



HAL
open science

Développement d'un modèle d'étude du vieillissement tissulaire basé sur l'utilisation de cellules souches humaines à pluripotence induite par reprogrammation cellulaire.

Nafissa Ait Hamou

► **To cite this version:**

Nafissa Ait Hamou. Développement d'un modèle d'étude du vieillissement tissulaire basé sur l'utilisation de cellules souches humaines à pluripotence induite par reprogrammation cellulaire.. Sciences du Vivant [q-bio]. UNIVERSITE MONTPELLIER I, 2016. Français. NNT : . tel-01609669

HAL Id: tel-01609669

<https://theses.hal.science/tel-01609669>

Submitted on 3 Oct 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

Pour obtenir le grade de
Docteur

**Délivré par l'Université de Montpellier 1
Préparée au sein de l'école doctorale CBS2**

**Et de l'unité de recherche IRMB
Spécialité : Biologie-Santé**

Présentée par Nafissa AIT-HAMOU

**Développement d'un modèle d'étude
du vieillissement tissulaire basé sur l'utilisation de
cellules souches humaines à pluripotence induite
par reprogrammation cellulaire.**

Soutenue le 13 Janvier 2016 devant le jury composé de

M Simon GALAS, PU, UM	Président
M Grégory JOUVION, CR1, IP	Rapporteur
M Martin CATALA, PU, UPMC	Rapporteur
M Jean-Pierre MOLES, CR1, INSERM	Examineur
M Franck PELLESTOR, MCU-PH, UM	Directeur de thèse
M Jean-Marc LEMAITRE, DR2, INSERM	Codirecteur de thèse



Développement

d'un modèle d'étude du vieillissement tissulaire
basé sur l'utilisation de cellules souches humaines à
pluripotence induite par reprogrammation cellulaire.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble de mon jury et particulièrement Mr Martin CATALA et Mr Grégory JOUVION pour avoir accepté d'être mes rapporteurs et d'évaluer mon travail.

Je souhaite remercier également mon Directeur de thèse Franck Pellestor d'avoir su être là quand il fallait, et plus particulièrement mon co-Directeur de thèse Jean-Marc Lemaitre qui a accepté de m'accueillir dans son équipe et d'avoir encadré cette thèse. Jean-Marc, j'ai beaucoup appris à travers toi.

Je remercie également Jean-Pierre Molès pour sa collaboration à ce projet de thèse, ses corrections, ses commentaires et son temps au cours de la rédaction de ce manuscrit. Mais je le remercie surtout pour sa rigueur scientifique, et sa façon si particulière de m'amener à réfléchir à certaines questions. J'ai tant apprécié nos échanges scientifiques, et ce que j'ai appris de vous. Merci !

Je remercie Ollivier Milhabet, qui a encadré mon stage de Master 2 et sans qui je n'aurai jamais connu ni Jean-Marc et ni la reprogrammation cellulaire. Merci Ollivier, j'ai beaucoup appris à tes côtés, et même de loin je l'avoue. Je partirai avec grand nombre de tes conseils et leçons.

Je remercie également Laure Lapasset, qui m'a permise de participer à ce fastidieux projet que je présente dans ce manuscrit. Je te remercie aussi pour les moments que tu m'as consacré à me former à mes débuts.

Au cours de cette thèse, j'ai eu des rencontres très enrichissantes, et je tenais à remercier les personnes qui en ont fait un moment particulier, et qui m'ont enrichi chacun à leur façon d'un petit quelque chose qui leur ressemble. Je vous remercie Christelle Bruschi et Marco Cadilhac pour m'avoir fait tant rire, je te remercie Etienne Savary pour ta gentillesse. Merci Zohra pour l'honneur que tu m'as fait. Camille pour

l'instant « bagel », Anthony pour tes coups de main et protocoles, Merci Christophe pour toutes ces conversations intéressantes que nous avons eu. Merci Leila Makrini pour être qui tu es tout simplement, j'ai aimé rire avec toi. Merci Delphine, Ounissa, Carole pour votre soutien et vos encouragements. Merci Vincent Gatinois pour tous ces petits coucous et échanges de soirées. Merci Alexia pour ta douceur. Merci Alexandre pour tous nos fous-rires et toutes tes conneries que mes petites oreilles ont pu entendre. Merci Nicolas Boudal pour ton amitié sans faille. Merci Miko Gotchev pour les moments qui nous sont communs et qui ont été une étape à aujourd'hui, je n'oublie pas. Merci Jehanne Aubert car il n'y a pas de fin s'il n'y avait pas eu un début, je n'ai pas la mémoire courte. Merci Tancrède Melet de m'inspirer chaque jour. Merci Ivana pour les fous-rires que nous avons eu ensemble. Merci Andrés Caicedo, Julie Mion, Isabelle Devambez, Laura Yazdani, Anne Vincent, Nelly Béchir pour qui vous êtes. Merci Marion Escobar pour les coups de mains que tu m'as donné. Merci Satish, Merci Nina, Merci Marta, Merci Anissa, Merci Paul pour votre soutien quotidien et votre aide pendant la rédaction de cette thèse. Merci Ilian Abbouda-Leduc pour ta folie, pour ta curiosité et aussi parce j'aime quand tu me fais rire. Merci Matthieu Druot, ce que tu m'as apporté ne se décrit pas, et je t'en serai éternellement reconnaissante. Merci Souleymane pour ton amitié après toutes ces années.

Je remercie également les membres de mon équipe pour leurs corrections et commentaires dans l'élaboration de ce manuscrit. Merci Nicolas, Merci Fanny.

J'ai une pensée pour tous mes étudiants que j'ai eu la chance d'avoir aux cours de mes missions d'enseignements, ils ont tous été formidables. Je me suis régalée à vous enseigner pendant tous ces semestres.

Un merci à toutes les personnes de l'Institut de Génomique Fonctionnelle, que j'ai pu rencontrer pour des échanges ou des coups de mains, et ils sont nombreux.

Un merci particulier à toi Hicham, qui est une personne incroyable et époustouflante au quotidien. J'ai encore du mal à croire que quelqu'un comme toi puisse exister. J'ai de la chance.

Je remercie mes parents pour toutes ces valeurs qu'ils m'ont transmises, et pour tous leurs sacrifices. Ce que vous m'avez apporté dans la vie n'a pas d'égal. Merci.

Ma dernière pensée est pour ma grand-mère partie pendant cette thèse et à qui je dédie ce manuscrit.

Un grand Merci à chacun de vous pour tout ce que vous m'avez apporté.

Je finirai cette thèse avec un peu de chacun d'entre vous.

Sommaire

REMERCIEMENTS	3
SOMMAIRE	6
LISTE DES ABBREVIATIONS	10
INTRODUCTION	13
<u>Chapitre 1</u> : LE DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE	17
1. Les premiers stades du développement :	17
1.1 La période embryonnaire ou embryogénèse :	17
1. 2. Formation du feuillet ectodermique :	18
2. La formation du périderme, esquisses primaires de l'épiderme :	20
<u>Chapitre 2</u> : LA PEAU : UN MODELE D'ETUDE :	22
1. Organisation et propriétés histologiques :	22
1.1 L'hypoderme :	23
1.2 Le derme :	23
1.3 La jonction dermo-épidermique :	24
1.4 L'épiderme :	25
1.5 Organisation de l'épiderme :	26
1.5.1 La couche basale :	26
1.5.2 La couche spinieuse :	26
1.5.3 La couche granuleuse :	26
1.5.4 La couche cornée :	28
2. Les cellules souches de l'épiderme :	29
2.1 Définition, fonction et localisation des cellules souches épidermiques :	29
2.2 Caractérisation des cellules souches épidermiques :	30
2.2.1 La durée du cycle cellulaire :	30
2.2.2 Les intégrines :	30
2.2.3 Le concept de clonogénicité :	31
2.2.4 Les récepteurs membranaires de la transferrine :	32
2.2.5 Les récepteurs à l'Epidermal Growth Factor (EGF) :	33

2.2.6 Le facteur de transcription p63 :	33
3. Cellules souches épidermiques et vieillissement cutané :	34
Chapitre 3 : VIEILLISSEMENT DE L'ORGANISME ET SENESCENCE CELLULAIRE :	35
1. Comment définir le vieillissement ? : Une grande question !	36
2. Qu'est ce que la sénescence ?	36
2.1 La sénescence répllicative :	37
2.2 La sénescence liée aux dommages de l'ADN non télomérique :	40
2.3 La sénescence liée aux altérations mitochondriales :	41
2.4 La sénescence liée au sécrétome :	45
2.5 La sénescence induite par les oncogènes :	45
3. Les marqueurs de la sénescence :	46
4. Sénescence cutané et vieillissement :	48
Chapitre 4 : LES CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES ET LEUR POTENTIEL THERAPEUTIQUE EN MEDECINE REGENERATRICE :	53
1. Les cellules souches embryonnaires pluripotentes :	53
2. Les cellules souches à pluripotence induite et la reprogrammation cellulaire :	54
3. Caractérisation et validation du potentiel pluripotent des cellules programmées :	57
4. Les mécanismes impliqués dans le processus de reprogrammation cellulaire :	59
4.1 Les modifications épigénétiques :	60
4.2 Les transitions Mésoenchymateuses-Epithéliales (EMT) :	61
4.3 L'EMT et les voies p53, p21 :	63
4.4 La sénescence induite par la reprogrammation :	63
4.5 Le vieillissement et la reprogrammation :	64
5. Obtention d'hiPSC et effacement des marques de vieillissement, et après ? :	65
OBJECTIF DE LA THESE :	68

APPROCHES EXPERIMENTALES & RESULTATS :	69
<u>Projet N°1 : Réversibilité du vieillissement cellulaire.</u>	71
- Résumé des résultats de l'article:	71
- Article: <i>“Rejuvenating senescent and centenarian human cells by reprogramming through the pluripotent state”</i>	
<u>Projet N°2 : Evaluation de la réversibilité tissulaire.</u>	72
<u>A. Approches expérimentales :</u>	72
1. Culture de kératinocytes issus de biopsie de donneurs jeune et âgé :	72
2. Mise au point de protocoles de différenciation de cellules souches pluripotentes :	74
2.1 Mise au point Protocole A selon l'article « Human ESC derivatives for full reconstruction of the pluristratified epidermis: a preclinical study »	74
2.2 Mise au point du protocole B selon l'article « Generation of keratinocytes from normal and recessive dystrophic epidermolysis bullosa-IPSC».	75
2.3 Mise au point du protocole C selon l'article « Directed differentiation of human embryonic stem cells to epidermal progenitors »	76
2.4 Mise au point du protocole D adapté du protocole de Metallo et al. 2010	77
3. Caractérisation moléculaire des kératinocytes dérivés d'hiPSCs par marquage en immunofluorescence sur culture 2D :	81
4. Caractérisation du potentiel clonogénique des kératinocytes dérivés d'hiPSCs par observation directe et comptage manuel :	81
5. Caractérisation du potentiel de stratification en épiderme des kératinocytes dérivés d'hiPSCs par culture organotypique en condition air-liquide :	82
5.1 Stratification sur derme mortifié ou sur insert et analyse histochimique par coloration à l'hématoxyline-éosine:	82
5.2 Stratification sur un mélange de collagène-chitosan-fibroblastes et analyse histologique par la coloration à l'Hématoxyline-Eosine:	84
5.3 Stratification sur collagène-fibroblastes et insert :	87
<u>B. Résultats obtenus :</u>	89
DISCUSSION :	103
CONCLUSION et PERSPECTIVES :	121
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :	123
ANNEXES : Informations supplémentaires à l'article Lapasset et al. 2011	145

LISTE DES ABBREVIATIONS

A

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADP + Pi : Adénosine Di-Phosphate + Phosphate inorganique

ARF : Alternate Reading Frame

ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated

ATP : Adénosine Tri-Phosphate

ATR : Ataxia Telangiectasia and Rad3-Related

B

BMP4 : Bone Morphogenic Protein 4

BrdU : 5-Bromo-2'-deoxyuridine

C

CD71 : Cluster of Designation 71

CDK : Cycline Dependant Kinase

CDNK2A : Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A

CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

CSE : Cellules Souches Epidermiques

D

DDR : DNA Damage Response

E

EGF: Epidermal Growth Factor

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

EMT : Epithelial-Mesenchymal Transition

EpiSC : Epidermal Stem Cell

G

GAG : Glycosaminoglycanes

H

H3K9me3 : Lysine 9 tri-méthylée sur l’Histone H3

hESCs : human Embryonic Stem Cells

hiPSCs : human Induced Pluripotent Stem Cells

HP1 γ : Heterochromatin Protein 1 gamma

I

IGF1: Insulin Growth Factor 1

INK4A : Inhibitor Of Cyclin-Dependent Kinase Type 4

J

JDE : Jonction Dermo-Épidermique

K

K1/10 : Cytokératines 1 et 10 (dimère)

K14 : Cytokératine 14

K8/18 : Cytokératines 8 et 18 (dimère)

KGF : Keratinocyte Growth Factor

KLF4 : Kruppel-like factor 4

L

Lin28 : Lineage Protein 28

LRC : Label Retaining Cells

M

MacroH2A : Histone H2 possédant une queue C-terminale en plus

MCI : Masse Cellulaire Interne

MDM2 : Mouse Double Minute 2 (Ubiquitine-ligase)

MET : Mesenchymal-Epithelial Transition

MMP : Métalloprotéinase

c-MYC : Myelocytomatosis oncogene cellular homolog

N

NADH : Nicotinamide Adenine Dinucleotide

NADPH : Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Hydrogen

NOD/SCID : Non-Obese Diabetic/Severe Combined Immunodeficiency

O

OCT3/4 (voir aussi POUF5) : Octamer-binding transcription factor 4

OIS : Oncogen-Induced Senescence

P

POUF5 : POU domain, class 5

R

Rb : Retinoblastoma protein

REX1 : Ring-Exported Protein 1

RIS : Reprogrammation-Induced Senescence

ROS : Reactive Oxygen Species

S

SAHF : Senescence Associated Heterochromatin Foci

SASP : Senescence Associated Secretory Phenotype

SA- β -Galactosidase : Senescence Associated β -Galactosidase

SSEA-4 : Stage-Specific Embryonic Antigen-4

SOX2 : Sex Determining Region Y-Box 2

T

TA ou TAC : Transit Amplifying Cells

TGF α/β : Transforming Growth Factor α/β

Tra1-60: Tumour Rejection Antigen 1-60

U

UV : Ultra-Violet

Introduction

INTRODUCTION

La cellule représente l'unité fonctionnelle minimale du vivant. Il s'agit là d'un système très complexe au sein duquel des mécanismes vont interagir entre eux afin d'assurer au mieux l'ensemble des fonctions de la cellule au cours de sa vie.

Au cœur de la cellule, les chromosomes forment une encyclopédie où sont compilées les informations précieuses et nécessaires au bon fonctionnement du système et à la transmission à l'identique à la descendance. Bien qu'il soit protégé, l'ADN portant ces informations, est soumis en permanence à des signaux de stress de diverses sources qui vont être à l'origine de dommages variés sur cet ADN (ex. des cassures). Pour pallier à de telles altérations, la cellule possède de nombreux mécanismes capables de réparer ces dommages tout en conservant le plus fidèlement possible l'information génétique. Ainsi, assurer un contrôle précis et coordonné de cette transmission afin de garantir le renouvellement cellulaire et maintenir ainsi l'intégrité des différents tissus au cours du temps est une des régulations majeurs de l'organisme vivant.

Cependant, avec l'âge, la régulation des différentes fonctions physiologiques de l'ensemble des tissus du corps humain va progressivement décliner. Cette altération de l'homéostasie (équilibre physiologique) que l'on associe au vieillissement se caractérise au niveau cellulaire par des modifications morphologiques et fonctionnelles des cellules. Durant ces changements, plusieurs caractéristiques sont observées à différents niveaux notamment l'accumulation de cellules sénescentes dans les tissus (ex : la peau) accompagnée de modifications de l'organisation du génome en chromatine et d'anomalies de l'architecture nucléaire. Dans le cas de la peau, la présence de cellules sénescentes peut conduire à la perte de ses propriétés physiologiques dont l'impact serait la perte de la capacité de l'épiderme à se régénérer limitant ainsi son rôle de barrière protectrice (Zouboulis and Makrantonaki, 2011). Etudier de tels phénomènes notamment dans le cadre de la dermatologie, pourraient ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques notamment grâce aux avancées technologiques effectuées dans le domaine des cellules souches et de la médecine régénérative. Un des exemples est la découverte de la reprogrammation cellulaire en 2007 par l'équipe du Pr Yamanaka. Dans leurs travaux, ils montrent qu'il est possible grâce à des facteurs associés à la pluripotence, de générer à partir de cellules somatiques adultes humaines des cellules souches à pluripotence induite ou hiPSCs, présentant des propriétés comparables à des cellules souches embryonnaires humaines (Takahashi et al.,

2007). Sans risque de rejet, sans problème d'éthique, comme rencontré avec les cellules souches embryonnaires humaines, elles sont une opportunité pour modéliser et comprendre les mécanismes cellulaires tant physiologiques tel que le vieillissement que pathologiques.

Par exemple, dans nos propres travaux, il a été possible de générer des cellules hiPSCs à partir de cellules issues de biopsies de patients jeunes et âgées, sénescents ou prolifératives. Notre objectif a été de conduire ces cellules souches pluripotentes vers une différenciation terminale spécifique, dans le but d'établir un lien entre sénescence et vieillissement. Outre la caractérisation de leur état pluripotent, nous avons également mis en évidence au cours d'une différenciation dirigée en fibroblastes, que les caractéristiques cellulaires de ces fibroblastes présentaient une physiologie rajeunie. La poursuite de ces travaux menés sur une différenciation spécifique en kératinocytes vers une reconstruction organotypique d'un épiderme en interface air/liquide permettrait de faire état d'un tel rajeunissement au niveau tissulaire. L'utilisation du potentiel des cellules souches pluripotentes comme ressource biologique dans le cadre de protocoles de thérapie cellulaire cutanée mais également comme outil pour étudier les mécanismes moléculaires tissulaires et/ou impliqués dans la formation d'un tissu tel que l'épiderme chez l'humain est un véritable défi.

L'objectif de ce travail de thèse a été de développer un modèle tissulaire de peau par la mise au point d'un protocole de différenciation dirigée des cellules souches pluripotentes obtenues par reprogrammation de cellules sénescents ou prolifératives humaines en cellules somatiques épidermiques humaines.

Pour développer sur ce sujet abordant tant l'aspect développemental que vieillissement tissulaire, ce manuscrit se composera d'une introduction en 4 parties.

- Dans la 1^{ème} partie, nous aborderons les principales lignes du **développement**. Au cours de cette étape de la vie, les cellules souches pluripotentes humaines s'engagent dans un **programme de différenciation** afin de former les différents organes de l'organisme et nous intéresserons essentiellement sur la mise en place de la **peau**.

- La 2^{ème} partie, va nous permettre d'apprécier les aspects de ce **tissu cutané** aussi fascinant que complexe au stade **adulte**. Ainsi après avoir traité de ces différents aspects, nous intéresserons à un sous-type cellulaire de l'**épiderme**, les cellules souches basales de l'épiderme et leur potentiel régénératif à la base de l'autorenouvellement permanent de l'épiderme au cours de la vie d'un individu qui vont être à l'origine des **kératinocytes**, sous-type cellulaire majoritaire de l'épiderme et responsable des principales fonctions de ce tissu.

- La 3^{ème} partie porte sur le **vieillessement** et tous les aspects cellulaires retrouvés notamment dans le cas de la **sénescence**, puis dans le cas d'un tissu, ici la **peau**.
- La 4^{ème} et dernière partie abordera la thématique de la **pluripotence**, au travers des cellules souches embryonnaires humaines ainsi que des cellules souches à pluripotence induite par reprogrammation cellulaire .
- Et nous terminerons enfin sur l'enjeu d'utiliser une technologie dans la mise en place de protocoles de différenciation dans la perspective de les étendre à la médecine régénérative.

S'ensuivra à cette introduction, une présentation des observations préliminaires effectuées au cours de ce travail de thèse, qui seront discutées dans la dernière partie et qui permettront d'apporter des éléments de réponse quant aux perspectives que présente ce projet de thèse.



Chapitre 1 :

LE DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE.

1. Les premiers stades du développement :

La vie de chaque individu se définit par un début, une durée et une fin. A ses débuts du développement, l'être vivant est un œuf. Cet œuf (zygote) résulte de la fusion cellulaire entre un gamète mâle (spermatozoïde) et un gamète femelle (ovocyte II) au cours de l'étape dite de fécondation. Débute alors une organisation progressive de plusieurs événements moléculaires et cellulaires pour former un organisme pluricellulaire, complexe, coordonné, et différencié. Afin d'aboutir aux transformations morphologiques qui formeront le futur individu, deux périodes majeurs se distinguent : la période embryonnaire (ou embryogénèse) et la période fœtale (ou organogénèse). La période embryonnaire correspond aux 8 premières semaines de la grossesse. Elle se divise en une période pré-embryonnaire - de la 1^{ère} à la 3^{ème} semaine -, basée sur l'individualisation de l'embryon et la mise en place des trois feuilletts embryonnaires, suivie de la période embryonnaire proprement dite - de la 4^{ème} à la 8^{ème} semaine - pendant laquelle se développent les différentes ébauches embryonnaires des organes. Cette mise en place s'effectue grâce à l'interaction de facteurs génétiques et environnementaux, coordonnés avec précision dans l'espace et dans le temps, qui permettent d'établir des champs d'induction tissulaire. La période fœtale (pendant les 7 derniers mois de la grossesse) est la période du développement au cours de laquelle se constituent les organes et les appareils. Sa mise en place se caractérise par un remodelage et un processus de maturation des constituants cellulaires des feuilletts fondamentaux.

1.1 La période embryonnaire ou embryogénèse :

Durant 1^{ère} semaine suivant la fécondation, le zygote débute ses premières modifications. L'œuf fécondé subit sa 1^{ère} division cellulaire (mitose). A l'issue de cette première division qui ne s'accompagne pas de croissance cellulaire, deux cellules appelées blastomères sont formées, qui vont à leur tour et de manière asynchrone, donner 4 blastomères. S'ensuit plusieurs divisions successives toutes les 20 à 24h. Après 3 jours, le zygote est passé de 2 blastomères à 6, puis 12 cellules blastomères.

Au 4^{ème} jour, l'œuf atteint le stade morula et comporte 32 blastomères sous forme d'une petite sphère d'un diamètre de 200 µm, dont la forme s'apparente à une petite mûre.-Au

centre, les cellules sont sphériques tandis qu'elles s'aplatissent en périphérie pour constituer la paroi de la sphère (trophoectoderme) (Figure 1). A ce stade, par leur capacité à former toutes les cellules nécessaires au développement de l'organisme, annexes extra-embryonnaires comprises, les cellules sont dites totipotentes.

Du 4^{ème} au 7^{ème} jour du développement, le blastocyste se forme par compaction et grossissement la masse cellulaire interne (MCI). C'est de cette MCI, dont les cellules sont à présent dites pluripotentes (*in vivo*, capacité des cellules à former tous les types cellulaires des futurs organes), qu'émerge le futur embryon. En une semaine que dure la période embryonnaire, la taille de l'embryon au sens strict a été multipliée par plus de 200 fois et sa masse par près d'1 million. Le grossissement de la masse cellulaire interne s'arrête au premier contact avec la paroi utérine. C'est le début de la différenciation des cellules du bouton embryonnaire. Bien qu'encore précaire avec une taille de 1,5 à 2 mm, l'embryon est à un stade bien différencié.

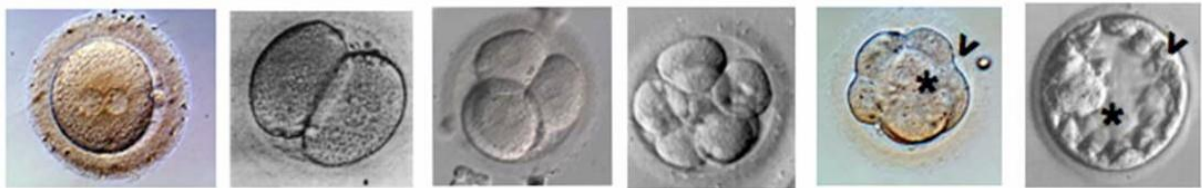


Figure 1 : Description des premières divisions cellulaires de la période embryonnaire :

Après fécondation, la première segmentation permet l'apparition de 2 cellules ou blastomères qui vont à leur tour donner des cellules filles. Les divisions successives mènent à la formation d'un œuf de 8, 16, 32 puis 64 cellules. A 64 blastomères, l'embryon est au stade morula (4^{ème} jour). Au stade suivant, le stade blastocyste, une cavité centrale se forme à un pôle (le blastocèle). A l'autre pôle, la compaction des cellules conduit à la formation de la masse cellulaire interne appelé le bouton embryonnaire.

Source : <http://yaolab.stanford.edu>

1.2. Formation du feuillet ectodermique :

Le bouton embryonnaire se transforme en un disque embryonnaire didermique comprenant deux feuillets appelés épiblaste (responsable de la formation des tissus embryonnaires) et hypoblaste (responsable de la formation des annexes extra-embryonnaires).

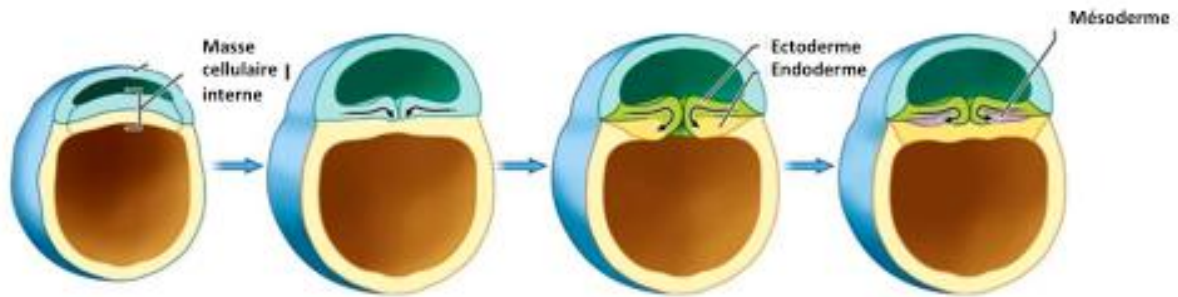


Figure 2 : Formation de l'embryon tridermique :

Au stade de l'embryon didermique, le feuillet embryonnaire dorsal est appelé épiblaste (en bleu) et le feuillet ventral est appelé l'hypoblaste (en jaune). Aux 15-17èmes jours, des cellules de l'épiblaste s'invaginent et s'insinuent entre les deux feuillets formant ainsi le 3^{ème} feuillet embryonnaire, le mésoblaste (en rose). Au stade tridermique, l'épiblaste devient l'ectoblaste, et l'hypoblaste devient l'entoblaste.

Source : <http://cvirtuel.cochin.univ-paris5.fr/embryologie>

Progressivement, la nature de ces 2 feuillets se modifie. De l'épiblaste se forme l'ectoblaste (ectoderme) et le mésoblaste (mésoderme), et l'hypoblaste sera remplacé par l'endoblaste (endoderme) (Figure 2). Ceci marque le début de la gastrulation (3^{ème} semaine du développement), étape importante appelée la gastrulation. Parallèlement à cela, au niveau du noeud primitif, les cellules de l'ectoderme primitif migrent, se compactent et donnent ainsi naissance à la notochorde (formation du canal axial central) qui formera par la suite la chorde. Dès sa formation, la notochorde a un rôle d'inducteur sur l'ectoderme qui s'épaissit et se différencie en plaque neurale. La formation de la notochorde puis de la chorde marque définitivement la fin de la gastrulation et l'entrée dans la phase de la neurulation. L'embryon tridermique se compose alors de l'endoderme définitif au niveau interne à partir duquel se forme le système digestif, du mésoderme responsable de la formation des systèmes circulatoires, squelettiques et musculaires, et de l'ectoderme définitif à l'origine du système nerveux et de l'épiderme. Pour favoriser la formation de l'épiderme à partir de l'ectoderme de nombreux mécanismes moléculaires entrent en jeu. L'un des facteurs clés dans cette différenciation dichotomique est le BMP4 dont la présence ou l'absence favorise l'un ou l'autre des lignages. Selon le gradient de concentration du BMP4 sécrétée, et de l'effet ou non des antagonistes du BMP4, les cellules du neuroectoderme s'engagent vers la formation de crêtes neurales, de tissu neural ou épidermal (Kierszenbaum). Le modèle actuellement admis est un engagement du neuroectoderme vers le lignage neuronale par un mécanisme dit « par défaut » en absence de la protéine BMP4 (Sasai, 2001). A cet effet, se superpose aussi une action de la notochorde, qui, *via* des protéines inhibitrices qu'elle sécrète, va venir neutraliser le BMP4 circulant afin de favoriser le lignage neural. Au niveau de ses parties

latérales, le neuroectoderme n'est en revanche, pas sous l'influence de la notochorde. Le BMP4 sécrété par l'ectoderme vient inhiber le processus de différenciation vers le lignage neuronale et permettre ainsi aux cellules des portions latérales du neuroectoderme de s'engager dans le lignage épidermal (Figure 3).

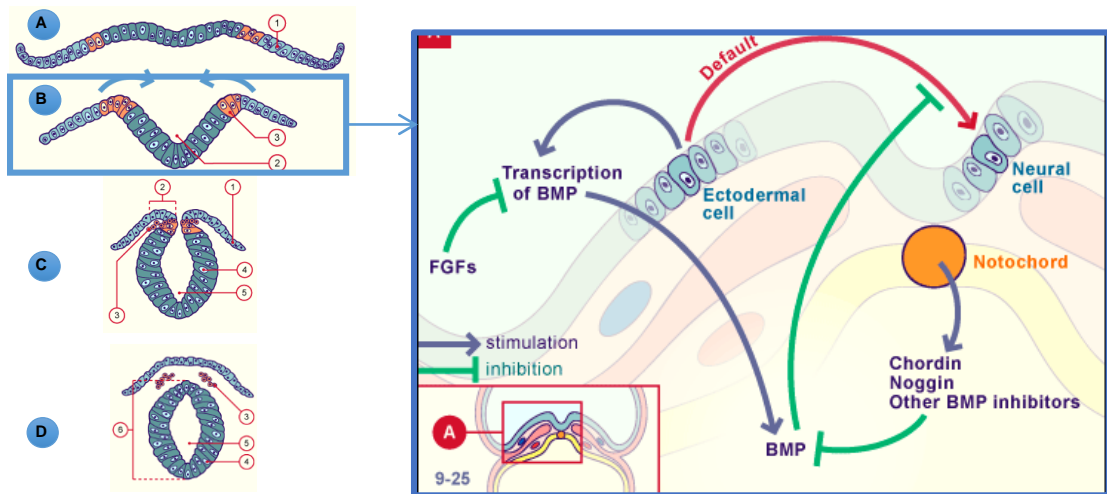


Figure 3 : Evènements moléculaires et cellulaires de la différenciation de l'ectoderme au cours de l'embryogénèse : A gauche) au cours de la formation du tube neural (C-D), l'ectoderme (A) s'épaissit pour former la plaque neurale (B). La formation de cette plaque neurale permet la distinction de deux ensembles : le neuroectoderme au niveau central et l'ectoderme au niveau dorso-latéral. A droite) au cours de la gastrulation, la différenciation de l'ectoderme vers le lignage épidermal se fait par inhibition de la voie neurale (voie d'expression par défaut). Cette inhibition se fait par la sécrétion du facteur de croissance BMP4 par les sections latérales au neuroectoderme.

Source : www.embryology.ch

2. La formation du périoderme, esquisses primaires de l'épiderme :

De la 4^{ème} à la 8^{ème} semaine, le processus de maturation est mis en place. L'ébauche épidermique commence à prendre ses premières caractéristiques de tissu pluristratifié.

L'ectoderme superficiel enveloppant l'embryon se spécialise et forme un épithélium pavimenteux simple constitué de cellules dites progénitrices exprimant les cytokératines 8/18 (K8/18) (Bragulla, 2009). Ces cellules prolifèrent et forment une nouvelle couche de cellules formant un épithélium pavimenteux aux cellules plus larges et aplaties appelé périoderme. On distingue alors une couche externe et une couche basale.

Au niveau basal, les cellules prolifératives s'organisent en couche basale. Progressivement, les cellules prolifératives perdent l'expression des cytokératines K8/18, remplacées par l'expression des cytokératines K5/14 qui donnera le nom de kératinocytes aux cellules de l'épiderme différencié.

Dès la 11^{ème} semaine, la couche basale prolifère et donne naissance à une nouvelle couche intermédiaire qui va se loger entre la couche basale et le périoderme. Dès la 20^{ème} semaine, alors que le périoderme en surface débute son processus de desquamation tandis que la couche intermédiaire s'organise en 3 couches de kératinocytes. Les premières caractéristiques structurelles de l'épiderme définies, on distingue alors les 4 principales strates qui seront maintenues tout le reste de la vie de l'individu (Figure 4). Au niveau basal, le *stratum germinativum*, au niveau suprabasal le *stratum spinosum*, au niveau intermédiaire le *stratum granulosum*, et en superficie le *stratum corneum*. Les aspects moléculaires et fonctionnels sont développés dans le chapitre 2.

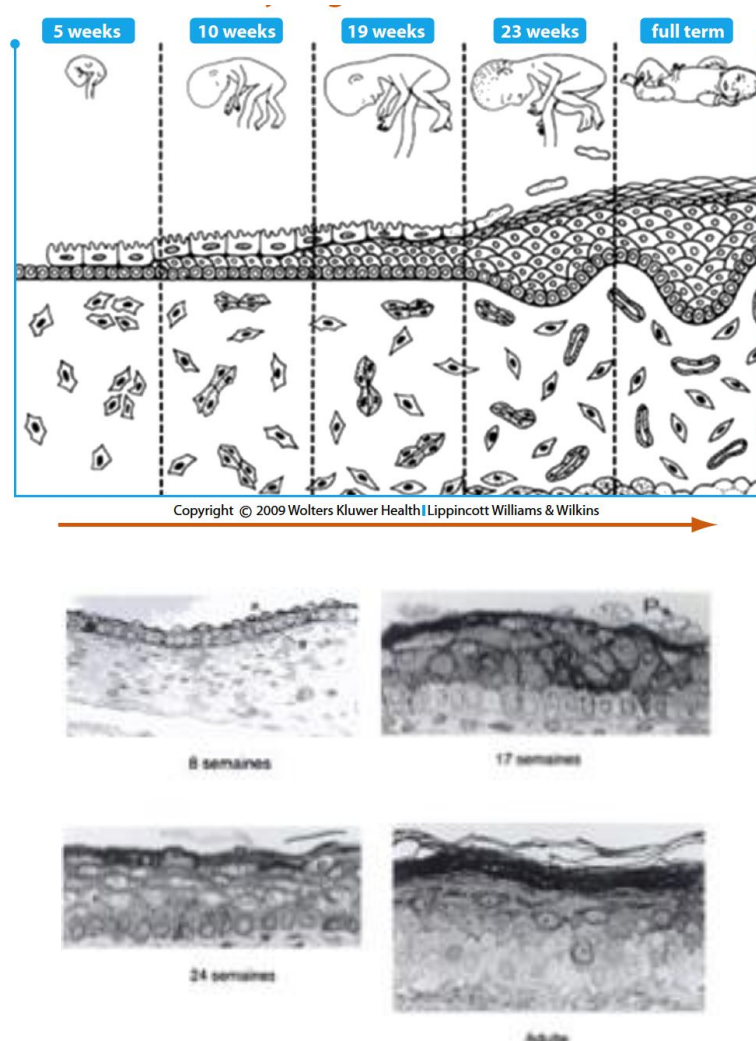
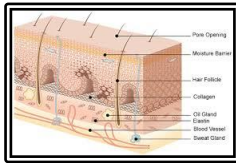


Figure 4 : Récapitulatif des différentes étapes de la formation du futur épiderme : 1) A 4-5 semaines, l'embryon est délimité d'une assise cellulaire unique appelée épiblaste. A 7 semaines, le futur épiderme se constitue de 2 assises cellulaires. Au niveau superficiel, les cellules forment le périoderme qui disparaîtra à la 23^{ème} semaine. A 12-13 semaines, le futur épiderme est formé de 3 assises cellulaires. Cette couche intermédiaire va s'épaissir et atteindre 4-5 assises cellulaires à la 25^{ème} semaine. A la 23^{ème} semaine, le périoderme est remplacé par la couche cornée. A la naissance, l'épiderme mature est complètement formé. 2) Coupes de peau à 8, 17, 24 semaines et à l'âge adulte représentant les étapes décrites ci-dessus. Source : Embryologie humaine, Larsen. Ed. De boeck.



