocyste-épiblaste (Pera and Tam, 2010) (**Fig.43**). D'après nos résultats, nous n'atteignons cependant pas le stade épiblaste qui correspondrait à des cellules à J4, J5 sans LIF. Nous nous situons plus tôt dans l'embryogénèse, à des stades qui seraient très difficile à appréhender dans l'embryon et qui se situent entre l'état blastocyste et l'état épiblastique.

L'établissement des mEpiSCs et des hESCs, au stade post-implantatoire d'embryons, leur appartenance au même état de pluripotence (primed) et leur similitude a rendu leur étude essentielle pour mieux comprendre le modèle humain. L'étude de la plasticité cellulaire entre l'état naïf et primed facilite l'identification des cytokines et des facteurs modulant l'état des hESCs vu l'intérêt potentiel qu'elles ont pour la médecine régénérative. Celle-ci s'appuie en grande partie sur la thérapie cellulaire basée sur les cellules souches permettant d'obtenir un grand nombre de types cellulaires, contrairement à la thérapie cellulaire classique qui utilise des cellules différenciées voire des cellules précurseurs.



**B. *Klf5* est impliqué dans la régulation de la plasticité et PI3K favorise l'engagement des cellules vers la différenciation mésodermique**

Nous avons montré que le gène *spe-Lif* induit *Klf5*, mais pas le gène *pléio-Lif* induit *JunB*, joue un rôle dans la régulation de la plasticité cellulaire alors que la voie de signalisation PI3K ne semble pas avoir d'effet alors qu'elle module l'engagement des cellules vers la différenciation mésodermique.

*Klf5* est connu comme un facteur de transcription indispensable pour la dérivation des mESCs à partir de l'ICM et il est essentiel pour le maintien de l'auto-renouvellement des mESCs (Ema *et al.*, 2008; Parisi *et al.*, 2008). Les mESCs *Klf5*<sup>-/-</sup> peuvent maintenir leur pluripotence mais elles ont une expression accrue de gènes de différenciation et beaucoup de différenciation spontanée. Inversement, la surexpression de *Klf5* supprime l'expression des gènes de différenciation et maintient l'auto-renouvellement indépendamment du LIF par sa liaison directe aux

promoteurs des gènes *Nanog* et *Oct3/4* (Ema *et al.*, 2008; Parisi *et al.*, 2008). *Klf5* régule également la prolifération des mESCs via la voie de signalisation Tc11-Akt1. Nos travaux montrent donc que ce facteur régule la plasticité cellulaire puisque son knock-down affecte le retour à la pluripotence en changeant le profil d'expression des gènes par une diminution des « *Pluri* » et une augmentation des gènes « *Diff* » comme *Lef1* et *Nestin* (**résultats article**).

Une des cibles directes de KLF5 est la GTPase *Mras* (Parisi *et al.*, 2010), identifiée comme un nouveau marqueur de pluripotence (Chen *et al.*, 2006) et notre laboratoire a aussi montré qu'il est impliqué dans le maintien en pluripotence (Mathieu *et al.*, 2013). Il serait prometteur d'étudier la plasticité des mESCs avec des expériences de simple et de double knock-down de tous les gènes *speLifind* ce qui permettrait de révéler une éventuelle synergie entre ces gènes dans la régulation de la phase d'engagement réversible.

Nous avons montré que la voie PI3K, essentielle pour le maintien en pluripotence des mESCs, n'a aucun rôle régulateur durant la phase d'engagement réversible.

Cependant, nous avons montré, en étudiant le devenir des cellules jusqu'à 5 jours sans LIF, que la voie PI3K agit sur le choix du destin cellulaire des mESCs en induisant l'expression des marqueurs du mésoderme (comme *Brachyury*) et en réprimant des marqueurs de l'endoderme (*Gata4*) et de l'ectoderme (*Nestin*). Nos résultats sont en accord avec des expériences effectuées dans les embryons de *Xenopus laevis*, où l'inhibition de la voie PI3K réprime la formation mésodermique (Carballada *et al.*, 2001) et en cohérence avec les effets de la voie PI3K sur la régulation de la myogénèse durant le développement et sur la différenciation ostéogénique via le MGF (mechano-growth factor) dans le modèle de MSCs du rat (Matheny *et al.*, 2015; Tong *et al.*, 2015). De plus, PI3K est également activée par d'autres protéines régulatrices comme l'insuline et BMP4 (de la voie PI3K). Il serait intéressant de confirmer, si l'implication de cette voie dépend de la sécrétion du LIF par les cellules différenciées et/ou dépend également d'autres protéines régulatrices comme BMP4. Il est connu que le LIF est sécrété dans des cellules différenciées, mais on ne sait rien sur son activité. Une possibilité de tester l'activité de LIF serait de recueillir des surnageants conditionnés à partir de cultures de cellules différenciées puis les ajouter à des cellules au moment du retrait du LIF. Le LIF actif devrait maintenir la pluripotence. De plus, l'analyse en western blot des niveaux de phosphorylation des cibles du LIF (comme JAK1, STAT3, ERK1/2, PI3K, etc.) devrait révéler l'activité du LIF sécrétée par les cellules différenciées. La régulation de la pluripotence des mESCs par les voies de signalisation

commence à être assez bien comprise. Toutefois, la régulation exacte de l'engagement en lignage cellulaire reste à élucider.

## II. « Test de Plasticité » effectué sur mESCs et miPSCs en parallèle

L'analyse comparative mESCs / miPSCs par l'étude transcriptionnelle, a montré qu'il y a une similarité entre ces deux lignées pour le profil global de l'expression des marqueurs « maîtres », « Pluri » et « Diff » à l'exception de *Nanog* et *Esrrb*. Aussi, nous avons montré que la plasticité cellulaire est conservée dans les miPSCs de manière similaire aux mESC, par la ré-augmentation des gènes « Pluri » (*Ceacam1* et *Mras*) et la ré-diminution des gènes « Diff » (*Lef1* et *Car4*).

### Pourquoi comparer les iPSCs aux ESCs?

Plusieurs études suggèrent que les iPSCs présentent des aberrations génétiques et épigénétiques plus forte que les ESCs suite au processus de la reprogrammation. Les trois principales sources d'anomalies génomiques des iPSCs sont: (1) la variabilité génomique des cellules parentales, (2) la reprogrammation cellulaire, et (3) la culture *in vitro* de cellules. Des études récentes affirment qu'il est possible de générer des miPSCs et hiPSCs avec un niveau de mutation similaire à celle des cellules parentales, ce qui indique que les techniques de reprogrammation "genome-friendly" peuvent être développées (Bai et al., 2013; Lapasset et al., 2011; Qiang et al., 2013). La question de l'intégrité de l'ADN des iPSCs met clairement en évidence le besoin crucial de lignées standards pour définir le niveau acceptable de l'intégrité du génome des cellules souches pluripotentes pour des applications biomédicales.

## III. Etudier l'impact des facteurs de l'environnement : MMP1 et Hypoxie sur la pluripotence et la plasticité des mESCs

### A. MMP1

Nous avons montré un effet de la métalloprotéinases MMP1 sur la plasticité des mESCs (**résultats article en révision**). De plus, nous avons évalué l'effet d'un « priming » MMP1 en cultivant les cellules pendant une semaine en présence de MMP1 (au lieu du LIF) avant

d'effectuer le test de plasticité cellulaire. Nous avons montré que cette métalloprotéinase conserve la morphologie pluripotente des mESCs ce qui est cohérent avec les résultats obtenus par Przybyla qui a prouvé par des tests fonctionnels que MMP1 maintient la pluripotence des mESCs jusqu'à 28 jours (Przybyla *et al.*, 2013). Cependant, elle semble avoir un effet sur la plasticité des mESCs mais avec une fenêtre de plasticité décalée à J2 suggérant que la fenêtre de plasticité est modifiée par rapport à celle observée par la cytokine LIF (**résultats non présentés, n=1**). Ces résultats de « priming » restent préliminaires et il faudrait vérifier leurs reproductibilités.

Aussi, nous avons montré un effet combiné de LIF/MMP1 sur la plasticité des mESCs suite à une meilleure re-stimulation des gènes « *Pluri* » à J1 et J2. Nous avons noté qu'à J3 les cellules semblent sécréter une protéine induite par MMP1 qui s'oppose à l'effet du LIF, (**Fig.30**).

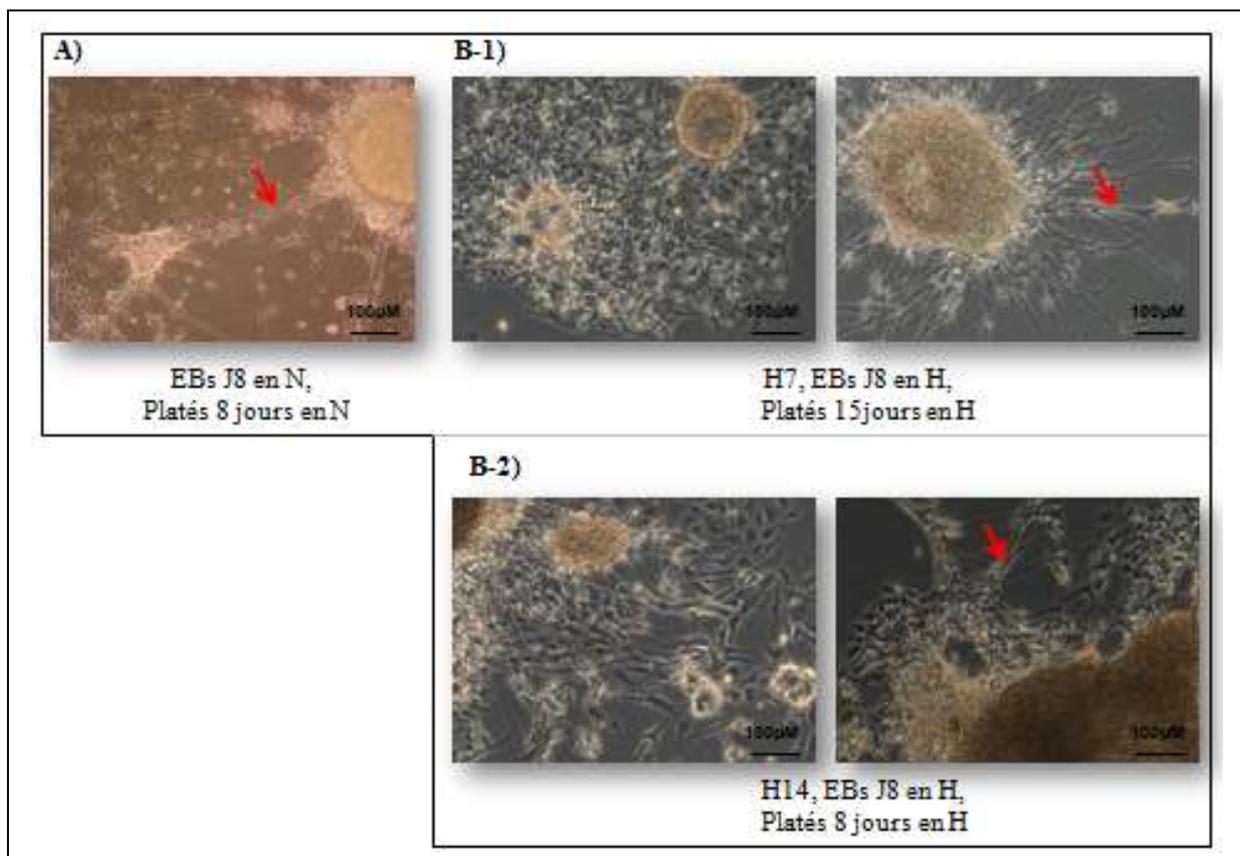
Les effets observés dépendent aussi des marqueurs analysés. Par exemple l'expression de *M-ras*, un nouveau marqueur important de la pluripotence, n'est pas régulée au cours de la cinétique du retrait et de rajout de MMP1 (**résultats non présentés, n=1**). Si seulement l'expression de *M-ras* est prise en compte, MMP1 n'a pas d'effet sur la plasticité. Par contre, si les expressions de *Jam2*, *Esrrβ* et *Rex1* sont également analysées, l'inverse est démontré. Ceci nous permet de poser l'hypothèse d'une classification en trois familles de gènes: gènes cibles de LIF, gènes cibles de MMP1 et gènes cibles communs de LIF et MMP1. Cette classification nécessiterait une étude comparative transcriptomique suite au test de « Plasticité cellulaire » des mESCs maintenues soit avec MMP1 seule soit avec le LIF seule. Par cette analyse, nous pourrions aussi déterminer si les cellules maintenues pluripotentes avec MMP1 appartiennent au même « état de pluripotence » que celles maintenues par le LIF.

Enfin, la découverte de MMP1 comme nouveau facteur sécrété par les fibroblastes pour le maintien de la pluripotence des mESCs met l'accent sur l'importance des cellules nourricières comme réservoir de facteurs, de cytokines et de métalloprotéases qu'il est critique d'identifier.

## **B. Hypoxie**

Nos résultats ont montré que la culture des mESCs à faible concentration d'O<sub>2</sub>, notamment [3% O<sub>2</sub>], influence leur morphologie (aspect des cellules moins compact), leur prolifération (moins rapide), ou encore leur profil d'expression génétique. En effet après 4 jours à [3% O<sub>2</sub>], on

observe des différences morphologiques, les cellules étant d'avantage disjointes, tout en restant AP+ (**Fig.32A**). Nous avons alors montré que l'expression de *Jam2* (un nouveau gène *Pluri* qui code pour une protéine de jonction membranaire, (Trouillas *et al.*, 2009b)) est diminuée en hypoxie (en ARN, **Fig. 7C** article en révision et en protéine, **Fig.32D**) ce qui pourrait expliquer le changement morphologique des mESCs. Après 7 jours en hypoxie, deux sous populations apparaissent: une population AP+, de type indifférencié et l'autre AP- de type différencié (**Fig.32B et C**), ce qui corrobore avec l'augmentation de l'expression de *Bcl2* et des gènes de différenciation précoce (**Fig.34B-2 et 36C**). Donc, la faible concentration d'O<sub>2</sub> semble permettre à la fois le maintien de la pluripotence d'une large partie des cellules et la différenciation d'une sous-population largement réprimée par la voie LIF à [20% O<sub>2</sub>]. Nous avons vérifié que les cellules après 7 jours et 14 jours de culture à [3% O<sub>2</sub>] restent pluripotentes (elles conservent leur capacité à se différencier en cellules des trois feuillets embryonnaires), par le test fonctionnel de la différenciation *in vitro* en formant des corps embryoides (EBs) (**Fig.44**).



**Figure 44: La faible [O<sub>2</sub>] maintient la pluripotence des mESCs *in vitro* à long terme.** Analyse morphologique des mESCs après différenciation *in vitro*: Différenciation neuronale des EBs après 8 jours de leur formation, suivi de 8 jours d'adhésion à [20% O<sub>2</sub>] (N-normoxie) (**A**) ou à [3% O<sub>2</sub>] (H- hypoxie) à partir des mESCs cultivées 7 jours (**B-1**) ou 14 jours (**B-2**). **Flèches rouges** : réseaux de neurones.

Les cellules exposées à [3% O<sub>2</sub>] subissent un retard de prolifération qui n'est pas dû à une apoptose accrue. Ces cellules, après 4 jours, prolifèrent 2,5 fois moins vite que les cellules à [20% O<sub>2</sub>] (**Fig.33**). A 20% d'O<sub>2</sub>, la chaîne respiratoire fonctionne correctement, on peut donc supposer que plus d'ATP est produit et donc que la cellule dispose de plus d'énergie pour se diviser. De plus, en hypoxie l'induction des HIFs altère la progression du cycle cellulaire en surexprimant le CKI (Cyclin-dependent Kinase inhibitor), P21, P27 et CyclinD1 (Baba *et al.*, 2003; Gardner *et al.*, 2001; Koshiji *et al.*, 2004). Les mESCs ont une phase G1 très courte et sont essentiellement en phase S à 20% O<sub>2</sub> (Coronado *et al.*, 2013; Savatier *et al.*, 1996). Il a été montré qu'à 1% O<sub>2</sub>, les mESCs se différencient avec une phase G1 plus longue (Jeong *et al.*, 2007). Dans nos conditions, à court terme (pendant 4 jours) les cellules gardent leur capacité de pluripotence avec un nouveau profil d'expression de gènes et à plus long terme il y a nettement 2 populations cellulaires qui apparaissent avec une partie des cellules qui reste pluripotente et une partie différenciée. Pour compléter ces travaux, il serait intéressant d'effectuer une analyse comparative des phases du cycle cellulaire des mESCs, avec le système FUCCI [qui permet de discriminer les cellules en G1, S et G2/M en fonction de l'expression de protéine fluorescentes préférentiellement dégradées dans l'une ou l'autre phase du cycle cellulaire (Coronado *et al.*, 2013; Sakaue-Sawano *et al.*, 2008)], à différentes concentrations d'O<sub>2</sub> et à des temps de culture différents de 4, 7, ou plusieurs semaines en présence et en absence du LIF. Ceci permettrait de mieux comprendre les mécanismes d'adaptation des mESCs à des faibles [O<sub>2</sub>].

Nous avons montré qu'en hypoxie la voie du LIF est atténuée (**résultats article** et Jeong *et al.*, 2007) et que cette répression n'est pas due à une augmentation de la transcription du gène répresseur *Socs3* (**Fig.34A**), ni à une stabilisation de la protéine Socs3 (nos résultats préliminaires non publiés). D'autres régulateurs négatifs de la voie LIF, entre autre les gènes de la famille des PIAS (protein inhibitors of activated STATs) (Chung *et al.*, 1997; Duval *et al.*, 2000; Hilton, 1999) et les phosphatases SHP1 et SHP2 pourraient aussi être analysés dans le cadre de cette étude (Furqan *et al.*, 2013). PIAS3 interagit avec STAT3 dimérique en empêchant sa liaison à l'ADN ce qui réprime l'effet de la voie LIF. De plus, une forme alternative de PIAS3, nommé PIAS3L, est exprimée de manière importante dans les cellules mESCs (Duval *et al.*, 2004). L'expression élevée des ces répresseurs pourrait être un des mécanismes à l'origine de l'atténuation de la voie LIF et de l'établissement de nouveaux équilibres d'expression génique en hypoxie.

Au bout de 7 jours en hypoxie, les gènes cibles de *HIF1α* ne sont plus induits (**Fig.31B**). Les cellules s'adaptent alors de manière indépendante du HIF1α comme c'est le cas dans les hESCs où HIF2α prend le relais de HIF1α, après 48h de culture en hypoxie, en induisant de nouvelles cibles (Hu *et al.*, 2006). De plus, après 48h de culture en hypoxie, HIF3α est surexprimée et réprime HIF1α et active HIF2α (Fornistal *et al.*, 2010). HIF1α permettrait une réponse rapide à de faibles concentrations d'oxygène, tandis qu' HIF2α, agirait pour des réponses à plus long terme. Il est possible que dans les cellules murines, un processus similaire existe, et que la protéine HIF1α devienne inactive, à long terme à [3% O<sub>2</sub>]. HIF2α est un régulateur direct de l'expression d'*Oct4* dans les mESCs et les hESCs (Covello *et al.*, 2006; Fornistal *et al.*, 2010) et de l'expression de *Sox2* et *Nanog* dans les hESCs (Boyer *et al.*, 2005). A J7, l'expression de *Nanog* et *Oct4* diminue (**Fig.36A**), ce qui nous amène à suggérer que dans les mESCs la régulation de ces marqueurs n'est pas forcément dépendante de HIF2α. Pour confirmer ceci il serait utile d'analyser l'expression au niveau protéique de HIF1α, HIF2α et de leurs cibles, comme *c-Myc*, *VEGF* (Vascular epidermal growth factor), *TGFα* (Transforming growth factor alpha) à J7.

En conclusion, en se basant sur le fait que: (i) l'effet de l'hypoxie sur les cellules souches n'est pas un effet controversé mais plutôt un effet différentiel dépendant des conditions expérimentales utilisées, (ii) les mESCs sont hétérogènes en culture et fluctuent entre différents états de pluripotence se situant entre les états naïf et primed plus particulièrement appelés les états intermédiaires qui partagent des caractéristiques intermédiaires communes avec ces derniers, la question se pose, au moins dans notre cas, est-ce-que l'état de pluripotence maintenu à [3% O<sub>2</sub>] est un état intermédiaire ? Pour prouver cette hypothèse, il serait intéressant d'analyser les niveaux d'expression des gènes de pluripotence naïf et primed et de voir s'ils correspondent aux profils des cellules IESCs. De plus, il faudrait vérifier la double dépendance au LIF/Activine A, c'est-à-dire si les cellules poussent mieux avec un seul phénotype cellulaire même à long terme en présence de ces deux facteurs. Ceci pourrait aussi expliquer pourquoi nos cellules sont pluripotentes malgré les niveaux bas des marqueurs « *Pluri* » et les niveaux relativement élevés des marqueurs « *Diff* ».

Pour vraiment comprendre l'effet de l'hypoxie sur les mESCs à long terme, il serait important de dériver des lignées mESCs de blastocystes directement en hypoxie puis de les cultiver à différentes [O<sub>2</sub>] pour voir comment elles s'adaptent aux variations d'O<sub>2</sub>. Une analyse comparative aux niveaux transcriptomique et protéomique de ces lignées en normoxie et hypoxie permettrait probablement l'identification de nouveaux facteurs régulateurs de pluripotence des mESCs.