Chapitre 2 :

LA PEAU : UN MODELE D'ETUDE

La peau représente une frontière mécanique, physique, chimique et immunologique d'une efficacité remarquable.

Après la naissance, l'épiderme continue à évoluer jusqu'à atteindre une superficie de 2m² à l'âge adulte, correspondant à 16% du poids du corps constituant ainsi le plus lourd organe de l'être humain. C'est un véritable tissu de revêtement qui enveloppe la surface du corps et allant jusqu'à recouvrir d'une muqueuse les cavités des orifices naturels pour protéger l'organisme de l'environnement extérieur en assurant un rôle de barrière sélective (Boutonnat, 2008). Bien que d'apparence inerte, c'est un organe très dynamique, qui est en permanence en train de se renouveler afin de remplacer les cellules qui se desquament à la surface du corps. Ce renouvellement est assuré par la formation et la progression de nouvelles cellules de la couche basale de l'épiderme à sa surface. Sur l'ensemble de l'épiderme recouvrant le corps, c'est environ 300.10⁶ cellules qui sont perdues chaque jour et qui doivent être renouvelées, ce qui représente au total une perte considérable au stade adulte. Ce renouvellement va avoir lieu en 21 jours et bien que d'une grande résilience, cela reflète une dynamique importante de l'épiderme car chaque jour lorsqu'une cellule se desquame, une autre est produite en profondeur pour la remplacer.

1. Organisation et propriétés histologiques :

D'un point de vue histologique, la peau s'organise de manière complexe. Elle se subdivise en 4 régions superposées qui sont du niveau le plus profond à la surface externe (Figure 5):

- l'hypoderme,
- le derme,
- la jonction dermo-épidermique
- et l'épiderme.

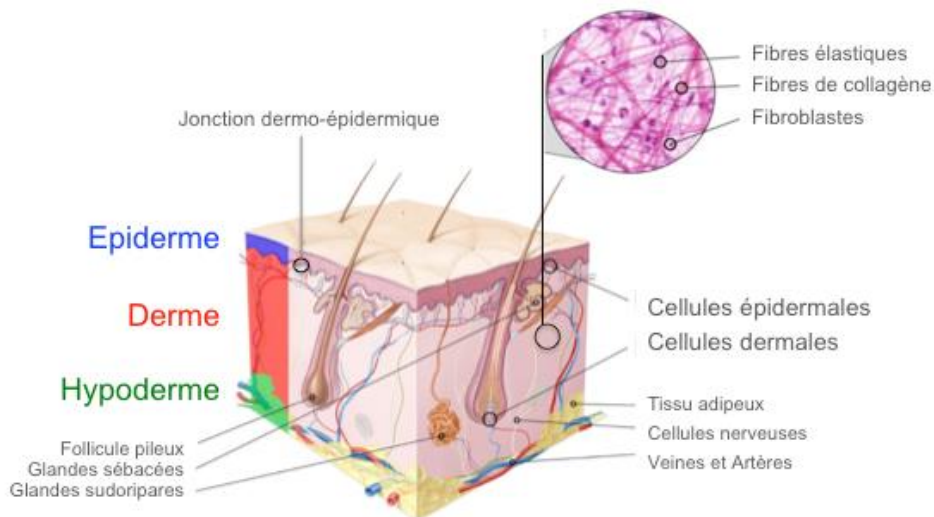


Figure 5 : Représentation illustrant la composition d'une peau humaine.

1.1 L'hypoderme :

L'hypoderme, localisé en profondeur, constitue un tissu gras sous-cutané. Ce tissu conjonctif est associé à des amas d'adipocytes qui vont être responsables de l'accumulation de graisses, assurant une barrière thermique et une partie des réserves énergétiques de l'organisme. L'hypoderme relie de façon souple la peau aux organes sous-jacents et va être rattaché au derme par sa surface grâce à des fibres de collagène et d'élastine (3, 2011)

1.2 Le derme :

D'origine mésodermique, le derme constitue sur le plan histologique un tissu conjonctif fibro-élastique qui soutient l'épiderme et le rattache au tissu sous-cutané. Richement innervé, il se constitue principalement d'une matrice extracellulaire (MEC) et de fibroblastes.

Son épaisseur varie en fonction de sa localisation corporelle, et peut atteindre jusqu'à 4 mm au niveau du dos par exemple. Sa surface irrégulière présente de nombreuses projections -les papilles dermiques- qui s'imbriquent avec des projections épidermiques -les crêtes épidermiques. Ces papilles augmentent la surface de la jonction dermo-épidermique et la consolident, ce qui explique qu'elles soient retrouvées en plus grande quantité au niveau des régions où la peau est soumise à de plus fortes pressions.

Au sein de ce tissu, on retrouve la matrice extracellulaire essentiellement composée d'eau, de collagène de type I, d'élastine, de protéoglycanes et de glycosaminoglycanes

notamment au niveau du derme réticulaire (3, 2011). On peut également y distinguer deux couches définissant le derme réticulaire et le derme papillaire.

Le derme réticulaire est un tissu conjonctif épais, dense et irrégulier composés de fibroblastes réticulaires. Le derme papillaire est plutôt un tissu conjonctif lâche, superficiel et fin, constitué de fibroblastes papillaires principalement, de mastocytes, de macrophages et de leucocytes, qui s'insinuent entre les crêtes épidermiques pour former les papilles dermiques (3, 2011).

L'élasticité de la peau est possible grâce à ce réseau de fibres élastiques de la MEC dont les plus épaisses se situent dans la couche réticulaire profonde, et les plus fines vers la surface. Très toniques au cours de la jeunesse, ces fibres de collagène vont plutôt avoir tendance à s'épaissir et se fragmenter avec l'âge. Les fibres élastiques vont augmenter en nombre puis en épaisseur puis disparaître, ce qui explique que la peau perde de sa souplesse et laisse place à l'apparition de rides.

L'ensemble de ces caractéristiques structurales permet au derme d'assurer sa fonction de soutien et apporte à la peau les propriétés d'extensibilité, d'élasticité et de résistance. Il est également le siège des différentes annexes épidermiques telles que les follicules pileux, les glandes sébacées et sudorales ; des fibres musculaires ; des vaisseaux sanguins et lymphatiques ainsi que les fibres nerveuses, leur permettant d'assurer à chacun leur fonction au sein de la peau.

1.3 La jonction dermo-épidermique :

A la surface du derme repose la lame basale, riche en GAG (glycosaminoglycanes), de fibrilles de réticuline, de protéines fibreuses de type collagène VII ou fibronectine, qui assure la jonction entre le derme et l'épiderme. Cette jonction, dite jonction dermo-épidermique, est une structure complexe permettant d'assurer la cohésion entre l'épiderme et le derme (3, 2011).

Elle possède plusieurs rôles. Elle assure le rôle de barrière sélective permettant le contrôle des échanges moléculaires et cellulaires entre ces deux compartiments. Elle intervient également en tant que soutien mécanique assurant l'ancrage du derme et de l'épiderme grâce aux molécules d'adhésion (Zhang K et al. 1996).

1.4 L'épiderme :

L'épiderme, est issu du feuillet ectodermique. Il est un tissu dépourvu de vascularisation dont la nutrition va se faire essentiellement par diffusion à travers la lame basale.

D'un point de vue structural, il s'organise en un épithélium pavimenteux, pluristratifié, et kératinisé hautement spécialisé lui permettant d'assurer de multiples fonctions. D'une épaisseur de 75 à 150 μm , il peut atteindre 400 à 600 μm selon la région du corps (plantar des pieds et paumes des mains par exemple). Au niveau de l'épiderme, 4 types de cellules vont être retrouvés (Figure 6) :

- Les mélanocytes dont le rôle est de protéger l'organisme des rayons UV en produisant des pigments de mélanine destinés aux kératinocytes
- Les cellules de Langerhans dispersées dans l'épiderme, où elles jouent leur rôle de cellules présentatrices d'antigènes.
- Les cellules de Merkel, auxquels s'apposent des terminaisons élargies d'un nerf sensoriel myélinisé assurant la sensibilité de la peau.
- Et enfin les kératinocytes qui représentent à elles seules 80 à 90% de la population cellulaire de l'épiderme, s'organisent en plusieurs assises, encore appelés strates (ou *stratum* ou couches). Ces cellules vont jouer un rôle de première importance dans la protection de l'organisme contre les agressions extérieures en se dressant comme une barrière (3, 2011).

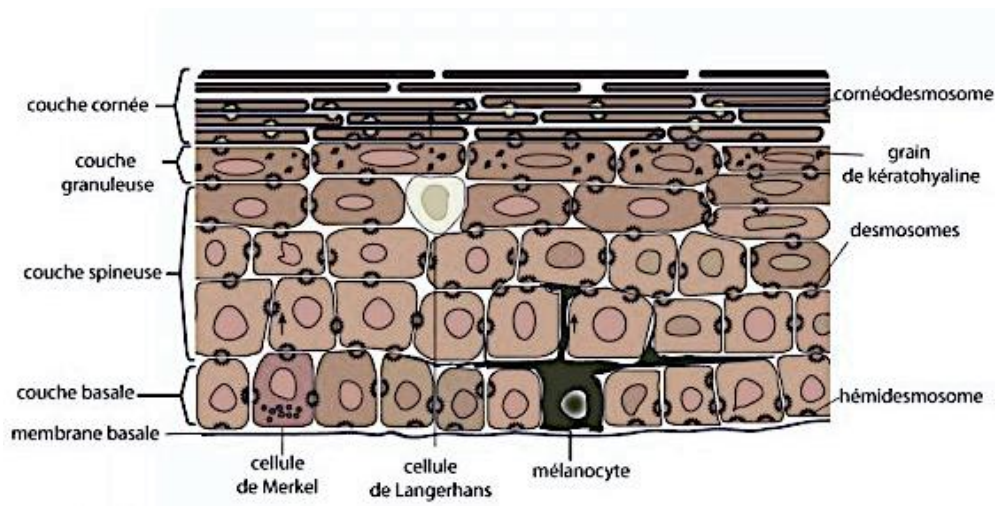


Figure 6 : Représentation schématique d'une coupe d'épiderme illustrant les différentes couches.

Comme nous l'avons brièvement abordé dans le chapitre 1, les kératinocytes de l'épiderme se répartissent sur 4 strates distinctes, elles mêmes formées de couches cellulaires. Chacune des strates va avoir des proportions qui vont varier d'une zone du corps à une autre.

Avec comme point de départ la jonction dermo-épidermique, lorsque la différenciation est initiée, les cellules progressent successivement de la couche basale, à la couche granuleuse, puis à la couche spinieuse et enfin la couche cornée pour être éliminées par le processus de desquamation. Le renouvellement de l'épiderme repose donc sur l'équilibre dynamique entre la prolifération des cellules basales et l'engagement vers le programme de différenciation aboutissant à l'élimination de squames qui doivent être remplacés.

1.5 Organisation de l'épiderme :

1.5.1 La couche basale :

De manière plus détaillée, la couche basale (ou couche germinative) est constituée d'une mono-couche de cellules importantes dans la régénération du tissu épidermique. C'est à ce niveau que sont localisées les cellules souches de l'épiderme appelées CSEs (cellules souches épidermiques) ou EpiSCs (pour *Epidermal Stem Cells*) à noyau allongé au grand axe perpendiculaire à la JDE. On y retrouve aussi des mélanocytes en transit vers la couche suprabasale ainsi que les cellules de Merkel (Barthel and Aberdam, 2005).

1.5.2 La couche spinieuse :

La première couche atteinte au cours de la migration est la couche spinieuse ou *stratum spinosum* (couche de Malpighi). A ce niveau, les kératinocytes forment 3 à 4 assises superposées de cellules polyhédrales en peau fine (ex. le cou ou la face interne du bras) ; et 5 à 6 en peau épaisse (ex. la peau palmaire ou plantaire). Les kératinocytes commencent à s'aplatir avant de poursuivre leur migration pour atteindre la couche granuleuse.

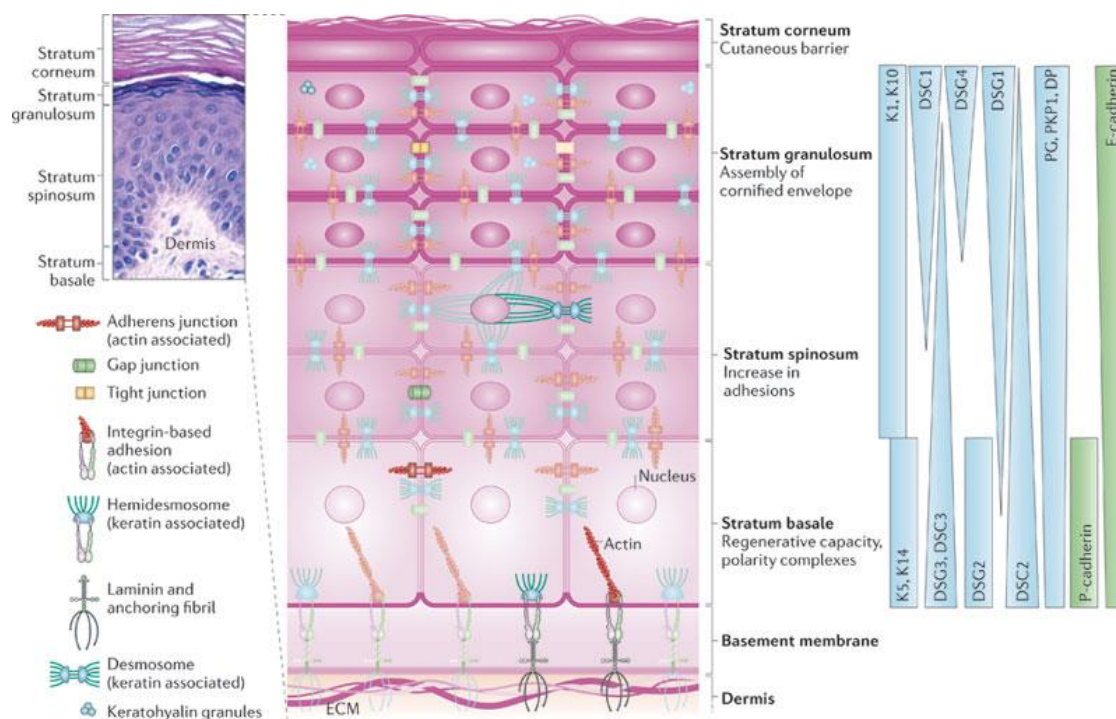
1.5.3 La couche granuleuse :

Au niveau de la couche granuleuse (ou *stratum granulosum*), les kératinocytes s'organisent en seulement 1 à 3 assises de cellules en peau fine, et 3 ou 4 en peau épaisse. Ces kératinocytes ont la particularité d'être aplatis, à noyau parallèle à la jonction dermo-épidermique avec un cytoplasme riche en granulations. Le caractère essentiel de ces cellules est la présence de grains de kératohyaline, principalement composés d'une protéine riche en histidine : la profilaggrine, importante dans l'organisation du cytosquelette. Elle se

transformera finalement en filaggrine dans la couche cornée, puis après dégradation composera la majorité du facteur d'hydratation de la peau (3, 2011).

1.5.4 La couche cornée :

La couche cornée, appelée l'enveloppe cornée, se constitue de 5 à 10 assises de cellules aplaties et anuclées (cornéocytes), ainsi que de nombreuses autres molécules, parmi lesquelles les plus étudiées sont la loricrine et l'involucrine (Dover and Potten, 1988). Les cornéocytes sont formés à partir des kératinocytes ayant déversés par exocytose leur contenu de lipides, de cholestérol, d'acides gras saturés et de céramides dans l'espace extracellulaire, ce qui forment un « ciment » péricellulaire assurant la cohésion entre les cellules avant de desquamer. De nombreuses enzymes protéolytiques sont également libérées par les cellules de la couche granuleuse qui vont participer à la destruction du noyau, des desmosomes et à la desquamation des cornéocytes. L'énucléation et l'assemblage des enveloppes cornifiées se fait grâce à l'action catalytique des transglutaminases dont l'activité résulte en la formation de liaisons covalentes *intra* et *inter* protéiques. Ce processus se termine par le détachement et la perte des cellules.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figure 7 : Illustration représentant l'architecture de l'épiderme :

L'épiderme s'organise en plusieurs couches assurant le renouvellement constant du tissu. En haut à gauche, une coupe de peau représentant les principales couches cellulaires colorées à l'hématoxyline-éosine. La représentation schématisée de cette coupe de peau permet de distinguer la couche basale, la couche spinieuse, la couche granuleuse et la couche cornée. Pour chacune des couches, sont représentées les principales molécules assurant la cohésion et la communication des cellules entre elles. Au niveau basal, les molécules d'adhésion (hémidesmosomes, intégrines) assurent l'ancrage de l'épiderme à la lame basale reposant sur le derme (jonction dermo-épidermique). Durant le programme de différenciation, il existe une expression graduelle de marqueurs spécifiques qui permettent aux kératinocytes d'assurer leur fonction dans la morphogénèse de l'épiderme.

K5/K14 : kératines 5/14 ; K1/10 : kératines 1/10 ; DSG : desmoglérine ; E-cadhérine : Epithelial cadherin ; P-cadherine : placentale-cadherin ; PG : plakiglobin ; PKP1 : plakophilin 1 ; DP : desmoplakin

Source : (Simpson et al., 2011)

Ces processus se manifestent par des modifications morphologiques et biochimiques importantes associant perte du potentiel prolifératif des kératinocytes basaux et engagement dans le programme de différenciation. Cet engagement se traduit par l'expression de marqueurs spécifiques de chaque strate permettant aux kératinocytes d'acquies de nouvelles propriétés pour pouvoir réaliser leurs fonctions. L'analyse de l'expression de ces différents marqueurs de différenciation (Figure 7) permet de repérer les kératinocytes engagés ou non dans le programme de différenciation terminale (Bragulla and Homberger, 2009).

Ainsi par leur potentiel prolifératif et les marqueurs qu'ils expriment, on peut distinguer différents types de cellules aux propriétés particulières, spécifiques et distinctes.

Au niveau basal, trois principaux types de cellules prolifératives ont pu être ainsi identifiés :

- les cellules souches épidermiques,
- les cellules progénitrices,
- et les cellules d'amplification transitoires (TA pour Transient Amplifying).

Dans l'épiderme, les principales cytokératines exprimées sont les paires 5/14 et 1/10, spécifiques des épithéliums stratifiés. La paire CK5/14 est exprimée chez l'adulte dans la couche basale et est associée aux cellules épidermiques qui maintiennent une capacité proliférative. La paire CK1/10 est exprimée par des kératinocytes en différenciation et est présente dans la totalité des couches suprabasales (spinuse et granuleuse) de l'épiderme (Bragulla and Homberger, 2009). En contact avec la jonction dermo-épidermique, les kératinocytes de la couche basale, seules cellules à pouvoir proliférer expriment les cytokératines 5 et 14 (Paramio et al., 1999), et dès la perte de contact avec la JDE, ces cytokératines cessent progressivement d'être exprimées pour laisser place à l'expression des cytokératines 1 et 10 initiée dans la couche basale. Cette expression constitue un très bon marqueur de différenciation permettant de bien distinguer les cellules différenciées sur des coupes histologiques pouvant être corrélé à la perte de pouvoir prolifératif des kératinocytes basaux (Figure 7).

2. Les cellules souches de l'épiderme :

2.1 Définition, fonction et localisation des cellules souches épidermiques :

Contrairement aux cellules souches embryonnaires humaines de type pluripotent, les cellules souches somatiques humaines, plus rares et plus spécialisées, ont un destin cellulaire plus restreint. Elles sont dites multipotentes ou unipotentes. Au niveau de la couche basale de l'épiderme, les cellules souches ont la caractéristique d'être unipotente c'est-à-dire qu'elles vont pouvoir donner naissance à un seul type de lignage cellulaire, le kératinocyte.

Dotées d'une certaine plasticité, ces cellules souches constituent une sous-population des kératinocytes à l'origine de la formation de l'épiderme interfolliculaire, des follicules pileux et des glandes sébacées (Oshima et al., 2001) (Figure 5). Dans l'épiderme interfolliculaire, elles représenteraient moins de 1% des kératinocytes basaux et leur localisation semble varier et dépendre de la région du corps. Mais cette localisation n'est pas clairement définie et reste sujet à controverse du fait que l'absence de marqueurs clairement

défini ne permet pas de les identifier ou de les sélectionner au sein de n'importe quel épiderme. A ce jour, les quelques moyens d'identification associe l'étude du potentiel de prolifération des cellules, leur clonogénicité, et la capacité de reconstruction d'un épiderme. Il est néanmoins à noter que l'ensemble des données expérimentales existantes reposent essentiellement sur l'étude du modèle murin *in vivo* ou sur des études *in vitro*, et sont donc à considérer avec précaution. Néanmoins, l'ensemble de ces données expérimentales permet d'apporter certaines pistes de réflexion qui permettront peut-être à terme de définir une technique standard d'identification de ces cellules.

2.2 Caractérisation des cellules souches épidermiques :

2.2.1 La durée du cycle cellulaire :

La technique d'administration d'analogues de nucléotides comme la thymide tritiée ou bromodésoxyuridine (BrdU) à des animaux a permis l'identification des cellules souches au niveau de la couche basale de l'épiderme. En s'intégrant dans l'ADN au cours de la réplication, on constate que l'ensemble des cellules ayant traversé la phase S du cycle cellulaire a pu être marqué, y compris les cellules souches. Après l'arrêt de l'administration du BrdU, les cellules prolifératives se divisent et vont au cours des divisions perdre leur marquage par dilution tandis que les cellules souches qui se divisent lentement conservent les analogues de nucléotides. De par cette capacité de rétention, ces cellules ont été appelées les *Label-retaining cells* (LRC) (Bickenbach, 1981; Dimri et al., 1995; Flores and Blasco, 2009) . Toutefois, une utilisation *in situ* chez l'Homme pour une localisation précise *in vivo* ne peut être établie du fait que l'application de BrdU n'est de toute évidence pas possible et restreint son utilisation à une investigation stricte *in vitro*.

2.2.2 Les intégrines :

Chez l'Homme, les études d'identification repose essentiellement sur l'expression de marqueurs de surface. Parmi les premières études décrivant des marqueurs des CSE, il a été observée que ces cellules exprimaient en effet un fort niveau des intégrine $\beta 1$ et d'intégrine $\alpha 6$ (Tumbar et al., 2004; Watt and Jones, 1993). Leur localisation encore assez controversée reste cependant à éclaircir. Cependant, différentes études *in vivo* les décrivent au niveau des papilles dermiques (prépuce, sein, abdomen) ou plutôt au niveau des crêtes épidermiques (épiderme de la paume des mains, palmes des pieds) (Jones et al., 1995).

Il a été en effet proposé que les kératinocytes à adhérence rapide exprimant l'intégrine $\beta 1$ au niveau des crêtes épidermiques peu profondes correspondent aux cellules souches compte tenu du fait qu'elles n'expriment pas la cytokératine 10 et qu'*ex vivo* elles ne sont pas capables d'incorporer le BrdU suggérant un cycle cellulaire faible (Kaur, 2006).

Les intégrines, des glycoprotéines organisées en hétérodimères comprenant une sous-unité α et une sous-unité β , sont des molécules d'adhésion situées à la surface cellulaire qui permettent principalement aux kératinocytes basaux d'adhérer à la JDE.

Lorsqu'elles sont fixées à la matrice de la lame basale, ces intégrines réprimeraient la différenciation. Expérimentalement, l'expression de l'intégrine $\beta 1$ a permis de distinguer deux catégories de kératinocytes dans la couche basale. Un niveau élevé d'intégrines $\beta 1$ caractériserait des kératinocytes à haut potentiel prolifératif et à adhérence rapide au collagène IV, formant de grandes colonies (Watt and Jones, 1993). A l'inverse, un niveau d'expression plus faible est associé aux kératinocytes dont le potentiel prolifératif est limité.

2.2.3 Le concept de clonogénicité :

La capacité d'autorenouvellement des kératinocytes isolés de l'épiderme est très hétérogène en culture, et peuvent être classifiés selon différentes catégories par l'étude de leur clonogénicité.

Cette analyse de la clonogénicité qui consiste à ensemercer des kératinocytes à faible densité, a été décrite pour la première fois par Barrandon & Green, et permet de définir trois catégories de colonies. Les holoclones de larges colonies à croissance rapide issues de cellules à forte capacité proliférative. Les paraclones représentent des colonies à croissance et taille limitées issues des cellules à très faible potentiel prolifératif. Les méroclones, quant eux correspondent à un profil prolifératif intermédiaire.

Ainsi, une population de kératinocytes riche en cellules souches ou progéniteurs très immatures produira plus de colonies et de plus grande taille (holoclones) qu'une population majoritairement constituée de kératinocytes engagés dans la différenciation (paraclones) (Figure 8) (Barrandon and Green, 1987; Jones and Watt, 1993). Ce type d'analyse est à considérer avec précaution car elle ne permet pas de caractériser de manière rigoureuse l'activité des cellules souches compte tenu du fait que l'analyse du potentiel des cellules n'est observé qu'à postériori (hors du contexte tissulaire et après manipulation des cellules)

mais aussi du fait qu'au sein de la couche basale réside une vaste population de cellules prolifératives pouvant générer de larges colonies (Kaur, 2006).

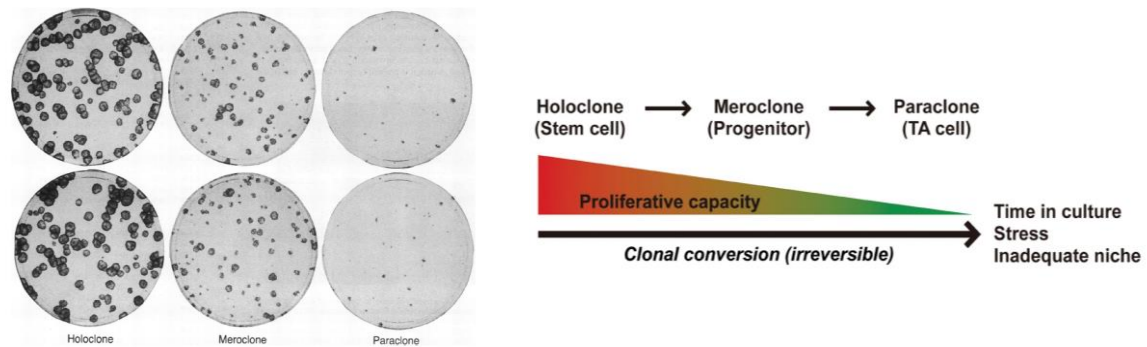


Figure 8 : Evaluation du potentiel prolifératif selon le test de clonogénicité développé par Barrandon & Green :

A) Après ensemencement des kératinocytes isolés et à faible densité, les colonies formées à l'issue des 15 jours de culture permet la distinction de 3 type de colonies : les holoclones constitués de cellules hautement prolifératives, les paraclones correspondant aux kératinocytes engagés dans la différenciation, et les méroclones au profil intermédiaire (Barrandon & Green, 1987). B) Représentation schématique du statut prolifératif selon le type de colonies décrites précédemment en fonction des conditions environnementales (Nanba et al. 2013)

2.2.4 Les récepteurs membranaires de la transferrine :

Un autre marqueur identifié est le récepteur membranaire de la transferrine appelé CD71. Tout comme les intégrines, son expression serait différente dans les cellules souches épidermiques et les cellules en différenciation. Il a été en effet montré que ce récepteur serait surexprimé par les cellules en division active, dont l'activité nécessite un besoin accru en fer alors que les CSE exprimeraient faiblement la protéine de surface CD71 et une expression élevée d'intégrine $\alpha 6$ (Terunuma et al., 2007). Sur la base de ces travaux, il a été proposé par le groupe de P. Kaur d'enrichir les cultures de kératinocytes en progéniteurs par tri cellulaire utilisant la combinaison de marqueurs intégrine $\alpha 6^+ / CD71^-$ (Li et al., 1998; Rachidi et al., 2007). L'analyse par cytométrie en flux permet ainsi d'identifier et trier une sous population cellulaire de l'ordre de 0,16% des cellules exprimant fortement les marqueurs intégrines $\alpha 6$, et faiblement le récepteur CD71 dont le potentiel prolifératif est très élevé (Terunuma et al., 2007). Des études plus récentes ont par ailleurs démontré que cette population isolée à partir

de culture primaire de kératinocytes présentait encore la capacité de générer un épiderme pluristratifié normal à hauts passages (Larderet et al., 2006).

2.2.5 Les récepteurs à l'Epidermal Growth Factor (EGF) :

En 2003, une étude a mis en évidence que les kératinocytes présentant une forte capacité d'adhérence sur un support plastique recouvert de collagène de type I et un faible niveau d'expression du récepteur à l'EGF (Epidermal Growth Factor) présentaient une capacité de prolifération accrue (Watt and Jensen, 2009). En effet, comme le récepteur à la transferrine CD71, l'EGFR serait directement associé à la capacité des cellules à proliférer. Les auteurs de cette étude ont montré qu'ainsi isolée et amplifiée en culture (durant 7 passages), cette population de kératinocytes « souches » présentait encore la capacité à reconstruire un épiderme *in vitro* suggérant son enrichissement en CSE (Fortunel et al., 2003).

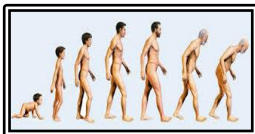
2.2.6 Le facteur de transcription p63 :

Enfin, plusieurs études proposent le facteur de transcription p63 codé par le gène TP63 (Tumor Protein 63), comme un marqueur potentiel des cellules souches épidermiques. Parmi les signaux intrinsèques aux kératinocytes basaux connus pour leur rôle dans la prolifération de cellules basales, p63 est un des marqueurs typiquement exprimé dans la couche basale de l'épiderme. Découvert en 1998, ce facteur de la famille de p53 et p73, serait au cœur de la régulation d'un réseau de gènes très impliqués dans l'induction de la différenciation et la perte de capacité proliférative des kératinocytes. L'inhibition du facteur de transcription p63 dans l'épiderme entraîne une perte de la stratification (Blanpain and Fuchs, 2007; Yang et al., 1999). Par exemple, des souris dont le gène p63 a été invalidé sont dépourvues d'épithelia pluristratifiés. *In vivo*, p63 jouerait donc un rôle central dans le développement de l'épiderme (Mills et al., 1999; Yang et al., 1999). Les travaux de Pelligrini ont montré *in vitro* que l'expression de p63 pouvait être corrélé au potentiel prolifératif des kératinocytes. Ils montrent en effet que de la même façon que pour les intégrines $\beta 1$, les cellules ayant le potentiel prolifératif le plus élevé (holoclones) expriment fortement p63, tandis que les cellules au potentiel prolifératif le plus bas (paraclones) n'expriment pas p63 (Pellegrini et al., 2001)

Ainsi, plusieurs protéines ou voies de signalisation ont pu être définies pour jouer un rôle important dans l'état souche des cellules épidermiques et dans leur engagement vers les différents programmes de différenciation épidermiques mais aucun ne permet encore d'identifier de manière non-ambigüe les cellules souches sur une coupe de peau et ainsi en isoler une population totalement pure.

3. Cellules souches épidermiques et vieillissement cutané :

La diminution du potentiel prolifératif des cellules souches épidermiques est une des caractéristiques retrouvée au cours du vieillissement cutané, et serait associée aux changements intracellulaires associés à l'âge communément retrouvés dans les tissus (Giangreco et al., 2010). L'impact de ces changements agirait plutôt sur la fonction des cellules souches à générer des cellules progénitrices et différenciées que sur leur nombre et leur capacité d'autorenouvellement. Il a été en effet suggéré que des altérations liées à la machinerie de réparation seraient responsables de la perte de la capacité répliquative des cellules souches épidermiques au cours du vieillissement. De manière extrinsèque, la fonction des cellules souches serait également modulée par la niche de ces cellules, autrement dit par le micro-environnement où évoluent ces cellules notamment par les signaux envoyés par le derme sous-jacent.



Chapitre 3 :

VIEILLISSEMENT DE L'ORGANISME ET SENESENCE CELLULAIRE :

Ainsi au début de la vie, des processus aussi complexes que nombreux s'organisent pour mettre en place les différents systèmes physiologiques nécessaires à la vie et au développement de l'être humain. Puis au cours du temps, ces ensembles physiologiques vont peu à peu décliner, et les tissus associés s'installent progressivement dans le processus de vieillissement.

1. Comment définir le vieillissement ? : Une grande question !

Dans l'un de ses entretiens, le sociologue Pierre Bourdieu a dit « La jeunesse n'est qu'un mot » (Bourdieu, 1984). Par extension, peut-on dire la même chose du vieillissement ?

Bien que généralement corrélé au temps qui passe, le vieillissement est surtout le résultat de nombreux processus complexes qui se succèdent au cours de ce temps. A ce jour de nombreuses théories, parfois contradictoires, tentent de dessiner une description mécanistique du vieillissement pour y apporter une définition claire (Tsurumi and Li, 2012). D'un point de vue global, le vieillissement serait le résultat d'un processus inéluctable ou bien le fruit d'une série d'agressions qui pourraient être évitées ou réparées. Sur la base d'observations existantes, le vieillissement se caractérise par des modifications morphologiques et fonctionnelles de la cellule qui conduisent à une perturbation de l'homéostasie tissulaire corrélée à l'augmentation de la présence de cellules sénescents (Dimri et al., 1995). Ce déséquilibre se traduit au niveau tissulaire par un potentiel de régénération altéré dont la conséquence directe va être un déclin des fonctions physiologiques. A l'origine de ces altérations, différents facteurs semblent entrer en jeu. Les altérations mitochondriales, l'accumulation d'espèces réactives d'oxygène associées (appelées ROS, pour *Reactive Oxygen Species*), les dommages liés à l'ADN télomérique ou non télomérique, ou bien encore l'augmentation de l'expression de protéines impliquées dans le cycle cellulaire et étroitement liées aux altérations de l'ADN sont parmi les premiers exemples décrits et admis comme principaux facteurs impliqués dans l'accumulation de

cellules sénescentes (Dimri et al., 1995; Munoz-Espin and Serrano, 2014; Tsurumi and Li, 2012) (Figure 9).

Avec l'âge, la corrélation la plus forte est une accumulation de cellules sénescentes au sein des tissus. Ces cellules sénescentes présentent une organisation de leur génome ainsi qu'une architecture nucléaire modifiées qui pourraient en effet participer activement au vieillissement de l'organisme (Dimri et al., 1995; Hayflick and Moorhead, 1961; Rodier and Campisi, 2011; Munoz-Espin and Serrano, 2014). Une description plus détaillée de cet état de sénescence est développée dans la section suivante.