Enfin, durant nos expériences, nous avons découvert que la dilution des cellules cultivées en normoxie avait un impact sur l'expression des gènes. En effet, l'expression des gènes cibles de l'hypoxie est plus importante dans les cellules non diluées que dans les cellules diluées, 2 jours avant l'extraction de l'ARN (**Fig.37**). Nos résultats nous laissent penser qu'en normoxie, une forte confluence cellulaire induit l'apparition de zones hypoxiques qui pourraient être à l'origine de l'hétérogénéité cellulaire. Pour compléter ces expériences, il faudrait marquer les cellules diluées ou à forte confluence *in situ* avec un marqueur d'hypoxie (comme le pimonidazole) selon un protocole qui permet d'identifier *in situ* les zones hypoxiques. En parallèle un immunomarquage avec un anticorps dirigé contre la protéine Nanog, dont on a montré que l'expression protéique chute en hypoxie (**Fig. 6A**, article en révision) permettrait de voir si les zones hypoxiques correspondent aux zones de faible expression de Nanog, protéine connue pour être exprimée de manière hétérogène dans les mESCs (Bessonard *et al.*, 2014; Toyooka *et al.*, 2008). De plus, il serait intéressant de lier ces résultats *in vitro* à l'*in vivo* pour prouver que la faible [O<sub>2</sub>], condition physiologique régulant la niche où les ESCs résident, est responsable de la mosaïque d'expression des marqueurs même au niveau du blastocyste.

### C. Existe-il un lien MMP1/Hypoxie dans les mESCs?

Les données de la littérature ont montré un lien entre faible concentration d'O<sub>2</sub> et l'expression de MMP1. Les études de Nakayama en 2013 ont montré que CREB et NF-κB, durant une hypoxie prolongée, induisent l'expression de MMP1 suite à la liaison sur leur site de fixation dans le promoteur de MMP1 (Nakayama, 2013). De même, un autre groupe a montré que HIF1α régule l'expression de MMP1 et MMP3 dans les cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse (bmMSCs) (Lin *et al.*, 2008). Par des études primaires, sur la lignée E14WT, nous avons montré que MMP1 maintient la pluripotence des mESCs aussi bien en Hypoxie qu'en Normoxie. Cependant, nous n'avons pas observé d'augmentation de l'expression de *MMP1* à [3% O<sub>2</sub>]. Il pourrait donc y avoir une spécificité cellulaire de l'induction de MMP1 par l'hypoxie mais ceci reste à confirmer.

## CONCLUSION GENERALE

Ce travail de thèse a permis d'établir un protocole expérimental pour comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la transition blastocyste vers l'épiblaste dans laquelle la cytokine LIF est essentielle. Ce test permet d'étudier l'impact des gènes, des voies de signalisation et des facteurs environnementaux, qui pourraient moduler la propriété de la plasticité cellulaire dépendante du LIF dans les mESCs. Nous avons montré que *Klf5*, effecteur clé du LIF participe à la régulation de la phase de réversion alors que *JunB* n'est pas impliqué. De même la signalisation de la PI3K, nécessaire pour le maintien de la pluripotence des mESCs, n'a aucun effet tout en affichant un rôle majeur dans l'engagement des cellules vers la différenciation mésodermique. Nous avons montré également que la métalloprotéinase MMP1, qui peut remplacer le LIF dans le maintien de la pluripotence, l'imite aussi dans la fenêtre de plasticité mais avec moins d'efficacité et que les mESCs restent pluripotentes et plastiques à 3% d'O<sub>2</sub>, *in vitro*, en présentant un nouvel équilibre d'expression des gènes et des protéines en comparaison à 20% d'O<sub>2</sub>. Ces résultats mettent l'accent sur l'importance de la compréhension des mécanismes d'adaptation cellulaire aboutissant à l'établissement de nouveaux programmes génétiques.

De plus, ces études ont permis d'émettre et de valider une hypothèse de travail originale concernant les mécanismes à l'origine de l'hétérogénéité des mESCs. Ce genre d'étude permet de définir les microenvironnements et les facteurs nécessaires assurant le maintien de l'auto-renouvellement et guidant la différenciation des ces cellules vers un type cellulaire particulier.

Enfin, pour caractériser et mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de la plasticité des mESCs dépendante du LIF, nous avons développé une nouvelle approche par cytométrie en flux en dérivant des clones de cellules fluorescentes dont le niveau de fluorescence est sous le contrôle des promoteurs sensibles au LIF. Un tel outil va faciliter les études de criblage de chimiothèques qui sont essentielles pour l'utilisation future de ces cellules en thérapie cellulaire. De plus, il pourrait se révéler très performant pour tester l'effet des agents polluants pour déterminer à court et long terme leur impact sur la pluripotence et la différenciation de ce modèle cellulaire.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abe, E., Tanaka, H., Ishimi, Y., Miyaura, C., Hayashi, T., Nagasawa, H., Tomida, M., Yamaguchi, Y., Hozumi, M., and Suda, T. (1986). Differentiation-inducing factor purified from conditioned medium of mitogen-treated spleen cell cultures stimulates bone resorption. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *83*, 5958–5962.
- Abranches, E., Guedes, A.M.V., Moravec, M., Maamar, H., Svoboda, P., Raj, A., and Henrique, D. (2014). Stochastic NANOG fluctuations allow mouse embryonic stem cells to explore pluripotency. *Dev. Camb. Engl.* *141*, 2770–2779.
- Ailhaud, G., Grimaldi, P., and Négre, R. (1992). A molecular view of adipose tissue. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes.* *16 Suppl 2*, S17–S21.
- Akita, S., Ohte, N., Narita, H., Hashimoto, T., Kobayashi, K., and Fujinami, T. (1997). Estimation of pulmonary capillary wedge pressure from M-mode mitral echograms. *Cardiology* *88*, 373–378.
- Aksoy, I., Giudice, V., Delahaye, E., Wianny, F., Aubry, M., Mure, M., Chen, J., Jauch, R., Bogu, G.K., Nolden, T., et al. (2014). Klf4 and Klf5 differentially inhibit mesoderm and endoderm differentiation in embryonic stem cells. *Nat. Commun.* *5*, 3719.
- Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., and Clarke, M.F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 3983–3988.
- Amano, T., Hirata, T., Falco, G., Monti, M., Sharova, L.V., Amano, M., Sheer, S., Hoang, H.G., Piao, Y., Stagg, C.A., et al. (2013). Zscan4 restores the developmental potency of embryonic stem cells. *Nat. Commun.* *4*, 1966.
- Ambrosetti, D.C., Basilico, C., and Dailey, L. (1997). Synergistic activation of the fibroblast growth factor 4 enhancer by Sox2 and Oct-3 depends on protein-protein interactions facilitated by a specific spatial arrangement of factor binding sites. *Mol. Cell. Biol.* *17*, 6321–6329.
- Amit, M., Carpenter, M.K., Inokuma, M.S., Chiu, C.P., Harris, C.P., Waknitz, M.A., Itskovitz-Eldor, J., and Thomson, J.A. (2000). Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev. Biol.* *227*, 271–278.
- Amit, M., Margulets, V., Segev, H., Shariki, K., Laevsky, I., Coleman, R., and Itskovitz-Eldor, J. (2003). Human feeder layers for human embryonic stem cells. *Biol. Reprod.* *68*, 2150–2156.
- Amit, M., Shariki, C., Margulets, V., and Itskovitz-Eldor, J. (2004). Feeder layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells. *Biol. Reprod.* *70*, 837–845.
- Anhuf, D., Weissenbach, M., Schmitz, J., Sobota, R., Hermanns, H.M., Radtke, S., Linnemann, S., Behrmann, I., Heinrich, P.C., and Schaper, F. (2000). Signal transduction of IL-6, leukemia-inhibitory factor, and oncostatin M: structural receptor requirements for signal attenuation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *165*, 2535–2543.
- Anokye-Danso, F., Trivedi, C.M., Juhr, D., Gupta, M., Cui, Z., Tian, Y., Zhang, Y., Yang, W., Gruber, P.J., Epstein, J.A., et al. (2011). Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* *8*, 376–388.
- Auernhammer, C.J., and Melmed, S. (2000). Leukemia-inhibitory factor-neuroimmune modulator of endocrine function. *Endocr. Rev.* *21*, 313–345.
- August Weismann (1885). *Die Continuität des Keimplasma's als Grundlage einer Theorie der Vererbung* (Verlag von Gustav Fischer).
- Austin, L., and Burgess, A.W. (1991). Stimulation of myoblast proliferation in culture by leukaemia inhibitory factor and other cytokines. *J. Neurol. Sci.* *101*, 193–197.
- Avilion, A.A., Nicolis, S.K., Pevny, L.H., Perez, L., Vivian, N., and Lovell-Badge, R. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.* *17*, 126–140.

- Axelrod, H.R. (1984). Embryonic stem cell lines derived from blastocysts by a simplified technique. *Dev. Biol.* *101*, 225–228.
- Baba, M., Hirai, S., Yamada-Okabe, H., Hamada, K., Tabuchi, H., Kobayashi, K., Kondo, K., Yoshida, M., Yamashita, A., Kishida, T., et al. (2003). Loss of von Hippel-Lindau protein causes cell density dependent deregulation of CyclinD1 expression through hypoxia-inducible factor. *Oncogene* *22*, 2728–2738.
- Bäck, M., Ketelhuth, D.F.J., and Agewall, S. (2010). Matrix metalloproteinases in atherothrombosis. *Prog. Cardiovasc. Dis.* *52*, 410–428.
- Bai, Q., Desprat, R., Klein, B., Lemaître, J.-M., and De Vos, J. (2013). Embryonic stem cells or induced pluripotent stem cells? A DNA integrity perspective. *Curr. Gene Ther.* *13*, 93–98.
- Bao, S., Tang, F., Li, X., Hayashi, K., Gillich, A., Lao, K., and Surani, M.A. (2009). Epigenetic reversion of post-implantation epiblast to pluripotent embryonic stem cells. *Nature* *461*, 1292–1295.
- Barbosa, H.S.C., Fernandes, T.G., Dias, T.P., Diogo, M.M., and Cabral, J.M.S. (2012). New insights into the mechanisms of embryonic stem cell self-renewal under hypoxia: a multifactorial analysis approach. *PLoS One* *7*, e38963.
- Bárdos, J.I., and Ashcroft, M. (2005). Negative and positive regulation of HIF-1: a complex network. *Biochim. Biophys. Acta* *1755*, 107–120.
- Barnard, W., Bower, J., Brown, M.A., Murphy, M., and Austin, L. (1994). Leukemia inhibitory factor (LIF) infusion stimulates skeletal muscle regeneration after injury: injured muscle expresses *lif* mRNA. *J. Neurol. Sci.* *123*, 108–113.
- Barroso-del Jesus, A., Lucena-Aguilar, G., and Menendez, P. (2009). The miR-302-367 cluster as a potential stemness regulator in ESCs. *Cell Cycle Georget. Tex* *8*, 394–398.
- Bartoe, J.L., and Nathanson, N.M. (2000). Differential regulation of leukemia inhibitory factor-stimulated neuronal gene expression by protein phosphatases SHP-1 and SHP-2 through mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent pathways. *J. Neurochem.* *74*, 2021–2032.
- Baumann, H., and Wong, G.G. (1989). Hepatocyte-stimulating factor III shares structural and functional identity with leukemia-inhibitory factor. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *143*, 1163–1167.
- Becker, A.J., McCulloch, E.A., and Till, J.E. (1963). Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells.
- Beddington, R.S. (1983). Histogenetic and neoplastic potential of different regions of the mouse embryonic egg cylinder. *J. Embryol. Exp. Morphol.* *75*, 189–204.
- Beddington, S.P. (1981). An autoradiographic analysis of the potency of embryonic ectoderm in the 8th day postimplantation mouse embryo. *J. Embryol. Exp. Morphol.* *64*, 87–104.
- Beltrami, A.P., Barlucchi, L., Torella, D., Baker, M., Limana, F., Chimenti, S., Kasahara, H., Rota, M., Musso, E., Urbanek, K., et al. (2003). Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* *114*, 763–776.
- van den Berg, D.L.C., Snoek, T., Mullin, N.P., Yates, A., Bezstarosti, K., Demmers, J., Chambers, I., and Poot, R.A. (2010). An Oct4-centered protein interaction network in embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* *6*, 369–381.
- Bernstein, B.E., Mikkelsen, T.S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D.J., Cuff, J., Fry, B., Meissner, A., Wernig, M., Plath, K., et al. (2006). A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* *125*, 315–326.
- Berra, E., Ginouvès, A., and Pouyssegur, J. (2006). The hypoxia-inducible-factor hydroxylases bring fresh air into hypoxia signalling. *EMBO Rep.* *7*, 41–45.

- Bessonnard, S., De Mot, L., Gonze, D., Barriol, M., Dennis, C., Goldbeter, A., Dupont, G., and Chazaud, C. (2014). Gata6, Nanog and Erk signaling control cell fate in the inner cell mass through a tristable regulatory network. *Dev. Camb. Engl.* *141*, 3637–3648.
- Betschinger, J., Nichols, J., Dietmann, S., Corrin, P.D., Paddison, P.J., and Smith, A. (2013). Exit from pluripotency is gated by intracellular redistribution of the bHLH transcription factor Tfe3. *Cell* *153*, 335–347.
- Biressi, S., and Rando, T.A. (2010). Heterogeneity in the muscle satellite cell population. *Semin. Cell Dev. Biol.* *21*, 845–854.
- Bjerknes, M., and Cheng, H. (2006). Neurogenin 3 and the enteroendocrine cell lineage in the adult mouse small intestinal epithelium. *Dev. Biol.* *300*, 722–735.
- Boeuf, H., Hauss, C., Graeve, F.D., Baran, N., and Kedinger, C. (1997). Leukemia inhibitory factor-dependent transcriptional activation in embryonic stem cells. *J. Cell Biol.* *138*, 1207–1217.
- Boeuf, H., Merienne, K., Jacquot, S., Duval, D., Zeniou, M., Hauss, C., Reinhardt, B., Huss-Garcia, Y., Dierich, A., Frank, D.A., et al. (2001). The ribosomal S6 kinases, cAMP-responsive element-binding, and STAT3 proteins are regulated by different leukemia inhibitory factor signaling pathways in mouse embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* *276*, 46204–46211.
- Bonnet, D., and Dick, J.E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* *3*, 730–737.
- Borooah, S., Phillips, M.J., Bilican, B., Wright, A.F., Wilmut, I., Chandran, S., Gamm, D., and Dhillon, B. (2013). Using human induced pluripotent stem cells to treat retinal disease. *Prog. Retin. Eye Res.* *37*, 163–181.
- Boroviak, T., Loos, R., Bertone, P., Smith, A., and Nichols, J. (2014). The ability of inner-cell-mass cells to self-renew as embryonic stem cells is acquired following epiblast specification. *Nat. Cell Biol.* *16*, 516–528.
- Boulanger, M.J., and Garcia, K.C. (2004). Shared cytokine signaling receptors: structural insights from the gp130 system. *Adv. Protein Chem.* *68*, 107–146.
- Boulanger, M.J., Chow, D., Brevnova, E.E., and Garcia, K.C. (2003). Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex. *Science* *300*, 2101–2104.
- Bourillot, P.-Y., and Savatier, P. (2010). Krüppel-like transcription factors and control of pluripotency. *BMC Biol.* *8*, 125.
- Bourillot, P.-Y., Aksoy, I., Schreiber, V., Wianny, F., Schulz, H., Hummel, O., Hubner, N., and Savatier, P. (2009). Novel STAT3 target genes exert distinct roles in the inhibition of mesoderm and endoderm differentiation in cooperation with Nanog. *Stem Cells Dayt. Ohio* *27*, 1760–1771.
- Boveri T (1892). Ueber die Entstehung des Gegensatzes zwischen den Geschlechtszellen und den somatischen Zellen bei *Ascaris megalocephala*, nebst Bemerkungen zur Entwicklungsgeschichte der Nematoden. *Sitzungsberichte der Gesellschaft für Morphologie und Physiologie in München.*
- Boyer, L.A., Lee, T.I., Cole, M.F., Johnstone, S.E., Levine, S.S., Zucker, J.P., Guenther, M.G., Kumar, R.M., Murray, H.L., Jenner, R.G., et al. (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* *122*, 947–956.
- Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M.H., and Robertson, E. (1984). Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* *309*, 255–256.
- Briggs, R., and King, T.J. (1952). Transplantation of Living Nuclei From Blastula Cells into Enucleated Frogs' Eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *38*, 455–463.
- Brinsden, P.R., Alam, V., de Moustier, B., and Engrand, P. (2009). Recombinant human leukemia inhibitory factor does not improve implantation and pregnancy outcomes after assisted reproductive techniques in women with recurrent unexplained implantation failure. *Fertil. Steril.* *91*, 1445–1447.

- Brinster, R.L. (1974). The effect of cells transferred into the mouse blastocyst on subsequent development. *J. Exp. Med.* *140*, 1049–1056.
- Brons, I.G.M., Smithers, L.E., Trotter, M.W.B., Rugg-Gunn, P., Sun, B., Chuva de Sousa Lopes, S.M., Howlett, S.K., Clarkson, A., Ahrlund-Richter, L., Pedersen, R.A., et al. (2007). Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* *448*, 191–195.
- Brook, F.A., and Gardner, R.L. (1997). The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 5709–5712.
- Buecker, C., Chen, H.-H., Polo, J.M., Daheron, L., Bu, L., Barakat, T.S., Okwieka, P., Porter, A., Gribnau, J., Hochedlinger, K., et al. (2010). A murine ESC-like state facilitates transgenesis and homologous recombination in human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* *6*, 535–546.
- Buehr, M., and Smith, A. (2003). Genesis of embryonic stem cells. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* *358*, 1397–1402; discussion 1402.
- Buehr, M., Nichols, J., Stenhouse, F., Mountford, P., Greenhalgh, C.J., Kantachuvesiri, S., Brooker, G., Mullins, J., and Smith, A.G. (2003). Rapid loss of Oct-4 and pluripotency in cultured rodent blastocysts and derivative cell lines. *Biol. Reprod.* *68*, 222–229.
- Buehr, M., Meek, S., Blair, K., Yang, J., Ure, J., Silva, J., McLay, R., Hall, J., Ying, Q.-L., and Smith, A. (2008). Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts. *Cell* *135*, 1287–1298.
- Bugga, L., Gadiant, R.A., Kwan, K., Stewart, C.L., and Patterson, P.H. (1998). Analysis of neuronal and glial phenotypes in brains of mice deficient in leukemia inhibitory factor. *J. Neurobiol.* *36*, 509–524.
- Burdon, T., Stracey, C., Chambers, I., Nichols, J., and Smith, A. (1999). Suppression of SHP-2 and ERK signalling promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells. *Dev. Biol.* *210*, 30–43.
- Burdon, T., Smith, A., and Savatier, P. (2002). Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. *Trends Cell Biol.* *12*, 432–438.
- Burgess, R.J., Agathocleous, M., and Morrison, S.J. (2014). Metabolic regulation of stem cell function. *J. Intern. Med.* *276*, 12–24.
- Cadigan, K.M., and Liu, Y.I. (2006). Wnt signaling: complexity at the surface. *J. Cell Sci.* *119*, 395–402.
- Capecci, M.R. (2005). Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. *Nat. Rev. Genet.* *6*, 507–512.
- Carballada, R., Yasuo, H., and Lemaire, P. (2001). Phosphatidylinositol-3 kinase acts in parallel to the ERK MAP kinase in the FGF pathway during *Xenopus* mesoderm induction. *Dev. Camb. Engl.* *128*, 35–44.
- Cartwright, P., McLean, C., Sheppard, A., Rivett, D., Jones, K., and Dalton, S. (2005). LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Dev. Camb. Engl.* *132*, 885–896.
- Casteilla, L., Planat-Benard, V., Bourin, P., Laharrague, P., and Cousin, B. (2011). [Use of adipose tissue in regenerative medicine]. *Transfus. Clin. Biol. J. Société Fr. Transfus. Sang.* *18*, 124–128.
- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., and Smith, A. (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* *113*, 643–655.
- Chambers, I., Silva, J., Colby, D., Nichols, J., Nijmeijer, B., Robertson, M., Vrana, J., Jones, K., Grotewold, L., and Smith, A. (2007). Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature* *450*, 1230–1234.
- Chandra, P., and Lee, S.J. (2015). Synthetic Extracellular Microenvironment for Modulating Stem Cell Behaviors. *Biomark. Insights* *10*, 105–116.
- Chang, K.-H., and Li, M. (2013). Clonal isolation of an intermediate pluripotent stem cell state. *Stem Cells Dayt. Ohio* *31*, 918–927.

- Chen, D., Sun, Y., Wei, Y., Zhang, P., Rezaeian, A.H., Teruya-Feldstein, J., Gupta, S., Liang, H., Lin, H.-K., Hung, M.-C., et al. (2012). LIFR is a breast cancer metastasis suppressor upstream of the Hippo-YAP pathway and a prognostic marker. *Nat. Med.* *18*, 1511–1517.
- Chen, H., Aksoy, I., Gonnot, F., Osteil, P., Aubry, M., Hamela, C., Rognard, C., Hochard, A., Voisin, S., Fontaine, E., et al. (2015). Reinforcement of STAT3 activity reprogrammes human embryonic stem cells to naive-like pluripotency. *Nat. Commun.* *6*, 7095.
- Chen, J.R., Cheng, J.G., Shatzer, T., Sewell, L., Hernandez, L., and Stewart, C.L. (2000). Leukemia inhibitory factor can substitute for nidatory estrogen and is essential to inducing a receptive uterus for implantation but is not essential for subsequent embryogenesis. *Endocrinology* *141*, 4365–4372.
- Chen, P.-S., Shih, Y.-W., Huang, H.-C., and Cheng, H.-W. (2011). Diosgenin, a steroidal saponin, inhibits migration and invasion of human prostate cancer PC-3 cells by reducing matrix metalloproteinases expression. *PLoS One* *6*, e20164.
- Chen, S., Do, J.T., Zhang, Q., Yao, S., Yan, F., Peters, E.C., Schöler, H.R., Schultz, P.G., and Ding, S. (2006). Self-renewal of embryonic stem cells by a small molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 17266–17271.
- Chen, X., Xu, H., Yuan, P., Fang, F., Huss, M., Vega, V.B., Wong, E., Orlov, Y.L., Zhang, W., Jiang, J., et al. (2008). Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells. *Cell* *133*, 1106–1117.
- Cheung, A.M.S., Wan, T.S.K., Leung, J.C.K., Chan, L.Y.Y., Huang, H., Kwong, Y.L., Liang, R., and Leung, A.Y.H. (2007). Aldehyde dehydrogenase activity in leukemic blasts defines a subgroup of acute myeloid leukemia with adverse prognosis and superior NOD/SCID engrafting potential. *Leukemia* *21*, 1423–1430.
- Chow, D., Ho, J., Nguyen Pham, T.L., Rose-John, S., and Garcia, K.C. (2001). In vitro reconstitution of recognition and activation complexes between interleukin-6 and gp130. *Biochemistry (Mosc.)* *40*, 7593–7603.
- Chung, B.M., Kang, H.C., Han, S.Y., Heo, H.S., Lee, J.J., Jeon, J., Lim, J.Y., Shin, I., Hong, S.H., Cho, Y.S., et al. (2006). Jak2 and Tyk2 are necessary for lineage-specific differentiation, but not for the maintenance of self-renewal of mouse embryonic stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *351*, 682–688.
- Chung, C.D., Liao, J., Liu, B., Rao, X., Jay, P., Berta, P., and Shuai, K. (1997). Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science* *278*, 1803–1805.
- Cinelli, P., Casanova, E.A., Uhlig, S., Lochmatter, P., Matsuda, T., Yokota, T., Rüllicke, T., Ledermann, B., and Bürki, K. (2008). Expression profiling in transgenic FVB/N embryonic stem cells overexpressing STAT3. *BMC Dev. Biol.* *8*, 57.
- Cockburn, K., and Rossant, J. (2010). Making the blastocyst: lessons from the mouse. *J. Clin. Invest.* *120*, 995–1003.
- Collins, A.T., Berry, P.A., Hyde, C., Stower, M.J., and Maitland, N.J. (2005). Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res.* *65*, 10946–10951.
- Coronado, D., Godet, M., Bourillot, P.-Y., Tapponnier, Y., Bernat, A., Petit, M., Afanassieff, M., Markossian, S., Malashicheva, A., Iacone, R., et al. (2013). A short G1 phase is an intrinsic determinant of naïve embryonic stem cell pluripotency. *Stem Cell Res.* *10*, 118–131.
- Coulombel, L. (2003a). [Adult stem cells: seing is not being]. *Médecine Sci. MS* *19*, 683–694.
- Coulombel, L. (2003b). [Adult tissue stem cells: definition, identification and therapeutic use]. *Journ. Annu. Diabétologie Hôtel-Dieu* 1–16.
- Coulombel, L. (2009). [Pluripotency: defining standards]. *Médecine Sci. MS* *25*, 798–801.
- Covello, K.L., Kehler, J., Yu, H., Gordan, J.D., Arsham, A.M., Hu, C.-J., Labosky, P.A., Simon, M.C., and Keith, B. (2006). HIF-2 $\alpha$  regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes Dev.* *20*, 557–570.

- Croy, B.A., Guilbert, L.J., Browne, M.A., Gough, N.M., Stinchcomb, D.T., Reed, N., and Wegmann, T.G. (1991). Characterization of cytokine production by the metrial gland and granulated metrial gland cells. *J. Reprod. Immunol.* *19*, 149–166.
- Cui, S., and Selwood, L. (2000). cDNA cloning, characterization, expression and recombinant protein production of leukemia inhibitory factor (LIF) from the marsupial, the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*). *Gene* *243*, 167–178.
- Dahéron, L., Opitz, S.L., Zaehres, H., Lensch, M.W., Lensch, W.M., Andrews, P.W., Itskovitz-Eldor, J., and Daley, G.Q. (2004). LIF/STAT3 signaling fails to maintain self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* *22*, 770–778.
- Davies, O.R., Lin, C.-Y., Radziszewska, A., Zhou, X., Taube, J., Blin, G., Waterhouse, A., Smith, A.J.H., and Lowell, S. (2013). Tcf15 primes pluripotent cells for differentiation. *Cell Rep.* *3*, 472–484.
- Davy, P., and Allsopp, R. (2011). Hypoxia: are stem cells in it for the long run? *Cell Cycle Georget. Tex* *10*, 206–211.
- Deverman, B.E., and Patterson, P.H. (2012). Exogenous leukemia inhibitory factor stimulates oligodendrocyte progenitor cell proliferation and enhances hippocampal remyelination. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *32*, 2100–2109.
- Dick, J.E. (2008). Stem cell concepts renew cancer research. *Blood* *112*, 4793–4807.
- Dimitriadis, E., Sharkey, A.M., Tan, Y.L., Salamonsen, L.A., and Sherwin, J.R.A. (2007). Immunolocalisation of phosphorylated STAT3, interleukin 11 and leukaemia inhibitory factor in endometrium of women with unexplained infertility during the implantation window. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* *5*, 44.
- Discher, D.E., Mooney, D.J., and Zandstra, P.W. (2009). Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science* *324*, 1673–1677.
- Diwan, S.B., and Stevens, L.C. (1976). Development of teratomas from the ectoderm of mouse egg cylinders. *J. Natl. Cancer Inst.* *57*, 937–942.
- Dixon, F.J., and Moore, R.A. (1953). Testicular tumors. A clinicopathological study. *Cancer* *6*, 427–454.
- Doetschman, T., Maeda, N., and Smithies, O. (1988). Targeted mutation of the Hprt gene in mouse embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *85*, 8583–8587.
- Doulatov, S., Vo, L.T., Chou, S.S., Kim, P.G., Arora, N., Li, H., Hadland, B.K., Bernstein, I.D., Collins, J.J., Zon, L.I., et al. (2013). Induction of multipotential hematopoietic progenitors from human pluripotent stem cells via respecification of lineage-restricted precursors. *Cell Stem Cell* *13*, 459–470.
- Dromard, C., Bourin, P., André, M., De Barros, S., Casteilla, L., and Planat-Benard, V. (2011). Human adipose derived stroma/stem cells grow in serum-free medium as floating spheres. *Exp. Cell Res.* *317*, 770–780.
- Dunn, S.-J., Martello, G., Yordanov, B., Emmott, S., and Smith, A.G. (2014). Defining an essential transcription factor program for naïve pluripotency. *Science* *344*, 1156–1160.
- Duval, D., Reinhardt, B., Kedinger, C., and Boeuf, H. (2000). Role of suppressors of cytokine signaling (Socs) in leukemia inhibitory factor (LIF) -dependent embryonic stem cell survival. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *14*, 1577–1584.
- Duval, D., Malaisé, M., Reinhardt, B., Kedinger, C., and Boeuf, H. (2004). A p38 inhibitor allows to dissociate differentiation and apoptotic processes triggered upon LIF withdrawal in mouse embryonic stem cells. *Cell Death Differ.* *11*, 331–341.
- Duval, D., Trouillas, M., Thibault, C., Dembelé, D., Diemunsch, F., Reinhardt, B., Mertz, A.L., Dierich, A., and Boeuf, H. (2006). Apoptosis and differentiation commitment: novel insights revealed by gene profiling studies in mouse embryonic stem cells. *Cell Death Differ.* *13*, 564–575.

- Egeblad, M., and Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer* 2, 161–174.
- Ema, M., Mori, D., Niwa, H., Hasegawa, Y., Yamanaka, Y., Hitoshi, S., Mimura, J., Kawabe, Y., Hosoya, T., Morita, M., et al. (2008). Krüppel-like factor 5 is essential for blastocyst development and the normal self-renewal of mouse ESCs. *Cell Stem Cell* 3, 555–567.
- Encinas, J.M., Vazquez, M.E., Switzer, R.C., Chamberland, D.W., Nick, H., Levine, H.G., Scarpa, P.J., Enikolopov, G., and Steindler, D.A. (2008). Quiescent adult neural stem cells are exceptionally sensitive to cosmic radiation. *Exp. Neurol.* 210, 274–279.
- Ernst, M., Oates, A., and Dunn, A.R. (1996). Gp130-mediated signal transduction in embryonic stem cells involves activation of Jak and Ras/mitogen-activated protein kinase pathways. *J. Biol. Chem.* 271, 30136–30143.
- Ernst Heinrich Philipp August Haeckel (1877). *Anthropogenie, oder, Entwicklungsgeschichte des Menschen: Gemeinverständliche wissenschaftliche ...* (W. Engelmann).
- Escary, J.L., Perreau, J., Duménil, D., Ezine, S., and Brûlet, P. (1993). Leukaemia inhibitory factor is necessary for maintenance of haematopoietic stem cells and thymocyte stimulation. *Nature* 363, 361–364.
- Evans, M.J., and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154–156.
- Evans, M.J., Bradley, A., Kuehn, M.R., and Robertson, E.J. (1985). The ability of EK cells to form chimeras after selection of clones in G418 and some observations on the integration of retroviral vector proviral DNA into EK cells. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 50, 685–689.
- Fábián, Á., Vereb, G., and Szöllösi, J. (2013). The hitchhikers guide to cancer stem cell theory: markers, pathways and therapy. *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.* 83, 62–71.
- Faddah, D.A., Wang, H., Cheng, A.W., Katz, Y., Buganim, Y., and Jaenisch, R. (2013). Single-cell analysis reveals that expression of nanog is biallelic and equally variable as that of other pluripotency factors in mouse ESCs. *Cell Stem Cell* 13, 23–29.
- Falco, G., Lee, S.-L., Stanghellini, I., Bassey, U.C., Hamatani, T., and Ko, M.S.H. (2007). Zscan4: a novel gene expressed exclusively in late 2-cell embryos and embryonic stem cells. *Dev. Biol.* 307, 539–550.
- Fandrey, J., Gorr, T.A., and Gassmann, M. (2006). Regulating cellular oxygen sensing by hydroxylation. *Cardiovasc. Res.* 71, 642–651.
- Fang, D., Nguyen, T.K., Leishear, K., Finko, R., Kulp, A.N., Hotz, S., Van Belle, P.A., Xu, X., Elder, D.E., and Herlyn, M. (2005). A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res.* 65, 9328–9337.
- Feldman, B., Poueymirou, W., Papaioannou, V.E., DeChiara, T.M., and Goldfarb, M. (1995). Requirement of FGF-4 for postimplantation mouse development. *Science* 267, 246–249.
- Feng, B., Jiang, J., Kraus, P., Ng, J.-H., Heng, J.-C.D., Chan, Y.-S., Yaw, L.-P., Zhang, W., Loh, Y.-H., Han, J., et al. (2009). Reprogramming of fibroblasts into induced pluripotent stem cells with orphan nuclear receptor Esrrb. *Nat. Cell Biol.* 11, 197–203.
- Fernandes, TG, et al (2010). Different stages of pluripotency determine distinct patterns of proliferation, metabolism, and lineage commitment of embryonic stem cells under hypoxia. *Stem Cell Res.*, 5, 76-89.
- Festuccia, N., Osorno, R., Halbritter, F., Karwacki-Neisius, V., Navarro, P., Colby, D., Wong, F., Yates, A., Tomlinson, S.R., and Chambers, I. (2012). Esrrb is a direct Nanog target gene that can substitute for Nanog function in pluripotent cells. *Cell Stem Cell* 11, 477–490.
- Filipczyk, A., Gkatzis, K., Fu, J., Hoppe, P.S., Lickert, H., Anastassiadis, K., and Schroeder, T. (2013). Biallelic expression of nanog protein in mouse embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 13, 12–13.
- Folkman, J., Hahnfeltd, P., and Hlatky, L. (2000). Cancer: looking outside the genome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 76–79.

- Forrai, A., Boyle, K., Hart, A.H., Hartley, L., Rakar, S., Willson, T.A., Simpson, K.M., Roberts, A.W., Alexander, W.S., Voss, A.K., et al. (2006). Absence of suppressor of cytokine signalling 3 reduces self-renewal and promotes differentiation in murine embryonic stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 24, 604–614.
- Forristal, C.E., Wright, K.L., Hanley, N.A., Oreffo, R.O.C., and Houghton, F.D. (2010). Hypoxia inducible factors regulate pluripotency and proliferation in human embryonic stem cells cultured at reduced oxygen tensions. *Reprod. Camb. Engl.* 139, 85–97.
- Francis, N.J., Kingston, R.E., and Woodcock, C.L. (2004). Chromatin compaction by a polycomb group protein complex. *Science* 306, 1574–1577.
- Frank, N.Y., Schatton, T., and Frank, M.H. (2010). The therapeutic promise of the cancer stem cell concept. *J. Clin. Invest.* 120, 41–50.
- Fuchs, E., Tumber, T., and Guasch, G. (2004). Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell* 116, 769–778.
- Fukuda, R., Zhang, H., Kim, J., Shimoda, L., Dang, C.V., and Semenza, G.L. (2007). HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell* 129, 111–122.
- Furqan, M., Mukhi, N., Lee, B., and Liu, D. (2013). Dysregulation of JAK-STAT pathway in hematological malignancies and JAK inhibitors for clinical application. *Biomark. Res.* 1, 5.
- Furusawa, T., Ohkoshi, K., Honda, C., Takahashi, S., and Tokunaga, T. (2004). Embryonic stem cells expressing both platelet endothelial cell adhesion molecule-1 and stage-specific embryonic antigen-1 differentiate predominantly into epiblast cells in a chimeric embryo. *Biol. Reprod.* 70, 1452–1457.
- Gardner, R.L. (1982). Investigation of cell lineage and differentiation in the extraembryonic endoderm of the mouse embryo. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 68, 175–198.
- Gardner, L.B., Li, Q., Park, M.S., Flanagan, W.M., Semenza, G.L., and Dang, C.V. (2001). Hypoxia inhibits G1/S transition through regulation of p27 expression. *J. Biol. Chem.* 276, 7919–7926.
- Garter 2008 An in situ hybridization-based screen for heterogeneously expressed genes in mouse ES cells.
- Gascan, H., Godard, A., Ferenz, C., Nault, J., Praloran, V., Peyrat, M.A., Hewick, R., Jacques, Y., Moreau, J.F., and Soulillou, J.P. (1989). Characterization and NH<sub>2</sub>-terminal amino acid sequence of natural human interleukin for DA cells: leukemia inhibitory factor. Differentiation inhibitory activity secreted by a T lymphoma cell line. *J. Biol. Chem.* 264, 21509–21515.
- Gatenby, R.A., and Gillies, R.J. (2004). Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat. Rev. Cancer* 4, 891–899.
- Gearing, D.P., Thut, C.J., VandeBos, T., Gimpel, S.D., Delaney, P.B., King, J., Price, V., Cosman, D., and Beckmann, M.P. (1991). Leukemia inhibitory factor receptor is structurally related to the IL-6 signal transducer, gp130. *EMBO J.* 10, 2839–2848.
- Gearing, D.P., Comeau, M.R., Friend, D.J., Gimpel, S.D., Thut, C.J., McGourty, J., Brasher, K.K., King, J.A., Gillis, S., and Mosley, B. (1992). The IL-6 signal transducer, gp130: an oncostatin M receptor and affinity converter for the LIF receptor. *Science* 255, 1434–1437.
- Gerami-Naini, B., Dovzhenko, O.V., Durning, M., Wegner, F.H., Thomson, J.A., and Golos, T.G. (2004). Trophoblast differentiation in embryoid bodies derived from human embryonic stem cells. *Endocrinology* 145, 1517–1524.
- Ginestier, C., Hur, M.H., Charafe-Jauffret, E., Monville, F., Dutcher, J., Brown, M., Jacquemier, J., Viens, P., Kleer, C.G., Liu, S., et al. (2007). ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* 1, 555–567.
- Godard, A., Gascan, H., Nault, J., Peyrat, M.A., Jacques, Y., Soulillou, J.P., and Moreau, J.F. (1988). Biochemical characterization and purification of HILDA, a human lymphokine active on eosinophils and bone marrow cells. *Blood* 71, 1618–1623.

- Gonzalez, R., Lee, J.W., Snyder, E.Y., and Schultz, P.G. (2011). Dorsomorphin promotes human embryonic stem cell self-renewal. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* *50*, 3439–3441.
- González-Arriaga, P., Pascual, T., García-Alvarez, A., Fernández-Somoano, A., López-Cima, M.F., and Tardón, A. (2012). Genetic polymorphisms in MMP 2, 9 and 3 genes modify lung cancer risk and survival. *BMC Cancer* *12*, 121.
- Gonzalez-Cordero, A., West, E.L., Pearson, R.A., Duran, Y., Carvalho, L.S., Chu, C.J., Naeem, A., Blackford, S.J.I., Georgiadis, A., Lakowski, J., et al. (2013). Photoreceptor precursors derived from three-dimensional embryonic stem cell cultures integrate and mature within adult degenerate retina. *Nat. Biotechnol.* *31*, 741–747.
- Gordan, J.D., Bertout, J.A., Hu, C.-J., Diehl, J.A., and Simon, M.C. (2007). HIF-2 $\alpha$  promotes hypoxic cell proliferation by enhancing c-myc transcriptional activity. *Cancer Cell* *11*, 335–347.
- Gough, N.M., Gearing, D.P., King, J.A., Willson, T.A., Hilton, D.J., Nicola, N.A., and Metcalf, D. (1988). Molecular cloning and expression of the human homologue of the murine gene encoding myeloid leukemia-inhibitory factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *85*, 2623–2627.
- Graf, U., Casanova, E.A., and Cinelli, P. (2011). The Role of the Leukemia Inhibitory Factor (LIF) - Pathway in Derivation and Maintenance of Murine Pluripotent Stem Cells. *Genes* *2*, 280–297.
- Greber, B., Wu, G., Bernemann, C., Joo, J.Y., Han, D.W., Ko, K., Tapia, N., Sabour, D., Sternecker, J., Tesar, P., et al. (2010). Conserved and divergent roles of FGF signaling in mouse epiblast stem cells and human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* *6*, 215–226.
- Grinnell, J. (1917). The Niche-Relationships of the California Thrasher (The Auk).
- Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P.G., and Shi, S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 13625–13630.
- Grün, D., Kester, L., and van Oudenaarden, A. (2014). Validation of noise models for single-cell transcriptomics. *Nat. Methods* *11*, 637–640.
- Guan, K., Nayernia, K., Maier, L.S., Wagner, S., Dressel, R., Lee, J.H., Nolte, J., Wolf, F., Li, M., Engel, W., et al. (2006). Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature* *440*, 1199–1203.
- Guo, G., Yang, J., Nichols, J., Hall, J.S., Eyres, I., Mansfield, W., and Smith, A. (2009). Klf4 reverts developmentally programmed restriction of ground state pluripotency. *Dev. Camb. Engl.* *136*, 1063–1069.
- Gupta, R., Vyas, P., and Enver, T. (2009). Molecular targeting of cancer stem cells. *Cell Stem Cell* *5*, 125–126.
- Gurdon, J.B., and Byrne, J.A. (2003). The first half-century of nuclear transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 8048–8052.
- Häcker, V. (1892). Die Kerntheilungsvorgänge bei der Mesoderm und Entodermbildung von Cyclops. *Arch. Für Mikrosk. Anat.* *39*, 556–581.
- Haeckel, E.H.P.A. (1868). *Natürliche Schöpfungsgeschichte. Gemeinverständliche wissenschaftliche Vorträge über die Entwicklungslehre im Allgemeinen und diejenige von Darwin, Goethe, und Lamarck im Besonderen ..* (Berlin : Reimer).
- Hafner, A.-L., and Dani, C. (2014). Human induced pluripotent stem cells: A new source for brown and white adipocytes. *World J. Stem Cells* *6*, 467–472.
- Haines, B.P., Voyle, R.B., Pelton, T.A., Forrest, R., and Rathjen, P.D. (1999). Complex conserved organization of the mammalian leukemia inhibitory factor gene: regulated expression of intracellular and extracellular cytokines. *J. Immunol. Baltim. Md* *162*, 4637–4646.
- Hall, J., Guo, G., Wray, J., Eyres, I., Nichols, J., Grotewold, L., Morfopoulou, S., Humphreys, P., Mansfield, W., Walker, R., et al. (2009). Oct4 and LIF/Stat3 additively induce Krüppel factors to sustain embryonic stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell* *5*, 597–609.