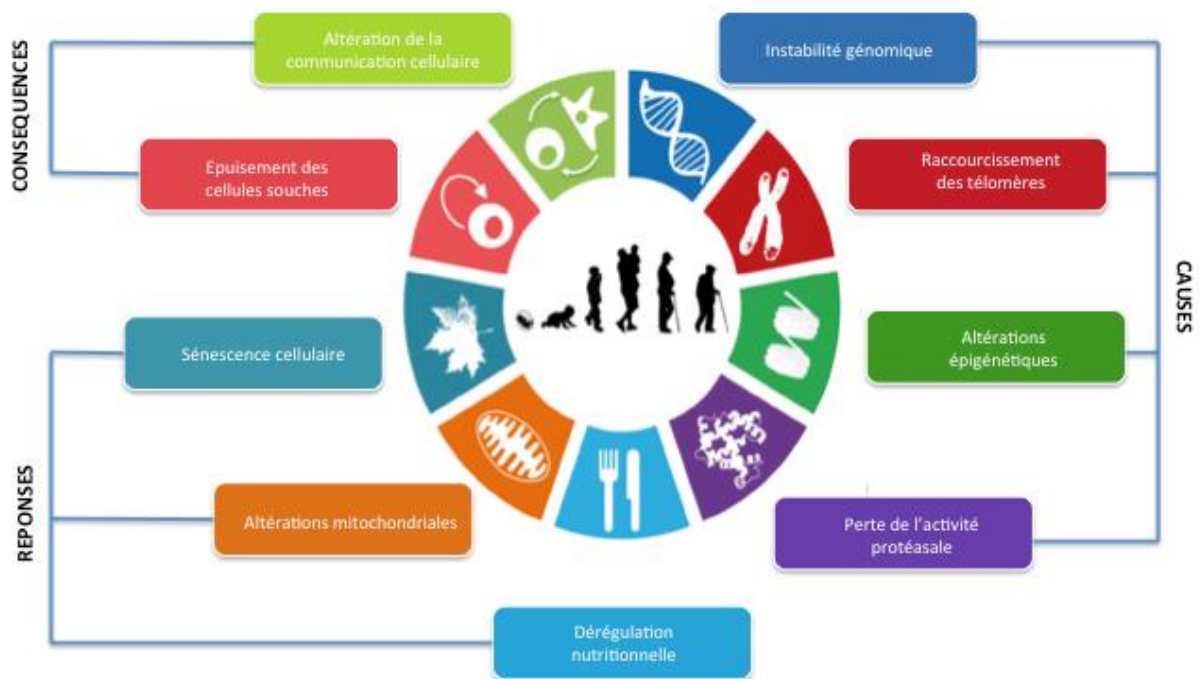


Figure 9 : Représentation schématisée des principales marques associées au vieillissement.
Source : Adaptée de Lopez-Otin et al. 2013.

2. Qu'est-ce que la sénescence ?

En opposition au cancer, la sénescence se définit comme un mécanisme suppresseur de tumeur qui va conduire à limiter la prolifération des cellules.

L'une des conséquences principales moléculaires de la sénescence se caractérise par un arrêt irréversible du cycle cellulaire. La sénescence cellulaire réunit deux principaux types

de sénescence : la sénescence répliquative et la sénescence prématurée induite par des stress pouvant être de nature génétique via l'activation d'oncogènes, métabolique associé au stress oxydatif, ou encore environnemental notamment par l'assimilation de drogues cytotoxiques dans un contexte de chimiothérapie. Sénescences répliquative et prématurée présentent des différences importantes mais partagent des similarités phénotypiques et moléculaires. Elles impliquent les voies classiques des suppresseurs de tumeurs p53 et Rb, ainsi que plusieurs autres mécanismes impliqués pour son induction et son maintien. L'état sénescence ne peut donc pas être caractérisé uniquement à partir de critères isolés, mais comme un phénotype complexe impliquant de nombreux facteurs qui doivent être considérés conjointement. Son rôle récemment décrit dans le remodelage tissulaire au cours du développement embryonnaire permettrait aussi dans de futures études d'apporter une vision plus précise de ses mécanismes pour une meilleure compréhension et évaluation sur son implication dans le vieillissement de l'organisme (Munoz-Espin et al., 2013; Munoz-Espin and Serrano, 2014).

De l'ensemble des différentes études, on distingue alors :

- la sénescence répliquative,
- la sénescence induite par les espèces réactives d'oxygènes ou tout autres stress comme les dommages à l'ADN, le sécrétome (SASP)...
- la sénescence induite par les oncogènes.

2.1 La sénescence répliquative :

De manière générale, la sénescence répliquative est définie comme un état stable de l'arrêt du cycle couplé à des changements phénotypiques spécifiques (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007) et dans lequel les cellules vont toutefois présenter une activité métabolique. Aujourd'hui, on sait que ce phénomène pour la première fois décrit par Hayflick sur des fibroblastes humains en culture, est principalement dû au raccourcissement des télomères. Selon son postulat, les cellules mises en culture vont passer par 3 phases successives. Après mise en culture, les cellules somatiques vont d'abord présenter un profil prolifératif faible, puis passeront à une phase d'expansion exponentielle, puis s'arrêteront pour ne conserver que leur activité métabolique durant une longue période. Les cellules somatiques dépourvues de télomérase, enzyme assurant l'élongation des télomères à chaque division cellulaire, présenteront alors les extrémités des chromosomes diminuées en taille lors de chaque cycle de répliquative (Hayflick and Moorhead, 1961).

Ces régions appelées télomères, d'une longueur d'environ 10kb à la naissance et pouvant atteindre 20 kilobases, sont des éléments de séquence TTAGGG, répétés en tandem et situés à l'extrémité des chromosomes linéaires (Mu and Wei, 2002). Ces structures spécialisées permettent de ne pas être reconnues par la machinerie de réparation et donc ne pas être réparées comme des dommages à l'ADN en étant reconnues comme des cassures double brin. Elles permettent aussi de protéger les chromosomes linéaires contre des fusions par leurs extrémités et d'empêcher la dégradation des séquences internes (Shampay et al., 1984; Szostak and Blackburn, 1982).

La stabilité de cette structure particulière des télomères nécessite la présence d'une transcriptase inverse cellulaire spécifique appelée télomérase. Or chez l'Homme, la télomérase est active dans les tissus de la lignée germinale et certaines cellules souches, mais pas dans les tissus somatiques normaux. En absence de télomérase, les télomères raccourcissent graduellement au fil des divisions cellulaires (ou doublements de population) tandis que l'âge de l'individu augmente, jusqu'à atteindre une taille critique qui entraîne un arrêt des divisions cellulaires (Mu and Wei, 2002). En perdant leur potentiel mitotique, les cellules entrent naturellement en sénescence répllicative. Par exemple, pour les fibroblastes, après environ 60 doublements de population en moyenne, les cellules dont la taille des télomères est devenue trop courte ne sont plus en mesure de voir leur extrémité simple brin non répliqué protégé (Blasco, 2002).

Ceci est alors reconnu comme un signal d'endommagement ou d'une instabilité génomique susceptible d'enclencher une réponse aux dommages à l'ADN appelé DDR (*DNA Damage Response*) (Rossiello et al., 2014). L'activation de cette DDR entraîne l'arrêt de la progression du cycle cellulaire en agissant sur des kinases dépendantes des cyclines, protéines responsables de la progression du cycle cellulaire (Pickett and Reddel, 2012).

Cette DDR a deux principaux effecteurs : les protéines kinases, ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) et ATR (*Ataxia Telangiectasia and Rad3-Related*) (Nyberg et al., 2002). Ces protéines ATM et ATR agissent en phosphorylant de nombreuses protéines telles que p53 (d'Adda di Fagagna et al., 2003). Une fois phosphorylée, p53 va à son tour activer la protéine p21 dont le rôle va être de cibler et inhiber une cyclin-dépendent kinase, la CDK2 (Nyberg et al., 2002). De ces activations et inhibitions successives, un arrêt du cycle permanent et irréversible s'installe (Figure 10). Chez les mammifères, cet arrêt a lieu le plus souvent en phase G1 (Nyberg et al., 2002) et est associé à de nombreux changements dans l'expression des gènes. En particulier, les télomères peuvent être le lieu d'accumulation de dommages irréparables à l'ADN, source de sénescence.

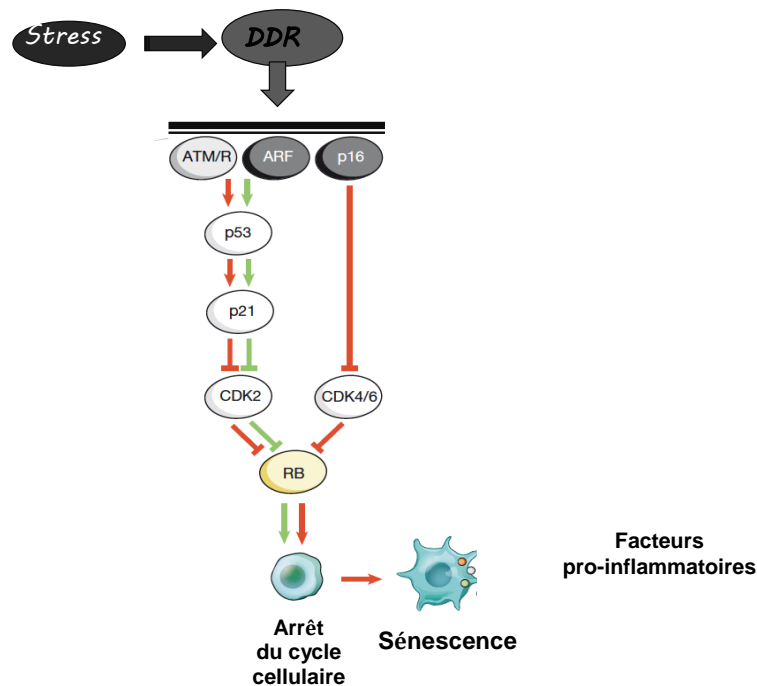


Figure 10 : Mécanismes moléculaires impliqués dans la sénescence : Sous l'effet des différents stress, le mécanisme d'action des protéines ATM et ATR, a lieu en ciblant la protéine p53 dont la phosphorylation résulte en l'activation de la protéine p21 responsable de l'inhibition de la cycline-dépendent kinase CDK2. Cette inhibition, se fait par la fixation de la protéiner CDK/Cycline, et a pour effet l'arrêt du cycle cellulaire et l'entrée en sénescence des cellules. La protéine p16 va avoir un effet inhibiteur sur la progression du cycle cellulaire en se fixant sur CDK4. En absence de p16, la CDK4 et la cycline D s'associent, et vont inhiber la protéine Rb par hyperphosphorylation. A l'état hyperphosphorylé, Rb ne peut empêcher l'action de la progression du cycle cellulaire. A noter, qu'il existe un crosstalk entre les voies impliquant les protéines p16 et p21 non représenté ici. L'activation du locus INK4A/ARF est responsable de l'expression des protéines ARF et p16 aux actions distinctes et complémentaires sur les voies p53/Rb. L'expression de la protéine ARF va réguler l'expression et la stabilité de la protéine p53, par un effet inhibiteur sur MDM2, protéine responsable de la dégradation de p53 non représenté ici.
Source : Adapté de Van Deursen JM. 2014.

Ainsi, la sénescence réplivative est un arrêt permanent et irréversible du cycle cellulaire alors que les cellules sont toujours métaboliquement actives, dû au raccourcissement excessif des télomères. Les télomères sont donc un point central du contrôle de la sénescence, et il est important de comprendre comment ils sont reconnus et maintenus au cours de ce processus d'autant que cette érosion télomérique peut être source de vieillissement prématuré s'il est mal contrôlé. C'est le cas de pathologie comme les dyskératoses congénitales où les patients présentent un vieillissement prématuré de la peau notamment dû à des mutations au niveau des gènes codants pour la télomérase ou les protéines associées à la structure des télomères (Mitchell et al., 1999; Stanley and Armanios, 2015).

Par ailleurs, une forme prématurée de sénescence cellulaire peut aussi être induite par de nombreux stress, tels que le stress oxydatif, les lésions à l'ADN, ou l'activation d'oncogènes.

Les dommages à l'ADN non télomérique ou la levée d'inhibition du locus INK4A/ARF qui apparaissent au cours du vieillissement chronologique sont une des caractéristiques de l'entrée des cellules en sénescence (Collado et al., 2007; Lopez-Otin et al., 2013). Il a été également identifié comme un locus dont le polymorphisme est génétiquement lié à un grand nombre de pathologies associées au vieillissement (maladies cardiovasculaires, diabète, glaucome et maladie d'Alzheimer) (Lopez-Otin et al., 2013).

Ce locus INK4A/ARF (également appelé CDKN2A) code pour les protéines p16^{INK4A}, p19ARF et p15 qui vont être responsables de l'arrêt du cycle cellulaire (Li et al., 2009). L'expression de la protéine p16 entraîne l'inhibition des cyclin-dépendent kinases CDK4 et CDK6, normalement responsable de la phosphorylation de la protéine Rb assurant la progression du cycle cellulaire. La protéine p19^{ARF} lorsqu'elle est exprimée, assure quant à elle la stabilité de p53 en inhibant la protéine MDM2, responsable elle-même de la dégradation de p53 pour assurer le cycle réplicatif (Shay et al., 1991).

Ces voies p53/p21^{CIP1} et p16^{INK4a}/Rb constituent donc une plateforme complexe de traitement des signaux de stress, comme le stress oxydatif et les dommages à l'ADN accumulés par la cellule.

Ainsi, même si cela ne permet qu'une description partielle de la sénescence, la longueur des télomères, l'expression des protéines p53, p21^{CIP1} et/ou p16^{INK4a} intervenant au niveau du cycle réplicatif constituent les principaux marqueurs validés et utilisés expérimentalement pour identifier l'état de sénescence au niveau cellulaire et tissulaire.

2.2 La sénescence liée aux dommages à l'ADN non télomérique :

Au cours de la vie de la cellule, l'ADN est soumis à de nombreux événements de stress naturels (agents physiques ou chimiques) qui vont avoir pour conséquence de provoquer des lésions diverses qui modifient sa séquence. Les cellules ont alors développé de nombreux mécanismes de réponses pour pouvoir réparer de manière spécifique chacune de ces lésions, mettant en jeu différentes voies de réparation capables de rétablir l'intégrité de l'information génétique.

Au niveau de l'extrémité des chromosomes linéaires, on retrouve des régions appelées télomères. Ces télomères de par leur structure essentielle assurent une viabilité aux cellules

en permettant de maintenir un équilibre entre vieillissement cellulaire et le risque de prolifération cellulaire incontrôlée associée aux cancers. Elles vont en effet assurer une protection de ces extrémités naturelles en empêchant la machinerie de réparation de reconnaître l'extrémité de l'ADN comme un endommagement dû à une cassure. Cette spécificité si importante à la protection va néanmoins rendre difficile l'accès de ces régions à la machinerie de réplication. En conséquence, chaque division cellulaire va conduire à la perte d'une petite séquence terminale des télomères, et donc à un raccourcissement progressif de ces télomères (Hayflick and Moorhead, 1961). Après un nombre limité de cycle de réplication, la longueur des télomères atteint un seuil critique où les télomères ne sont plus protégés et vont alors être détectés comme un signal de dommages à l'ADN. Contrairement au reste du génome, la machinerie de réparation n'a pas accès à ces extrémités, ce qui entraîne de manière inévitable des effets délétères tels que la sénescence et/ou l'apoptose (Lopez-Otin et al., 2013) (voir section C de ce chapitre, partie « 1. La sénescence répllicative » pour une description détaillée).

2.3 La sénescence liée aux altérations mitochondriales

La respiration aérobie décrit le mode de respiration qui va utiliser l'oxygène comme comburant. Les sites de production des radicaux libres sont les mitochondries, les reticulum endoplasmiques, les peroxysomes. Au cours de différentes réactions chimiques qui ont eu lieu au sein des cellules, telles que la glycolyse, le processus du cycle de Krebs, la β -oxydation ou encore des événements de dégradation de biomolécules, il y a formation de coenzymes réduites (exemple : NADH). A l'issue de cette réduction, les électrons de ces coenzymes vont transiter au niveau des mitochondries, à travers une chaîne de transporteurs d'hydrogène et d'électrons, générant ainsi un gradient électro-chimique utilisé pour la formation de l'ATP à partir de l'ADP+P, énergie de l'organisme. Les protons sont transportés vers l'extérieur et les électrons sont quant à eux transportés à travers la membrane interne mitochondriale où ils seront finalement pris en charge par le complexe mitochondrial IV et sont oxydés par l'action de la cytochrome c oxydase. A ce niveau-là et dans le cas de la respiration cellulaire dite aérobie, l'oxygène va jouer le rôle d'accepteur final de ces électrons qui en présence d'hydrogène va permettre la formation de l'eau. La présence de l'oxygène est ainsi vitale pour la fonction mitochondriale car il assure le maintien de son équilibre en éliminant les électrons de la chaîne de transport, tout en assurant un équilibre énergétique à la cellule.

Pendant le trajet des électrons, une certaine proportion d'électrons peuvent fuir et vont pouvoir agir de manière directe avec l'oxygène, conduisant à la formation de produits hautement toxiques comme le radical superoxyde noté $O_2^{\cdot-}$.

Les radicaux libres, tels que le superoxyde, ont la particularité de posséder un électron non apparié dans l'orbite externe, ce qui leur confère la propriété de pouvoir réagir avec d'autres molécules, en leur cédant un électron ou en captant un électron pour restaurer une paire d'électron.

Au cours de réactions d'oxydation/réduction (appelées communément réactions redox), réducteurs (donneurs d'électrons) et oxydants (accepteurs d'électrons) sont naturellement modifiés, soit de manière réversible, ou comme souvent de manière irréversible, et vont avoir un potentiel d'action sur les cellules environnantes. Dans le cas de stress oxydatif, à travers la formation de radicaux libres oxydants, que ce soit dans le cas d'une fuite d'électrons, ou encore en présence de radiations, d'enzymes, de xénobiotiques ou bien d'un évènement de stress, la réaction redox peut être à l'origine de graves dommages des constituants de la cellule.

En effet, dans la cellule, les radicaux libres ont le potentiel de réagir avec les ions ferriques (Fe^{3+}) et les convertir en ions ferreux (Fe^{2+}) hautement dommageables pour la cellule. Par la modification des ions métalliques qui forment un centre catalytique important d'un large spectre d'enzymes. Mais aussi car les ions ferreux peuvent réagir avec le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) généré à partir du radical superoxyde (réaction de Fenton), ce qui résulte en la formation de radicaux hydroxyls ($OH\cdot$) (réaction Haber-Weis).

Bien que le peroxyde d'hydrogène est considéré comme un oxydant moyen, il a néanmoins la capacité de modifier certains acides aminés au niveau des protéines, mais aussi celle d'apporter des modifications au niveau de lipides et de l'ADN.

En revanche, les radicaux hydroxyls sont quant à eux considérés comme hautement toxiques car ils vont avoir la possibilité d'aller agir et modifier une plus grande proportion de protéines, de lipides, ainsi que l'ADN.

Les conséquences moléculaires de cette potentielle toxicité va se traduire à différents niveaux soit par :

- L'hydroperoxydation des acides gras insaturés, des lipides ou des lipoprotéines,
- L'oxydation des chaînes polypeptidiques notamment au niveau des résidus cystéine, méthionine et tyrosine,
- l'oxydation de l'ADN où la base nucléique guanine va être convertie en 8-oxoguanine,

- l'oxydation de l'ADN mitochondriale, d'autant plus à risque du fait de sa proximité de la chaîne de transport d'électrons, et de l'absence de chromatine,
- la carbonylation ou la glycation des protéines conduisant à la formation de produits AGEs (pour Advanced Glycation End products).

D'un point de vue plus physiopathologique, l'impact de ces modifications moléculaires va se traduire au niveau de l'organisme par différentes pathologies associées à la sénescence (maladies neurodégénératives, diabète, cancer...)

Cependant, la cellule et l'organisme de manière plus générale dispose de moyens de défense pour lutter contre l'accumulation de ces radicaux libres toxiques. Par neutralisation directe soit avec des anti-oxydants (vitamines E et C, glutathion...), soit par l'action d'enzymes (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase). Dans le cas où cette neutralisation ne serait pas suffisante, la cellule met en place l'activation de gènes codant pour des protéines oxydantes ou chaperonnes, codant pour des enzymes de réparation de l'ADN ou des protéines, ou par la répression des mécanismes responsables de la formation des radicaux libres (chaîne respiratoire, cytochrome P450, NADPH oxydase...). Enfin de manière ultime et exceptionnelle, la cellule peut déclencher son programme d'apoptose comme dernière ligne de défense.

Cela va avoir des conséquences sévères sur la fonction de la cellule et la viabilité de l'organisme d'où l'importance de vite les retirer et de manière efficace. C'est le rôle de plusieurs protéasomes dont celui du protéasome 20S dont la fonction est de détruire les protéines endommagées. Dans le cas contraire, lorsque la chaîne est altérée ou que les radicaux libres oxygénés ne sont pas éliminés, différents mécanismes entrent en jeu. Les radicaux libre oxygénés créés lors de ce processus de respiration mitochondriale vont avoir aussi pour effet d'induire des dommages oxydatifs au niveau des composés protéiques, lipidiques et les acides nucléiques des cellules (Valko et al., 2007) créant un microenvironnement oxydatif délétère (Sahin and DePinho, 2012) perturbant ainsi l'homéostasie cellulaire et donc la prolifération des cellules.

Au niveau des mitochondries, la voie Insuline/IGF1 impliquée dans la régulation de la longévité fut parmi les premières voies décrites dans le vieillissement. Cible de la protéine p53, l'activité de cette voie est diminuée avec pour conséquence un impact sur l'intégrité et la longévité des cellules (Sahin and DePinho, 2012). L'impact du fonctionnement des mitochondries sur le vieillissement ou sur la longévité semble être largement admis, mais

des études sur d'autres modèles d'études semble apporter des résultats contraires à ceux observés chez l'humain (Doonan et al., 2008; Perez et al., 2009). Il est donc nécessaire de poursuivre les études afin de déterminer plus précisément comment ces voies métaboliques interviennent dans le vieillissement cellulaire et notamment pourquoi avec l'âge les cellules ne parviennent pas éliminer correctement les protéines oxydées par cet environnement délétère.

Dans le cas de la sénescence induite par le stress et les ROS, la présence élevée de ROS dû à un dysfonctionnement mitochondriale (Figure 11), va provoquer l'expression transcriptionnelle des protéines p53 et p21^{CIP1} (Sahin and DePinho, 2012). En conséquence, de la même manière que décrit lors de l'érosion des télomères et des lésions de l'ADN, cette expression conduit à l'activation des voies de la DDR et à terme à un arrêt du cycle cellulaire (van Deursen, 2014).

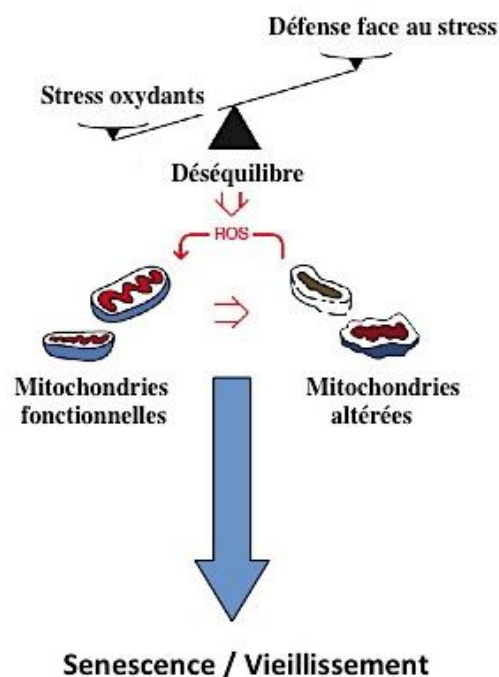


Figure 11 : Les altérations mitochondriales. Les signaux de stress et les altérations de la fonction mitochondriale génèrent des ROS qui en dessous d'un certain seuil vont conduire à rétablir l'homéostasie cellulaire. Si le seuil est dépassé, un déséquilibre se crée, ce qui va contribuer à l'entrée en sénescence des cellules et au vieillissement.

2.4 La sénescence liée au sécrétome :

Depuis quelques années, la sécrétion des cellules sénescents ou SASP (*Senescence-Associated Secretory Phenotype*) semble présenter des propriétés qui pourraient contribuer au vieillissement (Rodier and Campisi, 2011). En sécrétant de nombreuses cytokines dont certaines sont pro-inflammatoires ainsi que des metalloprotéinases (TGF β ...), les cellules sénescents propagent la sénescence aux cellules environnantes via un mécanisme pouvant générer des ROS et des dommages à l'ADN (Gorgoulis and Halazonetis, 2010; Munoz-Espin and Serrano, 2014). Ainsi, par une activité autocrine et paracrine le SASP crée un environnement inflammatoire pouvant aggraver les dommages et conduire à l'entrée des cellules en sénescence (Kuilman et al., 2010; Rodier and Campisi, 2011).

2.5 La sénescence induite par les oncogènes :

Enfin, des observations montrent que l'apparition de la sénescence cellulaire ne reflète pas seulement l'accumulation de divisions cellulaires ou de dommages à l'ADN, mais qu'elle peut être également induite de manière prématurée en réponse à un stimulus oncogénique (Serrano et al., 1997). *In vivo*, l'induction de la sénescence cellulaire par des oncogènes, appelée OIS (*Oncogen-induced senescence*), agirait comme une barrière dans les premières étapes de la tumorigénèse en agissant comme un frein (Campisi, 2001; Gorgoulis and Halazonetis, 2010; Rodier and Campisi, 2011). *In vitro*, l'OIS a été observée pour la première fois avec l'oncogène RAS activé sur des fibroblastes humains. En induisant l'expression de cet oncogène, Serrano et ses collaborateurs ont observé un arrêt permanent des cellules en phase G1 du cycle cellulaire associé à une accumulation des protéines p53 et p16^{INK4a} et un phénotype comparable à la sénescence réplivative (Serrano et al., 1997). Une particularité observée dans les cas d'OIS, et plus rarement retrouvé dans le cas de la sénescence réplivative, est la formation de foyers d'hétérochromatine appelée SAHF (*Senescence Associated Heterochromatine Foci*) impliqués dans la séquestration de gènes spécifiques de la prolifération cellulaire et identifiables par des marqueurs d'hétérochromatines tels que H3K9me3, HP1 γ ou encore macroH2A (Kahli, 2011). Cependant, de manière similaire à la sénescence réplivative, l'OIS induit la DDR en réponse aux dommages de l'ADN provoqués par une hyperprolifération générant un stress réplificatif, ou encore par la formation de ROS. En réponse, une activation du locus CDKN2A est observée et dont les cibles en aval sont celles décrites précédemment (Munoz-Espin and Serrano, 2014; Serrano, 1997).

3. Les marqueurs de la sénescence :

Ainsi, l'ensemble de ces études ont permis de mettre en évidence plusieurs facteurs caractéristiques de l'état sénescents *in vitro* ou dans les tissus pouvant être utilisés comme marqueurs. Parmi eux :

- La détection de l'activité de la β -galactosidase est le plus couramment utilisé pour identifier les cellules sénescents *in vitro* et *in vivo* (Figure 12). Normalement active à pH 4,5 dans les lysosomes, la β -galactosidase est capable de dégrader le composé X-gal dans des conditions non optimales dans les cellules sénescents uniquement du fait d'une forte activité lysosomiale. Corrélée à l'augmentation de l'activité lysosomiale, et qui serait étroitement liée à l'augmentation de l'activité autophagique et à l'augmentation du compartiment lysosomal, cette activité SA- β -galactosidase (*Senescence-Associated β -galactosidase*) augmente avec l'âge au niveau des tissus. En accord avec l'augmentation des cellules sénescents dans l'organisme, elle constitue un bon marqueur de la sénescence et du vieillissement (Dimri et al., 1995; Kurz et al., 2000; Lee et al., 2006).

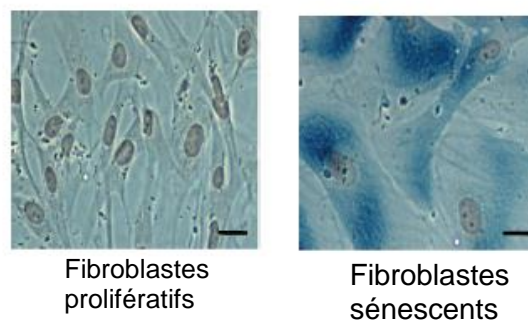


Figure 12 : Photographies de fibroblastes prolifératifs et de fibroblastes sénescents révélés par la β -galactosidase (en bleu), Lapasset al. 2011.

- L'entrée en sénescence et les signaux qui y sont associés conduisent à l'expression de protéines médiatrices intervenant dans les différents états de la sénescence. Parmi ces médiateurs utilisés comme marqueurs et que nous avons abordé précédemment, l'expression des protéines p16^{INK4a}, p19^{ARF}, p53, p21^{CIP1}, ou encore Rb hypophosphorylé intervenant dans le blocage du cycle cellulaire constitue également les marqueurs les plus largement utilisés (Figure 13).

- L'arrêt du cycle cellulaire se traduit par un arrêt de la prolifération cellulaire et par conséquent à une perte des marqueurs de prolifération tels que le BrdU ou Ki67. Leur absence d'expression reflète un état d'entrée des cellules en sénescence.
- Enfin, alors qu'*in vivo* les cellules préservent une morphologie en adéquation avec l'architecture tissulaire, certaines cellules comme les fibroblastes vont *in vitro* avoir une morphologie modifiée. Ces cellules apparaissent en effet étalées (Figure 12), avec de nombreuses vacuoles et voire dans certains contextes, multinucléées.

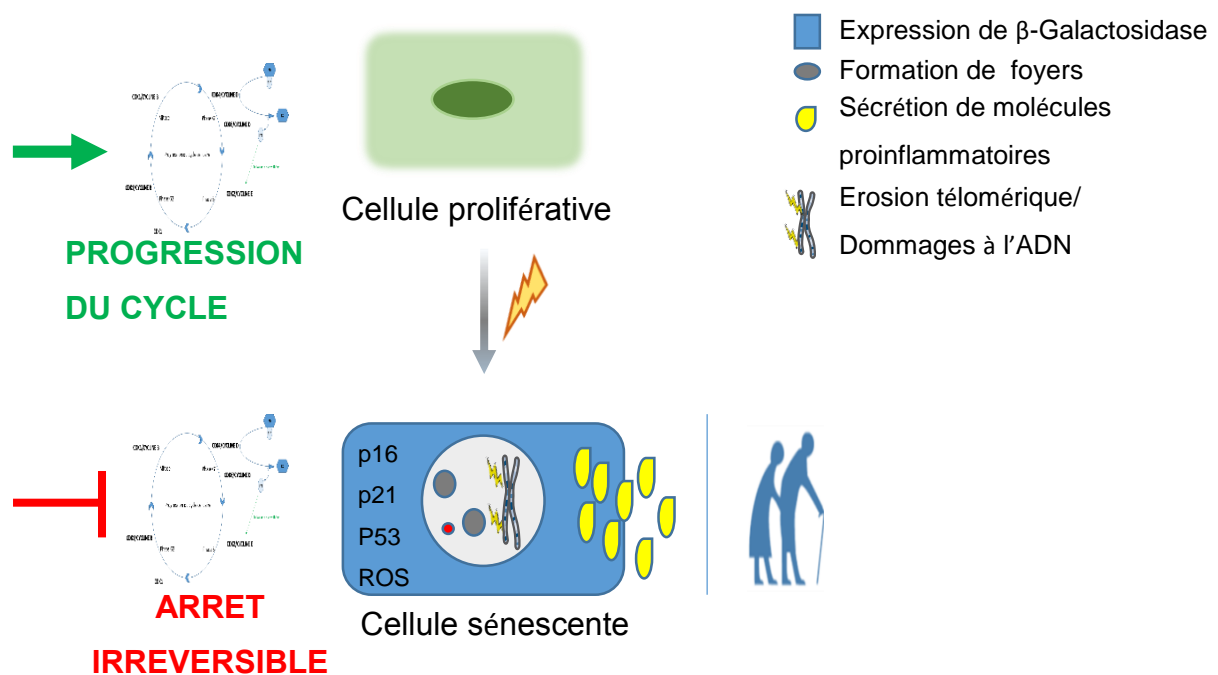


Figure 13: Représentation schématique des principaux marqueurs décrivant une cellule sénescente *in vitro* ou dans les tissus dès lors qu'ils sont observés communément. La détection de l'activité de la SA- β -galactosidase est signe d'une augmentation de l'activité lysosomale. L'entrée en sénescence et les signaux qui y sont associés conduisent également à l'expression de protéines médiatrices telles que les protéines p16, p53, p21 provoquant ainsi un arrêt irréversible de la progression du cycle cellulaire. Source : Adapté de Rodier & Campisi, 2011.

En résumé, les stimuli d'activation de la sénescence cellulaire semblent nombreux et convergent vers des voies communes dont l'utilisation en tant que marqueurs de caractérisation de la sénescence nécessite qu'ils soient retrouvés exprimés simultanément.

4. Sénescence cutané et vieillissement :

La sénescence cellulaire est donc un processus complexe mais il n'est pas un concept retrouvés dans tous les tissus (Dimri et al., 1995; van Deursen, 2014). La peau est un des principaux organes qui n'échappent pas à la sénescence.

D'un point de vue macroscopique, la peau s'affine avec l'âge (Figure 14) et perd ses propriétés de résistance, de plasticité et d'élasticité. Cette perte de tonicité, couplée à l'effet de la gravité terrestre, se traduit au niveau physique par l'apparition de rides. Outre cet aspect esthétique, la perte de ses propriétés conduit surtout la peau à ne plus pouvoir assurer de manière optimale son rôle de barrière protectrice notamment face aux risques infectieux et perd progressivement, comme de nombreux autres tissus, son potentiel d'autorenouvellement. Elle devient ainsi plus vulnérable aux agents extérieurs ionisants ou microbiens (Zouboulis and Makrantonaki, 2011).

Cette diminution de l'épaisseur de l'épiderme serait due à la diminution du nombre de cellules ainsi qu'à la dégradation de la matrice extracellulaire comme observé sur des coupes histologiques de donneurs âgés comparés à un donneur jeune (Robert et al., 2009) (Figure 14).

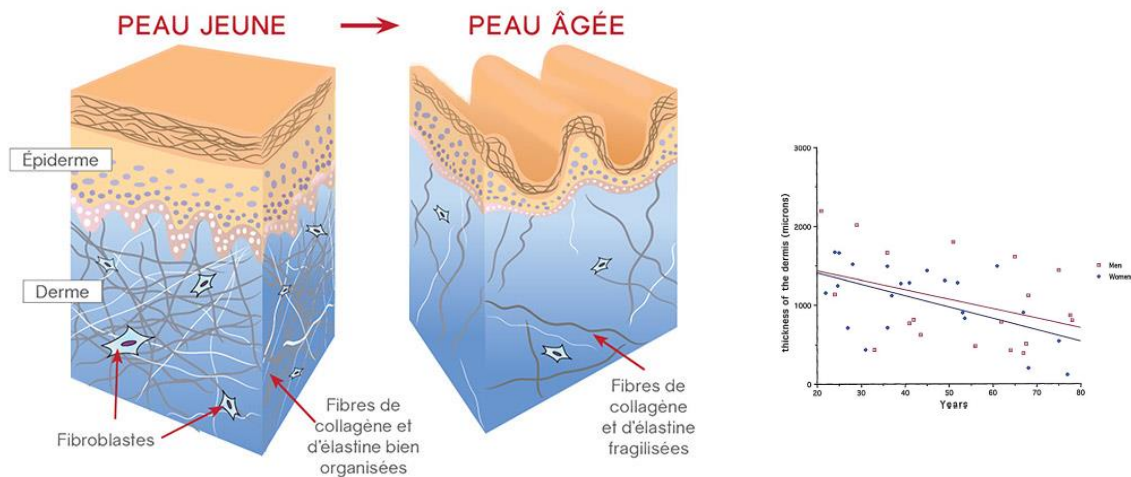


Figure 14: Représentation morphologique d'une peau et d'une peau âgée. Au cours du vieillissement l'épiderme s'amincit, les crêtes sont moins nombreuses et moins prononcées. Au niveau derme, les fibres de collagène et d'élastine se fragilisent et conduisent à une perte d'élasticité. D'un point de vue général, l'ensemble de ces caractéristiques conduit à l'affaissement de la peau et l'apparition de rides. D'après Mine et al. 2008 ; Robert et al. 2009.