- Hall, L.L., Byron, M., Butler, J., Becker, K.A., Nelson, A., Amit, M., Itskovitz-Eldor, J., Stein, J., Stein, G., Ware, C., et al. (2008). X-inactivation reveals epigenetic anomalies in most hESC but identifies sublines that initiate as expected. *J. Cell. Physiol.* 216, 445–452.
- Handyside, A.H., Pattinson, J.K., Penketh, R.J., Delhanty, J.D., Winston, R.M., and Tuddenham, E.G. (1989). Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification. *Lancet Lond. Engl.* 1, 347–349.
- Hanna, J., Wernig, M., Markoulaki, S., Sun, C.-W., Meissner, A., Cassady, J.P., Beard, C., Brambrink, T., Wu, L.-C., Townes, T.M., et al. (2007). Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science* 318, 1920–1923.
- Hanna, J., Markoulaki, S., Mitalipova, M., Cheng, A.W., Cassady, J.P., Staerk, J., Carey, B.W., Lengner, C.J., Foreman, R., Love, J., et al. (2009). Metastable pluripotent states in NOD-mouse-derived ESCs. *Cell Stem Cell* 4, 513–524.
- Hayashi, K., Lopes, S.M.C. de S., Tang, F., and Surani, M.A. (2008). Dynamic equilibrium and heterogeneity of mouse pluripotent stem cells with distinct functional and epigenetic states. *Cell Stem Cell* 3, 391–401.
- Heinrich, P.C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H.M., Müller-Newen, G., and Schaper, F. (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem. J.* 374, 1–20.
- Herberg, M., Kalkan, T., Glauche, I., Smith, A., and Roeder, I. (2014). A Model-Based Analysis of Culture-Dependent Phenotypes of mESCs. *PLoS ONE* 9, e92496.
- Hervé Ratel (2012). Infographie: les quatre types de cellules souches. *Sci. Avenir* 2615–2619.
- Hewitson, K.S., McNeill, L.A., Riordan, M.V., Tian, Y.-M., Bullock, A.N., Welford, R.W., Elkins, J.M., Oldham, N.J., Bhattacharya, S., Gleadle, J.M., et al. (2002). Hypoxia-inducible factor (HIF) asparagine hydroxylase is identical to factor inhibiting HIF (FIH) and is related to the cupin structural family. *J. Biol. Chem.* 277, 26351–26355.
- Hilton, D.J. (1999). Negative regulators of cytokine signal transduction. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 55, 1568–1577.
- Hilton, D.J., Nicola, N.A., Gough, N.M., and Metcalf, D. (1988). Resolution and purification of three distinct factors produced by Krebs ascites cells which have differentiation-inducing activity on murine myeloid leukemic cell lines. *J. Biol. Chem.* 263, 9238–9243.
- Hodge, R.D., Kowalczyk, T.D., Wolf, S.A., Encinas, J.M., Rippey, C., Enikolopov, G., Kempermann, G., and Hevner, R.F. (2008). Intermediate progenitors in adult hippocampal neurogenesis: Tbr2 expression and coordinate regulation of neuronal output. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 3707–3717.
- Holtmann, B., Wiese, S., Samsam, M., Grohmann, K., Pennica, D., Martini, R., and Sendtner, M. (2005). Triple knock-out of CNTF, LIF, and CT-1 defines cooperative and distinct roles of these neurotrophic factors for motoneuron maintenance and function. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 1778–1787.
- Hu, C.-J., Wang, L.-Y., Chodosh, L.A., Keith, B., and Simon, M.C. (2003). Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation. *Mol. Cell. Biol.* 23, 9361–9374.
- Hu, C.-J., Iyer, S., Sataur, A., Covelto, K.L., Chodosh, L.A., and Simon, M.C. (2006). Differential regulation of the transcriptional activities of hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in stem cells. *Mol. Cell. Biol.* 26, 3514–3526.
- Huang, Y., Osorno, R., Tsakiridis, A., and Wilson, V. (2012). In Vivo differentiation potential of epiblast stem cells revealed by chimeric embryo formation. *Cell Rep.* 2, 1571–1578.
- Humphrey, R.K., Beattie, G.M., Lopez, A.D., Bucay, N., King, C.C., Firpo, M.T., Rose-John, S., and Hayek, A. (2004). Maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells is STAT3 independent. *Stem Cells Dayt. Ohio* 22, 522–530.

- Ichikawa, Y. (1969). Differentiation of a cell line of myeloid leukemia. *J. Cell. Physiol.* *74*, 223–234.
- Ihle, J.N., and Kerr, I.M. (1995). Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet. TIG* *11*, 69–74.
- Ishibashi, T., Lee, P.R., Baba, H., and Fields, R.D. (2009). Leukemia inhibitory factor regulates the timing of oligodendrocyte development and myelination in the postnatal optic nerve. *J. Neurosci. Res.* *87*, 3343–3355.
- Ito, K., and Suda, T. (2014). Metabolic requirements for the maintenance of self-renewing stem cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 243–256.
- Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J.M., Lane, W.S., and Kaelin, W.G. (2001). HIF $\alpha$  targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing. *Science* *292*, 464–468.
- Ivanovic, Z. (2009). Hypoxia or in situ normoxia: The stem cell paradigm. *J. Cell. Physiol.* *219*, 271–275.
- James, D., Levine, A.J., Besser, D., and Hemmati-Brivanlou, A. (2005). TGF $\beta$ /activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Dev. Camb. Engl.* *132*, 1273–1282.
- Jang, H., Kim, T.W., Yoon, S., Choi, S.-Y., Kang, T.-W., Kim, S.-Y., Kwon, Y.-W., Cho, E.-J., and Youn, H.-D. (2012). O-GlcNAc regulates pluripotency and reprogramming by directly acting on core components of the pluripotency network. *Cell Stem Cell* *11*, 62–74.
- Jeong, C.-H., Lee, H.-J., Cha, J.-H., Kim, J.H., Kim, K.R., Kim, J.-H., Yoon, D.-K., and Kim, K.-W. (2007). Hypoxia-inducible Factor-1 $\alpha$  Inhibits Self-renewal of Mouse Embryonic Stem Cells in Vitro via Negative Regulation of the Leukemia Inhibitory Factor-STAT3 Pathway. *J. Biol. Chem.* *282*, 13672–13679.
- Jiang, J., and Papoutsakis, E.T. (2013). Stem-cell niche based comparative analysis of chemical and nano-mechanical material properties impacting ex vivo expansion and differentiation of hematopoietic and mesenchymal stem cells. *Adv. Healthc. Mater.* *2*, 25–42.
- Jiang, J., Chan, Y.-S., Loh, Y.-H., Cai, J., Tong, G.-Q., Lim, C.-A., Robson, P., Zhong, S., and Ng, H.-H. (2008). A core Klf circuitry regulates self-renewal of embryonic stem cells. *Nat. Cell Biol.* *10*, 353–360.
- Jirmanova, L., Afanassieff, M., Gobert-Gosse, S., Markossian, S., and Savatier, P. (2002). Differential contributions of ERK and PI3-kinase to the regulation of cyclin D1 expression and to the control of the G1/S transition in mouse embryonic stem cells. *Oncogene* *21*, 5515–5528.
- Joo, J.Y., Choi, H.W., Kim, M.J., Zaehres, H., Tapia, N., Stehling, M., Jung, K.S., Do, J.T., and Schöler, H.R. (2014). Establishment of a primed pluripotent epiblast stem cell in FGF4-based conditions. *Sci. Rep.* *4*, 7477.
- Jouneau, A., Ciaudo, C., Sismeiro, O., Brochard, V., Jouneau, L., Vandormael-Pournin, S., Coppée, J.-Y., Zhou, Q., Heard, E., Antoniewski, C., et al. (2012). Naive and primed murine pluripotent stem cells have distinct miRNA expression profiles. *RNA N. Y. N* *18*, 253–264.
- Kalkan, T., and Smith, A. (2014). Mapping the route from naive pluripotency to lineage specification. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* *369*.
- Kallio, P.J., Wilson, W.J., O'Brien, S., Makino, Y., and Poellinger, L. (1999). Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1 $\alpha$  by the ubiquitin-proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* *274*, 6519–6525.
- Kalmar, T., Lim, C., Hayward, P., Muñoz-Descalzo, S., Nichols, J., Garcia-Ojalvo, J., and Martinez Arias, A. (2009). Regulated fluctuations in nanog expression mediate cell fate decisions in embryonic stem cells. *PLoS Biol.* *7*, e1000149.
- Kaltz, N., Ringe, J., Holzwarth, C., Charbord, P., Niemeyer, M., Jacobs, V.R., Peschel, C., Häupl, T., and Oostendorp, R.A.J. (2010). Novel markers of mesenchymal stem cells defined by genome-

- wide gene expression analysis of stromal cells from different sources. *Exp. Cell Res.* 316, 2609–2617.
- Kapinas, K., Grandy, R., Ghule, P., Medina, R., Becker, K., Pardee, A., Zaidi, S.K., Lian, J., Stein, J., van Wijnen, A., et al. (2013). The abbreviated pluripotent cell cycle. *J. Cell. Physiol.* 228, 9–20.
- Karwacki-Neisius, V., Göke, J., Osorno, R., Halbritter, F., Ng, J.H., Weiße, A.Y., Wong, F.C.K., Gagliardi, A., Mullin, N.P., Festuccia, N., et al. (2013). Reduced Oct4 expression directs a robust pluripotent state with distinct signaling activity and increased enhancer occupancy by Oct4 and Nanog. *Cell Stem Cell* 12, 531–545.
- Keramari, M., Razavi, J., Ingman, K.A., Patsch, C., Edenhofer, F., Ward, C.M., and Kimber, S.J. (2010). Sox2 is essential for formation of trophectoderm in the preimplantation embryo. *PLoS One* 5, e13952.
- Kieffer, E., Kuntz, S., and Viville, S. (2010). [An overview of pluripotent stem cell lines]. *Médecine Sci.* MS 26, 848–854.
- Kimura, C., Shen, M.M., Takeda, N., Aizawa, S., and Matsuo, I. (2001). Complementary functions of Otx2 and Cripto in initial patterning of mouse epiblast. *Dev. Biol.* 235, 12–32.
- Kiyonari, H., Kaneko, M., Abe, S., and Aizawa, S. (2010). Three inhibitors of FGF receptor, ERK, and GSK3 establishes germline-competent embryonic stem cells of C57BL/6N mouse strain with high efficiency and stability. *Genes. N. Y. N* 2000 48, 317–327.
- Kleinsmith, L.J., and Pierce, G.B. (1964). MULTIPOTENTIALITY OF SINGLE EMBRYONAL CARCINOMA CELLS. *Cancer Res.* 24, 1544–1551.
- Kojima, Y., Kaufman-Francis, K., Studdert, J.B., Steiner, K.A., Power, M.D., Loebel, D.A.F., Jones, V., Hor, A., de Alencastro, G., Logan, G.J., et al. (2014). The transcriptional and functional properties of mouse epiblast stem cells resemble the anterior primitive streak. *Cell Stem Cell* 14, 107–120.
- Koller, B.H., Hagemann, L.J., Doetschman, T., Hageman, J.R., Huang, S., Williams, P.J., First, N.L., Maeda, N., and Smithies, O. (1989). Germ-line transmission of a planned alteration made in a hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene by homologous recombination in embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 8927–8931.
- Koopman, P., and Cotton, R.G. (1984). A factor produced by feeder cells which inhibits embryonal carcinoma cell differentiation. Characterization and partial purification. *Exp. Cell Res.* 154, 233–242.
- Kopp, J.L., Ormsbee, B.D., Desler, M., and Rizzino, A. (2008). Small increases in the level of Sox2 trigger the differentiation of mouse embryonic stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 26, 903–911.
- Koshiji, M., Kageyama, Y., Pete, E.A., Horikawa, I., Barrett, J.C., and Huang, L.E. (2004). HIF-1 $\alpha$  induces cell cycle arrest by functionally counteracting Myc. *EMBO J.* 23, 1949–1956.
- Kotaja, N., Karvonen, U., Jänne, O.A., and Palvimo, J.J. (2002). PIAS proteins modulate transcription factors by functioning as SUMO-1 ligases. *Mol. Cell. Biol.* 22, 5222–5234.
- Krebs, D.L., and Hilton, D.J. (2000). SOCS: physiological suppressors of cytokine signaling. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 16), 2813–2819.
- Kuijk, E.W., van Tol, L.T.A., Van de Velde, H., Wubbolts, R., Welling, M., Geijsen, N., and Roelen, B.A.J. (2012). The roles of FGF and MAP kinase signaling in the segregation of the epiblast and hypoblast cell lineages in bovine and human embryos. *Dev. Camb. Engl.* 139, 871–882.
- Kunath, T., Saba-El-Leil, M.K., Almousaillekh, M., Wray, J., Meloche, S., and Smith, A. (2007). FGF stimulation of the Erk1/2 signalling cascade triggers transition of pluripotent embryonic stem cells from self-renewal to lineage commitment. *Dev. Camb. Engl.* 134, 2895–2902.
- Kuroda, T., Tada, M., Kubota, H., Kimura, H., Hatano, S., Suemori, H., Nakatsuji, N., and Tada, T. (2005). Octamer and Sox elements are required for transcriptional cis regulation of Nanog gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 25, 2475–2485.

- Labosky, P.A., Barlow, D.P., and Hogan, B.L. (1994). Mouse embryonic germ (EG) cell lines: transmission through the germline and differences in the methylation imprint of insulin-like growth factor 2 receptor (Igf2r) gene compared with embryonic stem (ES) cell lines. *Dev. Camb. Engl.* *120*, 3197–3204.
- Lander, A.D., Kimble, J., Clevers, H., Fuchs, E., Montarras, D., Buckingham, M., Calof, A.L., Trumpp, A., and Oskarsson, T. (2012). What does the concept of the stem cell niche really mean today? *BMC Biol.* *10*, 19.
- Lando, D., Peet, D.J., Gorman, J.J., Whelan, D.A., Whitelaw, M.L., and Bruick, R.K. (2002). FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev.* *16*, 1466–1471.
- Lapasset, L., Milhavel, O., Prieur, A., Besnard, E., Babled, A., Aït-Hamou, N., Leschik, J., Pellestor, F., Ramirez, J.-M., De Vos, J., et al. (2011). Rejuvenating senescent and centenarian human cells by reprogramming through the pluripotent state. *Genes Dev.* *25*, 2248–2253.
- Leahy, A., Xiong, J.W., Kuhnert, F., and Stuhlmann, H. (1999). Use of developmental marker genes to define temporal and spatial patterns of differentiation during embryoid body formation. *J. Exp. Zool.* *284*, 67–81.
- Lee, J., Kotliarova, S., Kotliarov, Y., Li, A., Su, Q., Donin, N.M., Pastorino, S., Purow, B.W., Christopher, N., Zhang, W., et al. (2006). Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell* *9*, 391–403.
- Lee, S.-W., Jeong, H.-K., Lee, J.-Y., Yang, J., Lee, E.J., Kim, S.-Y., Youn, S.-W., Lee, J., Kim, W.J., Kim, K.-W., et al. (2012). Hypoxic priming of mESCs accelerates vascular-lineage differentiation through HIF1-mediated inverse regulation of Oct4 and VEGF: HIF1-mediated inverse regulation of Oct4 and VEGF. *EMBO Mol. Med.* *4*, 924–938.
- Lehmann, U., Schmitz, J., Weissenbach, M., Sobota, R.M., Hortner, M., Friederichs, K., Behrmann, I., Tsiaris, W., Sasaki, A., Schneider-Mergener, J., et al. (2003). SHP2 and SOCS3 contribute to Tyr-759-dependent attenuation of interleukin-6 signaling through gp130. *J. Biol. Chem.* *278*, 661–671.
- Leitch, H.G., and Smith, A. (2013). The mammalian germline as a pluripotency cycle. *Dev. Camb. Engl.* *140*, 2495–2501.
- Leitch, H.G., Nichols, J., Humphreys, P., Mulas, C., Martello, G., Lee, C., Jones, K., Surani, M.A., and Smith, A. (2013). Rebuilding pluripotency from primordial germ cells. *Stem Cell Rep.* *1*, 66–78.
- Lengner, C.J., Gimelbrant, A.A., Erwin, J.A., Cheng, A.W., Guenther, M.G., Welstead, G.G., Alagappan, R., Frampton, G.M., Xu, P., Muffat, J., et al. (2010). Derivation of pre-X inactivation human embryonic stem cells under physiological oxygen concentrations. *Cell* *141*, 872–883.
- Li, W., and Ding, S. (2010). Small molecules that modulate embryonic stem cell fate and somatic cell reprogramming. *Trends Pharmacol. Sci.* *31*, 36–45.
- Li, D., Shimamura, T., Ji, H., Chen, L., Haringsma, H.J., McNamara, K., Liang, M.-C., Perera, S.A., Zaghlul, S., Borgman, C.L., et al. (2007). Bronchial and peripheral murine lung carcinomas induced by T790M-L858R mutant EGFR respond to HKI-272 and rapamycin combination therapy. *Cancer Cell* *12*, 81–93.
- Li, P., Tong, C., Mehrian-Shai, R., Jia, L., Wu, N., Yan, Y., Maxson, R.E., Schulze, E.N., Song, H., Hsieh, C.-L., et al. (2008). Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts. *Cell* *135*, 1299–1310.
- Li, Y., Powell, S., Brunette, E., Lebkowski, J., and Mandalam, R. (2005). Expansion of human embryonic stem cells in defined serum-free medium devoid of animal-derived products. *Biotechnol. Bioeng.* *91*, 688–698.

- Lin, J.-L., Wang, M.J., Lee, D., Liang, C.-C., and Lin, S. (2008). Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  regulates matrix metalloproteinase-1 activity in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *FEBS Lett.* *582*, 2615–2619.
- Liu, J., Li, J.W., Gang, Y., Guo, L., and Li, H. (1999). Expression of leukemia-inhibitory factor as an autocrinal growth factor in human medulloblastomas. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* *125*, 475–480.
- Liu, S.-C., Tsang, N.-M., Chiang, W.-C., Chang, K.-P., Hsueh, C., Liang, Y., Juang, J.-L., Chow, K.-P.N., and Chang, Y.-S. (2013). Leukemia inhibitory factor promotes nasopharyngeal carcinoma progression and radioresistance. *J. Clin. Invest.* *123*, 5269–5283.
- Loh, Y.-H., Wu, Q., Chew, J.-L., Vega, V.B., Zhang, W., Chen, X., Bourque, G., George, J., Leong, B., Liu, J., et al. (2006). The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat. Genet.* *38*, 431–440.
- Ma, Y.G., Rosfjord, E., Huebert, C., Wilder, P., Tiesman, J., Kelly, D., and Rizzino, A. (1992). Transcriptional regulation of the murine k-FGF gene in embryonic cell lines. *Dev. Biol.* *154*, 45–54.
- MacArthur, B.D., and Lemischka, I.R. (2013). Statistical mechanics of pluripotency. *Cell* *154*, 484–489.
- Macfarlan, T.S., Gifford, W.D., Driscoll, S., Lettieri, K., Rowe, H.M., Bonanomi, D., Firth, A., Singer, O., Trono, D., and Pfaff, S.L. (2012). Embryonic stem cell potency fluctuates with endogenous retrovirus activity. *Nature* *487*, 57–63.
- Maeda, M., Horiuchi, M., Numa, S., and Ichikawa, Y. (1977). Characterization of a differentiation-stimulating factor for mouse myeloid leukemia cells. *Gan* *68*, 435–447.
- Maes, C., Araldi, E., Haigh, K., Khatri, R., Van Looveren, R., Giaccia, A.J., Haigh, J.J., Carmeliet, G., and Schipani, E. (2012). VEGF-independent cell-autonomous functions of HIF-1 $\alpha$  regulating oxygen consumption in fetal cartilage are critical for chondrocyte survival. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* *27*, 596–609.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2003). RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat. Rev. Cancer* *3*, 459–465.
- Månsson, R., Lagergren, A., Hansson, F., Smith, E., and Sigvardsson, M. (2007). The CD53 and CEACAM-1 genes are genetic targets for early B cell factor. *Eur. J. Immunol.* *37*, 1365–1376.
- Marins, N., da Silva, C.T., da Motta, V.P., Scianni, C.C., Arcaldi, N., and de Matos, J.V. (1981). [Hemodynamic study in subjects with Chagas' disease without apparent heart disease]. *Arq. Bras. Cardiol.* *37*, 463–466.
- Marks, H., and Stunnenberg, H.G. (2014). Transcription regulation and chromatin structure in the pluripotent ground state. *Biochim. Biophys. Acta* *1839*, 129–137.
- Marks, H., Kalkan, T., Menafra, R., Denissov, S., Jones, K., Hofemeister, H., Nichols, J., Kranz, A., Stewart, A.F., Smith, A., et al. (2012). The transcriptional and epigenomic foundations of ground state pluripotency. *Cell* *149*, 590–604.
- Marson, A., Levine, S.S., Cole, M.F., Frampton, G.M., Brambrink, T., Johnstone, S., Guenther, M.G., Johnston, W.K., Wernig, M., Newman, J., et al. (2008). Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Cell* *134*, 521–533.
- Martello, G., and Smith, A. (2014). The nature of embryonic stem cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *30*, 647–675.
- Martello, G., Sugimoto, T., Diamanti, E., Joshi, A., Hannah, R., Ohtsuka, S., Göttgens, B., Niwa, H., and Smith, A. (2012). Esrrb is a pivotal target of the Gsk3/Tcf3 axis regulating embryonic stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell* *11*, 491–504.
- Martello, G., Bertone, P., and Smith, A. (2013). Identification of the missing pluripotency mediator downstream of leukaemia inhibitory factor. *EMBO J.* *32*, 2561–2574.
- Martin, G.R. (1980). Teratocarcinomas and mammalian embryogenesis. *Science* *209*, 768–776.