Nous avons vu que dans le cas du SASP, les cellules sénescents augmentent leur activité sécrétoire en libérant des métalloprotéinases (MMP) dans leur environnement. L'activité de ces métalloprotéinases pourrait être responsable de la dégradation ou de la perte de cette matrice extracellulaire (Jenkins, 2002). L'augmentation de cette activité protéolytique a également été décrite dans les défauts de cicatrisation, où une augmentation de la quantité des métalloprotéinases est associée à une diminution des inhibiteurs de ces protéases et à une dégradation de la fibronectine présente dans la matrice extracellulaire (Grinnell et al., 1992; Wysocki et al., 1993).

Avec l'âge, on constate également au niveau de la peau, une diminution importante du nombre de cellules de Langherans en comparaison à une peau jeune (Zouboulis and Makrantonaki, 2011). Ces cellules de Langherans dispersées dans l'épiderme jouent un rôle important dans la réponse immunitaire cutanée en assurant leur fonction de cellules présentatrices d'antigènes. Diminuées, ces cellules présentent par ailleurs des altérations dans leur capacité de présentation aux antigènes, mais aussi dans leur morphologie avec des formations dendritiques (Grewe, 2001). Ceci va contribuer à l'altération de la fonction immunitaire au niveau de la peau, et expliquer ainsi les risques infectieux retrouvés au cours du vieillissement.

Les principaux marqueurs spécifiques de la sénescence que nous avons décrit antérieurement (télomères courts, expression augmentée de p53, p16^{INK4a} (Figure 16) et de la β -galactosidase (Figures 17 et 18) sont pour la plupart retrouvés au niveau des cellules de la peau, notamment dans les cas de photo-vieillessement (Flores and Blasco, 2009; Matsui et al., 2000; Ressler et al., 2006). Plusieurs études semblent montrer une diminution de la taille des télomères au cours de la sénescence répllicative ou au cours de l'âge au niveau des kératinocytes, ou au niveau des fibroblastes du derme (Figure 15) (Flores et al., 2008; Matsui et al., 2000; Robert et al., 2009), ce qui pourrait expliquer de manière partielle la perte du potentiel de renouvellement de l'épiderme.

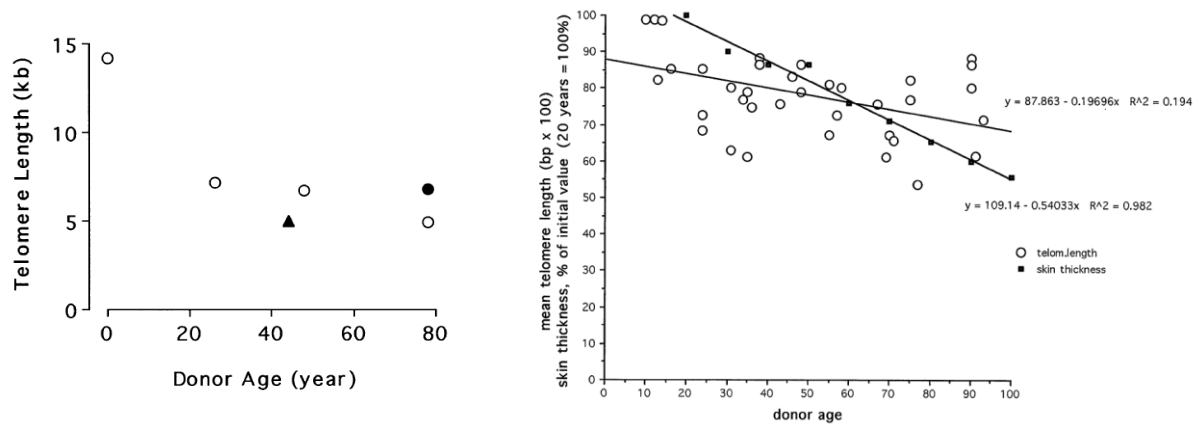


Figure 15 : Analyse de la longueur des télomères de kératinocytes et de fibroblastes en fonction de l'âge.

A) Travaux de Robert et al. 2009 mettant en évidence une réduction de la taille des télomères des kératinocytes issus de donneurs de différents âges. B) Travaux de Matsui et al. 2000 mettant en corrélation l'épaisseur de l'épiderme et la longueur des télomères de fibroblastes dermiques en fonction de l'âge.

Par ailleurs, certains travaux semblent plutôt mettre en évidence que le mécanisme de sénescence des kératinocytes ferait plutôt intervenir les protéines p53 et p16^{INK4a} de manière indépendante de la longueur des télomères (Rheinwald et al., 2002). Selon Sharpless & DePinho, le nombre de cellules souches et la capacité d'auto-renouvellement ne sont pas les causes d'une perte du potentiel régénératif avec l'âge, mais il s'agirait plutôt d'une altération fonctionnelle des cellules souches dans la capacité à produire des progéniteurs épidermiques dont le nombre diminuerait donc avec l'âge (Sharpless and DePinho, 2007).

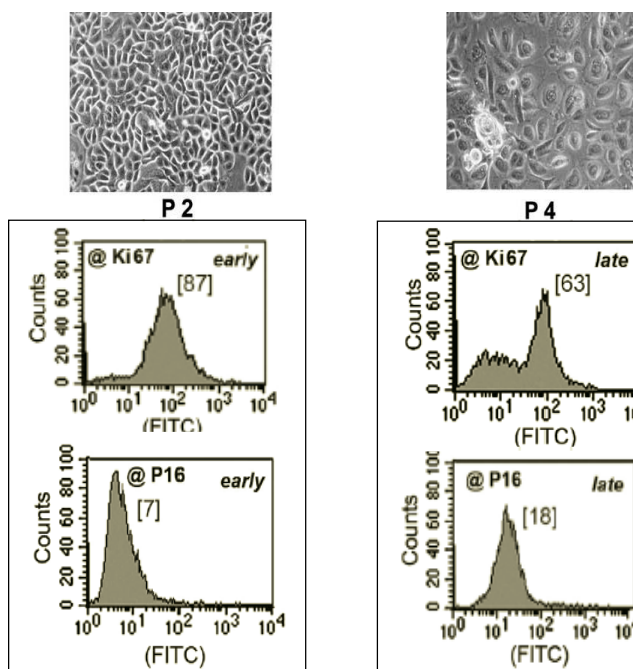


Figure 16 : Travaux de Soroka et al. 2008 mettant en évidence un des marqueurs de la sénescence sur des kératinocytes au cours des passages. L'expression du marqueur p16 tandis que le marqueur de Ki67 semble montrer une diminution de la population de cellules prolifératives. *Early* : passage 2 et *Late* : passage 4 correspondant respectivement aux photos en contraste de phase.

Campisi J. et ses collaborateurs ont observé que d'autres marques liées à la sénescence s'accumulent avec l'âge au niveau du derme et de l'épiderme, et ont ainsi mis en évidence la présence de cellules sénescents dans la peau (Dimri et al., 1995). Ils montrent en effet qu'il existe un marquage β -galactosidase au sein du tissu, notamment au niveau des cellules basales de l'épiderme où se retrouvent essentiellement les kératinocytes à potentiel prolifératif (Figure 17). Ils observent également que ce marquage, qui n'est pas retrouvé chez des donneurs jeunes, est spécifique des donneurs âgés. Ils suggèrent ainsi que l'augmentation de l'activité β -galactosidase avec l'âge au niveau de la peau humaine (*in vivo*) reflète en effet une accumulation de kératinocytes sénescents dans l'épiderme, mais également de fibroblastes sénescents au niveau du derme.

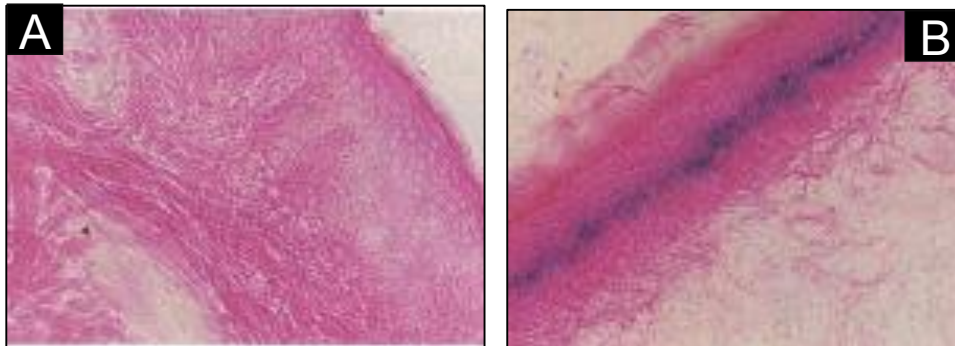


Figure 17 : Marquage β -galactosidase sur coupe de peau humain.

A) Coupe de peau de femme de 38 ans sans marquage de β -galactosidase.

B) Coupe de peau d'homme de 73 ans avec marquage de β -galactosidase en bleu.

Source : Dimri et al. 1995.

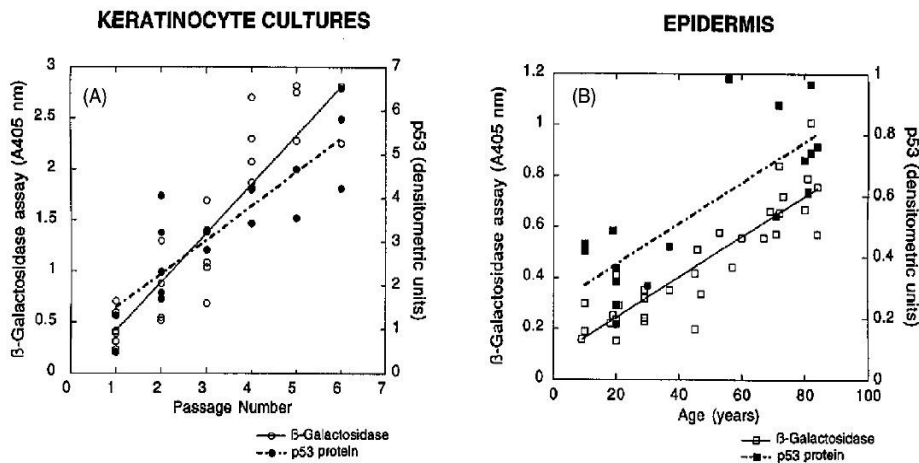


Figure 18 : Mesure et comparaison de l'activité β -galactosidase et de l'expression de p53 au cours des passages des kératinocytes (à gauche) et au cours du vieillissement de l'organisme (à droite). Source : Wang et al. 2004.

D'autres études menées *in vitro* font également le lien entre l'état sénescence et le potentiel « souche » des kératinocytes. Ils montrent que le vieillissement chronologique et la sénescence répliquative induite par des passages successifs en culture conduisent à une diminution du potentiel « souche » des kératinocytes isolés de la couche basale (Michel et al., 1997; Youn et al., 2004).

Ainsi que ce soit au niveau de la peau, mais également de tout autre tissu, le déclin physiologique lié à l'âge provient d'une diminution des mécanismes de protection cellulaire combinés à une augmentation de processus délétères dont les effets sont modulés par une prédisposition génétique et par l'exposition aux facteurs de stress environnementaux, y compris les espèces réactives d'oxygènes. Il est important de continuer à développer et à optimiser les méthodes d'investigations à l'aide de modèles cellulaires mais aussi animaux pour analyser les mécanismes fondamentaux qui sous-tendent la réponse cellulaire au stress et leur évolution au cours du vieillissement, mais aussi de déterminer leur implication dans les systèmes physiologiques qui sont affectés de manière critique avec l'âge comme nous tentons de le faire avec le modèle cutané.



Chapitre 4 :

LES CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES

ET LEUR POTENTIEL THERAPEUTIQUE EN MEDECINE REGENERATRICE

1. Les cellules souches embryonnaires pluripotentes :

Comme nous l'avons vu dans le 1^{er} chapitre, le passage de l'état pluripotent à l'état différencié au cours du développement permet la formation des différents types cellulaires de l'organisme. Il a été longtemps considéré que ce processus était irréversible. Aujourd'hui, il est dorénavant possible de parcourir le chemin inverse en reprogrammant des cellules différenciées en cellules pluripotentes.

Les premiers fondements du concept de reprogrammation cellulaire s'appuient sur les différentes études sur le développement embryonnaire. L'ensemble de ces études, initiées par les expériences de Spemann et Mangold, cherchent à identifier les différents facteurs impliqués dans le destin cellulaire au cours du développement embryonnaire précoce (Briggs and King, 1952 ; Gurdon, 1962).

Et bien que les différences fondamentales entre le processus qui a lieu pendant la différenciation au cours du développement embryonnaire et celui de la reprogrammation ne sont pas établis, il est largement admis, que la reprogrammation se déroule en réversant le processus naturel de la différenciation au cours du développement suggérant un lien étroit entre ces deux mécanismes (Takahashi and Yamanaka, 2015).

La possibilité de pouvoir isoler des cellules souches embryonnaires à partir de blastocytes chez le modèle murin et de pouvoir les cultiver *in vitro*, fut un véritable tournant dans l'étude des mécanismes de différenciation et de maintien de la pluripotence. L'importance d'une telle découverte s'appuie sur les propriétés des cellules souches embryonnaires liées à leur état pluripotent. Elles vont pouvoir s'auto-renouveler de manière illimitée en maintenant leur état indifférencié de manière physiologique (par opposition aux cellules cancéreuses) grâce à un réseau signalisation cellulaire important. En réponse à des signaux inducteurs issus de l'environnement cellulaire ou bien par l'induction de voies particulières ces cellules vont aussi avoir le potentiel de s'engager rapidement dans un processus de différenciation pouvant former les différents types cellulaires dérivés des 3 feuilletts primaires formés au cours de la gastrulation (cf.chapitre 1 et Figure 19).

Cette démonstration a ouvert la voie à un domaine qui offre des promesses incroyables vers une compréhension fine des processus biologiques qui ont lieu au cours du développement. De nouvelles pistes de recherche se sont alors dessinées laissant entrevoir des applications thérapeutiques aussi fascinantes qu'ambitieuses et devenir la base de la médecine régénérative (Evans and Kaufman, 1981 ; Martin, 1981; Thomson et al., 1998).

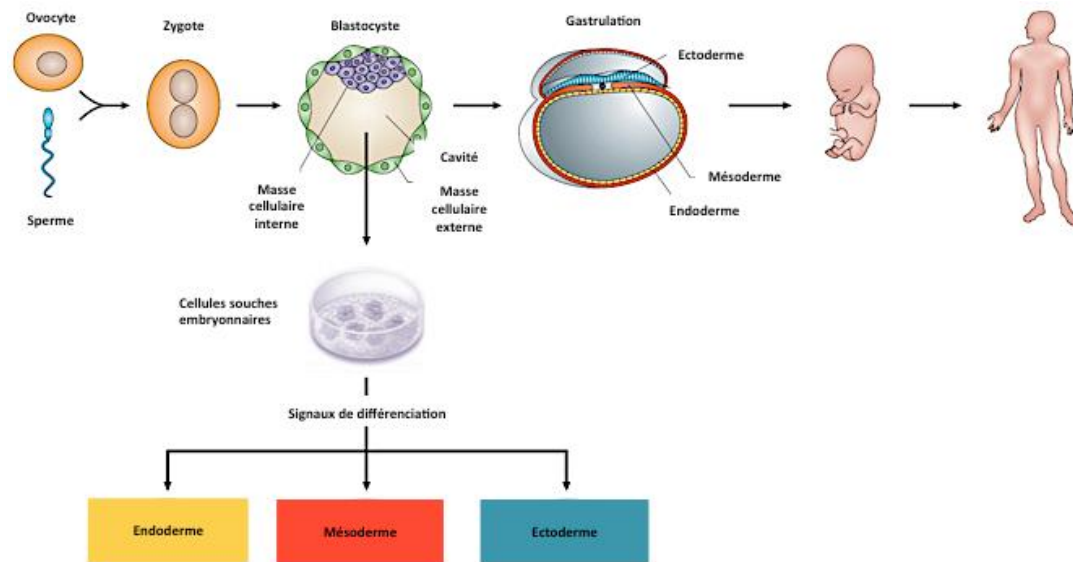


Figure 19: Dérivation des cellules souches embryonnaires humaines. Au stade blastocyste, les cellules de la masse cellulaire interne sont prélevées et amplifiées *in vitro*. Par différenciation dirigée, les cellules souches embryonnaires ont la capacité de former les différents types de cellules issues des 3 feuillets embryonnaires. Source : Adapté de O'Connor et al. 2008.

2. Les cellules souches à pluripotence induite et la reprogrammation cellulaire :

La première expérience de reprogrammation cellulaire fut apportée par les travaux de Gurdon en 1962, par transfert du noyau d'une cellule épithéliale différenciée dans un oocyte énucléé (Gurdon, 1962). Associée aux travaux de Thomson, cette démonstration a conduit de nombreuses équipes à la mise au point de techniques de dé-différenciation, soit en exposant les noyaux des cellules somatiques à un environnement pluripotent (SCNT, fusion cellulaire) soit en agissant sur l'activité génomique des cellules somatiques. Le but étant de leur conférer les propriétés de pluripotence similaires aux cellules souches embryonnaires.

Poursuivant le même objectif, les formidables travaux du Dr Yamanaka et de son équipe en 2006 sont devenus un tournant majeur. Ils parviennent à identifier les conditions factorielles nécessaires permettant à une cellule somatique adulte murine d'acquérir les propriétés de pluripotence et de différenciation comparables à celles des cellules souches

embryonnaires murines (Takahashi and Yamanaka, 2006). Ces travaux ont consisté à évaluer 24 gènes présélectionnés à partir d'un ensemble de gènes selon l'hypothèse qu'ils auraient un rôle central dans le maintien de l'identité des hESCs. Leur première étape consiste à transduire tous ces gènes par voie rétrovirale dans des fibroblastes embryonnaires murins (MEF) et observent la formation de cellules pluripotentes. De ces gènes candidats qu'ils retirent un à un, ils identifient dans une 2nde étape, qu'il y a 10 facteurs qui, combinés, sont capables de former des colonies d'IPSCs. De ces 10 facteurs, toujours en retirant les facteurs un à un, ils ciblent 4 facteurs principaux ayant un rôle important pour la génération de cellules pluripotentes à partir de MEF. Ce cocktail de 4 facteurs constitués de OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC (OSKM) associés à la pluripotence ont l'année suivante été testés chez l'Homme et ont permis de générer des cellules pluripotentes aux caractéristiques communes aux hESCs (Figure 20) (Takahashi et al., 2007). La même année, l'équipe du Dr Thomson montre qu'il est également possible de générer ces cellules pluripotentes humaines, et avec une efficacité similaire, en proposant d'utiliser une alternative au cocktail du Pr Yamanaka en substituant les facteurs KLF4 et c-MYC par les facteurs NANOG, LIN28 (formant le set OSNL) (Yu et al., 2007).

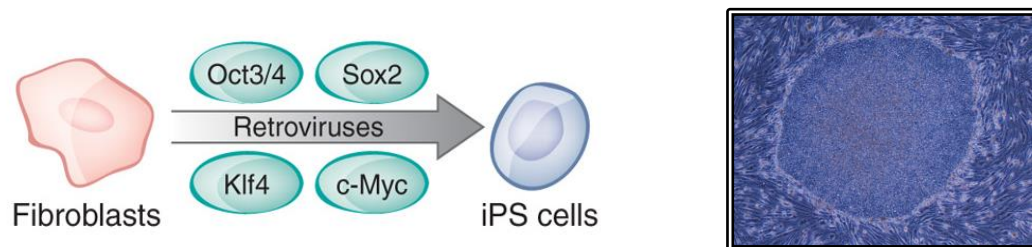


Figure 20 : Principe de la reprogrammation cellulaire développée par Takahashi et al. 2006. La reprogrammation cellulaire consiste en la transduction des facteurs OCT3/4, SOX2, KLF4, et c-MYC dans des fibroblastes via l'utilisation de vecteurs rétroviraux. Source : Yamanaka S. 2009

Ces cellules somatiques humaines reprogrammées génétiquement ont été appelées hiPSCs, pour cellules souches humaines à pluripotence induite (*human induced Pluripotent Stem Cells*). Ces cellules présentent les mêmes caractéristiques d'autorenouvellement illimité *in vitro*, et de différenciation vers les différents types de cellules associées aux 3 feuilletts embryonnaires. Les caractéristiques de pluripotence de ces hiPSCs font bien entendu de ces cellules des outils très attractifs en terme d'application. D'autant plus qu'elles présentent l'avantage de pouvoir s'affranchir des contraintes éthiques et techniques (disponibilité d'embryons) relatives à l'utilisation des hESCs ainsi que des risques associés

au rejet de greffe (les cellules reprogrammées à partir de cellules somatiques sont issus du patient même et sont donc histocompatibles).

Cependant le faible rendement d'obtention de colonies du fait d'une efficacité de production limitée, ainsi que l'atteinte à l'intégrité génomique du fait de l'utilisation de rétrovirus furent les premiers écueils de cette technologie pour envisager une application clinique (Hanna et al., 2010).

De ces deux constats, de nombreuses équipes ont focalisé leur effort afin de comprendre les mécanismes responsables de cette efficacité limitée afin de pouvoir proposer de nouvelles stratégies de reprogrammation plus efficaces et surtout plus sûres en évitant les aberrations chromosomiques. Grâce à cette dynamique, il existe aujourd'hui, seulement 8 ans après les premières démonstrations de reprogrammation de cellules humaines, plusieurs stratégies alternatives pour une reprogrammation cellulaire complète, plus efficace et apportant une meilleure compréhension des voies mécanistiques impliquées.

C'est ainsi que les différentes équipes ont pu proposer des stratégies de plus en plus optimisées et efficaces. A partir du protocole de Yamanaka, S., différents paramètres ont pu être ajustés voire modifiés parmi lesquels le choix du type cellulaire à reprogrammer (fibroblastes, neurones, kératinocytes, cellules hématopoïétiques) (Aasen et al., 2008), le choix de la fonction, du nombre et de la stœchiométrie des facteurs de transcription seuls ou en association à d'autres composés, ou encore la méthode de transfert des facteurs (avec intégration avec des rétrovirus, lentivirus ou AAV ; ou bien sans intégration avec des ARN, vecteurs épisomiaux ou molécules chimiques) (Figure 21) et/ou enfin en faisant varier les conditions de culture (conditions d'oxygène, conditions d'amplification enzymatique ou mécanique, présence ou non de tapis nourricier).

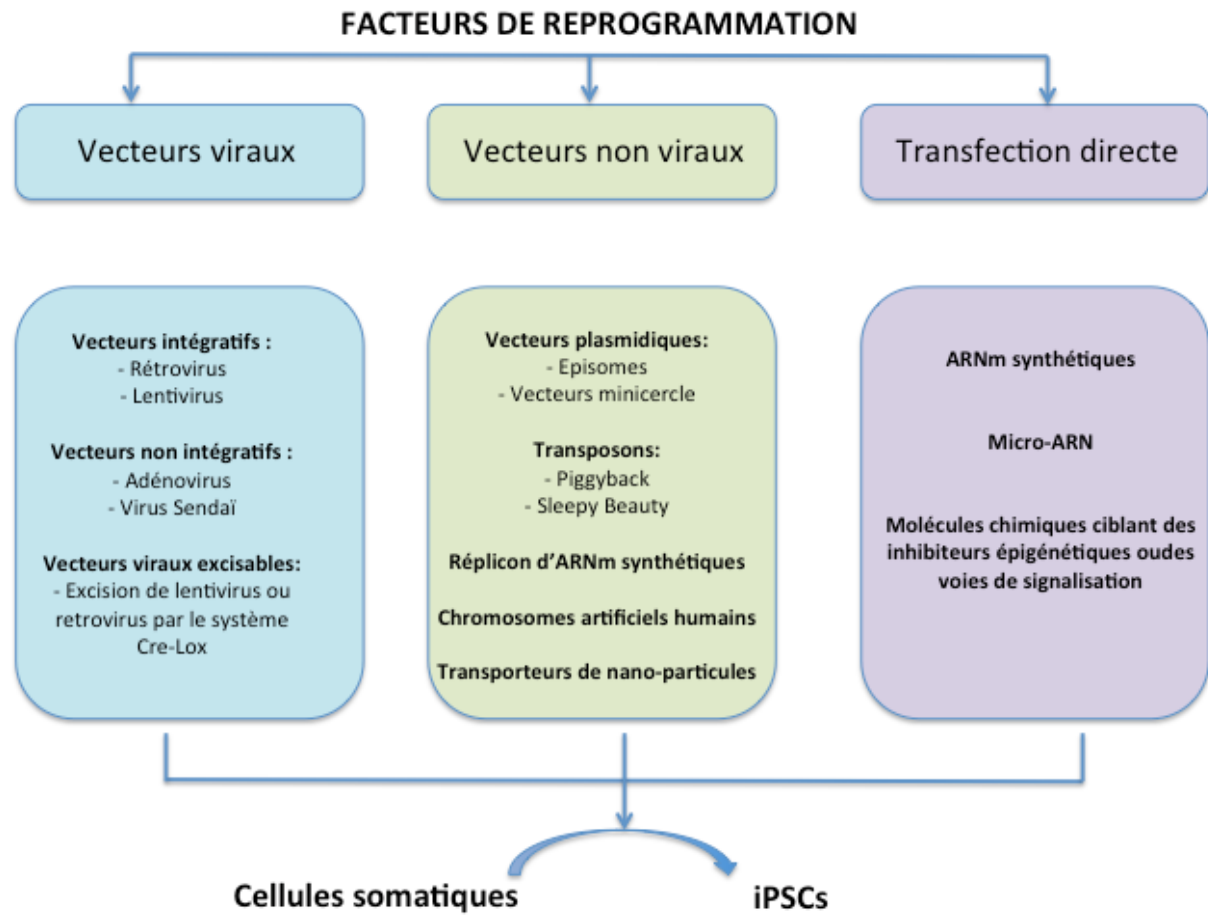


Figure 21 : Résumé des différentes approches expérimentales développées pour la génération de cellules souches à pluripotence induite (iPSCs). Source : Adapté de Rony et al. 2015.

3. Caractérisation et validation du potentiel pluripotent des cellules reprogrammées :

Outre l'aspect morphologique où les cellules doivent être arrondies au ratio nucléocytoplasmique élevé avec la capacité à s'organiser en colonies, une pluripotence établie repose principalement sur le potentiel d'auto-renouvellement en culture ainsi que sur celui de pouvoir se différencier en tout type cellulaire aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Ces deux propriétés sont alors évaluées pour définir une reprogrammation cellulaire complète. Pour cela, les démonstrations doivent être effectuées à plusieurs niveaux par la validation de l'expression de gènes endogènes et/ou de marqueurs associés à la pluripotence, par leur potentiel à se redifférencier *in vitro* et *in vivo*. Après reprogrammation cellulaire, on observe effectivement une réactivation des gènes endogènes responsables de l'expression des facteurs associés à la pluripotence. Pour décrire l'état pluripotent des cellules, celles-ci doivent alors exprimer les principaux facteurs impliqués dans le réseau de signalisation conduisant à la pluripotence qui sont les marqueurs OCT4 (POUF5), NANOG, SOX2,

REX1. Ces gènes sont, à l'état différencié, réprimés par la présence de marques de méthylation au niveau de leur promoteur. La démonstration d'une déméthylation de ces promoteurs montrent que les cellules ont bien ré-exprimé leurs gènes endogènes (Figure 21). L'expression de marqueurs de surface tels que SSEA-4 et/ou TRA1-60, ou l'expression d'alkaline phosphatase sont également des marqueurs qui doivent être observés au niveau de cellules pluripotentes, bien qu'à eux seuls, ils sont insuffisants pour définir l'état pluripotent des cellules.

En revanche, la démonstration de la capacité à se différencier *in vitro* et *in vivo* vers les lignages issus des 3 feuilletts embryonnaires est essentielle. *In vitro*, la différenciation peut se faire soit de manière directe et dirigée en changeant les conditions de culture, ou bien par la formation de corps embryoïdes en suspension. La démonstration que les cellules ont la capacité à former des tératomes *in vivo* est la méthode de référence pour caractériser la pluripotence. L'injection en sous-cutané de cellules reprogrammées dans des souris immunodéficientes (NOD/SCID) donne en effet des tératomes dans des tissus différenciés provenant des 3 feuilletts embryonnaires.

Enfin, et même s'il ne s'agit pas là d'un paramètre d'évaluation de la pluripotence, l'analyse caryotypique permet de s'assurer de l'absence d'aberration chromosomique pouvant être générée par le processus de reprogrammation cellulaire ou bien par le temps de culture relativement long nécessaire à l'obtention des hiPSCs. Un caryotype normal associé aux différentes démonstrations précédemment citées permet de s'assurer d'une reprogrammation cellulaire complète et optimale.

L'une des particularités des cellules pluripotentes humaines, embryonnaires ou obtenues après reprogrammation, est leur incapacité à former des chimères en comparaison à leurs cellules homologues murines (Kieffer E, 2010 ; Maherali and Hochedlinger, 2008). Avec les cellules souches embryonnaires ou à pluripotence induite murines (mESCs ou miPSCs), deux démonstrations complémentaires permettent de mettre en évidence le caractère pluripotent des cellules. D'une part, la formation de chimères avec transmission germinale chez la souris, et d'une autre part la complémentarité d'embryons tétraploïdes qui permet la formation d'un embryon viable issu de l'injection des cellules pluripotentes dans un blastocyste. Pour une question d'éthique qui s'impose de manière évidente, ce type de démonstration ne peut pas être appliqué à l'Homme avec des hiPSCs ou des hESCs.

Toutefois, au-delà de cette limite importante, les cellules souches pluripotentes humaines n'ont pas ce potentiel cellulaire de chimérisation. En effet, il existe deux types de pluripotence : les cellules pluripotentes « naïves » qui correspondent aux mESCs et les cellules pluripotentes dites « primed » ou « engagées » correspondant plutôt aux hESCs et mEpiSCs. Les cellules naïves constituent un état de pluripotence plus précoce que les cellules primed. Elles correspondraient en effet au stade morula voire blastocyste au cours du développement. Les cellules primed quant à elle, apparaissant au stade suivant le stade blastocyste et correspondraient aux cellules épiblastiques. Pour pouvoir former des chimères, les cellules doivent être de type naïve, identifiables par une hypométhylation des gènes associés à la pluripotence ainsi qu'à une activation du X, mais également par un profil transcriptomique et une réponse aux cytokines différents (Chen et al., 2015; Fang et al., 2014; Gafni et al., 2013 ; Takashima et al., 2014; Ware et al., 2014). Ces caractéristiques sont retrouvées sur les mESCs (ou miPSCs) mais pas les hESCs (hiPSCs). Les hESCs se distinguent donc des mESCs ce qui suggèrent que le stade d'engagement dans la différenciation au cours du développement ou en culture n'est pas le même, point essentiel à considérer dans le cadre d'une reprogrammation cellulaire. De ce fait, en tenant compte également que les conditions de culture pour les cellules engagées et les cellules naïves ne sont pas les mêmes, cela laisse à penser que l'obtention de cellules naïves nécessitent encore d'être optimiser. Parvenir à un tel résultat est d'un enjeu majeur en médecine régénérative. Cela apporterait en effet de meilleures conditions de culture pour une meilleure sélection des cellules sans marque épigénétique d'engagement en différenciation, autrement dit des cellules optimisées dans la perspective d'une utilisation clinique.

4. Les mécanismes impliqués dans le processus de reprogrammation cellulaire :

La plasticité cellulaire est la capacité que possède une cellule somatique à changer son identité lui permettant de passer d'un état différencié donné à un autre état (ici pluripotent) grâce à un remodelage important de son organisation génomique et de son activité intracellulaire.

4.1 Les modifications épigénétiques :

Ce processus de reprogrammation cellulaire repose entre autre sur un vaste réseau modulant les états épigénétiques des cellules.

Au cours du développement et puis à l'âge adulte, les mécanismes épigénétiques ont un rôle important dans le contrôle de l'expression des gènes par l'organisation de l'architecture nucléaire des chromosomes en facilitant ou non l'accès de certains facteurs de transcription, mais aussi pour préserver une mémoire des activités transcriptionnelles en fonction des différents types de cellules (Rivera and Ren, 2013). Ces modifications épigénétiques telles que la méthylation de l'ADN et les modifications post-traductionnelles des histones (par acétylation, méthylation, ubiquitinylation ou encore phosphorylation) (Figure 22), sont importantes pour pouvoir mener les cellules vers une fonction appropriée notamment au cours de la différenciation.

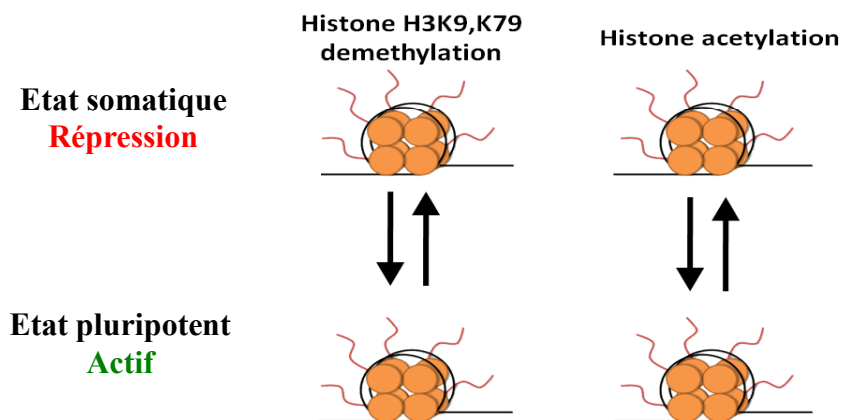


Figure 22 : Modifications épigénétiques à l'état somatique et après la reprogrammation cellulaire. La déméthylation de l'ADN et l'acétylation des histones sont des marques essentielles pour le passage de l'état somatique à l'état pluripotent au cours du processus de reprogrammation cellulaire. Source : Cota et al. 2013.

Un des mécanismes majeurs décrit comme affectant la plasticité épigénétique au cours de la reprogrammation est la méthylation à l'échelle du génome entier (Watanabe et al., 2013). Pour une reprogrammation efficace, le processus intervient alors au niveau de la modification des histones de la chromatine ainsi qu'au niveau de la régulation des marques épigénétiques des gènes de la pluripotence et des gènes impliqués dans le programme de différenciation de la cellule (Watanabe et al., 2013; Festuccia et al., 2013; van Oevelen et

al., 2013). La régulation de ces marques est assurée essentiellement par des enzymes qui vont agir sur le remodelage de la chromatine comme des co-répresseurs ou des co-activateurs des facteurs de la pluripotence (OKSM), et ainsi influencer la formation de colonies d'hiPSCs (Loh and Lim, 2012; Kanherkar et al., 2014).

4.2 Les transitions Mésoenchymateuses-Epithéliales (EMT/MET) :

Par cette plasticité, la reprogrammation cellulaire apparaît de toute évidence comme un processus de dé-différenciation d'une cellule différenciée. En plus des mécanismes précédemment abordés, pour que le processus soit complet cela implique une première étape de transdifférenciation mettant en jeu cette plasticité appelée transition mésoenchymateuse-épithéliale (MET), le processus inverse de l'EMT (transition épithélio-mésoenchymateuse) et qui va permettre d'optimiser l'efficacité de reprogrammation (Brosh et al., 2013).

L'EMT et la MET mettent toutes deux en jeu les cellules épithéliales et mésoenchymateuses, deux types cellulaires dotées de caractéristiques multiples et opposées. Les cellules mésoenchymateuses possèdent des propriétés importantes de motilité et de migration relatives à leur morphologie allongée. Les cellules épithéliales quant à elles, plutôt arrondies et capables de s'organiser en un tissu très cohésif grâce aux interactions et l'adhésion entre les cellules. Grâce à de nombreux et rapides changements au cours d'une transition, les cellules mésoenchymateuse vont se convertir en cellules épithéliales, appelée dans ce cas MET, ou inversement et on parlera alors d'EMT respectivement (Brosh et al., 2013). MET et EMT apparaissent être très importantes au cours du développement notamment au cours de la gastrulation (Chuai et al., 2012), où de nombreux signaux extracellulaires vont agir pour diriger les cellules vers l'EMT ou la MET (Valcourt et al., 2005). De manière générale, ils sont également décrit avoir de nombreux rôles dans les métastases. L'EMT semble contribuer aux patterns de tissus normaux ainsi que dans l'invasion de carcinomes, tandis que la MET semble plus impliquée dans la colonisation de sites distants (Valcourt et al., 2005).

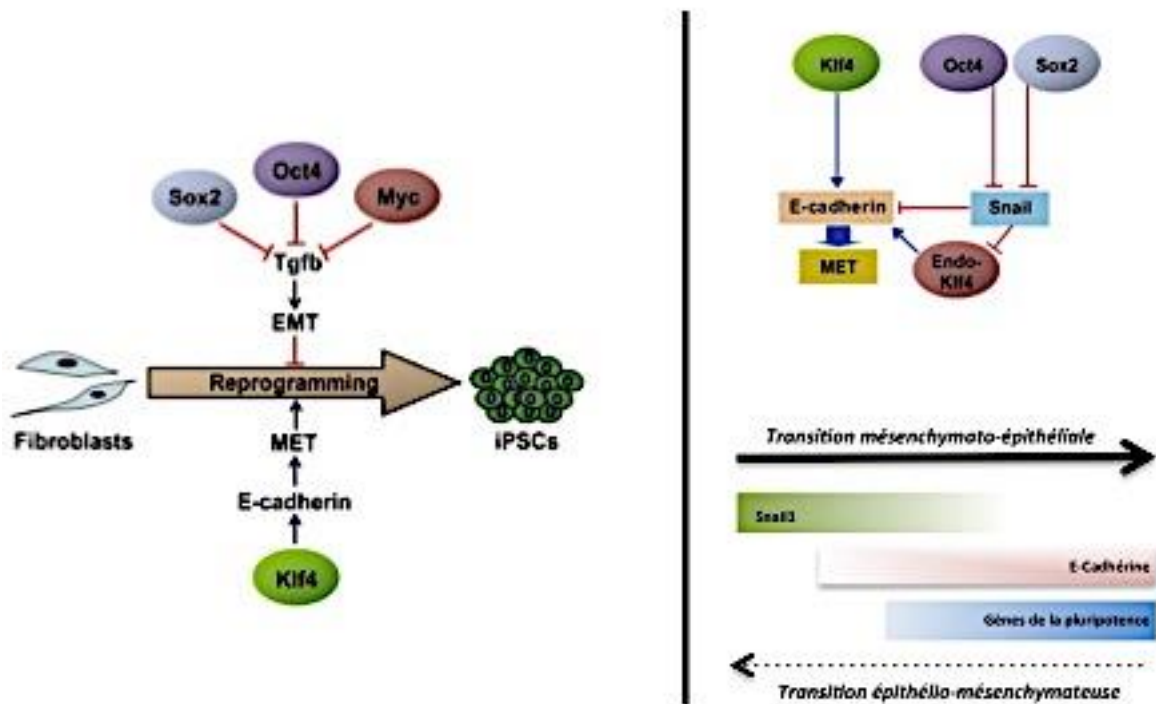


Figure 23 : Représentation schématique décrivant les mécanismes moléculaires d'activation du programme épithélial favorisant la reprogrammation.

Les facteurs Sox2, Oct4 et c-Myc bloque la MET via l'inhibition du TGFβ. Le facteur Klf4 active l'expression des gènes de la voie épithéliale comme l'E-cadhérine favorisant ainsi la MET. Au cours du processus de reprogrammation, les gènes associés à la voie mésenchymateuse ne sont plus exprimés en faveur de l'expression des gènes associés à la voie épithéliale et à la pluripotence. Sources : Li et al. 2010, et adaptation de Polo & Hochedlinger, 2010.

Ces deux mécanismes sont possibles grâce à un réseau complexe de signaux intracellulaires qui vont agir en réprimant ou activant l'expression ou l'inhibition de gènes spécifiques (Figure 23). A partir des différentes études menées, Sleeman JP & Thiery JP dessinent un réseau général et complexe des mécanismes cellulaires majeurs et de la régulation de l'EMT (Sleeman and Thiery, 2011). Au coeur de ce complexe, Snail1 apparaît être le *master gene* du phénotype mésenchymateux, tandis que l'E-cadhérine a un rôle central dans l'adhésion entre les cellules (Klymkowsky and Savagner, 2009), et dont le lien entre ces deux acteurs se situe dans le fait que dans l'épiblaste, Snail1 vient inhiber l'E-Cadherine en faveur de l'EMT (Gill et al., 2011) (Figure 23).

Au cours de la reprogrammation cellulaire, les fibroblastes issus de l'EMT, peuvent être transformés en hiPSCs grâce à l'expression des facteurs de transcription que nous avons décrit précédemment. Par une analyse transcriptomique, Wang et son équipe, définisse un nouveau rôle pour la MET, qu'il décrit comme un état intermédiaire au cours du processus

de reprogrammation où les cellules semblent n'avoir ni un profil somatique ni pluripotent (Wang et al., 2010).

Bien que les mécanismes moléculaires ne soient pas encore complètement élucidés, le groupe de Li R. apporte une meilleure compréhension où les facteurs de reprogrammation active le programme épithélial et vont réprimer les gènes du programme mésenchymateux afin de franchir la barrière épigénétique constituée par l'EMT, et ainsi favoriser la formation d'hiPSC (Li et al., 2010). Les facteurs KLF4 et SOX2/OCT4 agiraient en effet de concert pour induire le lignage épithélial (en agissant sur l'E-cadhérine) et inhiber le lignage mésenchymateux (par répression de Snail1) respectivement afin de convertir les cellules vers un état épithélial intermédiaire. L'EMT présenterait donc un caractère restrictif à l'efficacité de reprogrammation, tandis que la MET apparaît comme l'une des étapes initiales dans le processus de reprogrammation (Li et al., 2010; Samavarchi-Tehrani et al., 2010; Yori et al., 2010).

4.3 L'EMT et les voies p53, p21 :

Parmi les mécanismes également observés au cours du processus de conversion, une étude de Brosh et son équipe décrit un nouveau rôle pour p53 dans le contrôle de l'EMT. Ils montrent en effet que l'activité répressive de p53 sur la MET pourrait être un nouveau mécanisme pouvant intervenir dans l'efficacité de reprogrammation. Au cours de ce mécanisme, la voie p53/p21 aurait une action restrictive sur la plasticité cellulaire et sur le processus de reprogrammation, en inhibant, *via* p21, le facteur de transcription KLF4 responsable de l'activation de l'E-Cadhérine. En conséquence, une inhibition de la MET en faveur de l'EMT conduirait à une faible efficacité au cours de la reprogrammation (Brosh et al., 2013). A l'inverse, KLF4 dont l'un des rôles est la répression de l'activité de p53 dans un contexte oncogénique assurerait le maintien du phénotype épithélial (Rowland et al., 2005; Yori et al., 2010).

4.4 La sénescence induite par la reprogrammation:

Le vieillissement et la reprogrammation cellulaire sont également deux processus interconnectés. Les dommages au niveau de l'ADN accumulés dans certains tissus font partie des événements observés au cours du vieillissement et responsables de l'induction de la sénescence cellulaire (Moskalev et al., 2013).

De nombreuses études ont mis en évidence qu'au cours de la reprogrammation, la sénescence cellulaire était induite. Appelée RIS pour *Reprogramming Induced Senescence*

(Sénescence Induite par la Reprogrammation), ce processus intervient en limitant la formation d'hiPSCs. L'un des mécanismes démontré, est l'activation par les protéines p16, p15 et p19 codés par le locus INK4/ARF (Kawamura et al., 2009). Cette activation entraîne une réponse de dommages à l'ADN ou encore à la déméthylation de l'histone H3K36me2/3 également sous influence du locus INK4/ARF ce qui renforce l'entrée en sénescence des cellules au cours de la reprogrammation réduisant ainsi son efficacité (Banito et al., 2009 ; Esteban et al., 2010 ; Kawamura et al., 2009 ; Li et al., 2009 ; Marion et al., 2009; Wang et al., 2011). D'autres études pointent également le rôle de p53 où ils observent que l'inhibition de p53 permet d'augmenter l'efficacité de reprogrammation en bloquant les mécanismes anti-prolifératifs (Kawamura et al., 2009; Hong et al., 2009). Ils confirmaient alors l'impact de la sénescence comme une barrière au processus de reprogrammation (Mahmoudi and Brunet, 2012), ce qui soulevait alors la question d'une potentielle utilisation de cette technologie pour des patients âgés ou atteints d'une pathologie associée au vieillissement.

4.5 Le vieillissement et la reprogrammation :

Malgré le scepticisme initiale sur la possibilité d'appliquer cette technologie sur des cellules issues de donneurs âgés et/ou sénescentes, de nombreuses études ont permis d'établir la possibilité de générer des hiPSCs à partir des cellules (saines ou pathologiques) issus de donneurs âgés, centenaires et sénescentes grâce à des techniques plus robustes (Boulting et al., 2011; Lapasset et al., 2011; Kudva et al., 2012; Ohmine et al., 2012; Yagi et al., 2012; Israel et al., 2012; Kondo et al., 2013; Okita et al., 2013; Wen et al., 2013). Parmi ces études, les travaux que nous avons menés dans notre laboratoire ont apporté la première démonstration en proposant l'utilisation de 6 facteurs (OSKNL) qu'il était en effet possible de franchir la sénescence cellulaire et de pouvoir ainsi reprogrammer des cellules somatiques humaines de donneurs âgés en hiPSCs (Figure 23) (Lapasset et al., 2011). Aujourd'hui, l'ensemble des études s'accorde pour démontrer qu'il est aujourd'hui possible d'obtenir des hiPSCs à partir d'individus âgés et répondant aux critères de pluripotence. Il reste aujourd'hui à déterminer clairement le potentiel de différenciation de ces hiPSCs dans le cadre d'une étude comparative d'hiPSCs issues de patients âgés vs jeunes (Phanthong et al., 2013). Dans ce sens, dans notre laboratoire, nous avons en effet montré qu'en plus de cette capacité à effacer les marques du vieillissement par l'acquisition d'un état pluripotent, les hiPSCs redirigées en différenciation dans le lignage cellulaire équivalent aux cellules initiales et en comparaison à celles-ci, présentaient à différents niveaux un rajeunissement physiologique.

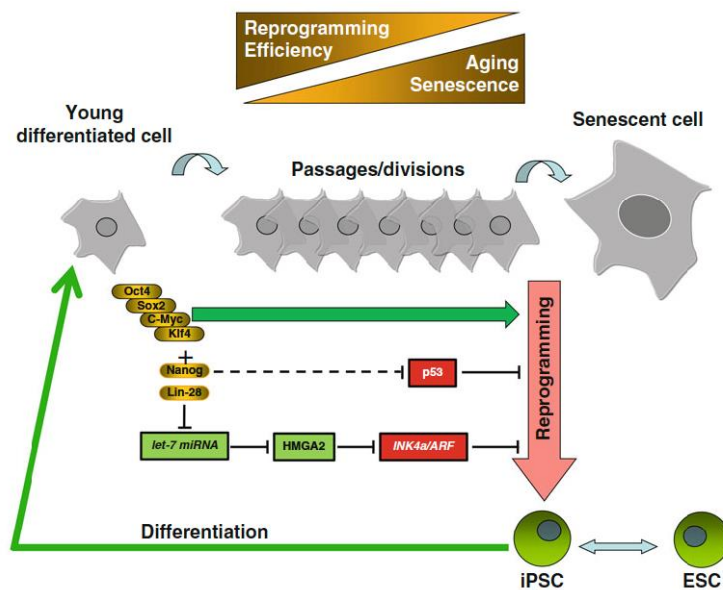


Figure 24 : Représentation schématique décrivant l'action des 6 facteurs sur la reprogrammation des cellules sénescents/âgées. L'efficacité de reprogrammation utilisant le cocktail de 4 facteurs proposé par Yamanaka S. et constitué de OSKM est décrit comme inversement proportionnel à l'âge des cellules et bloquées en sénescence. Cette inhibition est principalement due à l'action de la protéine p53 et du locus INK4a/ARF. L'expression additionnelle de NANOG au cocktail OSKM permet de contre-carrer l'action négative de p53 sur l'expression de NANOG. Le facteur Lin28 a également son importance car il va inhiber le locus INK4a/ARF via l'inhibition du μ ARN Let7. A ces effets, Nanog et Lin28 pourraient également avoir des effets directs en activant le programme de réplication.

5. Obtention d'hiPSCs et effacement des marques de vieillissement, et après ?:

A présent, dans le but de définir leur potentiel d'utilisation dans le cadre de la médecine régénérative appliquée au vieillissement, il est important de définir l'impact de l'environnement tissulaire « âgé » dans le cas d'une greffe de ces hiPSCs différenciées, et réciproquement. Cela permettrait de pouvoir affirmer si leur fonctionnalité après différenciation peut-être maintenu, ou encore de déterminer s'il existe une influence de l'environnement hôte vers un rajeunissement. C'est pourquoi, il est important de concentrer les efforts dans ce sens et continuer à développer de nouveaux modèles et de nouveaux protocoles de différenciation à partir de ces hiPSCs vers la formation d'un modèle tissulaire fonctionnel et de pouvoir en étudier les différents aspects cellulaires, tissulaires et sécrétoires. L'un des défis majeurs est d'établir des protocoles spécifiques de différenciation dirigée vers les multiples lignages cellulaires et de pouvoir les intégrer dans le cadre d'études sur le vieillissement. Aujourd'hui, les exemples d'études allant dans ce sens sont

nombreux et concernent l'ensemble des tissus de l'organisme. Pour exemple, différentes équipes ont tenté de développer des protocoles d'induction, de spécification et de différenciation des cellules souches embryonnaires humaines dans le lignage ectodermique puis épidermique (Aberdam et al., 2008 ; Dabelsteen et al., 2009; Green et al., 2003; Guenou et al., 2009; Iuchi et al., 2006; Kidwai et al., 2013; Metallo et al., 2010a).

Roop DR. et ses collaborateurs furent les premiers à dériver des cellules épithéliales à partir de cellules souches à pluripotence induite dans un modèle murin. Les cellules obtenues expriment les principaux marqueurs tels que p63 et la cytokératine 14. Ils montrèrent également que ces cellules présentent des caractéristiques de prolifération comparables aux kératinocytes normaux, et une capacité à générer un épiderme pluristratifié en culture organotypique (Bilousova et al., 2011). La même année, une démonstration similaire fut faite sur des cellules souches à pluripotence induite humaines par l'équipe de Christiano AM. et ses collaborateurs qui poussèrent l'étude en dérivant ces kératinocytes de cellules souches à pluripotence induite générées à partir de cellules de patients atteints d'une pathologie cutanée, l'épidermolyse bulleuse (Itoh et al., 2011). Sortant du cadre pathologique, l'équipe de Christiano AM. alla plus loin en montrant qu'il était possible de reconstituer une peau constituée d'un derme sécrétant du collagène VII et d'un épiderme, et ce totalement à partir de cellules souches à pluripotence induite (Itoh et al., 2013). Récemment, Ilic D. et ses collaborateurs, par une approche de reprogrammation sans intégration génique, ont obtenu des hiPSCs qu'ils différencièrent ensuite en kératinocytes aux caractéristiques moléculaires similaires à des kératinocytes adultes issus de biopsies. Ces kératinocytes dérivés sont capables de former un épiderme fonctionnel comparable à une peau normale notamment en raison de sa capacité à assurer son rôle de barrière protectrice (Petrova et al., 2014). Plus récemment, l'équipe du Dr Christiano s'est rapprochée un peu plus de la reconstruction d'une peau complète. Il s'agit du premier modèle de peau reconstruite complètement dérivé de cellules hiPSCS. Dans leur étude, ils parviennent à dériver leurs hiPSCS en 3 types cellulaires différents principalement retrouvés dans la peau : fibroblastes, kératinocytes, mélanocytes. Après avoir conduit ces hiPSCs en différenciation, ils ont ainsi développé un derme constitué de ces fibroblastes, reconstitué un épiderme grâce aux kératinocytes obtenus. Et enfin les mélanocytes issus de différenciation ont révélé qu'ils étaient capables de transférer leurs mélanosomes aux kératinocytes, et que ces derniers avaient la capacité de les intégrer en les phagocytant (Gledhill et al., 2015). Aussi, reprenant l'ensemble de ces travaux afin d'atteindre ces objectifs et dans le cadre de nos propres études, nous avons tenté de développer des protocoles de différenciation de

cellules hiPSCs en kératinocytes et de formation d'un épiderme en culture organotypique. Essentiellement basée sur des études développementales (Kawasaki et al., 2000; Metallo et al., 2008) et sur les caractéristiques kératinocytaires bien décrites (Blanpain and Fuchs, 2009; Simpson et al., 2011) toutes ces études montrent le potentiel de l'utilisation des cellules souches pluripotentes comme ressource biologique dans le cadre de protocoles de thérapie cellulaire cutanée mais également comme outil d'étude des mécanismes moléculaires tissulaires et/ou impliqués dans la formation de l'épiderme chez l'humain.

De plus, la possibilité d'établir des cellules pluripotentes à partir d'une multitude de types cellulaires différents, à partir de cellules prélevées de patients de tous âges et atteints éventuellement de pathologies donne en effet l'opportunité de mieux comprendre le développement humain, mais aussi de comprendre et modéliser de nouveaux mécanismes physiopathologiques, jusque-là inaccessibles.

OBJECTIF DE LA THESE :

De cette démonstration que les hiPSCs étaient capables d'être conduits vers des tissus issus des trois feuillets embryonnaires (mésoderme, endoderme, ectoderme), notre objectif a été tout d'abord de conduire ces cellules pluripotentes vers une différenciation terminale spécifique. Nous avons cultivés des cellules pluripotentes et les avons conduits vers la voie épithéliale ce qui nous a permis à terme d'obtenir en coculture avec des fibroblastes embryonnaires murins J2, des kératinocytes formant des colonies, et dont la morphologie est comparable à une culture de kératinocytes issus de biopsie.

Dans le but de caractériser ces kératinocytes, nous nous intéressons au potentiel clonogénique des kératinocytes obtenus, et à l'évaluation par immunofluorescence de l'expression de certains marqueurs tels que les kératines. Une culture en 3D en interface air/liquide permettrait au final de mettre en évidence la capacité de ces kératinocytes à générer un épiderme pluristratifié, et d'en analyser les caractéristiques de stratification, tant morphométrique que moléculaire.

De la même manière que cela a été fait au niveau cellulaire dans nos travaux antérieurs où nous avons mis en évidence un rajeunissement cellulaire, la mise au point d'un tel protocole de différenciation spécifique et à son extension vers la reconstruction d'un épiderme permettrait d'établir un lien entre sénescence, vieillissement et rajeunissement tissulaire en vue de mieux comprendre les mécanismes du vieillissement au sein d'un tissu voire à terme considérer la possibilité d'une application clinique.

Approches expérimentales

&

Résultats

Approches expérimentales & Résultats

Dans cette partie “Approches expérimentales et résultats”, deux projets vous sont présentés.

Le premier projet est présenté sous forme d’un article intitulé “*Rejuvenating senescent and centenarian human cells by reprogramming through the pluripotent state*” (Lapasset et al. 2011). Ce projet est décrit sous forme d’un résumé reprenant l’ensemble du travail qui a pu être effectué. Les approches expérimentales à proprement parler sont décrites dans l’article ainsi que dans les annexes associés et insérés en fin de manuscrit. Ce travail auquel j’ai pu contribuer notamment au niveau de la culture, de la sélection des hiPSCs et de la préparation des échantillons pour différentes analyses, constitue le point de départ du 2nd projet.

Ce 2nd projet correspond à mon projet de thèse et va s’appuyer sur la démonstration d’un rajeunissement cellulaire décrit dans l’article, et sur les différentes lignées d’hiPSCs caractérisées. L’objectif étant d’observer si l’utilisation de ces lignées hiPSCs issus de donneurs âgés, permet dans le cadre d’une reconstruction tissulaire *in vitro*, d’observer un rajeunissement tissulaire tel que nous avons pu l’observer au niveau cellulaire dans le précédent projet. Ce projet n’a pas fait l’objet d’un article publié ou en cours de publication, sera alors présenté ici de manière plus détaillée pour les différentes approches expérimentales ainsi que pour les résultats observés.

Projet N°1 : résumé de l'article Lapasset et al. 2011.

Rejuvenating senescent and centenarian human cells by reprogramming through the pluripotent state

Lapasset, L., Milhavet, O., Prieur, A., Besnard, E., Babled, A., Aït-Hamou, N., Leschik, J., Pellestor, F., Ramirez, JM., De Vos, J., Lehmann, S., Jean-Marc Lemaitre.

Alors que la sénescence était décrite comme une barrière à la reprogrammation cellulaire, nos travaux apportent la démonstration qu'il est possible de franchir cette barrière en combinant les facteurs proposés par Yamanaka et Thomson respectivement. La combinaison de ces deux groupes de gènes comprenant alors *OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *c-MYC*, *NANOG*, *LIN28* (OSKMNL). Cette combinaison nous a permis d'observer une augmentation dans l'efficacité de reprogrammation en permettant d'obtenir des hiPSCs à partir de cellules sénescents et de donneurs âgés. Avec cette combinaison, nous avons pu en effet montrer qu'il était possible de générer des hiPSCs à partir de cellules issues de biopsies de donneurs jeunes et âgés de 74 ans, 92 ans, 94 ans, 96 ans jusqu'à 101 ans, à l'état prolifératif ou conduit en sénescence. Les cellules hiPSCs produites n'étaient alors pas distinguables des cellules souches pluripotentes embryonnaires humaines (hESCs). Nous en effet pu observer que les hiPSCs formées exprimées de manière comparables aux hESCs, les facteurs endogènes de la pluripotence (NANOG, OCT-4 et SOX2) ainsi que les marqueurs de surface SSEA-4 et TRA 1-60 associés à la pluripotence. L'analyse du profil de méthylation des promoteurs des gènes codant pour les facteurs associés à la pluripotence a permis d'observer une déméthylation des promoteurs d'OCT4 et de NANOG confirmant l'expression des gènes endogènes. La démonstration que ces cellules hiPSCs étaient capables de former les 3 feuillets embryonnaires comme les hESCs a pu être déterminée par différenciation directe *in vitro* ainsi qu'*in vivo* par la formation de tératomes. L'analyse caryotypique nous a permis de conclure qu'en plus d'avoir pu générer des hiPSCs au profil transcriptomique et génique similaires aux hESCs, qu'aucune aberration chromosomique n'a été intégrée au cours de la génération de ces cellules. En plus de la caractérisation de l'état pluripotent des cellules obtenues, il a été également mis en évidence au cours d'une différenciation dirigée en fibroblastes, que les cellules avaient effacées les marques initiales du vieillissement cellulaire, et présentaient un profil d'expression génique, un métabolisme mitochondrial, une longueur de télomères restaurée, comparables à celle de fibroblastes juvéniles, issues de cellules souches pluripotentes embryonnaires humaines.



Rejuvenating senescent and centenarian human cells by reprogramming through the pluripotent state

Laure Lapasset, Ollivier Milhabet, Alexandre Prieur, et al.

Genes Dev. 2011 25: 2248-2253

Access the most recent version at doi:[10.1101/gad.173922.111](https://doi.org/10.1101/gad.173922.111)

Supplemental Material

<http://genesdev.cshlp.org/content/suppl/2011/11/04/25.21.2248.DC1.html>

References

This article cites 31 articles, 4 of which can be accessed free at:
<http://genesdev.cshlp.org/content/25/21/2248.full.html#ref-list-1>

Email alerting service

Receive free email alerts when new articles cite this article - sign up in the box at the top right corner of the article or [click here](#)

To subscribe to *Genes & Development* go to:
<http://genesdev.cshlp.org/subscriptions>

RESEARCH COMMUNICATION

Rejuvenating senescent and centenarian human cells by reprogramming through the pluripotent state

Laure Lapasset,¹ Ollivier Milhavel,^{2,5}
 Alexandre Prieur,¹ Emilie Besnard,¹
 Amelie Babled,¹ Nafissa Ait-Hamou,¹
 Julia Leschik,¹ Franck Pellestor,³
 Jean-Marie Ramirez,⁴ John De Vos,⁴
 Sylvain Lehmann,² and Jean-Marc Lemaître^{1,6}

¹Laboratory of Plasticity of the Genome and Aging, Institute of Functional Genomics, 34094 Montpellier Cedex 05, France; ²Laboratory of Neurological Disorders and Stem Cells, Institute of Human Genetics, 34396 Montpellier Cedex 05, France; ³Laboratory of Chromosomal Genetics, Medical Genetics Department, Hôpital CHRU Arnaud de Villeneuve, 34295 Montpellier Cedex 5, France; ⁴Laboratory of Early Embryo Development and Human Pluripotent Stem Cells, Institute for Research in Biotherapy, CHU Saint-Eloi Hospital, 34295 Montpellier Cedex 05, France

Direct reprogramming of somatic cells into induced pluripotent stem cells (iPSCs) provides a unique opportunity to derive patient-specific stem cells with potential applications in tissue replacement therapies and without the ethical concerns of human embryonic stem cells (hESCs). However, cellular senescence, which contributes to aging and restricted longevity, has been described as a barrier to the derivation of iPSCs. Here we demonstrate, using an optimized protocol, that cellular senescence is not a limit to reprogramming and that age-related cellular physiology is reversible. Thus, we show that our iPSCs generated from senescent and centenarian cells have reset telomere size, gene expression profiles, oxidative stress, and mitochondrial metabolism, and are indistinguishable from hESCs. Finally, we show that senescent and centenarian-derived pluripotent stem cells are able to redifferentiate into fully rejuvenated cells. These results provide new insights into iPSC technology and pave the way for regenerative medicine for aged patients.

Supplemental material is available for this article.

Received July 7, 2011; revised version accepted September 21, 2011.

The recent discovery of induced pluripotent stem cells (iPSCs) by Yamanaka's group (Takahashi et al. 2007) and rapid progress in this technology have opened up a new

avenue in autologous regenerative medicine whereby patient-specific pluripotent cells could potentially be derived from adult cells. iPSCs have been reproducibly obtained in different cell types by forced expression of the OCT4, SOX2, KLF4, and c-MYC (Takahashi et al. 2007) transcription factor cocktail (OSKM) or by an alternative combination of four factors (OSNL), substituting KLF4 and c-MYC with NANOG and LIN28 (Yu et al. 2007). However, the reprogramming into iPSCs still suffers from several hurdles that have to be overcome for their practical application (Hanna et al. 2010). Among them, cellular senescence increasing with the age was thought to be a critical issue. Senescence is linked to physiological aging, and is characterized by an irreversible cell cycle arrest in response to various forms of stress, including activation of oncogenes, shortened telomeres (replicative senescence), DNA damage, oxidative stress, and mitochondrial dysfunction (Campisi and d'Adda di Fagagna 2007). A common feature is the activation of the p53/p21^{CIP1} and p16^{INK4A}/pRb pathways, alteration of cell morphology and metabolism, increase in senescence-associated β -galactosidase (SA- β -Gal) activity, and formation of senescence-associated heterochromatic foci (SAHF) (Narita et al. 2003).

It has been reported by several groups that cellular senescence is a barrier to reprogramming due to up-regulation of p53, p16^{INK4A}, and p21^{CIP1}, which are also induced by some of the iPSC reprogramming factors (Banito et al. 2009; Kawamura et al. 2009; Li et al. 2009; Marion et al. 2009a; Utikal et al. 2009). This suggested that cellular aging might be an important limitation for the derivation of iPSCs for therapeutic purposes from elderly individuals. Here we demonstrate that a specific six-factor gene cocktail causes efficient reversing of cellular senescence and reprogramming into iPSCs and that reprogrammed iPSCs generated from senescent and centenarian fibroblasts are indistinguishable from human embryonic stem cells (hESCs). Finally, we demonstrate that redifferentiation led to rejuvenated cells with a reset cellular physiology, defining a new paradigm for cell rejuvenation.

Results and Discussion

Efficient iPSC generation from senescent fibroblasts using a six-factor gene cocktail

Because iPSC generation from senescent cells was only assayed using the initial gene set OSKM, we decided to investigate the effect of a six-factor combination containing NANOG and LIN28 in addition. Thus, proliferative human diploid fibroblasts from a 74-yr-old donor, which had undergone 12 population doublings (PDs) in culture after the biopsy (hereafter 74P), were induced into replicative senescence by serial passaging (hereafter 74S). Senescence was reached after an additional 39 PDs (51 PDs total) and assessed by FACS analysis, showing a permanent cell cycle arrest (Supplemental Fig. 1A,B), increase in SA- β -Gal activity, up-regulation of p16^{INK4A} and p21^{CIP1}, and formation of SAHF (Fig. 1A, panel 1; Supplemental Fig. 1C,D). These senescent cells were also maintained for >2 mo in culture without any detectable increase in the cell number. Next, 74P and 74S cells were infected with a mix of the individual lentiviruses carrying each of the six genes

[**Keywords:** senescence; aging; reprogramming; iPSC; rejuvenation]

⁵Present address: Laboratory of Plasticity of the Genome and Aging, Institute of Functional Genomics, 141 Rue de la Cardonille, 34094 Montpellier Cedex 05, France.

⁶Corresponding author.

E-mail jean-marc.lemaitre@igf.cnrs.fr.

Article is online at <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.173922.111>.

to further enhance the efficiency of iPSC generation (Liao et al. 2008). One week after infection, we observed first the disappearance of SAHFs in 74S senescent-infected cells (Fig. 1A, panel 1), and then a restored proliferation after 18–20 d. Colonies resembling hESCs appeared at 35–40 d post-infection (Fig. 1A, panel 2), with a mean reprogramming efficiency of 0.06%, similar to 74P infected under the same conditions (Supplemental Fig. 2). We randomly selected six iPSC colonies from proliferative (iPSC 74P) and senescent (iPSC 74S) fibroblasts and further characterized three clones, which were successfully maintained in culture during >35 passages on either hESC feeders or in feeder-free culture conditions. The continued presence of stem cell surface markers SSEA-4 and TRA-1-60 (Fig. 1B), as well as reexpression of endogenous *OCT4*, *SOX2*, *NANOG*, and *REX1* pluripotent marker genes, compared with the parental fibroblasts and with H1 and H9 hESCs and IMR90 TH 4 iPSCs (Yu et al. 2007) used as

pluripotent control cell lines (Fig. 1C), assessed the successful reprogramming. Reactivation of endogenous pluripotency genes in either iPSCs from senescent (iPSC 74S Cl F) or proliferative (iPSC 74P Cl H) cells was also confirmed by DNA demethylation in previously described CpG-rich regions of the *OCT4* and *NANOG* promoters highly methylated in fibroblasts (Fig. 1D). To exclude any cell type-specific effects, we repeated the same protocol using the human embryonic fibroblast IMR90 induced into replicative senescence, and we also achieved efficient reprogramming from senescent (IMR90S) or proliferative (IMR90P) fibroblasts with the six-factor gene cocktail (Supplemental Fig. 3).

Next we assessed the pluripotent state of the derived iPSCs by evaluating their capacity to differentiate into the three embryonic lineages. All iPSCs clones generated from 74S or 74P were able to differentiate efficiently into endoderm, ectoderm, and mesoderm, as shown by immunodetection of SMA, MAP2, and FOXA2 proteins, respectively (Fig. 1E). We obtained similar results with proliferative and senescent IMR90 (data not shown).

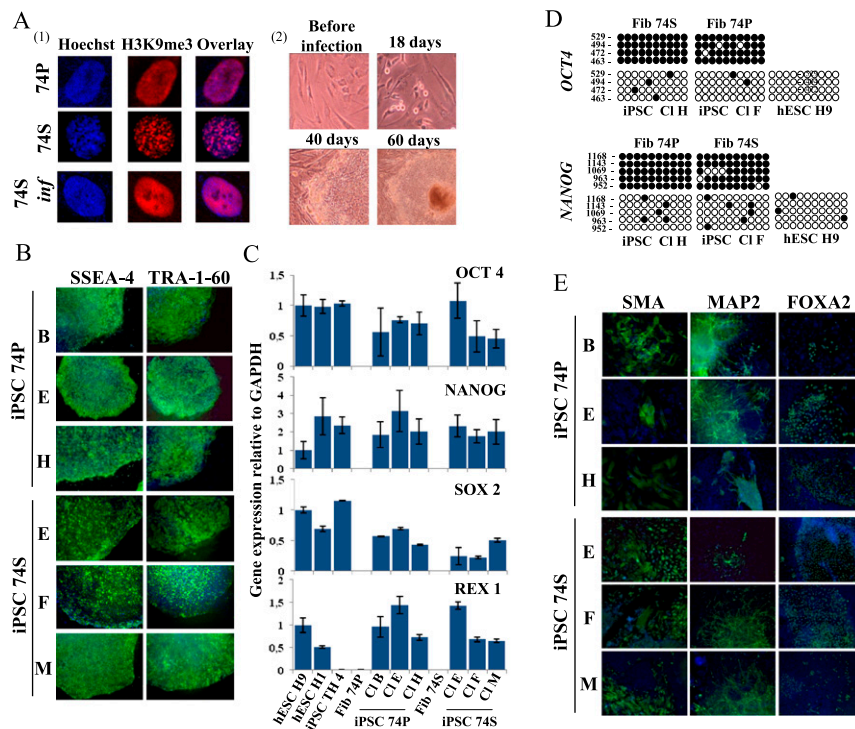


Figure 1. Induction of pluripotency in proliferative and senescent 74-yr-old-derived cells. (A, panel 1) Detection of SAHF by indirect immunofluorescence of H3K9me3 (red) and Hoechst (blue) in proliferative (74P), senescent (74S), and transduced senescent 74-yr-old cells (74S inf) by the six factors. Seven days after transduction, no SAHF were detected. (Panel 2) Eighteen days after transduction, proliferation of infected 74S cells was observed (74S inf). Around day 40, distinct colonies were observed. Representative phase-contrast images are shown. (B) Immunodetection of surface markers TRA-1-60 and SSEA-4 on iPSCs colonies derived from 74S- and 74P-year-old cells (three independent clones). (C) Quantitative RT-PCR of expression levels for endogenous pluripotency factors in the iPSCs from 74P and 74S and their parental fibroblasts. H1 and H9 hESCs and iPSC TH 4 were used as controls. Transcript levels were normalized to GAPDH expression. Error bars indicate standard deviations from duplicate experiments. (D) Bisulfite sequencing analysis of *OCT4* and *NANOG* promoter regions showing demethylation in iPSCs from 74P and 74S, as in H9 hESCs, compared with parental fibroblasts. Each column of circles for a given amplicon represents the methylation status of CpG dinucleotides in one clone for that region. Open circles are unmethylated CpGs and closed circles methylated ones. The left numbers of each column indicate CpG localization relative to the transcriptional start site. (E) In vitro differentiation experiments of iPSCs reveal their potential to generate cell derivatives of all three primary germ cell layers. Immunodetection of SMA, MAP2, and FOXA2 markers specific for endoderm, ectoderm, and mesoderm, respectively. Nuclei are stained with Hoechst (blue). Three independent clones are shown.