- Martin, G.R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *78*, 7634–7638.
- Maruta, S., Takiguchi, S., Ueyama, M., Kataoka, Y., Oda, Y., Tsuneyoshi, M., and Iguchi, H. (2009). A role for leukemia inhibitory factor in melanoma-induced bone metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* *26*, 133–141.
- Masui, S., Nakatake, Y., Toyooka, Y., Shimosato, D., Yagi, R., Takahashi, K., Okochi, H., Okuda, A., Matoba, R., Sharov, A.A., et al. (2007). Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat. Cell Biol.* *9*, 625–635.
- Matadeen, R., Hon, W.-C., Heath, J.K., Jones, E.Y., and Fuller, S. (2007). The dynamics of signal triggering in a gp130-receptor complex. *Struct. Lond. Engl.* *15*, 441–448.
- Matheny, R.W., Riddle-Kottke, M.A., Leandry, L.A., Lynch, C.M., Abdalla, M.N., Geddis, A.V., Piper, D.R., and Zhao, J.J. (2015). Role of phosphoinositide 3-OH kinase p110 $\beta$  in skeletal myogenesis. *Mol. Cell. Biol.* *35*, 1182–1196.
- Mathieu, M.-E., Saucourt, C., Mournetas, V., Gauthereau, X., Thézé, N., Praloran, V., Thiébaud, P., and Bœuf, H. (2012). LIF-dependent signaling: new pieces in the Lego. *Stem Cell Rev.* *8*, 1–15.
- Mathieu, M.-E., Faucheux, C., Saucourt, C., Soulet, F., Gauthereau, X., Fédou, S., Trouillas, M., Thézé, N., Thiébaud, P., and Boeuf, H. (2013). MRAS GTPase is a novel stemness marker that impacts mouse embryonic stem cell plasticity and *Xenopus* embryonic cell fate. *Dev. Camb. Engl.* *140*, 3311–3322.
- Matsuda, T., Nakamura, T., Nakao, K., Arai, T., Katsuki, M., Heike, T., and Yokota, T. (1999). STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *EMBO J.* *18*, 4261–4269.
- Matsui, Y., Toksoz, D., Nishikawa, S., Nishikawa, S., Williams, D., Zsebo, K., and Hogan, B.L. (1991). Effect of Steel factor and leukaemia inhibitory factor on murine primordial germ cells in culture. *Nature* *353*, 750–752.
- Matsui, Y., Zsebo, K., and Hogan, B.L. (1992). Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* *70*, 841–847.
- Maximow (1909). *Folia Haematologica*.
- Maxwell, P.H. (2005). Hypoxia-inducible factor as a physiological regulator. *Exp. Physiol.* *90*, 791–797.
- Mayshar, Y., Rom, E., Chumakov, I., Kronman, A., Yayon, A., and Benvenisty, N. (2008). Fibroblast growth factor 4 and its novel splice isoform have opposing effects on the maintenance of human embryonic stem cell self-renewal. *Stem Cells Dayt. Ohio* *26*, 767–774.
- Mazumdar J. et al. (2010) O2 regulates stem cells through Wnt/ $\beta$ -catenin signalling. *Nat. Cell. Biol.*, *12*, 1007-1013.
- McCulloch, E.A., and Till, J.E. (1960). The radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells, determined by quantitative marrow transplantation into irradiated mice. *Radiation Res.* *13*, 115–125.
- McKenzie, R.C., and Szepietowski, J. (2004). Cutaneous leukemia inhibitory factor and its potential role in the development of skin tumors. *Dermatol. Surg. Off. Publ. Am. Soc. Dermatol. Surg. Al* *30*, 279–290.
- Meloche, S., Vella, F.D.J., Voisin, L., Ang, S.-L., and Saba-El-Leil, M. (2004). Erk2 signaling and early embryo stem cell self-renewal. *Cell Cycle Georget. Tex* *3*, 241–243.
- Metcalfe, D. (2003). The unsolved enigmas of leukemia inhibitory factor. *Stem Cells Dayt. Ohio* *21*, 5–14.
- Metcalfe, S.M. (2011). LIF in the regulation of T-cell fate and as a potential therapeutic. *Genes Immun.* *12*, 157–168.

- Mikolajczyk, M., Wirstlein, P., and Skrzypczak, J. (2007). The impact of leukemia inhibitory factor in uterine flushing on the reproductive potential of infertile women--a prospective study. *Am. J. Reprod. Immunol. N. Y. N* 1989 58, 65–74.
- Mitchell, J.A., and Yochim, J.M. (1968). Measurement of intrauterine oxygen tension in the rat and its regulation by ovarian steroid hormones. *Endocrinology* 83, 691–700.
- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M., and Yamanaka, S. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 113, 631–642.
- Mohsen-Kanson, T., Hafner, A.-L., Wdziekonski, B., Takashima, Y., Villageois, P., Carrière, A., Svensson, M., Bagnis, C., Chignon-Sicard, B., Svensson, P.-A., et al. (2014). Differentiation of human induced pluripotent stem cells into brown and white adipocytes: role of Pax3. *Stem Cells Dayt. Ohio* 32, 1459–1467.
- Mohyeldin, A., Garzón-Muvdi, T., and Quiñones-Hinojosa, A. (2010). Oxygen in Stem Cell Biology: A Critical Component of the Stem Cell Niche. *Cell Stem Cell* 7, 150–161.
- Monk, M. (1981). A stem-line model for cellular and chromosomal differentiation in early mouse-development. *Differ. Res. Biol. Divers.* 19, 71–76.
- Moon, R.T., Bowerman, B., Boutros, M., and Perrimon, N. (2002). The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin. *Science* 296, 1644–1646.
- Moreau, J.F., Donaldson, D.D., Bennett, F., Witek-Giannotti, J., Clark, S.C., and Wong, G.G. (1988). Leukaemia inhibitory factor is identical to the myeloid growth factor human interleukin for DA cells. *Nature* 336, 690–692.
- Morrison, S.J., and Spradling, A.C. (2008). Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell* 132, 598–611.
- Murakami, M., Kamimura, D., and Hirano, T. (2004). New IL-6 (gp130) family cytokine members, CLC/NNT1/BSF3 and IL-27. *Growth Factors Chur Switz.* 22, 75–77.
- Najm, F.J., Chenoweth, J.G., Anderson, P.D., Nadeau, J.H., Redline, R.W., McKay, R.D.G., and Tesar, P.J. (2011). Isolation of epiblast stem cells from preimplantation mouse embryos. *Cell Stem Cell* 8, 318–325.
- Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Okita, K., Mochiduki, Y., Takizawa, N., and Yamanaka, S. (2008). Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat. Biotechnol.* 26, 101–106.
- Nakayama, K. (2013). cAMP-response element-binding protein (CREB) and NF-κB transcription factors are activated during prolonged hypoxia and cooperatively regulate the induction of matrix metalloproteinase MMP1. *J. Biol. Chem.* 288, 22584–22595.
- Neel, B.G., Gu, H., and Pao, L. (2003). The “Shp”ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling. *Trends Biochem. Sci.* 28, 284–293.
- Nekanti, U., Dastidar, S., Venugopal, P., Totey, S., and Ta, M. (2010). Increased proliferation and analysis of differential gene expression in human Wharton’s jelly-derived mesenchymal stromal cells under hypoxia. *Int. J. Biol. Sci.* 6, 499–512.
- Nichols, J., and Smith, A. (2011). The origin and identity of embryonic stem cells. *Dev. Camb. Engl.* 138, 3–8.
- Nichols, J., and Smith, A. (2012). Pluripotency in the embryo and in culture. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, a008128.
- Nichols, J., Davidson, D., Taga, T., Yoshida, K., Chambers, I., and Smith, A. (1996). Complementary tissue-specific expression of LIF and LIF-receptor mRNAs in early mouse embryogenesis. *Mech. Dev.* 57, 123–131.
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastasiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Schöler, H., and Smith, A. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 95, 379–391.

- Nichols, J., Silva, J., Roode, M., and Smith, A. (2009a). Suppression of Erk signalling promotes ground state pluripotency in the mouse embryo. *Dev. Camb. Engl.* *136*, 3215–3222.
- Nichols, J., Jones, K., Phillips, J.M., Newland, S.A., Roode, M., Mansfield, W., Smith, A., and Cooke, A. (2009b). Validated germline-competent embryonic stem cell lines from nonobese diabetic mice. *Nat. Med.* *15*, 814–818.
- Nicola, N.A., and Babon, J.J. (2015). Leukemia inhibitory factor (LIF). *Cytokine Growth Factor Rev.* *26*, 533–544.
- Nishiyama, A., Sharov, A.A., Piao, Y., Amano, M., Amano, T., Hoang, H.G., Binder, B.Y., Tapnio, R., Bassey, U., Malinou, J.N., et al. (2013). Systematic repression of transcription factors reveals limited patterns of gene expression changes in ES cells. *Sci. Rep.* *3*, 1390.
- Niwa, H., Burdon, T., Chambers, I., and Smith, A. (1998). Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev.* *12*, 2048–2060.
- Niwa, H., Miyazaki, J., and Smith, A.G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat. Genet.* *24*, 372–376.
- Niwa, H., Ogawa, K., Shimosato, D., and Adachi, K. (2009). A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature* *460*, 118–122.
- O'Brien, C.A., Pollett, A., Gallinger, S., and Dick, J.E. (2007). A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* *445*, 106–110.
- Oh, H., Fujio, Y., Kunisada, K., Hirota, H., Matsui, H., Kishimoto, T., and Yamauchi-Takahara, K. (1998). Activation of phosphatidylinositol 3-kinase through glycoprotein 130 induces protein kinase B and p70 S6 kinase phosphorylation in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* *273*, 9703–9710.
- Ohtsuka, S., and Niwa, H. (2015). The differential activation of intracellular signaling pathways confers the permissiveness of embryonic stem cell derivation from different mouse strains. *Dev. Camb. Engl.*
- Ohtsuka, S., Nishikawa-Torikai, S., and Niwa, H. (2012). E-cadherin promotes incorporation of mouse epiblast stem cells into normal development. *PloS One* *7*, e45220.
- Okabe, J., Honma, Y., and Hozumi, M. (1977). Inhibition of RNA and protein syntheses makes non-differentiating mouse myeloid leukemia cells sensitive to a factor(s) stimulating differentiation. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *20*, 933–940.
- Okamoto, K., Okazawa, H., Okuda, A., Sakai, M., Muramatsu, M., and Hamada, H. (1990). A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells. *Cell* *60*, 461–472.
- Osorno, R., and Chambers, I. (2011). Transcription factor heterogeneity and epiblast pluripotency. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* *366*, 2230–2237.
- Paling, N.R.D., Wheadon, H., Bone, H.K., and Welham, M.J. (2004). Regulation of embryonic stem cell self-renewal by phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling. *J. Biol. Chem.* *279*, 48063–48070.
- Papaioannou, V.E., McBurney, M.W., Gardner, R.L., and Evans, M.J. (1975). Fate of teratocarcinoma cells injected into early mouse embryos. *Nature* *258*, 70–73.
- Pappenheim, D.A. (1896). Ueber Entwicklung und Ausbildung der Erythroblasten. *Arch. Für Pathol. Anat. Physiol. Für Klin. Med.* *145*, 587–643.
- Pardo, M., Lang, B., Yu, L., Prosser, H., Bradley, A., Babu, M.M., and Choudhary, J. (2010). An expanded Oct4 interaction network: implications for stem cell biology, development, and disease. *Cell Stem Cell* *6*, 382–395.
- Parisi, S., Passaro, F., Aloia, L., Manabe, I., Nagai, R., Pastore, L., and Russo, T. (2008). Klf5 is involved in self-renewal of mouse embryonic stem cells. *J. Cell Sci.* *121*, 2629–2634.

- Parisi, S., Cozzuto, L., Tarantino, C., Passaro, F., Ciriello, S., Aloia, L., Antonini, D., De Simone, V., Pastore, L., and Russo, T. (2010). Direct targets of Klf5 transcription factor contribute to the maintenance of mouse embryonic stem cell undifferentiated state. *BMC Biol.* *8*, 128.
- Pedersen, G., Saermark, T., Kirkegaard, T., and Brynskov, J. (2009). Spontaneous and cytokine induced expression and activity of matrix metalloproteinases in human colonic epithelium. *Clin. Exp. Immunol.* *155*, 257–265.
- Pelton, T.A., Sharma, S., Schulz, T.C., Rathjen, J., and Rathjen, P.D. (2002). Transient pluripotent cell populations during primitive ectoderm formation: correlation of in vivo and in vitro pluripotent cell development. *J. Cell Sci.* *115*, 329–339.
- Peñuelas, S., Anido, J., Prieto-Sánchez, R.M., Folch, G., Barba, I., Cuartas, I., García-Dorado, D., Poca, M.A., Sahuquillo, J., Baselga, J., et al. (2009). TGF-beta increases glioma-initiating cell self-renewal through the induction of LIF in human glioblastoma. *Cancer Cell* *15*, 315–327.
- Pera, M.F., and Tam, P.P.L. (2010). Extrinsic regulation of pluripotent stem cells. *Nature* *465*, 713–720.
- Pereira, L., Yi, F., and Merrill, B.J. (2006). Repression of Nanog gene transcription by Tcf3 limits embryonic stem cell self-renewal. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 7479–7491.
- Pfeiffer, B.E., Zang, T., Wilkerson, J.R., Taniguchi, M., Maksimova, M.A., Smith, L.N., Cowan, C.W., and Huber, K.M. (2010). Fragile X mental retardation protein is required for synapse elimination by the activity-dependent transcription factor MEF2. *Neuron* *66*, 191–197.
- Piedrahita, J.A., Weaks, R., Petrescu, A., Shrode, T.W., Derr, J.N., and Womack, J.E. (1997). Genetic characterization of the bovine leukaemia inhibitory factor (LIF) gene: isolation and sequencing, chromosome assignment and microsatellite analysis. *Anim. Genet.* *28*, 14–20.
- Pimton, P., Lecht, S., Stabler, C.T., Johannes, G., Schulman, E.S., and Lelkes, P.I. (2015). Hypoxia enhances differentiation of mouse embryonic stem cells into definitive endoderm and distal lung cells. *Stem Cells Dev.* *24*, 663–676.
- Planat-Benard, V., Silvestre, J.-S., Cousin, B., André, M., Nibbelink, M., Tamarat, R., Clergue, M., Manneville, C., Saillan-Barreau, C., Duriez, M., et al. (2004). Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* *109*, 656–663.
- Prigione, A., and Adjaye, J. (2010). Modulation of mitochondrial biogenesis and bioenergetic metabolism upon in vitro and in vivo differentiation of human ES and iPS cells. *Int. J. Dev. Biol.* *54*, 1729–1741.
- Prince, M.E., Sivanandan, R., Kaczorowski, A., Wolf, G.T., Kaplan, M.J., Dalerba, P., Weissman, I.L., Clarke, M.F., and Ailles, L.E. (2007). Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 973–978.
- Przybyla, L.M., Theunissen, T.W., Jaenisch, R., and Voldman, J. (2013). Matrix remodeling maintains embryonic stem cell self-renewal by activating Stat3. *Stem Cells Dayt. Ohio* *31*, 1097–1106.
- Przybylowska, K., Kluczna, A., Zadrozny, M., Krawczyk, T., Kulig, A., Rykala, J., Kolacinska, A., Morawiec, Z., Drzewoski, J., and Blasiak, J. (2006). Polymorphisms of the promoter regions of matrix metalloproteinases genes MMP-1 and MMP-9 in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* *95*, 65–72.
- Qiang, L., Fujita, R., and Abeliovich, A. (2013). Remodeling neurodegeneration: somatic cell reprogramming-based models of adult neurological disorders. *Neuron* *78*, 957–969.
- Quaglino, A., Schere-Levy, C., Romorini, L., Meiss, R.P., and Kordon, E.C. (2007). Mouse mammary tumors display Stat3 activation dependent on leukemia inhibitory factor signaling. *Breast Cancer Res. BCR* *9*, R69.

- Radzisceuskaya, A., Chia, G.L.B., dos Santos, R.L., Theunissen, T.W., Castro, L.F.C., Nichols, J., and Silva, J.C.R. (2013). A defined Oct4 level governs cell state transitions of pluripotency entry and differentiation into all embryonic lineages. *Nat. Cell Biol.* *15*, 579–590.
- Rankin, E.B., Biju, M.P., Liu, Q., Unger, T.L., Rha, J., Johnson, R.S., Simon, M.C., Keith, B., and Haase, V.H. (2007). Hypoxia-inducible factor-2 (HIF-2) regulates hepatic erythropoietin in vivo. *J. Clin. Invest.* *117*, 1068–1077.
- Rathjen, P.D., Toth, S., Willis, A., Heath, J.K., and Smith, A.G. (1990). Differentiation inhibiting activity is produced in matrix-associated and diffusible forms that are generated by alternate promoter usage. *Cell* *62*, 1105–1114.
- Reinholdt, L.G., Howell, G.R., Czechanski, A.M., Macalinao, D.G., Macnicoll, K.H., Lin, C.-S., Donahue, L.R., and John, S.W.M. (2012). Generating embryonic stem cells from the inbred mouse strain DBA/2J, a model of glaucoma and other complex diseases. *PLoS One* *7*, e50081.
- Reubinoff, B.E., Pera, M.F., Fong, C.Y., Trounson, A., and Bongso, A. (2000). Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat. Biotechnol.* *18*, 399–404.
- Rey, A. (2003). [Are stem cells well named?]. *Médecine Sci.* *MS* *19*, 645.
- Rey, S., Luo, W., Shimoda, L.A., and Semenza, G.L. (2011). Metabolic reprogramming by HIF-1 promotes the survival of bone marrow-derived angiogenic cells in ischemic tissue. *Blood* *117*, 4988–4998.
- Richards, M., Fong, C.-Y., Chan, W.-K., Wong, P.-C., and Bongso, A. (2002). Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* *20*, 933–936.
- Ringrose, L., Ehret, H., and Paro, R. (2004). Distinct contributions of histone H3 lysine 9 and 27 methylation to locus-specific stability of polycomb complexes. *Mol. Cell* *16*, 641–653.
- Robertson, E., Bradley, A., Kuehn, M., and Evans, M. (1986). Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector. *Nature* *323*, 445–448.
- Robertson, M., Chambers, I., Rathjen, P., Nichols, J., and Smith, A. (1993). Expression of alternative forms of differentiation inhibiting activity (DIA/LIF) during murine embryogenesis and in neonatal and adult tissues. *Dev. Genet.* *14*, 165–173.
- Rodda, D.J., Chew, J.-L., Lim, L.-H., Loh, Y.-H., Wang, B., Ng, H.-H., and Robson, P. (2005). Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. *J. Biol. Chem.* *280*, 24731–24737.
- Rodesch, F., Simon, P., Donner, C., and Jauniaux, E. (1992). Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy. *Obstet. Gynecol.* *80*, 283–285.
- Rodig, S.J., Meraz, M.A., White, J.M., Lampe, P.A., Riley, J.K., Arthur, C.D., King, K.L., Sheehan, K.C., Yin, L., Pennica, D., et al. (1998). Disruption of the Jak1 gene demonstrates obligatory and nonredundant roles of the Jaks in cytokine-induced biologic responses. *Cell* *93*, 373–383.
- Rodriguez, A.-M., Elabd, C., Amri, E.-Z., Ailhaud, G., and Dani, C. (2005). The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie* *87*, 125–128.
- Rossant, J. (2008). Stem cells and early lineage development. *Cell* *132*, 527–531.
- Rousseau, F., Chevalier, S., Guillet, C., Ravon, E., Diveu, C., Froger, J., Barbier, F., Grimaud, L., and Gascan, H. (2008). Ciliary neurotrophic factor, cardiotrophin-like cytokine, and neuropoietin share a conserved binding site on the ciliary neurotrophic factor receptor alpha chain. *J. Biol. Chem.* *283*, 30341–30350.
- Rousseau, F., Basset, L., Froger, J., Dinguirard, N., Chevalier, S., and Gascan, H. (2010). IL-27 structural analysis demonstrates similarities with ciliary neurotrophic factor (CNTF) and leads to the identification of antagonistic variants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 19420–19425.
- Sakaki-Yumoto, M., Kobayashi, C., Sato, A., Fujimura, S., Matsumoto, Y., Takasato, M., Kodama, T., Aburatani, H., Asashima, M., Yoshida, N., et al. (2006). The murine homolog of SALL4, a causative gene in Okihiro syndrome, is essential for embryonic stem cell proliferation, and

- cooperates with Sall1 in anorectal, heart, brain and kidney development. *Dev. Camb. Engl.* *133*, 3005–3013.
- Sakaue-Sawano, A., Kurokawa, H., Morimura, T., Hanyu, A., Hama, H., Osawa, H., Kashiwagi, S., Fukami, K., Miyata, T., Miyoshi, H., et al. (2008). Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression. *Cell* *132*, 487–498.
- Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bernstein, B.E., Karabetsou, N., Morillon, A., Weise, C., Schreiber, S.L., Mellor, J., and Kouzarides, T. (2003). Methylation of histone H3 K4 mediates association of the Isw1p ATPase with chromatin. *Mol. Cell* *12*, 1325–1332.
- Sato, N., Meijer, L., Skaltsounis, L., Greengard, P., and Brivanlou, A.H. (2004). Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat. Med.* *10*, 55–63.
- Savatier, P., Huang, S., Szekely, L., Wiman, K.G., and Samarut, J. (1994). Contrasting patterns of retinoblastoma protein expression in mouse embryonic stem cells and embryonic fibroblasts. *Oncogene* *9*, 809–818.
- Savatier, P., Lapillonne, H., van Grunsven, L.A., Rudkin, B.B., and Samarut, J. (1996). Withdrawal of differentiation inhibitory activity/leukemia inhibitory factor up-regulates D-type cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors in mouse embryonic stem cells. *Oncogene* *12*, 309–322.
- Schaper, F., Gendo, C., Eck, M., Schmitz, J., Grimm, C., Anhof, D., Kerr, I.M., and Heinrich, P.C. (1998). Activation of the protein tyrosine phosphatase SHP2 via the interleukin-6 signal transducing receptor protein gp130 requires tyrosine kinase Jak1 and limits acute-phase protein expression. *Biochem. J.* *335 (Pt 3)*, 557–565.
- Schiemann, W.P., Bartoe, J.L., and Nathanson, N.M. (1997). Box 3-independent signaling mechanisms are involved in leukemia inhibitory factor receptor alpha- and gp130-mediated stimulation of mitogen-activated protein kinase. Evidence for participation of multiple signaling pathways which converge at Ras. *J. Biol. Chem.* *272*, 16631–16636.
- Schmidt, D., and Müller, S. (2002). Members of the PIAS family act as SUMO ligases for c-Jun and p53 and repress p53 activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 2872–2877.
- Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* *4*, 7–25.
- Schofield, C.J., and Ratcliffe, P.J. (2004). Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 343–354.
- Schöler, H.R., Ciesiolka, T., and Gruss, P. (1991). A nexus between Oct-4 and E1A: implications for gene regulation in embryonic stem cells. *Cell* *66*, 291–304.
- Schwartz, S.D., Hubschman, J.-P., Heilwell, G., Franco-Cardenas, V., Pan, C.K., Ostrick, R.M., Mickunas, E., Gay, R., Klimanskaya, I., and Lanza, R. (2012). Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report. *Lancet Lond. Engl.* *379*, 713–720.
- Shackleton, M., Quintana, E., Fearon, E.R., and Morrison, S.J. (2009). Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution. *Cell* *138*, 822–829.
- Shamblott, M.J., Axelman, J., Wang, S., Bugg, E.M., Littlefield, J.W., Donovan, P.J., Blumenthal, P.D., Huggins, G.R., and Gearhart, J.D. (1998). Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 13726–13731.
- Shellard, J., Perreau, J., and Brûlet, P. (1996). Role of leukemia inhibitory factor during mammalian development. *Eur. Cytokine Netw.* *7*, 699–712.
- Shen, Y., Matsuno, Y., Fouse, S.D., Rao, N., Root, S., Xu, R., Pellegrini, M., Riggs, A.D., and Fan, G. (2008). X-inactivation in female human embryonic stem cells is in a nonrandom pattern and prone to epigenetic alterations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 4709–4714.
- Silva, J., and Smith, A. (2008). Capturing pluripotency. *Cell* *132*, 532–536.

- Silva, J., Barrandon, O., Nichols, J., Kawaguchi, J., Theunissen, T.W., and Smith, A. (2008). Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition. *PLoS Biol.* *6*, e253.
- Silva, J., Nichols, J., Theunissen, T.W., Guo, G., van Oosten, A.L., Barrandon, O., Wray, J., Yamanaka, S., Chambers, I., and Smith, A. (2009). Nanog is the gateway to the pluripotent ground state. *Cell* *138*, 722–737.
- Simpson, R.J., Hilton, D.J., Nice, E.C., Rubira, M.R., Metcalf, D., Gearing, D.P., Gough, N.M., and Nicola, N.A. (1988). Structural characterization of a murine myeloid leukaemia inhibitory factor. *Eur. J. Biochem. FEBS* *175*, 541–547.
- Sims, N.A., and Johnson, R.W. (2012). Leukemia inhibitory factor: a paracrine mediator of bone metabolism. *Growth Factors Chur Switz.* *30*, 76–87.
- Sims, R.J., Chen, C.-F., Santos-Rosa, H., Kouzarides, T., Patel, S.S., and Reinberg, D. (2005). Human but not yeast CHD1 binds directly and selectively to histone H3 methylated at lysine 4 via its tandem chromodomains. *J. Biol. Chem.* *280*, 41789–41792.
- Singh, A.M., Hamazaki, T., Hankowski, K.E., and Terada, N. (2007). A heterogeneous expression pattern for Nanog in embryonic stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* *25*, 2534–2542.
- skinotis 2008 Structural organization of a full-length gp130/LIF-R cytokine receptor transmembrane complex.
- Smallwood, S.A., Lee, H.J., Angermueller, C., Krueger, F., Saadeh, H., Peat, J., Andrews, S.R., Stegle, O., Reik, W., and Kelsey, G. (2014). Single-cell genome-wide bisulfite sequencing for assessing epigenetic heterogeneity. *Nat. Methods* *11*, 817–820.
- Smith, A.G., and Hooper, M.L. (1987). Buffalo rat liver cells produce a diffusible activity which inhibits the differentiation of murine embryonal carcinoma and embryonic stem cells. *Dev. Biol.* *121*, 1–9.
- Smith, A.G., Nichols, J., Robertson, M., and Rathjen, P.D. (1992). Differentiation inhibiting activity (DIA/LIF) and mouse development. *Dev. Biol.* *151*, 339–351.
- Solchaga, L.A., Penick, K., Goldberg, V.M., Caplan, A.I., and Welter, J.F. (2010). Fibroblast growth factor-2 enhances proliferation and delays loss of chondrogenic potential in human adult bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng. Part A* *16*, 1009–1019.
- Solter, D., Skreb, N., and Damjanov, I. (1970). Extruterine growth of mouse egg-cylinders results in malignant teratoma. *Nature* *227*, 503–504.
- Song, H., Lim, H., Das, S.K., Paria, B.C., and Dey, S.K. (2000). Dysregulation of EGF family of growth factors and COX-2 in the uterus during the preattachment and attachment reactions of the blastocyst with the luminal epithelium correlates with implantation failure in LIF-deficient mice. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *14*, 1147–1161.
- Sridhar, A., Steward, M.M., and Meyer, J.S. (2013). Nonxenogeneic growth and retinal differentiation of human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Transl. Med.* *2*, 255–264.
- Stahl, N., Boulton, T.G., Farruggella, T., Ip, N.Y., Davis, S., Witthuhn, B.A., Quelle, F.W., Silvennoinen, O., Barbieri, G., and Pellegrini, S. (1994). Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components. *Science* *263*, 92–95.
- Stahl, N., Farruggella, T.J., Boulton, T.G., Zhong, Z., Darnell, J.E., and Yancopoulos, G.D. (1995). Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *Science* *267*, 1349–1353.
- Stavridis, M.P., Lunn, J.S., Collins, B.J., and Storey, K.G. (2007). A discrete period of FGF-induced Erk1/2 signalling is required for vertebrate neural specification. *Dev. Camb. Engl.* *134*, 2889–2894.
- Stead, E., White, J., Faast, R., Conn, S., Goldstone, S., Rathjen, J., Dhingra, U., Rathjen, P., Walker, D., and Dalton, S. (2002). Pluripotent cell division cycles are driven by ectopic Cdk2, cyclin A/E and E2F activities. *Oncogene* *21*, 8320–8333.

- Stevens, L.C. (1968). The development of teratomas from intratesticular grafts of tubal mouse eggs. *J. Embryol. Exp. Morphol.* *20*, 329–341.
- Stevens, L.C., and Little, C.C. (1954). Spontaneous Testicular Teratomas in an Inbred Strain of Mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *40*, 1080–1087.
- Stewart, C.L., Kaspar, P., Brunet, L.J., Bhatt, H., Gadi, I., Köntgen, F., and Abbondanzo, S.J. (1992). Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature* *359*, 76–79.
- Sugihara, E., and Saya, H. (2013). Complexity of cancer stem cells. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *132*, 1249–1259.
- Sutherland, G.R., Baker, E., Hyland, V.J., Callen, D.F., Stahl, J., and Gough, N.M. (1989). The gene for human leukemia inhibitory factor (LIF) maps to 22q12. *Leukemia* *3*, 9–13.
- Swietach, P., Vaughan-Jones, R.D., and Harris, A.L. (2007). Regulation of tumor pH and the role of carbonic anhydrase 9. *Cancer Metastasis Rev.* *26*, 299–310.
- Szablowska-Gadomska, I., Zayat, V., and Buzanska, L. (2011). Influence of low oxygen tensions on expression of pluripotency genes in stem cells. *Acta Neurobiol. Exp. (Warsz.)* *71*, 86–93.
- Tai, C.-I., and Ying, Q.-L. (2013). Gbx2, a LIF/Stat3 target, promotes reprogramming to and retention of the pluripotent ground state. *J. Cell Sci.* *126*, 1093–1098.
- Takahama, Y., Ochiya, T., Sasaki, H., Baba-Toriyama, H., Konishi, H., Nakano, H., and Terada, M. (1998). Molecular cloning and functional analysis of cDNA encoding a rat leukemia inhibitory factor: towards generation of pluripotent rat embryonic stem cells. *Oncogene* *16*, 3189–3196.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* *126*, 663–676.
- Takahashi, K., Okita, K., Nakagawa, M., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nat. Protoc.* *2*, 3081–3089.
- Takahashi, Y., Takahashi, M., Carpino, N., Jou, S.-T., Chao, J.-R., Tanaka, S., Shigeyoshi, Y., Parganas, E., and Ihle, J.N. (2008). Leukemia inhibitory factor regulates trophoblast giant cell differentiation via Janus kinase 1-signal transducer and activator of transcription 3-suppressor of cytokine signaling 3 pathway. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *22*, 1673–1681.
- Tam, P.P. (1984). The histogenetic capacity of tissues in the caudal end of the embryonic axis of the mouse. *J. Embryol. Exp. Morphol.* *82*, 253–266.
- Tan, R.J., and Liu, Y. (2012). Matrix metalloproteinases in kidney homeostasis and diseases. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* *302*, F1351–F1361.
- Tanei, T., Morimoto, K., Shimazu, K., Kim, S.J., Tanji, Y., Taguchi, T., Tamaki, Y., and Noguchi, S. (2009). Association of breast cancer stem cells identified by aldehyde dehydrogenase 1 expression with resistance to sequential Paclitaxel and epirubicin-based chemotherapy for breast cancers. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *15*, 4234–4241.
- Tang, F., Barbacioru, C., Bao, S., Lee, C., Nordman, E., Wang, X., Lao, K., and Surani, M.A. (2010). Tracing the derivation of embryonic stem cells from the inner cell mass by single-cell RNA-Seq analysis. *Cell Stem Cell* *6*, 468–478.
- Taupin, J.L., Pitard, V., Dechanet, J., Miossec, V., Gualde, N., and Moreau, J.F. (1998). Leukemia inhibitory factor: part of a large ingathering family. *Int. Rev. Immunol.* *16*, 397–426.
- Tesar, P.J., Chenoweth, J.G., Brook, F.A., Davies, T.J., Evans, E.P., Mack, D.L., Gardner, R.L., and McKay, R.D.G. (2007). New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* *448*, 196–199.
- Thoma, B., Bird, T.A., Friend, D.J., Gearing, D.P., and Dower, S.K. (1994). Oncostatin M and leukemia inhibitory factor trigger overlapping and different signals through partially shared receptor complexes. *J. Biol. Chem.* *269*, 6215–6222.

- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* *282*, 1145–1147.
- Tian, H., McKnight, S.L., and Russell, D.W. (1997). Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev.* *11*, 72–82.
- Till, J.E., and McCulloch, E.A. (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells.
- Tomida, M. (1997). Presence of mRNAs encoding the soluble D-factor/LIF receptor in human choriocarcinoma cells and production of the soluble receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *232*, 427–431.
- Tomida, M., and Saito, T. (2004). The human hepatocyte growth factor (HGF) gene is transcriptionally activated by leukemia inhibitory factor through the Stat binding element. *Oncogene* *23*, 679–686.
- Tomida, M., Yamamoto-Yamaguchi, Y., and Hozumi, M. (1984). Characterization of a factor inducing differentiation of mouse myeloid leukemic cells purified from conditioned medium of mouse Ehrlich ascites tumor cells. *FEBS Lett.* *178*, 291–296.
- Tong, Y., Feng, W., Wu, Y., Lv, H., Jia, Y., and Jiang, D. (2015). Mechano-growth factor accelerates the proliferation and osteogenic differentiation of rabbit mesenchymal stem cells through the PI3K/AKT pathway. *BMC Biochem.* *16*, 1.
- Toyooka, Y., Shimosato, D., Murakami, K., Takahashi, K., and Niwa, H. (2008). Identification and characterization of subpopulations in undifferentiated ES cell culture. *Dev. Camb. Engl.* *135*, 909–918.
- Trouillas, M., Saucourt, C., Duval, D., Gauthereau, X., Thibault, C., Dembele, D., Feraud, O., Menager, J., Rallu, M., Pradier, L., et al. (2008). Bcl2, a transcriptional target of p38alpha, is critical for neuronal commitment of mouse embryonic stem cells. *Cell Death Differ.* *15*, 1450–1459.
- Trouillas, M., Saucourt, C., Guillotin, B., Gauthereau, X., Taupin, J.-L., Moreau, J.-F., and Boeuf, H. (2009a). The LIF cytokine: towards adulthood. *Eur. Cytokine Netw.* *20*, 51–62.
- Trouillas, M., Saucourt, C., Guillotin, B., Gauthereau, X., Ding, L., Buchholz, F., Doss, M.X., Sachinidis, A., Hescheler, J., Hummel, O., et al. (2009b). Three LIF-dependent signatures and gene clusters with atypical expression profiles, identified by transcriptome studies in mouse ES cells and early derivatives. *BMC Genomics* *10*, 73.
- Tsakiridis, A., Huang, Y., Blin, G., Skylaki, S., Wymeersch, F., Osorno, R., Economou, C., Karagianni, E., Zhao, S., Lowell, S., et al. (2014). Distinct Wnt-driven primitive streak-like populations reflect in vivo lineage precursors. *Dev. Camb. Engl.* *141*, 1209–1221.
- Tsubooka, N., Ichisaka, T., Okita, K., Takahashi, K., Nakagawa, M., and Yamanaka, S. (2009). Roles of Sall4 in the generation of pluripotent stem cells from blastocysts and fibroblasts. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* *14*, 683–694.
- Tuckerman, J.R., Zhao, Y., Hewitson, K.S., Tian, Y.-M., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J., and Mole, D.R. (2004). Determination and comparison of specific activity of the HIF-prolyl hydroxylases. *FEBS Lett.* *576*, 145–150.
- Vallier, L., Alexander, M., and Pedersen, R.A. (2005). Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *J. Cell Sci.* *118*, 4495–4509.
- Varum, S., Momcilović, O., Castro, C., Ben-Yehudah, A., Ramalho-Santos, J., and Navara, C.S. (2009). Enhancement of human embryonic stem cell pluripotency through inhibition of the mitochondrial respiratory chain. *Stem Cell Res.* *3*, 142–156.
- Varum, S., Rodrigues, A.S., Moura, M.B., Momcilovic, O., Easley, C.A., Ramalho-Santos, J., Van Houten, B., and Schatten, G. (2011). Energy metabolism in human pluripotent stem cells and their differentiated counterparts. *PloS One* *6*, e20914.
- Vermeulen, L. (2013). Keeping stem cells in check: a hippo balancing act. *Cell Stem Cell* *12*, 3–5.

- Walker, E.C., McGregor, N.E., Poulton, I.J., Solano, M., Pompolo, S., Fernandes, T.J., Constable, M.J., Nicholson, G.C., Zhang, J.-G., Nicola, N.A., et al. (2010). Oncostatin M promotes bone formation independently of resorption when signaling through leukemia inhibitory factor receptor in mice. *J. Clin. Invest.* *120*, 582–592.
- Wang, G.L., and Semenza, G.L. (1995). Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* *270*, 1230–1237.
- Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E.A., and Semenza, G.L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 5510–5514.
- Warnecke, C., Zaborowska, Z., Kurreck, J., Erdmann, V.A., Frei, U., Wiesener, M., and Eckardt, K.-U. (2004). Differentiating the functional role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  (EPAS-1) by the use of RNA interference: erythropoietin is a HIF-2 $\alpha$  target gene in Hep3B and Kelly cells. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *18*, 1462–1464.
- Watanabe, K., Ueno, M., Kamiya, D., Nishiyama, A., Matsumura, M., Wataya, T., Takahashi, J.B., Nishikawa, S., Nishikawa, S., Muguruma, K., et al. (2007). A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* *25*, 681–686.
- Watanabe, S., Umehara, H., Murayama, K., Okabe, M., Kimura, T., and Nakano, T. (2006). Activation of Akt signaling is sufficient to maintain pluripotency in mouse and primate embryonic stem cells. *Oncogene* *25*, 2697–2707.
- Wenger, R.H. (2002). Cellular adaptation to hypoxia: O<sub>2</sub>-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O<sub>2</sub>-regulated gene expression. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *16*, 1151–1162.
- White, J., and Dalton, S. (2005). Cell cycle control of embryonic stem cells. *Stem Cell Rev.* *1*, 131–138.
- Williams, R.L., Hilton, D.J., Pease, S., Willson, T.A., Stewart, C.L., Gearing, D.P., Wagner, E.F., Metcalf, D., Nicola, N.A., and Gough, N.M. (1988). Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* *336*, 684–687.
- Willson, T.A., Metcalf, D., and Gough, N.M. (1992). Cross-species comparison of the sequence of the leukaemia inhibitory factor gene and its protein. *Eur. J. Biochem. FEBS* *204*, 21–30.
- Wilmot, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J., and Campbell, K.H. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* *385*, 810–813.
- Wobus, A.M., and Boheler, K.R. (2005). Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol. Rev.* *85*, 635–678.
- Wray, J., Kalkan, T., and Smith, A.G. (2010). The ground state of pluripotency. *Biochem. Soc. Trans.* *38*, 1027–1032.
- Wray, J., Kalkan, T., Gomez-Lopez, S., Eckardt, D., Cook, A., Kemler, R., and Smith, A. (2011). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 alleviates Tcf3 repression of the pluripotency network and increases embryonic stem cell resistance to differentiation. *Nat. Cell Biol.* *13*, 838–845.
- Wright, L.S., Phillips, M.J., Pinilla, I., Hei, D., and Gamm, D.M. (2014). Induced pluripotent stem cells as custom therapeutics for retinal repair: progress and rationale. *Exp. Eye Res.* *123*, 161–172.
- Wu, L., Yu, H., Zhao, Y., Zhang, C., Wang, J., Yue, X., Yang, Q., and Hu, W. (2015). HIF-2 $\alpha$  mediates hypoxia-induced LIF expression in human colorectal cancer cells. *Oncotarget* *6*, 4406–4417.
- Wysoczynski, M., Miekus, K., Jankowski, K., Wanzeck, J., Bertolone, S., Janowska-Wieczorek, A., Ratajczak, J., and Ratajczak, M.Z. (2007). Leukemia inhibitory factor: a newly identified metastatic factor in rhabdomyosarcomas. *Cancer Res.* *67*, 2131–2140.
- Xu, C., Inokuma, M.S., Denham, J., Golds, K., Kundu, P., Gold, J.D., and Carpenter, M.K. (2001). Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* *19*, 971–974.

- Xu, H., Ang, Y.-S., Sevilla, A., Lemischka, I.R., and Ma'ayan, A. (2014). Construction and Validation of a Regulatory Network for Pluripotency and Self-Renewal of Mouse Embryonic Stem Cells. *PLoS Comput Biol* *10*, e1003777.
- Xu, R.-H., Chen, X., Li, D.S., Li, R., Addicks, G.C., Glennon, C., Zwaka, T.P., and Thomson, J.A. (2002). BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast. *Nat. Biotechnol.* *20*, 1261–1264.
- Xu, Y., Kershaw, N.J., Luo, C.S., Soo, P., Pocock, M.J., Czabotar, P.E., Hilton, D.J., Nicola, N.A., Garrett, T.P.J., and Zhang, J.-G. (2010). Crystal structure of the entire ectodomain of gp130: insights into the molecular assembly of the tall cytokine receptor complexes. *J. Biol. Chem.* *285*, 21214–21218.
- Yanai, A., Laver, C.R.J., Gregory-Evans, C.Y., Liu, R.R., and Gregory-Evans, K. (2015). Enhanced functional integration of human photoreceptor precursors into human and rodent retina in an ex vivo retinal explant model system. *Tissue Eng. Part A* *21*, 1763–1771.
- Yang, J., Chai, L., Fowles, T.C., Alipio, Z., Xu, D., Fink, L.M., Ward, D.C., and Ma, Y. (2008). Genome-wide analysis reveals *Sall4* to be a major regulator of pluripotency in murine-embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 19756–19761.
- Yang, J., van Oosten, A.L., Theunissen, T.W., Guo, G., Silva, J.C.R., and Smith, A. (2010a). Stat3 activation is limiting for reprogramming to ground state pluripotency. *Cell Stem Cell* *7*, 319–328.
- Yang, J., Gao, C., Chai, L., and Ma, Y. (2010b). A novel SALL4/OCT4 transcriptional feedback network for pluripotency of embryonic stem cells. *PloS One* *5*, e10766.
- Yano, H., Readhead, C., Nakashima, M., Ren, S.G., and Melmed, S. (1998). Pituitary-directed leukemia inhibitory factor transgene causes Cushing's syndrome: neuro-immune-endocrine modulation of pituitary development. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *12*, 1708–1720.
- Ye, S., Li, P., Tong, C., and Ying, Q.-L. (2013). Embryonic stem cell self-renewal pathways converge on the transcription factor *Tfcp2l1*. *EMBO J.* *32*, 2548–2560.
- Yeom, Y.I., Fuhrmann, G., Ovitt, C.E., Brehm, A., Ohbo, K., Gross, M., Hübner, K., and Schöler, H.R. (1996). Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells. *Dev. Camb. Engl.* *122*, 881–894.
- Yi, F., Pereira, L., Hoffman, J.A., Shy, B.R., Yuen, C.M., Liu, D.R., and Merrill, B.J. (2011). Opposing effects of *Tcf3* and *Tcf1* control Wnt stimulation of embryonic stem cell self-renewal. *Nat. Cell Biol.* *13*, 762–770.
- Ying, Q.-L., and Smith, A.G. (2003). Defined conditions for neural commitment and differentiation. *Methods Enzymol.* *365*, 327–341.
- Ying, Q.-L., Stavridis, M., Griffiths, D., Li, M., and Smith, A. (2003a). Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. *Nat. Biotechnol.* *21*, 183–186.
- Ying, Q.-L., Nichols, J., Chambers, I., and Smith, A. (2003b). BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* *115*, 281–292.
- Ying, Q.-L., Wray, J., Nichols, J., Battle-Morera, L., Doble, B., Woodgett, J., Cohen, P., and Smith, A. (2008a). The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* *453*, 519–523.
- Ying, Q.-L., Wray, J., Nichols, J., Battle-Morera, L., Doble, B., Woodgett, J., Cohen, P., and Smith, A. (2008b). The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* *453*, 519–523.
- Ying, Q.-L., Wray, J., Nichols, J., Battle-Morera, L., Doble, B., Woodgett, J., Cohen, P., and Smith, A. (2008c). The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* *453*, 519–523.
- Yoshida, T., Satoh, M., Nakagaito, Y., Kuno, H., and Takeuchi, M. (1993). Cytokines affecting survival and differentiation of an astrocyte progenitor cell line. *Brain Res. Dev. Brain Res.* *76*, 147–150.
- Young, R.A. (2011). Control of the embryonic stem cell state. *Cell* *144*, 940–954.