Six-factor but not four-factor combination allows iPSC generation from senescent fibroblasts

NANOG overexpression has been described to facilitate reprogramming in a predominantly cell division rate-independent manner, and LIN28 overexpression, similar to inhibition of the p53/p21^{CIP1} pathway, increased the cell division rate, resulting in accelerated kinetics of iPSC production (Hanna et al. 2009; Yu et al. 2009). This suggested that the addition of the combination of NANOG and LIN28 might be essential for generating iPSCs from senescent cells. So, we decided to use first the other described combination, OSNL (Yu et al. 2007), on senescent cells, but after 40 d, we did not observe restarted proliferation or formation of hESCs resembling colonies when compared with proliferative cells. Additional treatments (VPA, 5-aza-dC, Wnt3A, or BIO) previously described to enhance the reprogramming efficiency (Feng et al. 2009) also failed to induce iPSCs, as confirmed by the absence of detectable expression of endogenous pluripotency genes in the infected cell population (Supplemental Fig. 4). These results demonstrate that the OSNL combination is not able to reverse the replicative senescence state to generate iPSCs, as also previously described for the OSKM combination.

Altogether, these results indicate that the combination of the six transcription factors (OSKMNL) is a key determinant for a successful and efficient reprogramming reversing cellular senescence to derive iPSCs, without any direct suppression of senescence effectors contributing as safeguards of the genome.

Generation of iPSCs from centenarian fibroblasts using the six-factor combination

The number of senescent cells increases in the human body during aging, and this is thought to impair tissue homeostasis (Campisi 2011). Increased expression of p16^{INK4A} and p21^{CIP1} also occurs in cells from aged donors; this correlates with decreased proliferation capacity and an increased ability to activate cell-intrinsic programs such as senescence and might impair their ability to be reprogrammed. To explore whether it might be a limitation, we investigated the possibility of deriving iPSCs for clinical purposes from very old humans on fibroblasts of extremely aged 92-, 94-, 96-, and 101-yr-old donors using our six-factor cocktail. We successfully derived iPSCs from all of the aged donor fibroblasts with efficiency similar to those obtained with senescent fibroblasts. All iPSC clones generated repressed endogenous pluripotency genes *OCT4*, *SOX2*, *NANOG*, and *REX1* (Fig. 2A); underwent demethylation of CpG in the *OCT4* and *NANOG* promoter regions (Supplemental Fig. 5); and re-expressed the pluripotency cell surface markers SSEA-4 and TRA-1-60 (Fig. 2B; Supplemental Fig. 6A). Finally, we demonstrated the capacity of iPSCs from very old donors to differentiate into the three embryonic lineages as shown previously (Fig. 2C; Supplemental Fig. 6B). These results demonstrate that our procedure efficiently reinstates self-renewal capacity and pluripotency from centenarian fibroblasts, and thus that cellular aging is definitely not a barrier to reprogramming.

iPSCs generated from senescent and centenarian cells with the six-factor-based strategy did not retain marks of cellular aging

Next we sought to investigate whether iPSCs derived from senescent fibroblasts and aged donors had main-

tained or lost their aged characteristics. Assuming that increased p16^{INK4A} and p21^{CIP1} levels are common hallmarks of senescence and aging, we first showed that all iPSCs generated from replicative senescent or proliferative fibroblasts from old donors exhibited down-regulated expression of these proteins, similar to hESC lines (Fig. 3A; Supplemental Fig. 7A,B).

Resetting telomere function

In humans, progressive telomere shortening is thought to be one of the mechanisms underlying organism aging (Sahin and Depinho 2010). Initial studies of telomere dynamics during reprogramming into iPSCs in mice demonstrated global lengthening of telomeres compared with parental fibroblasts, but also that telomere shortening represents a potent barrier for iPSC generation in engineered telomerase-deficient cells (Marion et al. 2009b). In the case of human cells, there are contradictory reports on the efficiency of telomere lengthening and its maintenance in long-term growth of iPSCs and in their attrition rate in redifferentiation experiments, and contradictory evidence has been amassed previously by the strategy of nuclear transfer for animal cloning (Shiels et al. 1999; Lanza et al. 2000; Alexander et al. 2007), definitely not applicable to humans. Although iPSCs created by current protocols generally exhibit an initial increased telomere size compared with the parental differentiated cells, prematurely aged (shortened) telomeres appear to be a common feature of these iPSCs and their cell progeny (Suhr et al. 2009; Feng et al. 2010; Vaziri et al. 2010).

We measured the telomere length of iPSCs generated from 74S or 74P and found an increased mean size when compared with H9 hESCs (Fig. 3B). Similarly, telomere length was increased in iPSCs derived from senescent or proliferative IMR90 after reprogramming (Supplemental Fig. 8A), like telomeres from centenarians (Supplemental Fig. 8B). Moreover, we were able to maintain all iPSC lines for >110 PDs without either any decrease in telomere length or loss of self-renewal and pluripotency properties, as with H9 hESCs. Interestingly, in some iPSC clones, telomeres were even longer than in H9 hESCs (Supplemental Fig. 9), suggesting possible additional improvements in iPSC generation with OSKMNL for increased proliferation capacity of redifferentiated cells. Collectively, these data demonstrate that our reprogramming protocol leads to erasure of the common marks of senescence and aging in the generated iPSCs, suggesting that it might be especially well suited clinically for deriving stem cells from aged donors.

To further investigate the ability of our six-factor-based reprogramming strategy to erase cellular marks of aging, we analyzed three iPSC clones in detail (iPSC 74P Cl H, iPSC 74S Cl F, and iPSC 96 Cl 1). First, we demonstrated that these clones, whose identities were confirmed by DNA fingerprinting analyses (Supplemental Table 1), exhibited perfectly normal karyotypes (Supplemental Fig. 10). Then, we showed that they acquired the capacity to progress into terminal differentiation, forming organized organ-like structures characteristic of the three embryonic lineages in teratoma (Supplemental Fig. 11), and that the six transgenes used for reprogramming were almost completely down-regulated (Supplemental Fig. 12).

Then, we performed transcriptome analysis of the three iPSCs and their parental counterparts, compared them with an iPSC IMR90 generated with six factors (iPSC IMR90P Cl C) from proliferative IMR90 fibroblasts

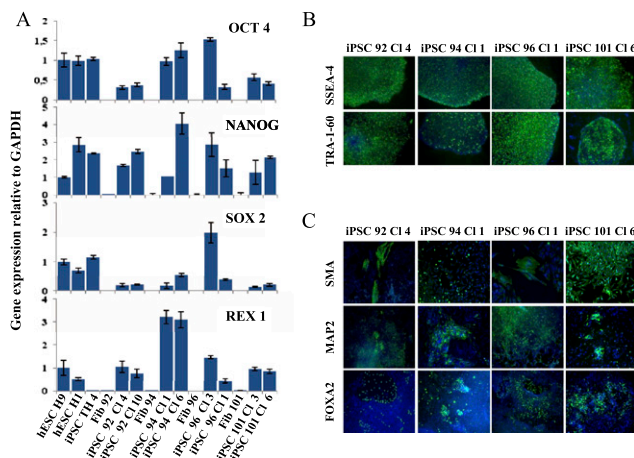


Figure 2. Induction of pluripotency in centenarian-derived cells. (A) Quantitative RT-PCR of expression levels of endogenous pluripotency factors in the indicated donor fibroblasts and iPSC lines. H1 and H9 hESCs as well as iPSC IMR90 TH Cl 4 cells were used as control. Transcript levels were normalized to GAPDH expression. Error bars indicate standard deviations from duplicate experiments. (B) Immunodetection of pluripotent cell surface markers TRA-1-60 and SSEA-4 on derived iPSC colonies. (C) In vitro differentiation ability of iPSCs in the three primary germ cell layers revealed by immunodetection of SMA, MAP2, FOXA2 markers specific for endoderm, ectoderm, and mesoderm, respectively. Hoechst labeling was used for nuclear staining (blue).

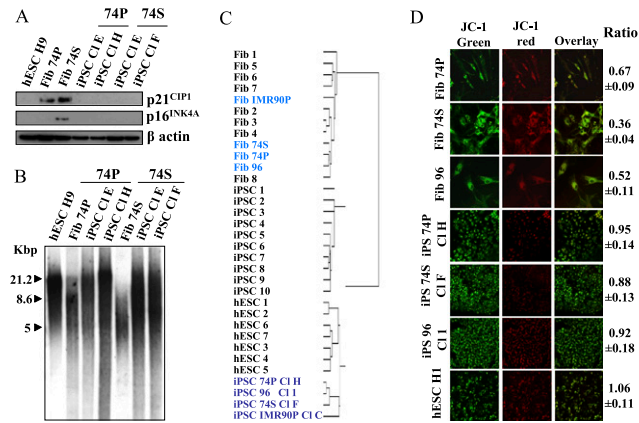


Figure 3. Disappearance of senescence markers in senescent cell-derived iPSCs. (A) Decrease of p21^{CIP1} and p16^{INK4A} protein level in iPSCs generated from 74P and 74S cells compared with parental fibroblasts and H9 hESCs, analyzed by Western blotting. β -Actin was used as a loading control. (B) TRF analysis of iPSC clones generated from 74P and 74S cells compared with their parental fibroblasts and H9 hESCs; TRF length is in kilobases (kb). (C) Nonsupervised hierarchical clustering of the global gene expression profiles in fibroblasts, iPSCs, hESCs, and 74- and 96-yr-old fibroblasts and their corresponding iPSCs. (D) Reprogramming of mitochondrial function in iPSCs derived from 74P and 74S and aged 96 cells compared with H1 hESCs, analyzed by JC-1 red/green fluorescence ratio measured by FACS. Red fluorescence indicates a normal membrane potential and green fluorescence indicates a membrane depolarization. A decreasing ratio measures the extent of mitochondrial dysfunction. Experiments were performed in triplicate (\pm SD for standard deviation).

(Fib IMR90P), and a built set of publicly available data for hESCs and iPSCs generated with four factors from different laboratories (Supplemental Table 2; Assou et al. 2007). We first confirmed that the specific pluripotency genes were expressed in our iPSCs at a level similar to hESCs and iPSCs (Supplemental Fig. 13; Guenther et al. 2010) and then performed a nonsupervised hierarchical clustering. Strikingly, gene expression profiles of proliferative and senescent aged fibroblasts clustered together compared with embryonic and postnatal fibroblasts, indicating that they share a general common aging signature, and our derived iPSCs (obtained using six factors) clustered with hESCs and separated them from previously described iPSCs derived with only four factors (Fig. 3C; Supplemental Fig. 14). Furthermore, selected genes involved in telomere metabolism and maintenance (Vaziri et al. 2010) were similarly reset in our iPSCs, which clustered with hESCs and not with iPSCs generated by four factors (Supplemental Fig. 15). Finally, we found that those iPSCs expressed higher levels of telomerase transcripts compared with hESCs (Supplemental Fig. 16) as well as longer telomeres measured by FISH (Supplemental Fig. 17), demonstrating that our six-factor-based strategy was more efficient for telomere resetting.

Resetting mitochondria metabolism

Since oxidative stress and mitochondrial dysfunction are well described common features of senescence and aging (Passos et al. 2007; Moiseeva et al. 2009), we wondered whether these functions were also specifically reprogrammed from senescent and aged cells to acquire the anaerobic-like metabolism observed in hESCs. Clustering

of transcriptomes using a specific subset of genes previously described as involved in these regulatory pathways (Armstrong et al. 2010; Prigione et al. 2010) confirmed that our iPSCs have reset these functions to an embryonic-like state (Supplemental Fig. 18). The overall mitochondrial activity was measured by evaluating the ($\Delta\Psi$ m) *trans*-membrane potential calculated by the fluorescence intensity ratio of the JC-1 dye with confocal microscopy and flow cytometry analysis. As previously shown, the red/green ratio decreases in fibroblasts with senescence and aging (Fig. 3D; Passos et al. 2007; Moiseeva et al. 2009). Strikingly, we found an increased membrane potential in iPSCs to a level similar to that in hESCs, confirming the reprogramming of the altered mitochondrial activity from old and senescent fibroblasts to an hESC-like metabolism. Similar results were obtained with iPSCs from IMR90P and IMR90S (Supplemental Fig. 19). Furthermore, we did not observe differences in the reset number, distribution, or morphology of mitochondria in iPSCs when compared with hESCs (Supplemental Figs. 20, 21). Analysis of mitochondrial properties in iPSCs illustrates how nuclear reprogramming in resetting gene expression programs to pluripotency might also reprogram cellular organelle function.

Collectively, our results indicate that senescent and aged cellular physiology is not a barrier to reprogramming and that our six-factor-based reprogramming strategy generates iPSCs indistinguishable from hESCs with some optimized properties.

Reprogramming senescent and centenarian fibroblasts with a six-factor-based strategy leads to redifferentiated cells with rejuvenated physiology

The last important and as-yet-unanswered question is whether reprogramming through pluripotency from senescent cells and cells from very aged patients allows the production of young redifferentiated cells.

First, we demonstrated that fibroblasts derived from 74P, 74S, and 96 iPSCs did not enter prematurely into senescence, contrary to previous results for redifferentiated iPSCs generated from different healthy proliferating cells or from premature aging syndromes (Feng et al. 2010; Liu et al. 2011). Indeed, our iPSCs had no SA- β -Gal activity after 10 PDs (Fig. 4A, top panel) and proliferated at a rate equivalent to young proliferative fibroblasts. To exclude the possibility that our reprogramming strategy was associated with any mutations in the senescence induction pathways, we demonstrated the ability of redifferentiated fibroblasts to finally re-enter in replicative senescence after extensive culture, as shown by increased SA- β -Gal activity associated with cell cycle arrest (Fig. 4A, bottom panel); the reincreased expression of p16^{INK4A} and p21^{CIP1} (Fig. 4B); and a reshortened telomere size (Supplemental Fig. 22). But importantly, the number of PDs to reach replicative senescence arrest has been increased after reprogramming through the pluripotent state. Indeed, the 74P parental fibroblasts were infected at PD 12, which without infection would last only a further 39 PDs before replicative senescence led to an iPSC 74P Cl H, which reached replicative senescence after 63 PDs when redifferentiated into fibroblasts, gaining >50% of additional proliferation capacity compared with their parental fibroblasts. Similarly, iPSC 74S Cl F produced from senescent 74S fibroblasts, which had totally exhausted their replicative life span, reentered into replicative senescence after 60

Lapasset et al.

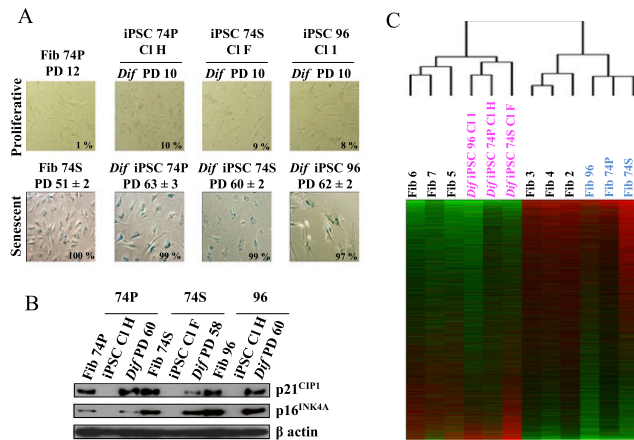


Figure 4. Rejuvenated features of fibroblasts redifferentiated from iPSCs generated from senescent and aged fibroblasts with a six-factor-based reprogramming strategy. (A) SA-β-gal staining of proliferative (PD 10) and replicative senescence (PD 60–63) fibroblasts redifferentiated from iPSCs (PD 90). The percentage of positive cells is indicated in the *inset*. Experiments were performed in triplicate (\pm SD for standard deviation). (B) Restoration of p21^{CIP1} and p16^{INK4A} protein expression in iPSC-derived fibroblasts is triggered during replicative senescence. Western blot analysis using β -actin as the loading control. (C) Nonsupervised hierarchical clustering with gene expression profiles of iPSCs redifferentiated into fibroblasts compared with their 74P-, 74S-, and 96-yr-old parental fibroblasts, postnatal fibroblasts, and embryonic fibroblasts differentiated from H1 hESCs.

PDs when redifferentiated into fibroblasts. A similar resetting of proliferation capacity was observed in the aged 96 parental fibroblasts initially close to replicative senescence. This demonstrates a rejuvenated proliferation potential of aged and senescent cells induced by our six-factor-based strategy.

In addition to short telomeres, senescent or aged cells closely share profound and numerous transcriptional modifications indicative of their cellular aging, with major impacts on their physiology. To confirm and assess rejuvenation of the global cellular physiology, we analyzed their transcriptomes, and this showed that the global gene expression profiles of redifferentiated fibroblasts from 74P, 74S, and 96 iPSCs actually cluster with young proliferative embryonic fibroblasts derived from the H1 hESCs, whereas their parental counterparts share a common aging signature, separating them from postnatal fibroblasts (Fig. 4C). This result was also confirmed by gene expression profile clustering of genes associated with oxidative stress (Supplemental Fig. 23) and mitochondrial activity (Supplemental Table 3). These results thus demonstrate a rejuvenated physiology of senescent and aged cells after the six-factor-based reprogramming through the pluripotent state.

Taken together, our results show that it is possible, using an adequate reprogramming strategy, to efficiently reprogram senescent cells and cells derived from very old individuals into iPSCs and that cellular senescence and aging are not barriers to reprogramming toward pluripotency. Crucially, we also demonstrated for the first time that, when redifferentiated back into fibroblasts, our cells have rejuvenated extended life spans and characteristics of young proliferative embryonic fibroblasts; thus, these cells have been completely rid of their former aged cellular phenotype. Our demonstration of the reversibility of major aspects of the cellular aging physiology provides a totally

unexpected insight into the perceived importance of epigenetic modifications in aging and provides a new paradigm for cell rejuvenation.

Because iPSCs can bypass the ethical concerns related to hESC derivation and potential issues of allogeneic rejection, an evident ultimate goal for iPSC research is their use for therapy, as they may represent an ideal source of immune system-tolerated adult cells for future clinical applications. In this context, we believe that our six-factor-based reprogramming, in reversing the aged altered cellular physiology, may constitute an optimal strategy for developing cell-based therapies for aged patients.

Materials and methods

SA-β-Gal

SA-β-Gal activity was detected as previously described (Matsuura et al. 2007).

Generation of human iPSCs

iPSCs were generated using lentiviral vectors containing cDNAs of human *OCT4*, *SOX2*, *NANOG*, *LIN28*, *KLF4*, and *C-MYC* genes in pSin vectors, as described (Takahashi et al. 2007; Yu et al. 2007).

In vitro differentiation assays

Embryoid bodies were generated from iPSCs as previously described, plated onto gelatin-coated tissue culture dishes, and grown for an additional 2 wk into the differentiating medium. For differentiation into fibroblast-like cells from iPSCs, they were cultured in differentiating conditions for 1 wk, selected, and subcultured according to regular fibroblast cell culture protocols.

Teratoma formation assay

For teratoma formation assays, undifferentiated cells were injected into rear leg muscles of NOD/SCID mice. Tumors were resected 2–4 mo after injection and fixed before paraffin embedding. Sections were subjected to hematoxylin and eosin staining before analysis under microscope.

Karyotypes

At least 25 metaphases were analyzed for each cell line using a conventional microscope and IKAROS software (Metasystems).

Bisulphite sequencing

Genomic DNA was treated with EZ-DNA Methylation kit (Zymo Research). The promoter regions of the human *Oct3/4* and *Nanog* genes were amplified by PCR and subcloned into pGEM-T easy vector system (Promega). Ten random clones were picked and checked by sequencing.

Microarray analysis

Total RNA from each sample was prepared, and hybridization with Affymetrix HG-U133 Plus 2.00 GeneChip was performed according to the manufacturer's protocol. Microarrays were processed in the Microarray Core Facility of the Institute for Research in Biotherapy of Montpellier (<http://irb.chu-montpellier.fr>). A gene expression profile of each cell line was established using the Cluster and TreeView programs.

Mitochondrial membrane potential

Mitochondrial membrane potential was measured with the JC-1 dye (Molecular Probes/Invitrogen).

Telomere length analysis

Telomere length analysis was measured using TeloTAGGG telomere length kit (Roche).

Acknowledgments

We thank Dr. M. Coué, Dr. C. Pfarr, Dr. D. Fisher, and Dr. J. Venables for critical reading and comments of the manuscript. We thank Dr. F. Moreau-Gaudry (University Bordeaux II) for subcloning c-Myc and Klf4 in pSin vectors. We also thank Dr. O. Feraud from the Stem Cell Core Facility of Villejuif for advice, technical assistance, and teratoma formation, and Dr. C. Crozet for gifts of MEF feeder. We also thank Q. Bai for help in transcriptome data analysis, and Dr. C. Cazevielle and C. Sanchez for technical assistance and interpreting of the ME ultrastructural data. Affymetrix microarrays were processed in IRB the Core Facility, CHRU-INSERM-UMI Montpellier. We acknowledge Montpellier RIO Imaging (MRI) for the imaging analysis and FACS facility. This work was supported by an AVENIR INSERM Program/INCa (Convention 2007/3D1616/InsermAvenir-22-1/NG-NC), la Fondation pour la Recherche Médicale (FRM: projet DCR20091217183), l'Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC) for the Lemaitre Laboratory, and by grants from the Région Languedoc-Roussillon (Chercheur d'Avenir 09-13198 01) and the Agence Nationale de la Recherche (ANR-07-BLAN-0076-01) for the DeVos Laboratory.

References

- Alexander B, Coppola G, Perrault SD, Peura TT, Betts DH, King WA. 2007. Telomere length status of somatic cell sheep clones and their offspring. *Mol Reprod Dev* **74**: 1525–1537.
- Armstrong L, Tilgner K, Saretzki G, Atkinson SP, Stojkovic M, Moreno R, Przyborski S, Lako M. 2010. Human induced pluripotent stem cell lines show stress defense mechanisms and mitochondrial regulation similar to those of human embryonic stem cells. *Stem Cells* **28**: 661–673.
- Assou S, Le Carrouer T, Tondeur S, Strom S, Gabelle A, Marty S, Nadal L, Pantesco V, Reme T, Hugnot JP, et al. 2007. A meta-analysis of human embryonic stem cells transcriptome integrated into a web-based expression atlas. *Stem Cells* **25**: 961–973.
- Banito A, Rashid ST, Acosta JC, Li S, Pereira CF, Geti I, Pinho S, Silva JC, Azuara V, Walsh M, et al. 2009. Senescence impairs successful reprogramming to pluripotent stem cells. *Genes Dev* **23**: 2134–2139.
- Campisi J. 2011. Cellular senescence: putting the paradoxes in perspective. *Curr Opin Genet Dev* **21**: 107–112.
- Campisi J, d'Adda di Fagagna F. 2007. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 729–740.
- Feng B, Ng JH, Heng JC, Ng HH. 2009. Molecules that promote or enhance reprogramming of somatic cells to induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **4**: 301–312.
- Feng Q, Lu SJ, Klimanskaya I, Gomes I, Kim D, Chung Y, Honig GR, Kim KS, Lanza R. 2010. Hemangioblastic derivatives from human induced pluripotent stem cells exhibit limited expansion and early senescence. *Stem Cells* **28**: 704–712.
- Guenther MG, Frampton GM, Soldner F, Hockemeyer D, Mitalipova M, Jaenisch R, Young RA. 2010. Chromatin structure and gene expression programs of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **7**: 249–257.
- Hanna J, Saha K, Pando B, van Zon J, Lengner CJ, Creighton MP, van Oudenaarden A, Jaenisch R. 2009. Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. *Nature* **462**: 595–601.
- Hanna JH, Saha K, Jaenisch R. 2010. Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell* **143**: 508–525.
- Kawamura T, Suzuki J, Wang YV, Menendez S, Morera LB, Raya A, Wahl GM, Belmonte JC. 2009. Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature* **460**: 1140–1144.
- Lanza RP, Cibelli JB, Blackwell C, Cristofalo VJ, Francis MK, Baerlocher GM, Mak J, Schertzer M, Chavez EA, Sawyer N, et al. 2000. Extension of cell life-span and telomere length in animals cloned from senescent somatic cells. *Science* **288**: 665–669.
- Li H, Collado M, Villasante A, Strati K, Ortega S, Canamero M, Blasco MA, Serrano M. 2009. The Ink4/Arf locus is a barrier for iPSC cell reprogramming. *Nature* **460**: 1136–1139.
- Liao J, Wu Z, Wang Y, Cheng L, Cui C, Gao Y, Chen T, Rao L, Chen S, Jia N, et al. 2008. Enhanced efficiency of generating induced pluripotent stem (iPS) cells from human somatic cells by a combination of six transcription factors. *Cell Res* **18**: 600–603.
- Liu GH, Barkho BZ, Ruiz S, Diep D, Qu J, Yang SL, Panopoulos AD, Suzuki K, Kurian L, Walsh C, et al. 2011. Recapitulation of premature ageing with iPSCs from Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* **472**: 221–225.
- Marion RM, Strati K, Li H, Murga M, Blanco R, Ortega S, Fernandez-Capetillo O, Serrano M, Blasco MA. 2009a. A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPSC cell genomic integrity. *Nature* **460**: 1149–1153.
- Marion RM, Strati K, Li H, Tejera A, Schoeftner S, Ortega S, Serrano M, Blasco MA. 2009b. Telomeres acquire embryonic stem cell characteristics in induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **4**: 141–154.
- Matsuura F, Hirano K, Ikegami C, Sandoval JC, Oku H, Yuasa-Kawase M, Tsubakio-Yamamoto K, Koseki M, Masuda D, Tsujii K, et al. 2007. Senescent phenotypes of skin fibroblasts from patients with Tangier disease. *Biochem Biophys Res Commun* **357**: 493–498.
- Moiseeva O, Bourdeau V, Roux A, Deschenes-Simard X, Ferbeyre G. 2009. Mitochondrial dysfunction contributes to oncogene-induced senescence. *Mol Cell Biol* **29**: 4495–4507.
- Narita M, Nunez S, Heard E, Narita M, Lin AW, Hearn SA, Spector DL, Hannon GJ, Lowe SW. 2003. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* **113**: 703–716.
- Passos JF, Saretzki G, Ahmed S, Nelson G, Richter T, Peters H, Wappler I, Birket MJ, Harold G, Schaeuble K, et al. 2007. Mitochondrial dysfunction accounts for the stochastic heterogeneity in telomere-dependent senescence. *PLoS Biol* **5**: e110. doi: 10.1371/journal.pbio.0050110.
- Prigione A, Fauler B, Lurz R, Lehrach H, Adjaye J. 2010. The senescence-related mitochondrial/oxidative stress pathway is repressed in human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* **28**: 721–733.
- Sahin E, Depinho RA. 2010. Linking functional decline of telomeres, mitochondria and stem cells during ageing. *Nature* **464**: 520–528.
- Shiels PG, Kind AJ, Campbell KH, Wilmut I, Waddington D, Colman A, Schnieke AE. 1999. Analysis of telomere length in Dolly, a sheep derived by nuclear transfer. *Cloning J* **1**: 119–125.
- Suhr ST, Chang EA, Rodriguez RM, Wang K, Ross PJ, Beyhan Z, Murthy S, Cibelli JB. 2009. Telomere dynamics in human cells reprogrammed to pluripotency. *PLoS ONE* **4**: e8124. doi: 10.1371/journal.pone.0008124.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**: 861–872.
- Utikal J, Polo JM, Stadtfeld M, Maherali N, Kulalert W, Walsh RM, Khalil A, Rheinwald JG, Hochedlinger K. 2009. Immortalization eliminates a roadblock during cellular reprogramming into iPSCs. *Nature* **460**: 1145–1148.
- Vaziri H, Chapman KB, Guigova A, Teichroeb J, Lacher MD, Sternberg H, Singec I, Briggs L, Wheeler J, Sampathkumar J, et al. 2010. Spontaneous reversal of the developmental aging of normal human cells following transcriptional reprogramming. *Regen Med* **5**: 345–363.
- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, et al. 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* **318**: 1917–1920.
- Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, Tian S, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. 2009. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* **314**: 797–801.

Projet N°2 : Développement d'un modèle d'évaluation de la réversibilité tissulaire.

A. Approches expérimentales :

1. Culture de kératinocytes issus de biopsie de donneurs jeune et âgé :

Dans le but de maîtriser les techniques nécessaires à l'analyse des différentes lignées de cellules différenciées en kératinocytes à partir de cellules souches pluripotentes la première partie de mon projet a consisté à prendre en main la culture de kératinocytes issus de biopsie de donneur jeune 3 ans, puis par la suite de donneur âgé (68 ans) selon la méthode de culture développé par Howard Green. Cette méthode consiste à une culture préalable de fibroblastes embryonnaires murins 3T3-J2 utilisé comme tapis nourricier en coculture des kératinocytes. Les 3T3-J2 sont préalablement cultivés dans du milieu classique DMEM/Sérum/Antibiotiques. Les kératinocytes en coculture avec les 3T3-J2 sont cultivés dans un milieu spécifique FAD dont la composition est reportée dans le tableau ci-dessous. La maîtrise de la culture de kératinocytes a permis par la suite d'aborder les différentes techniques de caractérisation des kératinocytes notamment par leur potentiel prolifératif et leur capacité à pouvoir générer un épiderme pluristratifié en 3D en condition de culture air/liquide et ainsi en analyser les caractéristiques de stratification.

1.1 Préparation de tapis nourricier 3T3-J2 :

Les fibroblastes sont cultivés avec du DMEM (Gibco) + 10% de sérum de veau de nouveau-né (Biowest) + 1% de pénicilline/streptomycine (Gibco). Les 3T3-J2 sont ensemencés dans des boîtes de culture de 100mm (Falcon) après incubation pendant 6 minutes au versène (Life technologies) puis passage enzymatique à la trypsine (Life technologies) dilué au 1/5^{ème} dans du versène jusqu'à décollement total. Le milieu est changé tous les 2 jours.

Les cellules sont ensuite bloquées dans leur prolifération avec de la mitomycine C stérilisées (MMC, Sigma) à 4 ug/ml directement dans le milieu pendant 2h30. Avec les précautions adéquates, le milieu/MMC est aspiré et les cellules rincées 3 fois avec du PBS.

Après le dernier rinçage les cellules sont incubées pendant 10 minutes avec de la trypsine diluée au 1/5^{ème} dans du versène jusqu'à décollement. Les cellules sont récupérées et centrifugées pendant 5 minutes à 300g max puisensemencées au 1/2 dans des boites de 100mm. Les cellules sont maintenues en culture à une température de 37°C et à 20% d'O2.

1.2 Préparation du milieu de culture de coculture kératinocytes/3T3-J2 :

Composants	Concentration finale
Insuline (Sigma)	5 µg/ml
Hydrocortisone (Sigma)	0,5 µg/ml
Choléra toxine (Sigma)	10 ⁻¹⁰ mol/L
Adénine (Sigma)	24 µg/ml
Recombinant human Epidermal Growth Factor (Life technologies-Invitrogen)	10 ng/ml
Penicilline/streptomycine	1%
Sérum de veau fœtal (Biowest)	10 %
DMEM/F12 (Gibco)	225 ml
DMEM (Gibco)	225 ml

1.3 Décongélation et culture des kératinocytes :

Après décongélation brève au bain-marie, les kératinocytes sont resuspendus dans 15 ml de milieu et centrifugés pendant 10 minutes à 1000rpm. Le culot obtenu est repris dans 5 ml de milieu et ensemencer dans une boite de 100 mm de contenant les 3T3-J2 mitomycinés dans 5 ml de milieu FAD (Tableau 1). Le milieu est changé tous les jours pendant toute la phase d'amplification.

Lors de l'amplification, les kératinocytes sont passés par une première étape d'élimination des 3T3-J2 par incubation préalable avec 5 ml de versène durant 6 à 7 minutes, puis 5 ml de trypsine diluée au 1/5^{ème} dans le versène jusqu'à décollement des fibroblastes. Puis dans une seconde étape d'incubation avec de la trypsine diluée dans le versène durant 15 min. Les cellules sont comptés manuellement avec une lame de comptage puisensemencées à 200.000 kératinocytes par boite de 100mm. Les cellules sont maintenues en culture à une température de 37°C et à 20% d'O2 (Figure 1).

2. Mise au point de protocoles de différenciation de cellules souches pluripotentes (hESCs et hiPSCs):

Afin d'établir un protocole que nous puissions utiliser dans le cadre de notre étude sur le vieillissement, nous avons testés différents protocoles que je décris ci-dessous et que je discuterais plus loin dans la partie discussion.

Sont donc récapitulés ci-dessous, les protocoles selon l'ordre où ils ont été testés et seront notés A, B, C, D respectivement selon leur ordre chronologique d'utilisation.

A. Protocole **A** selon l'article :

« Human embryonic stem-cell derivatives for full reconstruction of the pluristratified epidermis : a preclinical study ». Guenou et al. 2009, The Lancet.

B. Protocole **B** selon l'article :

« Generation of keratinocytes from normal and recessive dystrophic epidermolysis bullosa-induced pluripotent stem cells ». Itoh et al. 2011, PNAS.

C. Protocole **C** selon l'article :

« Directed differentiation of human embryonic stem cells to epidermal progenitors ». Metallo et al. 2010b, Methods Mol Biol.

D. Protocole **D**:

Développement de notre protocole adapté du protocole C de Metallo et al. 2010b.

2.1 Mise au point du protocole **A** selon l'article « **Human embryonic stem-cell derivatives for full reconstruction of the pluristratified epidermis : a preclinical study** ». Guenou et al. 2009, The Lancet.

Après culture des cellules souches embryonnaires humaines sur un tapis nourricier de fibroblastes murins, les colonies d'hESCs sont transférées sur un tapis nourricier de fibroblastes murins 3T3 mitomycinés.

L'induction de la différenciation est faite par coculture des hESCs et 3T3 mitomycinés en milieu FAD contenant 0,5 nmol/l de BMP4 (R&D System) et 0,3 mmol/l d'acide ascorbique

(Sigma). La composition du milieu FAD est récapitulée dans le tableau 2 ci-dessous. Les cellules sont maintenues en culture sous induction pendant 40 à 60 jours jusqu'à l'apparition de colonies.

Tableau 2 : Composition du milieu FAD selon Guenou et al. 2009

Composants	Concentration
Insuline	5 µg/ml
Hydrocortisone	0,5 µg/ml
Choléra toxine	10 ⁻¹⁰ mol/L
Triiodothyronine	1,37 ng/ml
Adénine	24 µg/ml
rhEGF	10 ng/ml
Sérum de veau fœtal	10%
DMEM/Ham's F12	Ratio 3 :1 dans qsp 500ml

2.2 Mise au point du protocole B selon l'article « Generation of keratinocytes from normal and recessive dystrophic epidermolysis bullosa-induced pluripotent stem cells ». Itoh et al. 2011, PNAS.