- Yu, H., Yue, X., Zhao, Y., Li, X., Wu, L., Zhang, C., Liu, Z., Lin, K., Xu-Monette, Z.Y., Young, K.H., et al. (2014). LIF negatively regulates tumour-suppressor p53 through Stat3/ID1/MDM2 in colorectal cancers. *Nat. Commun.* 5, 5218.
- Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., et al. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318, 1917–1920.
- Yuri, S., Fujimura, S., Nimura, K., Takeda, N., Toyooka, Y., Fujimura, Y.-I., Aburatani, H., Ura, K., Koseki, H., Niwa, H., et al. (2009). Sall4 is essential for stabilization, but not for pluripotency, of embryonic stem cells by repressing aberrant trophectoderm gene expression. *Stem Cells Dayt. Ohio* 27, 796–805.
- Zagórska, A., and Dulak, J. (2004). HIF-1: the knowns and unknowns of hypoxia sensing. *Acta Biochim. Pol.* 51, 563–585.
- Zalzman, M., Falco, G., Sharova, L.V., Nishiyama, A., Thomas, M., Lee, S.-L., Stagg, C.A., Hoang, H.G., Yang, H.-T., Indig, F.E., et al. (2010). Zscan4 regulates telomere elongation and genomic stability in ES cells. *Nature* 464, 858–863.
- Zeineddine, D., Hammoud, A.A., Mortada, M., and Boeuf, H. (2014). The Oct4 protein: more than a magic stemness marker. *Am. J. Stem Cells* 3, 74–82.
- Zhang, H., Bosch-Marce, M., Shimoda, L.A., Tan, Y.S., Baek, J.H., Wesley, J.B., Gonzalez, F.J., and Semenza, G.L. (2008). Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J. Biol. Chem.* 283, 10892–10903.
- Zhou, W., Choi, M., Margineantu, D., Margaretha, L., Hesson, J., Cavanaugh, C., Blau, C.A., Horwitz, M.S., Hockenbery, D., Ware, C., et al. (2012). HIF1 $\alpha$  induced switch from bivalent to exclusively glycolytic metabolism during ESC-to-EpiSC/hESC transition. *EMBO J.* 31, 2103–2116.
- Zhu, Z., González, F., and Huangfu, D. (2014). The iCRISPR platform for rapid genome editing in human pluripotent stem cells. *Methods Enzymol.* 546, 215–250.
- Zuk, P.A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J.W., Katz, A.J., Benhaim, P., Lorenz, H.P., and Hedrick, M.H. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 7, 211–228.

# **ANNEXE**

## Review Article

# The Oct4 protein: more than a magic stemness marker

Dana Zeineddine<sup>1\*</sup>, Aya Abou Hammoud<sup>1,2,3\*</sup>, Mohamad Mortada<sup>1</sup>, H el ene Boeuf<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Lebanese University, Beyrouth, Liban; <sup>2</sup>Univ. Bordeaux, CIRID, UMR 5164, F-33 000 Bordeaux, France; <sup>3</sup>CNRS, CIRID, UMR 5164, F-33 000 Bordeaux, France. \*Equal contributors.

Received July 22, 2014; Accepted August 7, 2014; Epub September 5, 2014; Published September 15, 2014

**Abstract:** The Oct4 protein, encoded by the *Pou5f1* gene was the very first master gene, discovered 25 years ago, to be absolutely required for the stemness properties of murine and primate embryonic stem cells. This transcription factor, which has also been shown to be essential for somatic cell reprogramming, displays various functions depending upon its level of expression and has been quoted as a "rheostat" gene. Oct4 protein is in complexes with many different partners and its activity depends upon fine post-translational modifications. This review aims at revisiting some properties of this protein, which has not yet delivered all its potentialities.

**Keywords:** Oct4/ *Pou5f1*, embryonic stem cells, pluripotency, cell lineages, cancer stem cells

### Oct-4: a member of the POU family

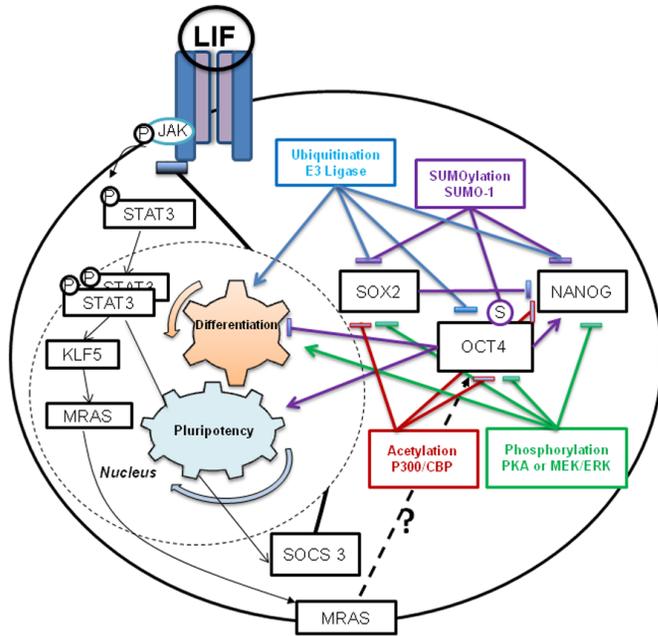
Oct-4, a transcription factor also known as Oct-3, Oct-3/4, Otf3 or NF-A3, is encoded by the *Pou5f1* gene (located on chromosome 6 in human and 17 in mouse) and belongs to the POU (Pit, Oct, Unc) family of DNA binding-proteins. These proteins regulate the expression of target genes by binding to the octamer motif ATGCAAAT within their promoter or enhancer regions [1, 2]. Oct4, whose expression is associated with pluripotent properties of stem cells, is an essential factor controlling early stages of mammalian embryogenesis [3-5].

### Oct4 expression in early embryos

Maternal murine Oct-4 mRNA and protein (352 AA), deposited in the oocyte, are inherited by the zygote and are necessary for development until the 4-cell stage. Proteins are present at low levels at these early stages of murine embryogenesis. Transcription of zygotic *Pou5f1* gene is activated at the 4- to 8-cell stage. Consequently, high level of nuclear Oct-4 protein is detected in all blastomeres until morula stage. Upon blastocyst formation, Oct4 expression remains high in the inner cell mass (ICM) and is not expressed in the trophectoderm (TE). After implantation of the mouse embryo, transient upregulation of Oct4 in a group of cells of

the ICM triggers their differentiation into primitive endoderm (hypoblast) cells. Subsequently, Oct4 expression is down-regulated in these cells [6-8]. During gastrulation, Oct4 is down-regulated and, after day 8 of gestation, it is confined to primordial germ cells [7, 9, 10]. *In vitro*, Oct4 is highly expressed in undifferentiated embryonic stem (ES) cells, embryonic carcinoma (EC) cells and embryonic germ cells. Upon differentiation of these cells induced by Leukemia Inhibitory Factor (LIF) withdrawal or in the presence of retinoic acid, Oct4 expression is down-regulated with different kinetic [11-13].

In humans, Oct-3/4, unlike in mice, encodes 2 isoforms that are generated by alternative splicing of *Pou5f1* mRNA [14, 15]. These isoforms, Oct4-IA and Oct4-IB (360 and 265 amino acids, respectively), of which the 225 amino acids at the C-termini are identical, differ in sequence at their N termini [15]. Critical amounts of human Oct4-IA are required to sustain stem cell self-renewal and it has been shown that Oct4-IB is not related to stemness. In humans, Oct4 mRNA is present throughout all stages from the unfertilized oocyte to the uncompact morula [16-18]. These stages display a variable expression pattern of Oct4 mRNA, between individual blastomeres of the same cell stage with only cytoplasmic localization of Oct4 proteins. No



**Figure 1.** LIF signaling and post-translational modifications of some stemness transcription factors. The maintenance of self-renewal and pluripotency in mESC is controlled by extrinsic signaling pathway (LIF) and intrinsic self-renewal factors (eg: Oct4, Sox2 and Nanog). LIF binds to its heterodimeric receptor which leads to the activation of receptor associated Janus kinases (JAKs) which phosphorylate receptor docking sites and Stat3 on tyrosine 705 (Tyr705). Then, dimers of Phospho-Stat3 translocate to the nucleus and activate the transcription of target genes that are essential for ES cell self-renewal (eg: Klf4, Klf5 which induces expression of Mras GTPase). The activated Stat3 leads also to expression of its own repressor like Socs3, which serves as a negative feedback signal. Phosphorylation, Ubiquitination, SUMOylation and Acetylation of Oct4, Sox2 and Nanog control protein activity, expression, and stability, which result in modulation of ESC self-renewal activity. S stands for “stabilization” of the protein. Arrow indicates “activation” while the line indicates “repression”.

Oct4 proteins are found in the nucleus during these stages [11]. During compaction, the expression of Oct4 protein becomes ubiquitous and abundant in the nuclei of all blastomeres of the morula. In blastocysts, Oct4 transcripts and proteins are present in the ICM [18]. As in murine model, Oct4 is present in human embryonic stem (hES) cells [19], human embryonic carcinoma cells [20] as well as in human embryonic germ cells [21].

**Oct4 is a gatekeeper for ES cell pluripotency**

Pluripotent embryonic stem cell identity is governed by a core of transcription factors involving Oct4 that acts as a key regulator of pluripotent cells across mammalian species. Oct-4

-/- embryos developed to blastocysts only composed of trophoblast cells and they are dead at the time of implantation [4, 22]. In mouse ES cells, Oct4 knockdown results in an up-regulation of genes associated with endoderm differentiation such as *Gata6* and *a-feto-protein* and those associated with trophoblast differentiation such as *Cdx2* [23, 24].

Recent investigation by elegant disruption of maternal or zygotic Oct4 show also the crucial role of this gene for lineage priming *in vivo* [25]. In addition, Oct-4 is required to maintain the pluripotency in hES cells where it acts as a repressor of the gene encoding for hCG (human chorionic gonadotropin), a placental marker in hES cells. Down-regulation of Oct4 in hES cells, was coincident with a significant increase in transcription of genes associated with trophoblast and endoderm lineages [26, 27]. Furthermore, Oct4, Sox2 and Nanog cooperate to maintain the self-renewal and pluripotency of mouse and human ES cells. These three transcription factors, together bound to the promoters of their own genes [28, 29], allow their activation. In addition, they activate the transcription of genes involved in maintaining ES cell self-renewal. *Dppa4*, *TdGF1*, *Oct4*, *Nanog*, and *Lefty2* are positively regulated by Oct4, Sox2 and Nanog and preferentially expressed in ES cells [28]. On the other hand Oct4, Sox2 and Nanog co-occupy the promoters of genes that have key roles in differentiation and development and promote their inactivation [30].

**The intersection between the transcriptional core (Oct4, Sox2 and Nanog) and LIF signaling**

In addition to Oct4, Sox2 and Nanog, the LIF/STAT3 signaling pathway is also known to be critical for the maintenance of pluripotency in murine ES (mES) cells while it seems dispensable in hES cells, despite the expression and the functional activation of the LIF/STAT3 in these cells [31]. Since these first observations, it has been demonstrated that hES cells are closer to murine Epiblast stem cells (primed cells) than to naïve mES cells [32, 33]. In addi-

Oct4: a rheostat effector gene

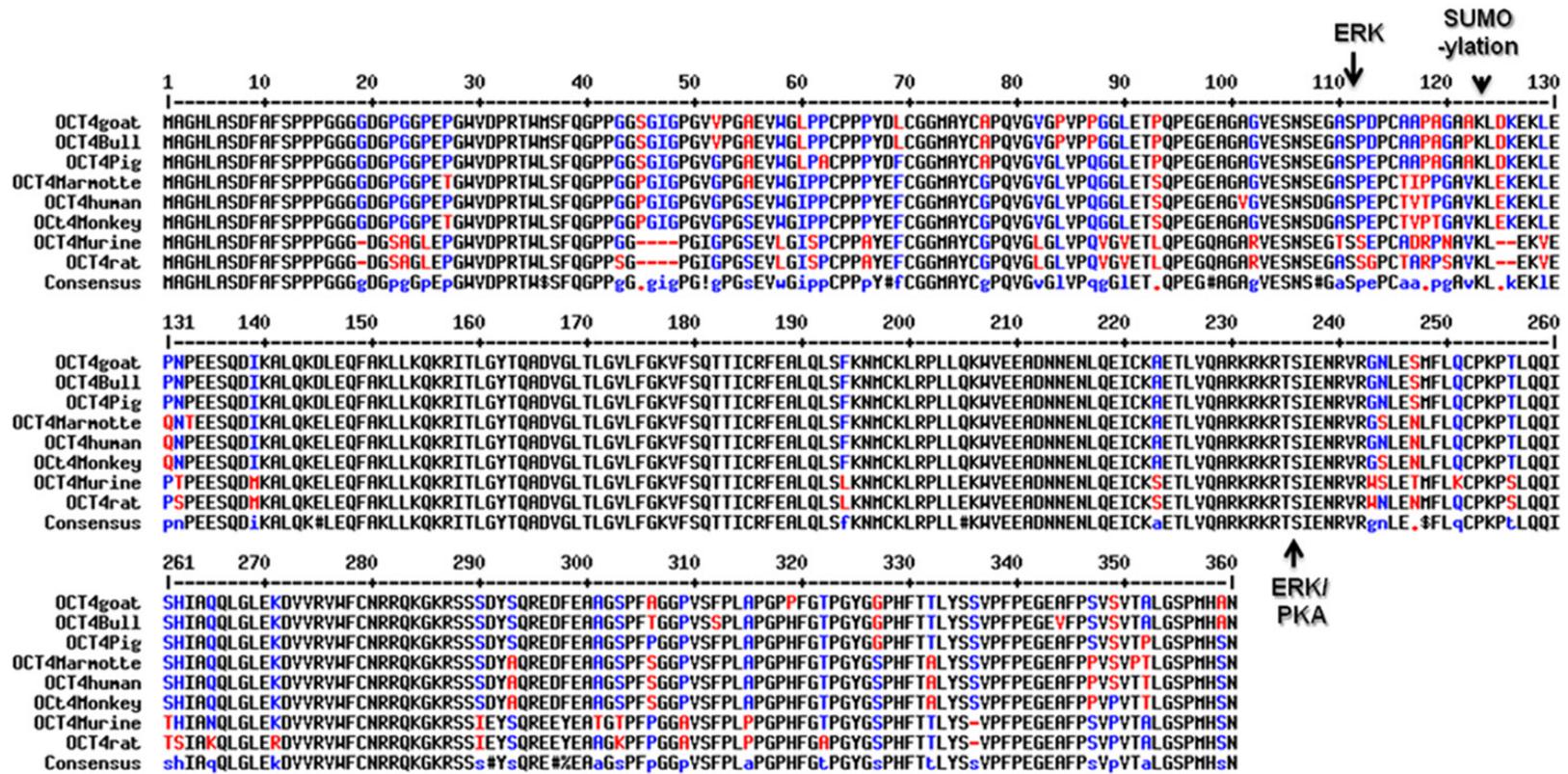


Figure 2. Protein sequence alignment of mammalian OCT4 proteins. Protein sequences of the different mammalian proteins, retrieved from GenBank, have been aligned with the MultiAlign software [81]. The conserved ERK, PKA and SUMOylation sites are indicated.

## Oct4: a rheostat effector gene

tion, recent studies have demonstrated a key role of LIF to induce the reversion of primed to naïve states in the human model [12, 34, 35]. An important challenge of this research field is to characterize the molecular mechanisms of ES cell plasticity.

In mES cells, LIF (Leukemia inhibitory factor), via activation of JAK1/ STAT3 pathway, is an essential cytokine that prevents differentiation. Stat3 activates the expression of a significant number of pluripotency-related genes in ES cells [12, 36-39]. Furthermore, some of the Stat3 target genes are also regulated by Oct4. For example, Oct4 and Stat3 directly bind to the promoter region of *Eed* gene (Embryonic ectoderm development) which encodes for a core component of Polycomb repressive complex 2 [40, 41]. In addition, *Klf4* (Krüppel-like transcription factor 4), a direct downstream target of Oct4 and Stat3, is required for ES cell self-renewal and maintenance of pluripotency [42-44]. These data revealed that the cooperation between the intrinsic Oct4 network and extrinsic LIF pathway is crucial to regulate ES cell self-renewal and pluripotency. However Oct4 and LIF's targets are regulated in different ways upon cell differentiation triggered by LIF withdrawal: indeed, *Oct4* mRNA and protein remains at high level for few days upon LIF withdrawal. This is in contrast with many of the LIF 's targets (named *Pluri* genes like *Mras*, *Ceacam1* and *2*, *Irak3*, *Esrrb*) whose mRNA expression decreased on the first day of LIF withdrawal concomitantly with cell differentiation [12, 13, 39]. It has also recently been shown that dysregulated *Mras* expression, a small GTPase of ras family, lead to an alteration in *Oct4* expression, indicating a potential link between this small GTPase and Oct4 regulation [45], see **Figure 1**. More generally, how the *Pluri* gene cluster, which encodes various types of protein regulators, modulates Master gene activity remains to be resolved.

### Oct4 and its dosage effect on the cell fate

Oct4 dosage is important in the determination of the mES cell fate. Depending upon Oct4 expression level, mES cells maintain their pluripotency or differentiate towards trophoblast (low or no *Oct4* expression) or primitive endodermal and mesodermal (high *Oct4*) lineages [23, 46, 47]. This rheostat behavior of gene, which has also been shown for *Sox2* [48], revealed that these genes exerts a dose-

dependent action. In addition, it has been well documented that neuronal differentiation of ES cells, under the serum-free culture condition, is enhanced because of the sustained overexpression of *Oct4* in ES cells [49]. Moreover, the involvement of *Oct4* in the mesendoderm differentiation and cardiac commitment of ES cells was also proved. Indeed, transient increase in *Oct4* expression upon TGF $\beta$  induction, in undifferentiated ES cells and in the epiblast of mouse embryos leads to establishment of cardiogenic lineages [46]. Also, by different approaches it was shown that, depending upon its expression level, Oct4 could form different protein complexes with members of the SOX family: the Sox2/ Oct4 complex, which binds to a canonical binding site, induces expression of genes involved in the maintenance of pluripotency. In contrast, an increase in *Oct4* or *Sox17* expression level leads to a switch of partners, Sox2 being replaced by Sox17. This complex then binds to a different compressed DNA motif at promoter of genes involved in primitive endoderm and mesendoderm differentiation [46, 47, 50, 51]. Whether the Oct4 protein, along with Sox2 or Sox17, displays various functions as a complex, depending upon their post-translational modification, remains unknown.

### Regulation of Oct4 stability at the post-translational level

The mechanisms through which Oct4 protein activity is regulated are largely unclear. Potential phosphorylated or sumoylated conserved residues, present among the mammalian Oct4 proteins, are shown in **Figure 2**. Oct4 can be phosphorylated by protein kinase A and/or ERK MAPK at a highly conserved residue, Ser 229 (murine) or Ser 236 (human) within the POU DNA-binding homeodomain, (see **Figure 2**) [52]. Phosphorylation at this Ser residue sterically hinders both DNA binding and homodimer assembly [53, 54]. Furthermore, ubiquitination of Oct4 (shown for both murine and human proteins) is also a post-translational modification that dramatically reduces its transcriptional activity. During ubiquitination process, the E3 ligase interacts directly with target proteins and promotes the Ubiquitin transfer. WWP2, an E3 ubiquitin ligase that specifically interacts with Oct4 through its Tryptophan-based WW domains, has been identified in murine and human embryonic

## Oct4: a rheostat effector gene

stem cells. WWP2 promotes the ubiquitination of Oct4 and its degradation both *in vivo* and *in vitro* [55-59]. Additionally, MEK/ERK signaling, activated upon ES cell differentiation, is involved in the negative regulation of human Oct4-IA protein, through its phosphorylation at Ser111 which alters stability and its subcellular localization [60]. Oct4 is also a target for small ubiquitin-related modifier (SUMO)-1 that occurs at a highly conserved K among the mammalian proteins (K118 in mice and K123 in primates), see **Figure 2**. This conserved lysine is located at the end of the amino-terminal transactivation domain and next to the DNA-binding domain. Sumoylation of Oct4, which does not alter its subnuclear localization, enhances its stability, DNA binding and transactivation functions [61, 62]. Whether sumoylation of Oct4 is involved in its increased level, coupled with its function in primitive endoderm differentiation, remains to be established. Interestingly, it has also been shown that SUMOylation of Oct4 and Sox2 regulated Nanog in an opposing manner: SUMOylation of Oct4 enhanced Nanog expression, while SUMOylated Sox2 inhibited its expression. Moreover, SUMOylation of Oct4 by Pias2 or Sox2 by Pias3 impaired the interaction between Oct4 and Sox2 [63]. All these findings reveal that the post-translational modifications of Oct4, act as a regulatory signal to control its activity and stability in a wide variety of cellular processes. This also applies to other stem cell factors, such as Sox-2 and Nanog (**Figure 1**).

### Oct-4 and tumorigenicity

It is well documented that overexpression of Oct4, Sox2 and Nanog, together or separately, led to tumorigenicity, tumor metastasis, and even distant recurrence after chemoradiotherapy in different types of cancer [64-66]. High expression of Oct4 was detected in Prostate [67] and Breast cancer stem cells [68] and in the tumor initiating cells in a p53<sup>-/-</sup> tumor mice model [69]. Oct4 has a critical role in the survival of these tumor cells. Generally, these transcription factors are more frequently overexpressed in poorly differentiated tumors (compared to well differentiated tumors) and expression level of these stemness-involved factors decreases with the differentiation of cells [70-73]. There are probably conserved molecular mechanisms which could explain dedifferentiation of somatic cells, as observed

in cancers, and somatic cell reprogramming [74-76]. So far, reprogramming has not yet been demonstrated to occur, normally, in particular situation in the adult body. However, we could hypothesize that this potential normal process, if it exists, should be constantly under strict control in adult body [for example, co-expression of Oct4, Nanog, Sox2 and myc, one of the *in vitro* reprogramming cocktails, [75, 77-79] should never occur in normal differentiated adult cells]. We could then hypothesize that cancer formation is the result of uncontrolled reprogramming, both involving Oct4 and many other stemness genes [80].

### Conclusion

Oct4, first discovered and characterized 25 years ago [1, 5], is not only a key stemness marker but it is also involved in lineages specification and it is a cell ressetor involved in somatic cell reprogramming *in vitro* [33, 74]. Oct4 is also reexpressed in different types of cancer stem cells, which are tumor cell clusters at the origin of chemotherapy tumor resistance and recidive of cancers. Though, the precise understanding of the molecular mechanisms of Oct4 regulation and particularly of its switch ON and OFF in tissues, depending upon microenvironment, is a challenge in fundamental and applied research fields, for regenerative medicine and cancer therapy.

### Acknowledgements

This work was funded by CNRS, University of Bordeaux, the Region Aquitaine, the SIRIC BRIO of Bordeaux and the SFR TransBiomed. AAH is funded by a co-tutelle PhD fellowship of the Hariri Foundation, Liban. We thank Claire Saucourt, a previous PhD student of the group, for her contribution to **Figure 1**.

### Disclosure of conflict of interest

None.

**Address correspondence to:** Dr. H el ene Boeuf, UMR-CNRS-5164-CIRID, Université de Bordeaux, Bat. 1B, RdC, BP14, 146 rue L eo Saignat, 33076 Bordeaux, France. E-mail: helene.boeuf@u-bordeaux2.fr

### References

- [1] Scholer HR, Balling R, Hatzopoulos AK, Suzuki N, Gruss P. Octamer binding proteins confer transcriptional activity in early mouse embryogenesis. *EMBO J* 1989; 8: 2551-7.

## Oct4: a rheostat effector gene

- [2] Yeom YI, Ha HS, Balling R, Scholer HR, Artzt K. Structure, expression and chromosomal location of the Oct-4 gene. *Mech Dev* 1991; 35: 171-9.
- [3] Boiani M, Scholer HR. Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6: 872-84.
- [4] Nichols J, Zevnik B, Anastasiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Schöler H, Smith A. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 1998; 95: 379-91.
- [5] Scholer HR. Octamania: the POU factors in murine development. *Trends Genet* 1991; 7: 323-9.
- [6] Palmieri SL, Peter W, Hess H, Schöler HR. Oct-4 transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation. *Dev Biol* 1994; 166: 259-67.
- [7] Pesce M, Scholer HR. Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem Cells* 2001; 19: 271-8.
- [8] Jerabek S, Merino F, Schöler HR, Cojocaru V. OCT4: Dynamic DNA binding pioneers stem cell pluripotency. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1839: 138-154.
- [9] Pan GJ, Chang ZY, Scholer HR, Pei D. Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4. *Cell Res* 2002; 12: 321-9.
- [10] Kehler J, Tolkunova E, Koschorz B, Pesce M, Gentile L, Boiani M, Lomelí H, Nagy A, McLaughlin KJ, Schöler HR, Tomilin A. Oct4 is required for primordial germ cell survival. *EMBO Rep* 2004; 5: 1078-83.
- [11] Cauffman G, Van de Velde H, Liebaers I, Van Steirteghem A. Oct-4 mRNA and protein expression during human preimplantation development. *Mol Hum Reprod* 2005; 11: 173-81.
- [12] Trouillas M, Saucourt C, Guillotin B, Gauthereau X, Taupin JL, Moreau JF, Boeuf H. The LIF cytokine: towards adulthood. *Eur Cytokine Netw* 2009; 20: 51-62.
- [13] Trouillas M, Saucourt C, Guillotin B, Gauthereau X, Ding L, Buchholz F, Doss MX, Sachinidis A, Hescheler J, Hummel O, Huebner N, Kolde R, Vilo J, Schulz H, Boeuf H. Three LIF-dependent signatures and gene clusters with atypical expression profiles, identified by transcriptome studies in mouse ES cells and early derivatives. *BMC Genomics* 2009; 10: 73.
- [14] Takeda J, Seino S, Bell GI. Human Oct3 gene family: cDNA sequences, alternative splicing, gene organization, chromosomal location, and expression at low levels in adult tissues. *Nucleic Acids Res* 1992; 20: 4613-20.
- [15] Cauffman G, Liebaers I, Van Steirteghem A, Van de Velde H. POU5F1 isoforms show different expression patterns in human embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Stem Cells* 2006; 24: 2685-91.
- [16] Verlinsky Y, Morozov G, Verlinsky O, Koukharenko V, Rechitsky S, Goltsman E, Ivakhnenko V, Gindilis V, Strom CM, Kuliev A. Isolation of cDNA libraries from individual human preimplantation embryos. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 571-5.
- [17] Abdel-Rahman B, Fiddler M, Rappolee D, Pergament E. Expression of transcription regulating genes in human preimplantation embryos. *Hum Reprod* 1995; 10: 2787-92.
- [18] Hansis C, Grifo JA, Krey LC. Oct-4 expression in inner cell mass and trophectoderm of human blastocysts. *Mol Hum Reprod* 2000; 6: 999-1004.
- [19] Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol* 2000; 18: 399-404.
- [20] Pera MF, Herszfeld D. Differentiation of human pluripotent teratocarcinoma stem cells induced by bone morphogenetic protein-2. *Reprod Fertil Dev* 1998; 10: 551-5.
- [21] Goto T, Adjaye J, Rodeck CH, Monk M. Identification of genes expressed in human primordial germ cells at the time of entry of the female germ line into meiosis. *Mol Hum Reprod* 1999; 5: 851-60.
- [22] Chambers I, Tomlinson SR. The transcriptional foundation of pluripotency. *Development* 2009; 136: 2311-22.
- [23] Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 2000; 24: 372-6.
- [24] Niwa H, Toyooka Y, Shimosato D, Strumpf D, Takahashi K, Yagi R, Rossant J. Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation. *Cell* 2005; 123: 917-29.
- [25] Le Bin GC, Muñoz-Descalzo S, Kurowski A, Leitch H, Lou X, Mansfield W, Etienne-Dumeau C, Grabole N, Mulas C, Niwa H, Hadjantonakis AK, Nichols J. Oct4 is required for lineage priming in the developing inner cell mass of the mouse blastocyst. *Development* 2014; 141: 1001-10.
- [26] Hay DC, Sutherland L, Clark J, Burdon T. Oct-4 knockdown induces similar patterns of endoderm and trophoblast differentiation markers in human and mouse embryonic stem cells. *Stem Cells* 2004; 22: 225-35.
- [27] Zafarana G, Avery SR, Avery K, Moore HD, Andrews PW. Specific knockdown of OCT4 in human embryonic stem cells by inducible short hairpin RNA interference. *Stem Cells* 2009; 27: 776-82.
- [28] Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, Guenther MG, Kumar RM, Mur-

## Oct4: a rheostat effector gene

- ray HL, Jenner RG, Gifford DK, Melton DA, Jaenisch R, Young RA. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 2005; 122: 947-56.
- [29] Niwa H. How is pluripotency determined and maintained? *Development* 2007; 134: 635-46.
- [30] Christophersen NS, Helin K. Epigenetic control of embryonic stem cell fate. *J Exp Med* 2010; 207: 2287-95.
- [31] Dahéron L, Opitz SL, Zaehres H, Lensch MW, Andrews PW, Itskovitz-Eldor J, Daley GQ. LIF/STAT3 signaling fails to maintain self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2004; 22: 770-8.
- [32] Pera MF, Trounson AO. Human embryonic stem cells: prospects for development. *Development* 2004; 131: 5515-25.
- [33] Pera MF. Defining pluripotency. *Nat Methods* 2010; 7: 885-7.
- [34] Gafni O, Weinberger L, Mansour AA, Manor YS, Chomsky E, Ben-Yosef D, Kalma Y, Viukov S, Maza I, Zviran A, Rais Y, Shipony Z, Mukamel Z, Krupalnik V, Zerbib M, Geula S, Caspi I, Schneir D, Shwartz T, Gilad S, Amann-Zalcenstein D, Benjamin S, Amit I, Tanay A, Massarwa R, Novershtern N, Hanna JH. Derivation of novel human ground state naive pluripotent stem cells. *Nature* 2013; 504: 282-6.
- [35] Hanna J, Cheng AW, Saha K, Kim J, Lengner CJ, Soldner F, Cassady JP, Muffat J, Carey BW, Jaenisch R. Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 9222-7.
- [36] Boeuf H, Hauss C, Graeve FD, Baran N, Keding-er C. Leukemia inhibitory factor-dependent transcriptional activation in embryonic stem cells. *J Cell Biol* 1997; 138: 1207-17.
- [37] Bourillot PY, Savatier P. Krüppel-like transcription factors and control of pluripotency. *BMC Biol* 2010; 8: 125.
- [38] Bourillot PY, Aksoy I, Schreiber V, Wianny F, Schulz H, Hummel O, Hubner N, Savatier P. Novel STAT3 target genes exert distinct roles in the inhibition of mesoderm and endoderm differentiation in cooperation with Nanog. *Stem Cells* 2009; 27: 1760-71.
- [39] Mathieu ME, Saucourt C, Mournetas V, Gauthereau X, Thézé N, Praloran V, Thiébaud P, Boeuf H. LIF-Dependent Signaling: New Pieces in the Lego. *Stem Cell Rev* 2012; 8: 1-15.
- [40] Ura H, Usuda M, Kinoshita K, Sun C, Mori K, Akagi T, Matsuda T, Koide H, Yokota T. STAT3 and Oct-3/4 control histone modification through induction of Eed in embryonic stem cells. *J Biol Chem* 2008; 283: 9713-23.
- [41] Ura H, Murakami K, Akagi T, Kinoshita K, Yamaguchi S, Masui S, Niwa H, Koide H, Yokota T. Eed/Sox2 regulatory loop controls ES cell self-renewal through histone methylation and acetylation. *EMBO J* 2011; 30: 2190-204.
- [42] Li Y, McClintock J, Zhong L, Edenberg HJ, Yoder MC, Chan RJ. Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4. *Blood* 2005; 105: 635-7.
- [43] Niwa H, Ogawa K, Shimosato D, Adachi K. A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature* 2009; 460: 118-22.
- [44] Papapetrou EP, Tomishima MJ, Chambers SM, Mica Y, Reed E, Menon J, Tabar V, Mo Q, Studer L, Sadelain M. Stoichiometric and temporal requirements of Oct4, Sox2, Klf4, and c-Myc expression for efficient human iPSC induction and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 12759-64.
- [45] Mathieu ME, Faucheux C, Saucourt C, Soulet F, Gauthereau X, Fédou S, Trouillas M, Thézé N, Thiébaud P, Boeuf H. MRAS GTPase is a novel stemness marker that impacts mouse embryonic stem cell plasticity and *Xenopus* embryonic cell fate. *Development* 2013; 140: 3311-22.
- [46] Zeineddine D, Papadimou E, Chebli K, Gineste M, Liu J, Grey C, Thurig S, Behfar A, Wallace VA, Skerjanc IS, Pucéat M. Oct-3/4 dose dependently regulates specification of embryonic stem cells toward a cardiac lineage and early heart development. *Dev Cell* 2006; 11: 535-46.
- [47] Stefanovic S, Puceat M. Oct-3/4: not just a gatekeeper of pluripotency for embryonic stem cell, a cell fate instructor through a gene dosage effect. *Cell Cycle* 2007; 6: 8-10.
- [48] Kopp JL, Ormsbee BD, Desler M, Rizzino A. Small increases in the level of Sox2 trigger the differentiation of mouse embryonic stem cells. *Stem Cells* 2008; 26: 903-11.
- [49] Shimosaki K, Nakashima K, Niwa H, Taga T. Involvement of Oct3/4 in the enhancement of neuronal differentiation of ES cells in neurogenesis-inducing cultures. *Development* 2003; 130: 2505-12.
- [50] Aksoy I, Jauch R, Chen J, Dyla M, Divakar U, Bogu GK, Teo R, Leng Ng CK, Herath W, Lili S, Hutchins AP, Robson P, Kolatkar PR, Stanton LW. Oct4 switches partnering from Sox2 to Sox17 to reinterpret the enhancer code and specify endoderm. *EMBO J* 2013; 32: 938-53.
- [51] Stefanovic S, Abboud N, Désilets S, Nury D, Cowan C, Pucéat M. Interplay of Oct4 with Sox2 and Sox17: a molecular switch from stem cell pluripotency to specifying a cardiac fate. *J Cell Biol* 2009; 186: 665-73.
- [52] Brumbaugh J, Hou Z, Russell JD, Howden SE, Yu P, Ledvina AR, Coon JJ, Thomson JA. Phos-

## Oct4: a rheostat effector gene

- phorylation regulates human OCT4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: 7162-8.
- [53] Saxe JP, Tomilin A, Schöler HR, Plath K, Huang J. Post-translational regulation of Oct4 transcriptional activity. *PLoS One* 2009; 4: e4467.
- [54] Swaney DL, Wenger CD, Thomson JA, Coon JJ. Human embryonic stem cell phosphoproteome revealed by electron transfer dissociation tandem mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 995-1000.
- [55] Cai N, Li M, Qu J, Liu G-H, Izpisua Belmonte JC. Post-translational modulation of pluripotency. *J Mol Cell Biol* 2012; 4: 262-5.
- [56] Liao B, Jin Y. Wwp2 mediates Oct4 ubiquitination and its own auto-ubiquitination in a dosage-dependent manner. *Cell Res* 2010; 20: 332-44.
- [57] Liao B, Zhong X, Xu H, Xiao F, Fang Z, Gu J, Chen Y, Zhao Y, Jin Y. Itch, an E3 ligase of Oct4, is required for embryonic stem cell self-renewal and pluripotency induction. *J Cell Physiol* 2013; 228: 1443-51.
- [58] Xu H, Wang W, Li C, Yu H, Yang A, Wang B, Jin Y. WWP2 promotes degradation of transcription factor OCT4 in human embryonic stem cells. *Cell Res* 2009; 19: 561-73.
- [59] Xu HM, Liao B, Zhang QJ, Wang BB, Li H, Zhong XM, Sheng HZ, Zhao YX, Zhao YM, Jin Y. Wwp2, an E3 ubiquitin ligase that targets transcription factor Oct-4 for ubiquitination. *J Biol Chem* 2004; 279: 23495-503.
- [60] Spelat R, Ferro F, Curcio F. Serine 111 phosphorylation regulates OCT4A protein subcellular distribution and degradation. *J Biol Chem* 2012; 287: 38279-88.
- [61] Gill G. SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? *Genes Dev* 2004; 18: 2046-59.
- [62] Wei F, Schöler HR, Atchison ML. Sumoylation of Oct4 enhances its stability, DNA binding, and transactivation. *J Biol Chem* 2007; 282: 21551-60.
- [63] Wu Y, Guo Z, Wu H, Wang X, Yang L, Shi X, Du J, Tang B, Li W, Yang L, Zhang Y. SUMOylation represses Nanog expression via modulating transcription factors Oct4 and Sox2. *PLoS One* 2012; 7: e39606.
- [64] Koo BS, Lee SH, Kim JM, Huang S, Kim SH, Rho YS, Bae WJ, Kang HJ, Kim YS, Moon JH, Lim YC. Oct4 is a critical regulator of stemness in head and neck squamous carcinoma cells. *Oncogene* 2014; [Epub ahead of print].
- [65] Boumahdi S, Driessens G, Lapouge G, Rorive S, Nassar D, Le Mercier M, Delatte B, Caauwe A, Lenglez S, Nkusi E, Brohé S, Salmon I, Dubois C, del Marmol V, Fuks F, Beck B, Blanpain C. SOX2 controls tumour initiation and cancer stem-cell functions in squamous-cell carcinoma. *Nature* 2014; 511: 246-50.
- [66] Abubaker K, Luwor RB, Zhu H, McNally O, Quinn MA, Burns CJ, Thompson EW, Findlay JK, Ahmed N. Inhibition of the JAK2/STAT3 pathway in ovarian cancer results in the loss of cancer stem cell-like characteristics and a reduced tumor burden. *BMC Cancer* 2014; 14: 317.
- [67] Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, Ge R, Bell GW, Regev A, Weinberg RA. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat Genet* 2008; 40: 499-507.
- [68] Hu T, Liu S, Breiter DR, Wang F, Tang Y, Sun S. Octamer 4 small interfering RNA results in cancer stem cell-like cell apoptosis. *Cancer Res* 2008; 68: 6533-40.
- [69] Darini CY, Pisani DF, Hofman P, Pedeutour F, Sudaka I, Chomienne C, Dani C, Ladoux A. Self-renewal gene tracking to identify tumour-initiating cells associated with metastatic potential. *Oncogene* 2012; 31: 2438-49.
- [70] Patru C, Romao L, Varlet P, Coulombel L, Raponi E, Cadusseau J, Renault-Mihara F, Thirant C, Leonard N, Berhneim A, Mihalescu-Maingot M, Haiech J, Bièche I, Moura-Neto V, Dumas-Duport C, Junier MP, Chneiweiss H. CD133, CD15/SSEA-1, CD34 or side populations do not resume tumor-initiating properties of long-term cultured cancer stem cells from human malignant glioblastoma. *BMC Cancer* 2010; 10: 66.
- [71] Thirant C, Bessette B, Varlet P, Puget S, Cadusseau J, Tavares Sdos R, Studler JM, Silvestre DC, Susini A, Villa C, Miquel C, Bogeas A, Surena AL, Dias-Morais A, Léonard N, Pflumio F, Bièche I, Boussin FD, Sainte-Rose C, Grill J, Dumas-Duport C, Chneiweiss H, Junier MP. Clinical relevance of tumor cells with stem-like properties in pediatric brain tumors. *PLoS One* 2011; 6: e16375.
- [72] Thirant C, Galan-Moya EM, Dubois LG, Pinte S, Chafey P, Broussard C, Varlet P, Devaux B, Soncin F, Gavard J, Junier MP, Chneiweiss H. Differential Proteomic Analysis of Human Glioblastoma and Neural Stem Cells Reveals HDGF as a Novel Angiogenic Secreted Factor. *Stem Cells* 2012; 30: 845-853.
- [73] Thirant C, Gavard J, Junier MP, Chneiweiss H. Critical multiple angiogenic factors secreted by glioblastoma stem-like cells underline the need for combinatorial anti-angiogenic therapeutic strategies. *Proteomics Clin Appl* 2013; 7: 79-90.
- [74] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126: 663-76.
- [75] Carey BW, Markoulaki S, Hanna JH, Faddah DA, Buganim Y, Kim J, Ganz K, Steine EJ, Casady JP, Creighton MP, Welstead GG, Gao Q,

## Oct4: a rheostat effector gene

- Jaenisch R. Reprogramming factor stoichiometry influences the epigenetic state and biological properties of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2011; 9: 588-98.
- [76] Buganim Y, Faddah DA, Jaenisch R. Mechanisms and models of somatic cell reprogramming. *Nat Rev Genet* 2013; 14: 427-39.
- [77] Okita K, Matsumura Y, Sato Y, Okada A, Morizane A, Okamoto S, Hong H, Nakagawa M, Tanabe K, Tezuka K, Shibata T, Kunisada T, Takahashi M, Takahashi J, Saji H, Yamanaka S. A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat Methods* 2011; 8: 409-12.
- [78] Shi Y, Desponts C, Do JT, Hahm HS, Scholer HR, Ding S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds. *Cell Stem Cell* 2008; 3: 568-74.
- [79] Inoue H, Nagata N, Kurokawa H, Yamanaka S. iPS cells: a game changer for future medicine. *EMBO J* 2014; 33: 409-17.
- [80] Ohnishi K, Semi K, Yamamoto T, Shimizu M, Tanaka A, Mitsunaga K, Okita K, Osafune K, Arioka Y, Maeda T, Soejima H, Moriwaki H, Yamanaka S, Woltjen K, Yamada Y. Premature termination of reprogramming in vivo leads to cancer development through altered epigenetic regulation. *Cell* 2014; 156: 663-77.
- [81] Corpet F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 10881-90.