Les cellules souches à pluripotence induite humaines (hiPSCs) sont cultivées sur un tapis nourricier de fibroblastes murins (MEF) en milieu conditionné + milieu ESKO, pendant 1 jour avant transfert des colonies d'hiPSCs sur matrigel (BD Biosciences). L'induction de la différenciation est faite par remplacement du milieu conditionné/ESKO par du milieu commercial KSFM (Keratinocytes Serum Free Medium) (Life Technologies) ou par le milieu FAD contenant 10 ng/ml de BMP4 (R&D System) et 1 µM all-trans RA. La composition du milieu FAD est récapitulée dans le tableau 3 ci-dessous. Après induction, les cellules sont maintenues en culture jusqu'à 30 jours en milieu KSFM, puis transférées sur des boîtes recouvertes d'un mélange de 0,01 mg/ml de fibronectine et 0,03 mg/ml de collagène. Les cellules sont maintenues en culture sous induction pendant 4 jours jusqu'à l'apparition des cellules.

Tableau 3 : Composition du milieu FAD selon Itoh et al. 2011

Composants	Concentration
Insuline (EMD Chemicals)	5 µg/ml
Hydrocortisone (Sigma)	0,4 µg/ml
Choléra toxine (ICN Pharmaceuticals)	10 ⁻¹⁰ mol/L
Hépès	3.10 ⁻³ M
Adénine (Sigma)	1,8 10 ⁻⁴ M
rhEGF (R&D Systems)	10 ng/ml
Sérum de veau fœtal	10%
DMEM/Ham's F12	Ratio 3 :1 dans qsp 500ml
Penicilline/Streptomycine (Invitrogen)	1%

2.3 Mise au point du protocole C selon l'article « Directed differentiation of human embryonic stem cells to epidermal progenitors ». Metallo et al. 2010b, Methods Mol Biol.

Les cellules souches embryonnaires humaines (hESCS) sont cultivées sur un tapis nourricier de fibroblastes murins (MEF) en milieu conditionné + milieu ESKO, puis incubés pendant 24h avec du milieu ESKO non conditionné puis avant transfert des colonies d'hESCs sur matrigel (BD Biosciences).

L'induction de la différenciation est faite par remplacement du milieu conditionné/ESKO par un milieu d'induction composé de 25ng/ml de BMP4 (R&D System) et 1 µM all-trans RA. La composition complète du milieu d'induction est récapitulée dans le tableau 4 ci-dessous. Après induction, les cellules sont maintenues en culture jusqu'à 30 jours en milieu KSFM, puis transférées sur des boîtes recouvertes d'un mélange de 0,01 mg/ml de fibronectine et 0,03 mg/ml de collagène. Les cellules sont maintenues en culture sous induction pendant 4 jours jusqu'à l'apparition des cellules.

Tableau 4 : Composition du milieu d'induction selon Metallo et al. 2010b.

Composants	Concentration
DMEM/F12 Glutamax (Gibco)	
Supplément N2 (Gibco)	100X
Acide Rétinoïque (Sigma)	1 μ M
BMP4 (R&D Systems)	25 ng/ml
Pénicilline/Streptomycine (Gibco)	1%

2.4 Mise au point du protocole **D** adapté du protocole de Metallo et al. 2010b.

Les cellules souches pluripotentes humaines, hPSCs, (embryonnaires, hESC et reprogrammées hiPSCs) sont cultivées sur matrigel (BD Biosciences) avec du milieu commercial mTesR (Stem Cell Technologies).

L'induction de la différenciation est initiée par remplacement du milieu mTesR par le milieu d'induction composé de 25ng/ml de BMP4 (R&D System) + 1 μ M all-trans RA (Sigma). La composition complète du milieu d'induction est récapitulée dans le tableau 5 ci-dessous. Après induction, les cellules sont passées à la fin d'induction soit par dispase soit par trypsine après 1 semaine ou 1 mois en milieu FAD (Tableau 6) en présence d'un tapis nourricier de fibroblastes murins 3T3-J2 ou sur des boîtes tapissées de « coating matrix ». Les différentes conditions de culture testées sont récapitulées dans le tableau 7. Les cellules sont maintenues en culture sous induction pendant 4 jours jusqu'à l'apparition des cellules.

Tableau 5 : Composition du milieu d'induction utilisé pour notre protocole.

Composants	Concentration
DMEM/F12 Glutamax (Gibco)	
Supplément N2 (Gibco)	100X
Acide Rétinoïque (Sigma)	1 μ M
BMP4 (R&D Systems)	25 ng/ml
Pénicilline/Streptomycine (Gibco)	1%

Tableau 6 : Composition du milieu FAD utilisé pour la culture des kératinocytes dérivés de cellules souches pluripotentes humaines.

Composants	Concentration finale
Insuline (Sigma)	5 µg/ml
Hydrocortisone (Sigma)	0,5 µg/ml
Choléra toxine (Sigma)	10 ⁻¹⁰ mol/L
Adénine (Sigma)	24 µg/ml
Recombinant human Epidermal Growth Factor (Life technologies-Invitrogen)	10 ng/ml
Pénicilline/streptomycine	1%
Sérum de veau fœtal (Biowest)	10 %
DMEM/F12 (Gibco)	225 ml
DMEM (Gibco)	225 ml

Tableau 7: Récapitulatif des différentes conditions de culture vers la mise au point d'un protocole de différenciation.

N° Condition	Culture à 5% O ₂	Culture à 20% O ₂	Culture sur Coating Matrix*	Culture sur 3T3-J2**	Passage avec Dispase	Passage avec Trypsine	Passage après 1 semaine	Passage après 1 mois
1	■	■	■	■	■	■	■	■
2	■	■	■	■	■	■	■	■
3	■	■	■	■	■	■	■	■
4	■	■	■	■	■	■	■	■
5	■	■	■	■	■	■	■	■
6	■	■	■	■	■	■	■	■
7	■	■	■	■	■	■	■	■
8	■	■	■	■	■	■	■	■
9	■	■	■	■	■	■	■	■

Pour les conditions 1 à 9, l'induction en différenciation est faite à 5% d'O₂ avec du BMP4 à 25ng/ml et de l'acide rétinoïque 1µM sur les cellules souches pluripotentes (hESCs et hiPSCs) préalablement cultivées sur matrigel. Après induction, différentes conditions de différenciation terminale sont testées, notées 1 à 9 dans le tableau et décrites ci-dessous.

Dans la condition N°1 :

Après 1 semaine d'induction à 5% d'O₂, les cellules sont passées à la dispase et ensemencées sur du *coating matrix* commercial (Life technologies) constitué de collagène I humain recombinant, et maintenues en culture à 5% d'O₂ pendant les 3 semaines. Le milieu de culture après induction est le milieu commercial Epilife (Life technologies), avec un changement quotidien.

Dans la condition N°2 :

Après 1 semaine d'induction à 5% d'O₂, les cellules sont passées à la dispase et ensemencées sur du *coating matrix* commercial (Life technologies) constitué de collagène I humain recombinant, et maintenues en culture à 20% d'O₂ pendant les 3 semaines. Le milieu de culture après induction est le milieu commercial Epilife (Life technologies), avec un changement quotidien.

Dans la condition N°3 :

Après 1 semaine d'induction à 5% d'O₂, les cellules sont passées à la dispase et ensemencées sur fibroblastes embryonnaires murins 3T3-J2 mitomycinés (tapis nourricier), et maintenues en culture à 5% d'O₂ pendant les 3 semaines. Le milieu de culture après induction est le milieu FAD décrit dans le tableau 2, avec un changement tous les 2 jours.

Dans la condition N°4 :

Après 1 semaine d'induction à 5% d'O₂, les cellules sont passées à la dispase et ensemencées sur fibroblastes embryonnaires murins 3T3-J2 mitomycinés (tapis nourricier), et maintenues en culture à 20% d'O₂ pendant les 3 semaines. Le milieu de culture après induction est le milieu FAD décrit dans le tableau 2, avec un changement tous les 2 jours.

Dans la condition N°5 :

Après 1 semaine d'induction à 5% d'O₂ suivie de 3 semaines de culture sans passage, les cellules sont passées à la trypsine et ensemencées sur du *coating matrix* commercial (Life technologies) constitué de collagène I humain recombinant, et maintenues en culture à 5% d'O₂ pendant les 3 semaines. Le milieu de culture après induction est le milieu commercial Epilife (Life technologies), avec un changement quotidien.

Dans la condition N°6 :

Après 1 semaine d'induction à 5% d'O₂ suivie de 3 semaines de culture sans passage, les cellules sont passées à la trypsine et ensemencées sur du *coating matrix* commercial (Life technologies) constitué de collagène I humain recombinant, et maintenues en culture à 20% d'O₂ pendant les 3 semaines. Le milieu de culture après induction est le milieu commercial Epilife (Life technologies), avec un changement quotidien.

Dans la condition N°7 :

Après 1 semaine d'induction à 5% d'O₂, des fibroblastes embryonnaires murins 3T3-J2 sont ajoutées à chaque boîte et s'en est suivie de 3 semaines de culture sans passage (avec ajout de 3T3-J2 quand nécessaire), les cellules sont passées à la trypsine et ensemencées sur 3T3-J2 mitomycinés (tapis nourricier), et maintenues en culture à 5% d'O₂ pendant les 3 semaines. Le milieu de culture après induction est le milieu FAD décrit dans le tableau 2, avec un changement tous les 2 jours.

Dans la condition N°8 :

Après 1 semaine d'induction à 5% d'O₂, des fibroblastes embryonnaires murins 3T3-J2 sont ajoutées à chaque boîte et s'en est suivie de 3 semaines de culture sans passage (avec ajout de 3T3-J2 quand nécessaire), les cellules sont passées à la trypsine et ensemencées sur fibroblastes embryonnaires murins 3T3-J2 mitomycinés (tapis nourricier), et maintenues en culture à 20% d'O₂ pendant les 3 semaines. Le milieu de culture après induction est le milieu FAD décrit dans le tableau 2, avec un changement tous les 2 jours.

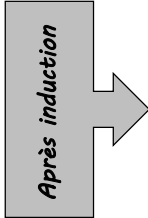
Dans la condition N° 9:

Après 1 semaine d'induction à 5% d'O₂, les cellules sont passées à la trypsine et ensemencées sur du *coating matrix* commercial (Life technologies) constitué de collagène I humain recombinant, et maintenues en culture à 5% d'O₂ pendant les 3 semaines. Le milieu de culture après induction est le milieu commercial Epilife (Life technologies), avec un changement quotidien.

A noter : Après la mise au point du protocole sur les cellules souches embryonnaires (hESCs), le protocole a été appliqué sur les différentes lignées cellulaires d'hiPSCs développées dans le laboratoire. Chaque de ces lignées après dérivation dans le lignage

kératinocytaires verra son annotation précédé de la lettre K permettant de distinguer les lignées hiPSCs des lignées différenciées (Tableau 8)

Tableau 8 : Annotation de chaque lignée après redifférenciation.

<i>Etat pluripotent</i>		<i>Etat différencié</i>
H9		K-H9
Thomson Cl4		K-ThCl4
IMR90p4		K-IMRp4
BJ		K-BJ
HSFp4		K-HSF p4
HSFp18		K-HSFp18
Old92		K-Old92

3. Caractérisation moléculaire des kératinocytes dérivés d’hiPSCs par marquage en immunofluorescence sur culture 2D :

Après culture, les cellules sont fixées au PFA 4% pendant 5 min à température ambiante. Après fixation, les cellules sont ensuite perméabilisées avec du PBS Triton 0,1% pendant 5 min si nécessaire, puis lavées au PBS. Après saturation à la BSA 1% pendant 30 à 45 min, l’anticorps primaire spécifique de la protéine d’intérêt est dilué dans de la BSA 1% et incubé toute la nuit à 4°C (Tableau 9). L’anticorps primaire anti-cytokératine 14 (rabbit, Genetex) est utilisé au 1/500^{ème}, l’anticorps primaire anti-cytokératine 1 (mouse, Covance) est utilisé au 1/200^{ème}. L’anticorps secondaire spécifique couplé à un fluorochrome est dilué dans de la BSA 1% et incubé pendant 1h à l’abri de la lumière. Après retrait de l’anticorps secondaire, les cellules sont à nouveau lavées 2 fois avec du PBS-Tween et 1 fois avec du PBS. Enfin, les noyaux des cellules sont marqués au Hoescht au 1/5000 (dans PBS) pendant 5 min maximum. Après aspiration de la solution de Hoescht, les cellules sont rincées 3 fois au PBS. L’observation des marquages est réalisée au microscope inversé Axiovert 200M.

4. Caractérisation du potentiel clonogénique des kératinocytes dérivés d’hiPSCs par observation directe et comptage manuel :

Dans le cas d’une analyse du test de clonogénicité, les cellules sont passées selon la technique précédemment citée. Sur 3 boîtes de 100 mm (triplicat), une suspension de 500 cellules est ensemencée par boîte de 100mm, et maintenues en culture pendant 15 jours avec

un changement de milieu FAD tous les 2 jours. Les cultures sont arrêtées pour analyse par fixation et coloration. Pour cela, une solution de fixation/coloration est préparée comme suit : 3g de Rhodamine B (1%, Sigma) + 3 g de Nile Blue (1 %, Sigma) sont ajoutés à une solution de 150 ml de méthanol + 150 ml d'H2O MilliQ.

Après aspiration du milieu de culture, les cellules sont recouvertes de la solution colorante (environ 5-7 ml) et laissées sous agitation douce pendant 10 min. Les cellules sont rincées à l'eau courante de débit faible, avant séchage des boîtes.

L'analyse quantitative des colonies obtenues et comptées s'effectue en respectant 2 principaux critères permettant de définir le type de colonies (colonie de bords réguliers avec un diamètre supérieur à >2mm décrivent les holoclones, et les colonies < à 2mm aux bords irréguliers décrivent les paraclones) (cf. Introduction §2.2.3).

5. Caractérisation du potentiel de stratification en épiderme des kératinocytes dérivés d'hiPSCs par culture organotypique en condition air-liquide :

5.1 Stratification sur derme mortifié ou sur insert et analyse histochimique par coloration à l'hématoxyline-éosine:

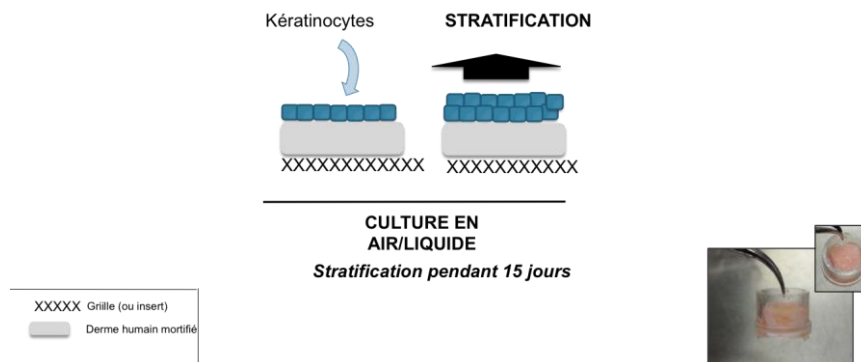
Dans le cas d'une analyse du potentiel de stratification ; les cellules sont cultivées et passées avant ensemencement selon la technique précédemment citée (cf. 1.3).

Le derme humain mortifié est décongelé à température ambiante, puis déposé sur une grille-support stérile (ou dans un insert) disposée dans le fond d'une boîte de 60 mm de diamètre à laquelle est ajouté du milieu FAD jusqu'à contact avec la base du derme.

Une suspension de 200.000 cellules dans 30-40 µl de volume final est ensemencée au centre du derme humain mortifié et laissée 20 min à température ambiante avant incubation. La culture est maintenue en condition air/liquide pendant 15 jours à 37°C et 20% d'O₂. Le milieu de culture est changé tous les 2 jours (Schéma 1).

Dans la culture sur insert (Millipore), l'insert est placé dans un puit d'une plaque de 6 puits (Falcon), auquel est ajouté 1,5 ml de milieu commercial EPILIFE (Life technologies) jusqu'à atteindre le niveau de la membrane de l'insert. Une suspension de 200.000 cellules dans 500 µl de volume final est ensemencée dans l'insert. Les cellules sont maintenues en immersion durant 5 jours avant d'être cultivées en air/liquide les 7 jours suivants. Le milieu est changé tous les 2 jours.

Schéma 1 : Représentation schématique du protocole utilisé dans le cas de la formation d'un épiderme en culture organotypique sur derme mortifié (avec support sur grille ou support insert).



Les cultures organotypiques (derme ou insert) sont inclus dans de l'OCT (Tissue-Tek) et congelés à -80°C jusqu'à congélation complète avant de procéder à la coupe au cryostat. Pour chaque échantillon, des coupes de 12 µm sont réalisées, déposées sur lames puis séchées à l'air avant stockage à -20°C. Avant coloration, les lames sont équilibrées à température ambiante environ 15 min au préalable. Les lames sont ensuite plongées dans des bains successifs selon la description dans le tableau suivant (Tableau 9) :

Tableau 9 : Etapes des bains pour la coloration des coupes à l'hématoxyline-éosine :

Bain	Solution	Durée
1	Hématoxyline de Harris selon Papanicalaou	30 secondes
2	H2O	3 minutes
3	EtOH 70%/Hcl 0,5%	30 secondes
4	H2O	3 minutes
5	Eosine alcoolique	1 minute
6	Ethanol 80 %	3 minutes
7	Ethanol 90%	3 minutes
8	Ethanol 100 %	3 minutes
9	Ethanol 100 %	3 minutes
10	Xylène	5 minutes minimum

Après coloration, les lames sont montées sous lamelles. Après séchage du xylène, une goutte du milieu de montage Pertex Mounting Medium (Histolab) est appliquée sur le tissu coloré. L'observation des coupes est effectuée après séchage complet.

5.2 Stratification sur un mélange de collagène-chitosan-fibroblastes et analyse histologique par la coloration à l'Hématoxyline-Eosine:

Ce travail a été réalisé en collaboration avec Amélie Thépot et le Dr Odile Damour, Laboratoire de substituts cutanés – Hôpital Edouard Herriot, Lyon.

La stratification sur le mélange de collagène-chitosan-fibroblastes nécessite au préalable plusieurs étapes de préparation (Schéma 2):

Etape 1 : Préparation des **fibroblastes** qui constitueront la base dermique en association avec la matrice de chitosan,

Etape 2 : Préparation de la **matrice de chitosan**

Etape 3 : Préparation du **derme-équivalent** (fibroblastes + matrice de chitosan)

Etape 4 : Amplification des **kératinocytes**

Etape 5 : Ensemencement des kératinocytes pour **stratification**

L'étape 1 consiste à décongeler les fibroblastes humains et les amplifier par des passages successifs selon le protocole décrit pour les 3T3-J2. L'étape 2 assure la préparation des matrices par réhydratation à l'alcool stérile. Après plusieurs rinçages au PBS, les matrices sont alors équilibrées et incubées dans le milieu à 37°C. Lors de l'étape 3 consistant à préparer le derme-équivalent, les fibroblastes ($1 \cdot 10^6$ cellules) sont déposés sur la matrice pendant 1h à l'air afin d'en assurer l'adhérence puis immergés dans le milieu et maintenus ainsi en culture avec un changement de milieu (Tableau 10) tous les 2 jours. L'étape suivante permet l'amplification des kératinocytes en coculture avec des fibroblastes humains irradiés selon le même procédé que celui décrit précédemment pour la coculture de kératinocytes/3T3-J2.

A J0 (au jour 0), les fibroblastes humains sont trypsinisés et ensemencés sur les matrices afin de constituer le derme-équivalent. Le derme-équivalent est maintenu en culture pendant 3 semaines avec un changement de milieu quotidien (Tableau 11) jusqu'à en obtenir sa

contraction et la formation d'une matrice concave. Une semaine avant l'ensemencement des kératinocytes un prélèvement contrôle d'un derme-équivalent est effectué afin de s'assurer de la bonne qualité des matrices.

A J21 (21ème jour), les dermes équivalents sont déposés sur un support en grille (selon le même procédé décrit précédemment).

Lors de l'étape finale, les fibroblastes irradiés (tapis nourricier) sont éliminés par trypsinisation pendant 1 min. Les kératinocytes sont à leur tour décollés avec 2-3 min. de trypsinisation, centrifugés 10 min à 1000rpm, comptés puis ensemencés au centre du derme-équivalent à une densité de 1.10^6 de kératinocytes. Après 1h en air/liquide, les cellules sont enfin maintenues en culture par immersion pendant 1 semaine à 37°C et 20% d'O₂ et le milieu changé quotidiennement (Tableau 11).

A J28, les kératinocytes sont élevés en interface en air/liquide jusqu'au 42ème-48ème jour et le milieu changé tous les 2 jours.

Des temps intermédiaires à J35 et J42 sont définis pour des prélèvements contrôles analysés sur coupe histologique afin d'en apprécier l'organisation et la stratification épidermique. Pour cela, les échantillons sont prélevés et fixés en formol 4% avant coloration.

Tableau 10 : Composition du milieu utilisé pour la culture des fibroblastes et la maintenance des dermes-équivalents.

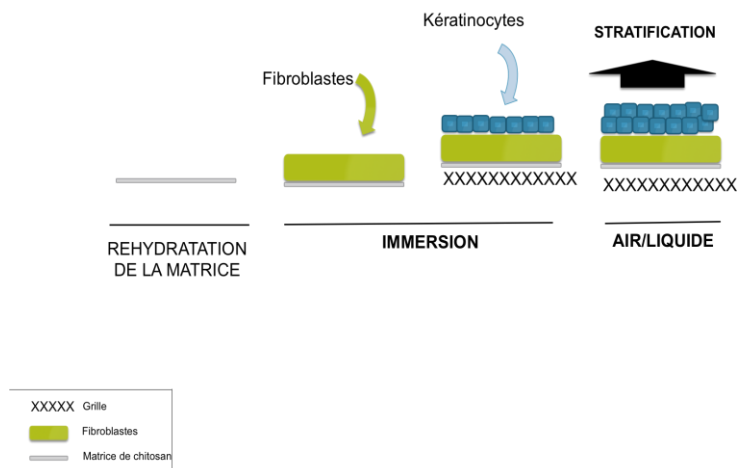
Composant	Concentration
Sérum de veau foetal	10%
Pénicilline/Streptomycine	1%
DMEM	Qsp 500 ml

Tableau 11 : Composition des milieux de culture pour l'amplification de kératinocytes et la stratification.

Milieu de culture pour peaux reconstruites (immersion et interface air/liquide)	Milieu de culture des kératinocytes (amplification)	Constituants du milieu	Concentration finale
		Umuline (Lilly)	0.12 UI/ml
		Isuprel (Abbott)	0,4 µg/ml
		T3 (Sigma)	2.10 ⁻⁹ M
		Adénine (Sigma)	24,3 µg/ml
		Hydrocortisone (Upjohn)	0,4 µg/ml
		DMEM Glutamax	290 ml
		F12	150 ml
		Sérum de Veau Fetal Clone II (Hyclone)	50 ml
		Penicilline	100 UI/ml
		Streptomycine	100 µg/ml
		Amphotéricine B	1 µg/ml
	❖	<i>Recombinant human EGF</i>	<i>10 ng/ml</i>
		<i>Vitamine C</i>	<i>50 µg/ml</i>

❖ A ajouter extemporanément.

Schéma 2 : Représentation schématique du protocole utilisé dans le cas de la formation d'un épiderme en culture organotypique sur un mélange de collagène-chitosan-fibroblastes (avec support sur grille).



Après prélèvement, l'échantillon est coupé en 2 portions à l'aide d'un scalpel et d'une pince.

Une moitié est incluse à l'OCT, et l'autre moitié est incluse dans de la paraffine.

L'inclusion dans l'OCT nécessite le dépôt de l'échantillon à plat dans un moule puis son enrobage avec du gel OCT et sa congélation à -80°C. Les coupes d'échantillon congelé sont réalisées au cryostat à -25°C puis séchées libres avant coloration à l'hématoxyline-éosine.

L'inclusion en paraffine nécessite le dépôt de l'échantillon dans une cassette, puis fixation au formol à 4% sur la nuit avant l'enrobage en paraffine dans un moule d'inclusion. Les coupes d'échantillon paraffiné sont réalisées au vibratome (5µm), puis sont séchés pendant 24h en étuve à 42°C avant déparaffinage et coloration à l'hématoxyline-éosine.

5.3 Stratification sur collagène-fibroblastes et insert :

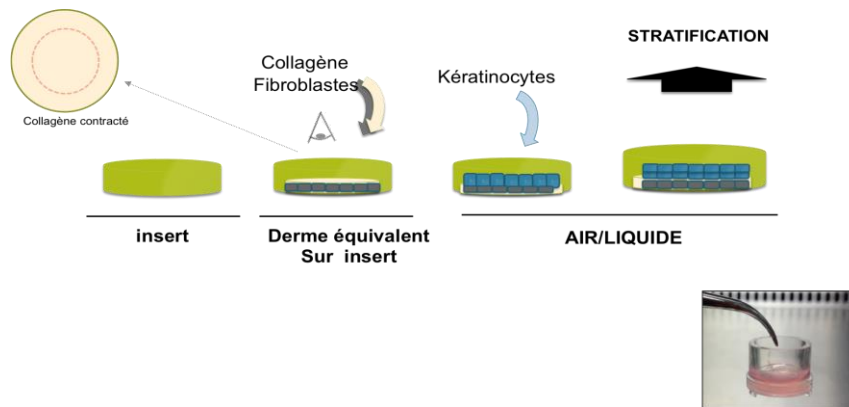
Pour la reconstruction d'un épiderme pluristratifié constitué de fibroblastes et de collagène, les éléments répertoriés dans le tableau 12 sont mélangés rapidement sur glace. Un volume de 1 ml de la mixture est coulé dans un insert et mis sous incubation pendant 30 à 60 minutes pour gélification. Après incubation, les rebords du derme-équivalent formé sont décollés de la paroi de l'insert et immergés dans du milieu jusqu'à contraction du gel de 50% de sa taille initiale (Schéma 4).

Après 24/48h, les kératinocytes sontensemencés au centre du derme-équivalent et cultivés en interface air/liquide pendant 15 jours.

Tableau 12 : Composants nécessaires à la constitution du derme équivalent.

Composants	Volume
Collagène I à 4 mg/ml	600 µl
NAOH 0,1N	633 µl
Fibroblastes/milieu	28,76 ml

Schéma 3: Représentation schématique du protocole utilisé dans le cas de la formation d'un épiderme en culture organotypique sur un derme-équivalent constitué de collagène-fibroblastes (avec support sur insert).



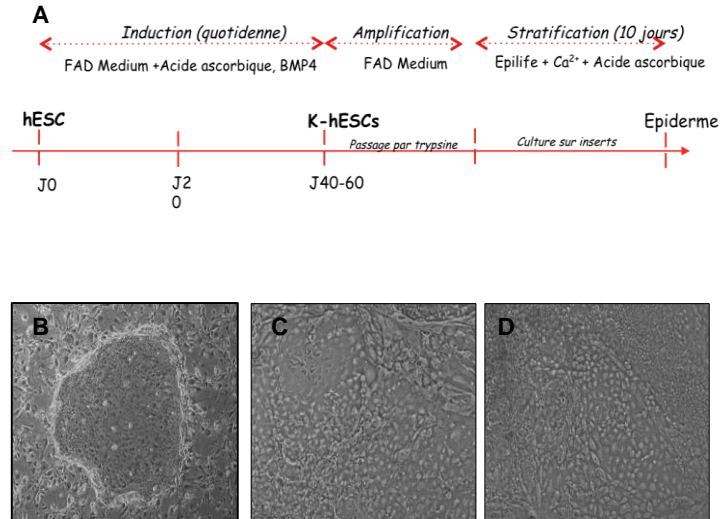
B. Résultats obtenus:

L'objectif de mon projet a consisté à développer une approche expérimentale permettant de différencier de manière spécifique, les cellules souches pluripotentes que nous avons obtenues vers le lignage kératinocytaire. Dans une seconde étape, ces kératinocytes seront utilisés dans le cadre d'une reconstruction d'un épiderme pluristratifié *in vitro*.

Afin de mener une étude comparative complète après différenciation des cellules souches pluripotentes humaines dans le lignage kératinocytaire, deux lignées de kératinocytes issues de biopsie de donneurs jeunes et âgés ont été utilisées comme contrôles.

L'un des premiers objectifs a été de développer au sein du laboratoire, le savoir-faire concernant la culture primaire de kératinocytes humains, ainsi que les techniques de caractérisation des kératinocytes. La culture des kératinocytes en milieu commercial Epilife ou KSFM (Keratinocytes Serum Free Medium) qui consiste à cultiver les kératinocytes dans un milieu sans sérum et sans adsorption de protéine (directement sur plastique) a également été développée. La figure 1B représente une colonie de kératinocytes contrôle en coculture avec un tapis nourricier de fibroblastes embryonnaires murins (3T3-J2) correspondant ici à un contrôle positif. On observe que la colonie présente un aspect arrondi aux bords réguliers et les cellules au sein de la colonie sont cohésives. Ces caractéristiques sont typiques d'une colonie de kératinocytes confirmant notre capacité de cultiver des kératinocytes. Nous avons ensuite tenté de mettre en place un protocole de dérivation de kératinocytes à partir de cellules souches pluripotentes humaines présentant des caractéristiques similaires aux kératinocytes contrôles. Sur la base de plusieurs protocoles existants, différentes approches ont été testées. Dans la figure 1 sont représentés les résultats obtenus après la mise en place du protocole de Guenou et al. 2009 (Figure 1A) avec la lignée hiPSC HSFp18 dérivés de fibroblastes sénescents d'un patient âgé de 74 ans. Comme décrit par les auteurs, on observe que les cellules ensemencées sur le tapis nourricier 3T3-J2 présentent un aspect épithélial à 2 semaines (Figures 1C et 1D). Cependant, malgré ces premières observations les cellules n'ont pas pu être maintenues au delà de cette période durant laquelle une forte mortalité et un détachement des cellules incluant le tapis nourricier est observée. Après différentes répétitions expérimentales aucune colonie n'a pu être obtenue. Selon l'un des auteurs, ce protocole a été validé uniquement pour des cellules souches embryonnaires humaines, et ils ne sont eux-mêmes jamais parvenus à transposer ce protocole sur des hiPSCS.

Figure 1 : Différentiation d'hiPSCs selon le protocole de Guenou et al. A) Récapitulatif des étapes du protocole de différenciation de Guenou et al. 2009. B) Colonie de kératinocytes isolés d'une biopsie de prépuce d'un donneur de 3 ans en coculture avec des fibroblastes 3T3-J2 (contrôle). Les photographies (C et D) correspondent à la mise en place de l'étape comprise entre J0 et J40-60. Les hiPSCs sont obtenues à partir de fibroblastes sénescents d'un donneur de 74 ans (hiPSCS HSF p18) cultivés en coculture avec des fibroblastes 3T3-J2 (C) ou sur gélatine (D) à 2 semaines d'induction de différenciation. Les hiPSCs HSFp18 sont induits en différenciation en présence de BMP4 et d'acide ascorbique dans le milieu FAD. Microscope à contraste de phase, Grossissement 10X.



A partir de ce constat, nous avons opté pour un deuxième protocole développé par Itoh et al. 2011 présentant l'avantage de proposer un protocole validé avec des hiPSCS. Pour faciliter la mise au point de ce modèle, nous avons opté, pour initier ce protocole, d'utiliser des cellules souches embryonnaires humaines (hESCs). Pendant les premiers jours de la phase d'induction (à J4), on observe une morphologie typique de type épithélial. Cependant, très rapidement après arrêt de l'induction, on observe une mortalité des cellules et ce indépendamment du milieu de culture utilisé (milieu commercial EPILIFE sans sérum (figure 2B-D) versus milieu FAD non commercial avec sérum (figure 2E-G)). Dans le cas de l'utilisation de milieu FAD, les cellules qui ont pu être maintenues en culture, présentent une morphologie fibroblastiques démontrant une instabilité des cellules. Après différentes tentatives, ce protocole a été abandonné au profit d'un autre protocole proposant d'induire la différenciation des cellules pendant un temps plus long qui permettrait d'assurer un engagement dans le processus de différenciation plus stable.

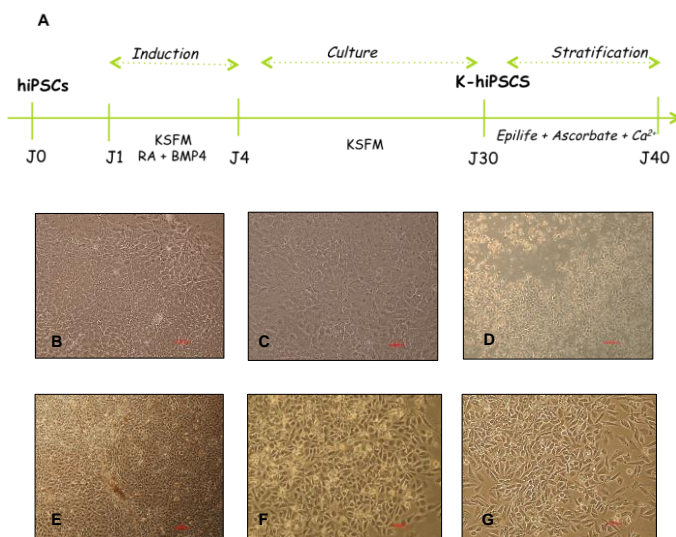


Figure 2 : Différentiation d'hiPSCs selon le protocole de Itoh et al. 2011 (Protocole de différenciation « B »). A) Récapitulatif des étapes du protocole de différenciation de Itoh et al. 2011. Les photographies (B-G) correspondent à la mise en place de l'étape comprise entre J1 et J30. D). Durant la phase d'induction, deux milieux sont évalués. Le milieu commercial défini KFSM sans sérum et le milieu FAD avec sérum, supplémentés d'acide rétinolique (RA) et de BMP4. (B-D) Cellules souches embryonnaires humaines H9 à 24h après l'induction (B) ; 48h après l'induction (C) ; cultivées en milieu commercial EPILIFE à J7 après l'induction (D). (E-G) Cellules souches embryonnaires humaines H9 cultivées avec du milieu FAD sans support cellulaire à 24h après l'induction (E) ; 48h après l'induction (F) ; et à J7 en milieu EPILIFE (G). Microscope à contraste de phase. Grossissement 10X.

Nous nous sommes alors orientés vers le protocole proposé par Metallo et al. 2010. (Figure 3A). Après induction, et ce en absence de passage, on constate que les cellules souches embryonnaires humaines ont une morphologie étalée caractéristique d'une entrée en sénescence (Figure 3B) alors même que les cellules présentaient un phénotype épithélial initialement. Cependant, après passage, les cellules acquièrent un phénotype fibroblastiques avec une accumulation de débris cellulaires dans le milieu de culture (Figure 3C).

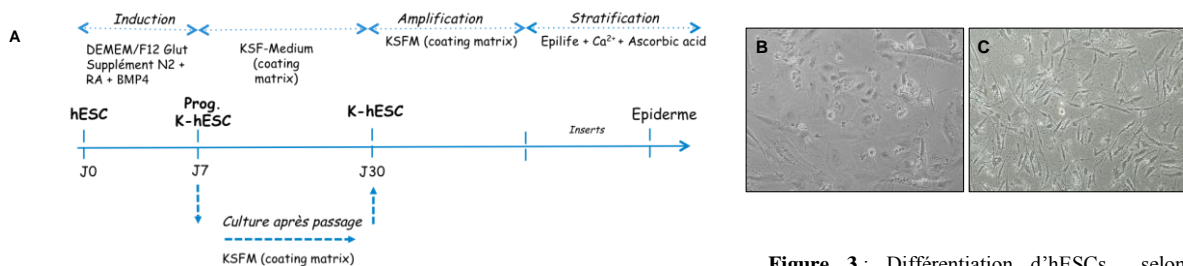
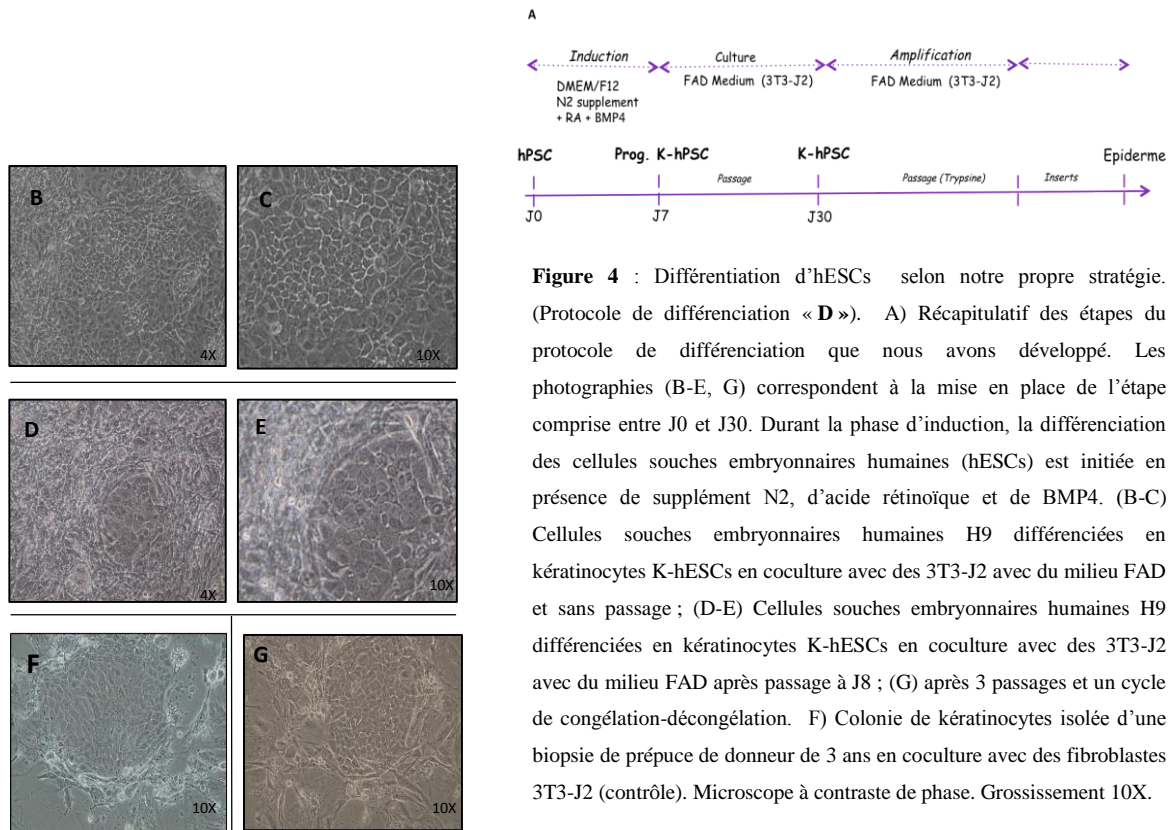
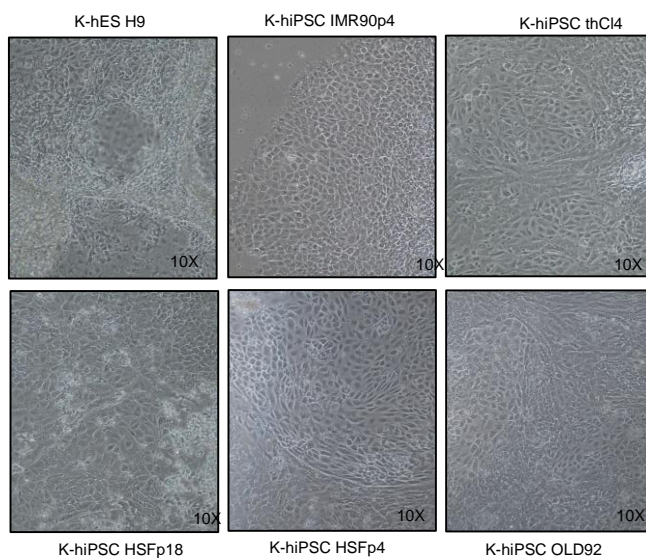


Figure 3 : Différentiation d'hESCs selon le protocole de Metallo et al. 2010 (Protocole de différenciation « C »). A) Récapitulatif des étapes du protocole de différenciation de Metallo et al. 2010. Les photographies (B et C) correspondent à la mise en place de l'étape comprise entre J0 et J30. D). Durant la phase d'induction, la différenciation est initiée en présence de supplément N2, d'acide rétinolique et de BMP4. B-C) Cellules souches embryonnaires humaines H9 maintenues sans passage en milieu KSFM (B) ; après passage à J8 (C). Microscope à contraste de phase. Grossissement 10X.

Au vu des résultats de ces différentes approches, nous avons opté pour une compilation de différents protocoles avec différentes modifications intégrant notamment, la technique de kératinocytes normaux. L'originalité de notre protocole repose sur l'utilisation d'un tapis nourricier et d'un milieu avec sérum (milieu FAD) qui permet un maintien plus long des cellules en culture. Nous avons pu observer qu'après la fin du processus de différenciation, les cellules souches embryonnaires humaines présentaient une morphologie comparable à des kératinocytes normaux et capables de la même façon de s'organiser en colonie aux bords réguliers. Au sein de la colonie, les cellules présentent entre elles un espace qui semble décrire la présence de jonctions intercellulaires. Après passage, le phénotype de cohésion reste stable. Afin de s'assurer d'une stabilité, les cellules ont été congelées puis décongelées, et maintenues en culture durant 3 passages afin de s'assurer de leur survie et leur maintien phénotypique (Figure 4).



Compte de tenu de ces résultats encourageants, il a été décidé de tester cette stratégie directement sur les hiPSCs que nous avons préalablement développés et caractérisés (Lapasset al. 2011). Au total, 5 lignées d'hiPSCs ont été utilisées. La lignée hiPSCs IMR90p4 correspond aux cellules reprogrammées avec le cocktail de 6 facteurs à partir de fibroblastes embryonnaires humaines. La lignée hiPSCs ThCL4 correspond aux cellules reprogrammées avec 4 facteurs à partir de fibroblastes embryonnaires humaines. Les lignées HSFp4 et HSFp18 correspondent aux cellules reprogrammées avec 6 facteurs à partir de fibroblastes (prolifératifs et sénescents respectivement) d'un donneur de 74 ans. Enfin, la lignée hiPSCs OLD92 correspond à des fibroblastes prolifératifs d'un donneur de 92 ans. Les hESCs ont été utilisés



comme contrôle positif de cellules souches pluripotentes. Quelle que soit la lignée d'hiPSCs, on observe à la fin de l'induction de la différenciation une morphologie cellulaire typique de type épithélial (Figure 5).

Figure 5 : Analyse morphologique des différenciations de nos lignées hiPSCs selon notre propre stratégie. (Protocole de différenciation « D »). Les photographies correspondent aux cellules souches pluripotentes humaines (hESCs et hiPSCs) en fin de phase d'induction de différenciation. K-H9 : Kératinocytes différenciés à partir d'hESCs H9 ; K-ThCl4 : Kératinocytes différenciés à partir d'hiPSCs Thomson Cl4 ; K-IMRp4 : Kératinocytes différenciés à partir d'hiPSCs IMR90p4 ; K-HSF p4 : Kératinocytes différenciés à partir d'hiPSCs HSFp4 ; K-HSFp18 : Kératinocytes différenciés à partir d'hiPSCs HSFp18 ; K-Old92 : Kératinocytes différenciés à partir d'hiPSCs Old92. Microscope à contraste de phase, Grossissement 10X.

Après transfert de ces cellules sur un tapis nourricier à la fin de l'induction, les cellules s'organisent en colonies et ce jusqu'au 8^{ème} passage (Figure 6).

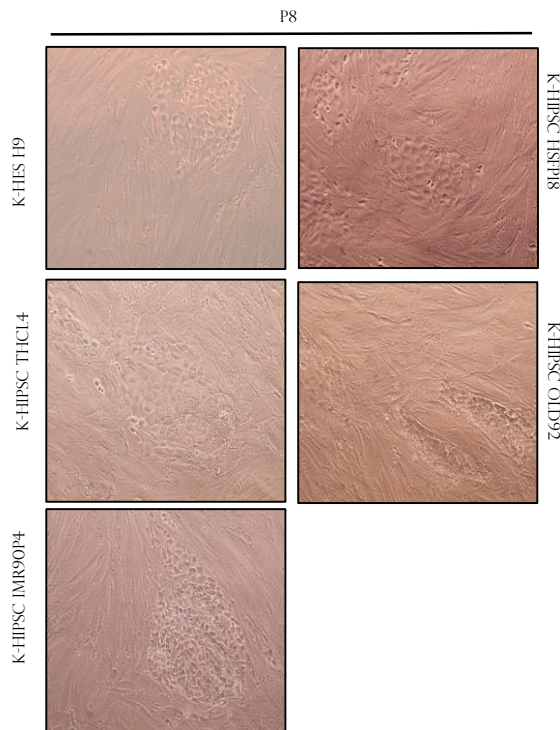


Figure 6 : Analyse morphologique des différenciations de nos lignées hiPSCs selon notre propre stratégie. (Protocole de différenciation « D »). Les photographies correspondent aux cellules souches pluripotentes humaines (hESCs et hiPSCs) au 8^{ème} passage après la fin de phase d'induction de différenciation. K-H9 : Kératinocytes différenciés à partir d'hES H9 ; K-ThCl4 : Kératinocytes différenciés à partir d'hiPSCs Thomson Cl4 ; K-IMRp4 : Kératinocytes différenciés à partir d'hiPSCs IMR90p4 ; K-HSFp18 : Kératinocytes différenciés à partir d'hiPSCs HSFp18 ; K-Old92 : Kératinocytes différenciés à partir d'hiPSCs Old92. Microscope à contraste de phase, Grossissement 10X.

Après cette caractérisation morphologique, nous avons cherché à déterminer par immunofluorescence indirecte si ces cellules pouvaient exprimer les marqueurs spécifiques des kératinocytes. La cytokératine 14 spécifique des cellules prolifératives et la cytokératine 1 spécifique d'une entrée en différenciation ont été les marqueurs sélectionnés pour cette caractérisation. Quelque ce soit la lignée considérée, on observe bien un marquage disparate de ces deux cytokératines au sein des colonies (Figure 7).

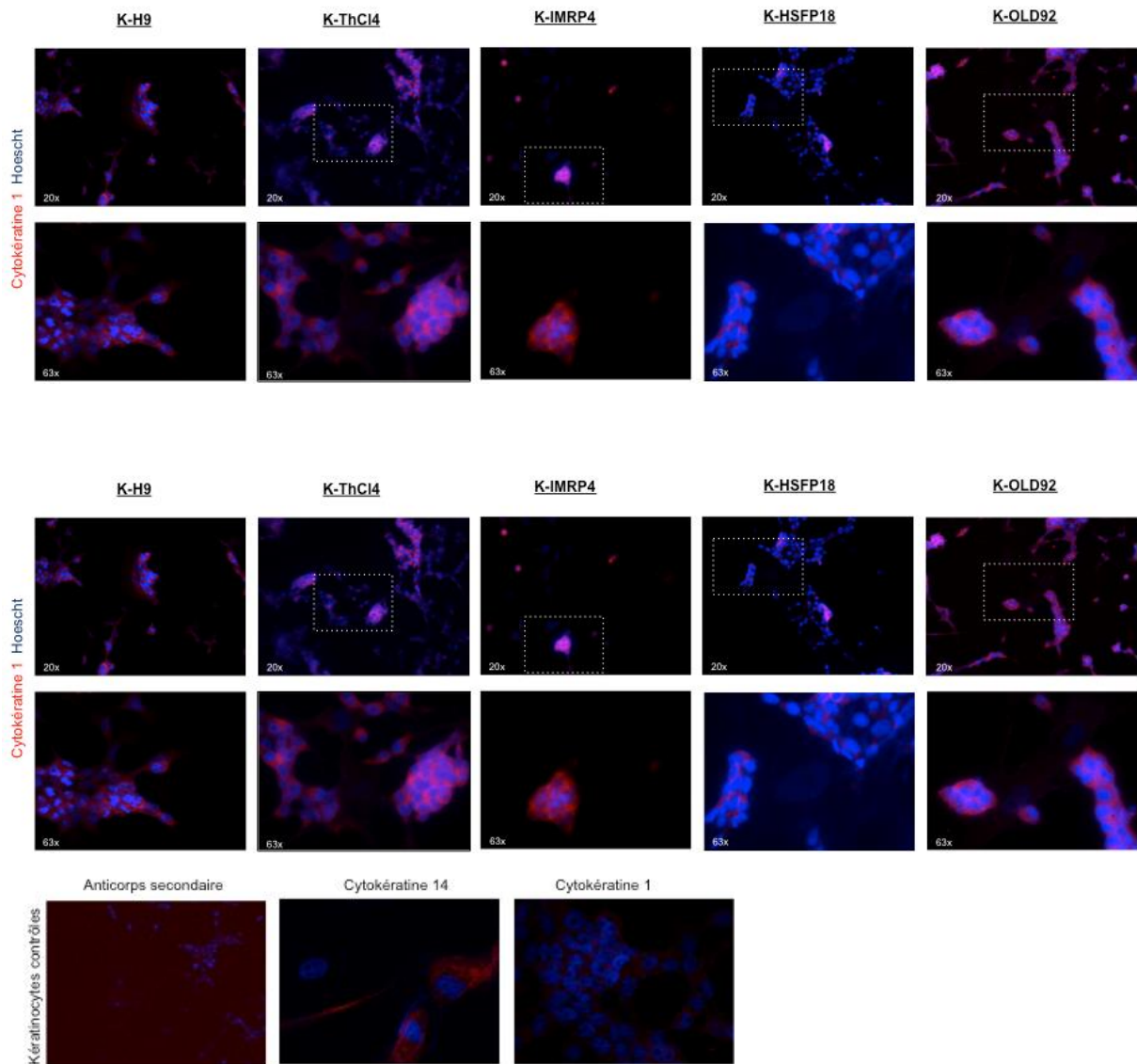


Figure 7: Caractérisation des kératinocytes dérivés de cellules souches pluripotentes humaines par immunomarquage des cytokératines 14 et 1 après les 30 jours de différenciation. K-H9 : Kératinocytes différenciés à partir d'hESCs H9 ; K-ThCl4 : Kératinocytes différenciés à partir d'hiPSCs Thomson Cl4 ; K-IMRp4 : Kératinocytes différenciés à partir d'hiPSCs IMR90p4 ; K-HSFp4 : Kératinocytes différenciés à partir d'hiPSCs HSFp4 ; K-HSFp18 : Kératinocytes différenciés à partir d'hiPSCs HSFp18 ; K-Old92 : Kératinocytes différenciés à partir d'hiPSCs Old92. Microscope Axiovert 200M, Grossissements 20X, et 63X.

Afin d'en évaluer l'organisation au sein d'une colonie, nous avons examiné plus précisément, toujours par immunofluorescence indirecte, l'expression de la cytokératine 14 au sein d'une colonie. Nous constatons qu'il n'y a pas une localisation spécifique de cellules marquées à la cytokératine 14 au sein de la colonie (Figure 8).

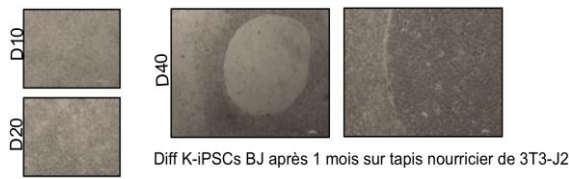
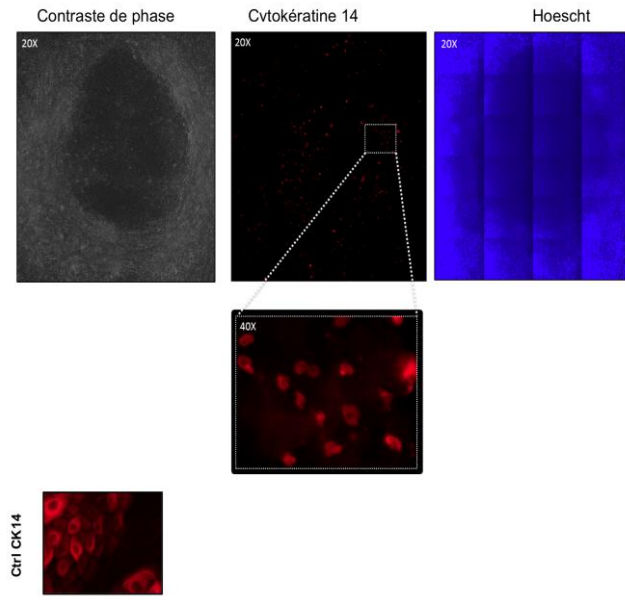


Figure 8 : Evaluation de la répartition des kératinocytes positives à la cytokératine K14 au sein des colonies. Partie supérieure, photographies en microscopie à contraste de phase à différents temps du programme de différenciation : à J10, J20 et J40 avec une lignée de kératinocytes dérivés d’hiPSC BJ en coculture avec des 3T3-J2. Partie inférieure : immunomarquage de l’expression de la cytokératine 14 (rouge) et analyse de la colonie entière par prises de vue en mosaïque (logiciel Metamorph). Marquage des noyaux au Hoescht (bleu). Microscope inversé Axiovert 200M.



Pour approfondir la caractérisation, nous avons par la suite analysé le potentiel clonogénique des kératinocytes. Pour cela, nous nous sommes appuyés sur le test de clonogénicité développé par Barrandon & Green, basé sur l’ensemencement des cellules à une très faible densité et maintenues en culture durant 15 jours. Après coloration, quel que soit la lignée considérée, on observe bien la formation de colonies. Cependant, les colonies ne passent pas les critères de sélection de taille et de morphologie décrits (diamètre supérieur à 2 mm et bords réguliers). Sur la base de ces critères, les cellules apparaissent au 2^{ème} passage après induction de petite taille correspondant aux paraclones (Figure 9).

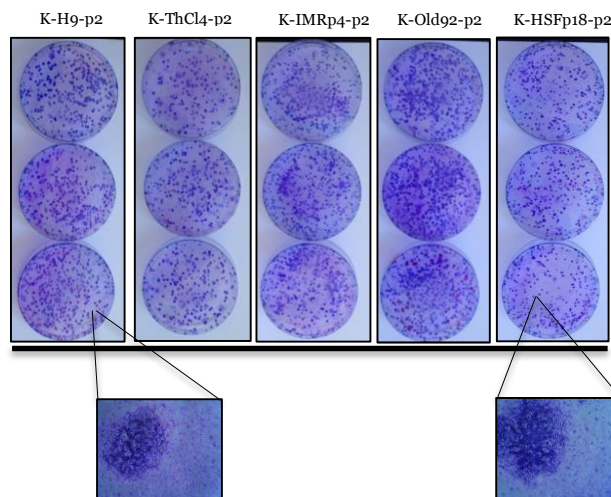


Figure 9 : Caractérisation du potentiel clonogénique des kératinocytes dérivés d’hiPSCs et d’hESCs par observation directe et comptage manuel au 2^{ème} passage après la semaine d’induction de la différenciation. Les agrandissements correspondent à un focus sur des colonies. Coloration Bleu de Nile et Rhodamine.

Le même test a ensuite été effectué sur des passages plus avancés (5^{ème} et 8^{ème} passages) présentant un contexte où le processus d'entrée dans le lignage kératinocytaire est achevé. Nous avons pu observer que malgré une maturation achevée du processus, les cellules s'organisent en colonies de petite taille toujours de type paraclone (Figure 10).

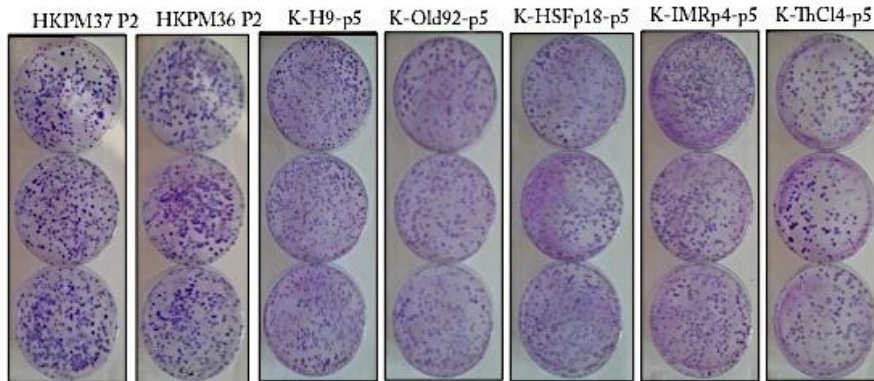


Figure 10: Caractérisation du potentiel clonogénique des kératinocytes dérivés d'hiPSCs et d'hESC's par observation directe et comptage manuel au 5^{ème} passage après la semaine d'induction de la différenciation. Coloration Bleu de Nile et Rhodamine. *Note : le 5^{ème} passage de kératinocytes dérivés de cellules souches pluripotentes correspond au 2^{ème} passage de kératinocytes normaux.*

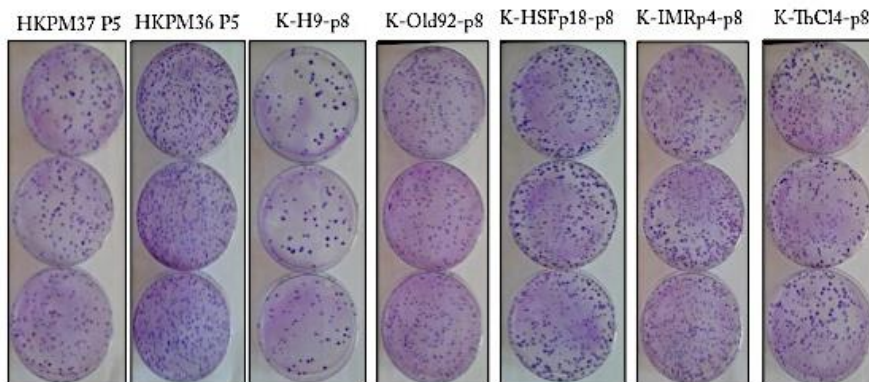


Figure 11 : Caractérisation du potentiel clonogénique des kératinocytes dérivés d'hiPSCs et hESC's par observation directe et comptage manuel au 8^{ème} passage après la semaine d'induction de la différenciation. Coloration Bleu de Nile et Rhodamine. *Note : le 8^{ème} passage de kératinocytes dérivés de cellules souches pluripotentes correspond au 5^{ème} passage de kératinocytes normaux.*

Il est à noter également, que l'observation du centre de la colonie permet de distinguer une zone sombre à la coloration correspondant à une stratification en immersion (Figure 9, grossissements associés). Après cette caractérisation qualitative, nous avons cherché à déterminer les aspects quantitatifs de ce test de clonogénicité. Ce qu'on observe, après comptage manuel, que toutes les lignées au 2^{ème} passage, à l'exception des K-hiPSCs ThCl4, présentent un potentiel prolifératif comparable aux kératinocytes de donneur jeune (HKPM36) (Figure 9-11). Les lignées K-hiPSCs ThCl4 et IMRp90 semblent se maintenir au cours des passages. A l'inverse, une tendance non significative vers la baisse du nombre de colonies est observée pour les K-hESC's (Figure 12A). On observe une baisse de 85% du nombre de

colonies pour les K-hESCs passant de 421 ± 52 colonies au 2^{ème} passage à 65 ± 4 au 8^{ème} passage. Une tendance vers la diminution est également observée pour les K-hiPSCs OLD92 et HSFp18 toutes deux dérivées de cellules de donneur âgé avec respectivement une baisse de 39% et 22% entre les 2^{ème} et 8^{ème} passages. La diminution observée pour les K-hiPSCs est proche de ce qui est observée pour les kératinocytes HKPM37 (donneur âgé) où le nombre de colonies baisse de 45% entre les deux passages. Ces tendances sont également retrouvées lors de l'évaluation du CFE (Colony-Forming Efficiency) correspondant au pourcentage de colonies ayant pu être formées à partir de l'ensemencement de 500 cellules isolées (Figure 12B). Il est à noter que de manière indépendante des variations observées, la taille des colonies (trop petites) ne permet pas la validation des comptages par un test.

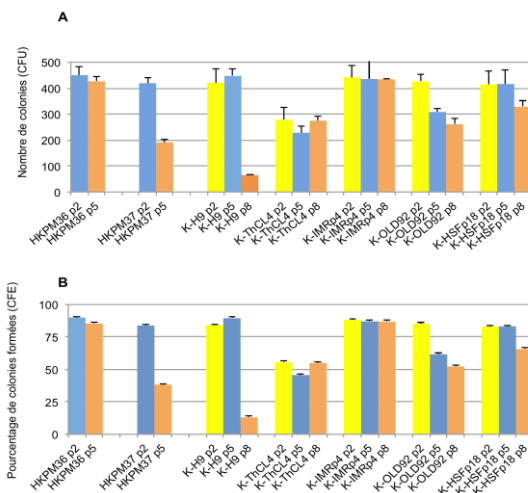


Figure 12 : Analyse quantitative du test de clonogénicité. Détermination du nombre de colonies formées (CFU) et de la proportion de colonies formées (CFE) à partir de l'ensemencement de 500 cellules isolées. Pour chaque lignée, le CFU (A) et le CFE (B) sont déterminés pour les 2^{ème}, 5^{ème} et 8^{ème} passages. Les kératinocytes contrôles HKPM correspondent à des kératinocytes de donneur jeune de 19 ans (HKPM36) et de donneur âgé de 68 ans (HKPM 37). Les valeurs représentées correspondent à la moyenne de n=3. Quantifications manuelles.
Notes : Le 5ème passage de kératinocytes dérivés de cellules souches pluripotentes correspond au 2ème passage de kératinocytes normaux. Et le 8ème passage de kératinocytes dérivés de cellules souches pluripotentes correspond au 5ème passage de kératinocytes normaux.

Afin de déterminer si la taille des colonies obtenues pour chaque lignée est influencé par le tapis nourricier, et compte tenu des difficultés rencontrées au cours de nos expérimentations concernant la perte du tapis nourricier, nous sommes orientés vers l'utilisation d'un tapis nourricier humain dont la prolifération a été arrêtée par irradiation. Parallèlement à cela, nous avons dérivé chacune des lignées hiPSCs en fibroblastes utilisés par la suite comme tapis nourricier après arrêt de leur prolifération avec de la mitomycine. Quelle que soit la lignée considérée, et le tapis nourricier utilisé, on observe que les cellules maintiennent leurs caractéristiques de cellules épithéliales (Figures 13 et 14).

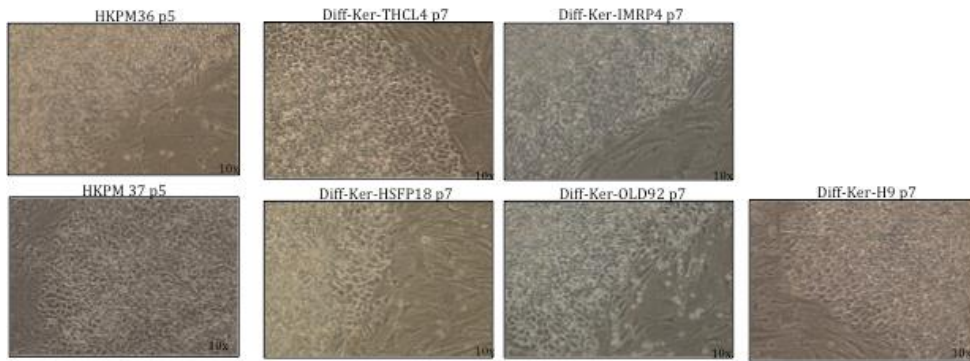
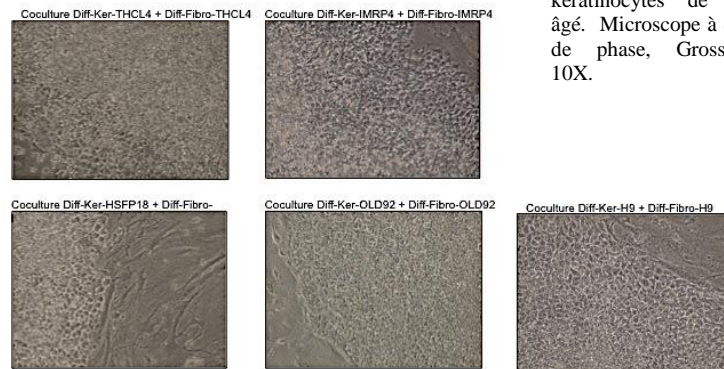


Figure 14 : Analyse morphologique des kératinocytes dérivés de cellules souches pluripotentes en coculture avec des fibroblastes dérivés des hiPSCs homologues. K-H9 : Kératinocytes différenciés à partir d'hES H9 ; K-ThCl4 : Kératinocytes différenciés à partir d'hiPSCs Thomson Cl4 ; K-IMRp4 : Kératinocytes différenciés à partir d'hiPSCs IMR90p4 ; K-HSFp18 : Kératinocytes différenciés à partir d'hiPSCs HSFp18 ; K-Old92 : Kératinocytes différenciés à partir d'hiPSCs Old92 ; Diff-Fibro-H9 : Fibroblastes différenciés à partir d'hES H9 ; Diff-Fibro-ThCl4 : Fibroblastes différenciés à partir d'hiPSCs Thomson Cl4 ; Diff-Fibro-IMRp4 : Fibroblastes différenciés à partir d'hiPSCs IMR90p4 ; Diff-Fibro-HSFp18 : Fibroblastes différenciés à partir d'hiPSCs HSFp18 ; Diff-Fibro-Old92 : Fibroblastes différenciés à partir d'hiPSCs Old92 ; HKPM36 : kératinocytes de donneur jeune et HKPM37 : kératinocytes de donneur âgé. Microscope à contraste de phase, Grossissement 10X.

Figure 13 : Analyse morphologique des kératinocytes dérivés de cellules souches pluripotentes en coculture avec des fibroblastes de derme humain irradiés. K-H9 : Kératinocytes différenciés à partir d'hESCs H9 ; K-ThCl4 : Kératinocytes différenciés à partir d'hiPSCs Thomson Cl4 ; K-IMRp4 : Kératinocytes différenciés à partir d'hiPSCs IMR90p4 ; K-HSFp18 : Kératinocytes différenciés à partir d'hiPSCs HSFp18 ; K-Old92 : Kératinocytes différenciés à partir d'hiPSCs Old92, HKPM 36 : kératinocytes de donneur jeune et HKPM 37 : kératinocytes de donneur âgé. Microscope à contraste de phase, Grossissement 10X.



Cependant, l'analyse du potentiel clonogénique démontre un nombre et une taille de colonies formées beaucoup plus faible dans le cadre de l'utilisation de fibroblastes humains comme tapis nourricier, en comparaison à l'utilisation de fibroblastes dérivés des hiPSCs (Figures 15 et 16).

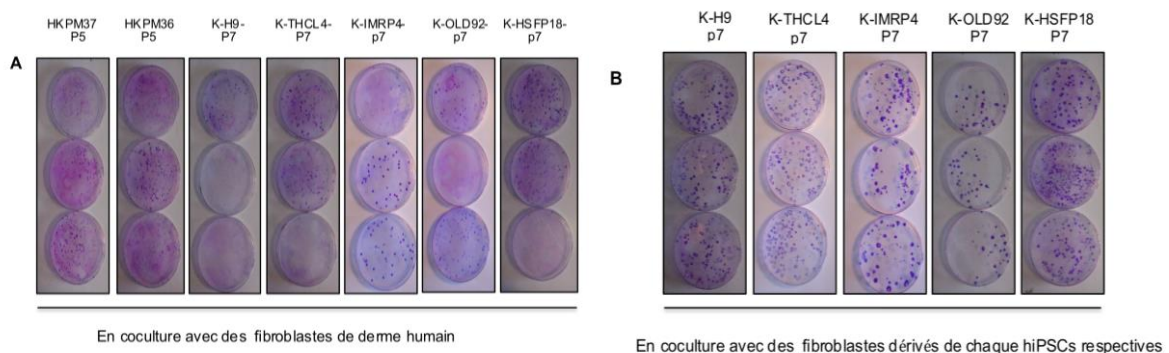


Figure 15 : Caractérisation du potentiel clonogénique des kératinocytes dérivés d'hiPSCs par observation directe et comptage manuel au 7^{ème} passage selon le type de tapis nourricier. A) Coculture des kératinocytes différenciés d'hiPSCs avec des fibroblastes de derme humain. B) Coculture des kératinocytes dérivés de cellules souches pluripotentes avec des fibroblastes dérivés des hiPSCs homologues. Coloration Bleu de Nile et Rhodamine. *Note : le 7^{ème} passage de kératinocytes dérivés de cellules souches pluripotentes correspond au 4^{ème} passage de kératinocytes normaux.*

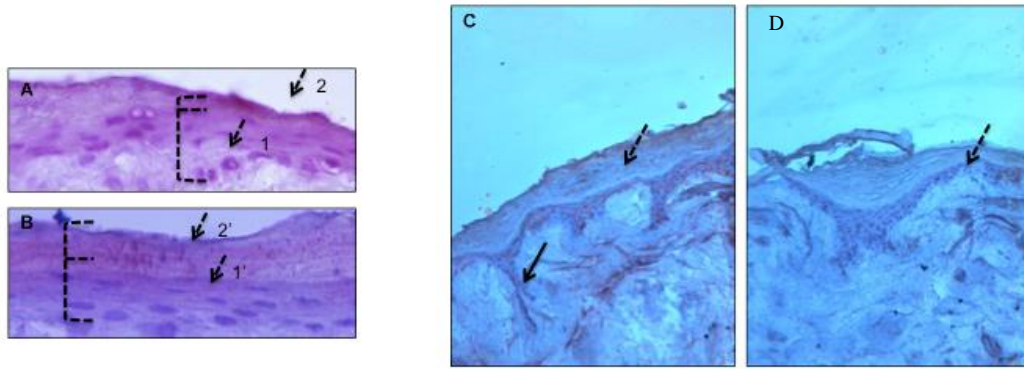


Figure 17 : Analyse histologique d'une stratification de kératinocytes de donneur âgé de 3 ans ensemencés sur derme humain mortifié et cultivés en interface air/liquide. A et B) correspondent à la même reconstruction de peau dont la coupe est observée à différents niveaux de l'échantillon et correspondant à un focus de la zone supérieure de l'épiderme C-D) Coupes de peau reconstruite. La flèche pleine indique l'invagination où est normalement localisé le follicule pileux. Les flèches discontinues mettent en évidence la variabilité dans l'épaisseur des couches sur un même échantillon. Cryosections de 12 µm séchées à l'air libre et colorées à l'Hématoxyline-Eosine.

De même, l'utilisation d'un support matriciel de type collagène I pour la reconstitution d'un derme-équivalent permettant un support de stratification ne s'est pas avérée efficace. On observe effectivement qu'aucune lame basale nécessaire à l'ancrage des cellules de la couche basale de l'épiderme n'est formée avec pour conséquence une déstructuration de l'organisation tissulaire (Figure 18).

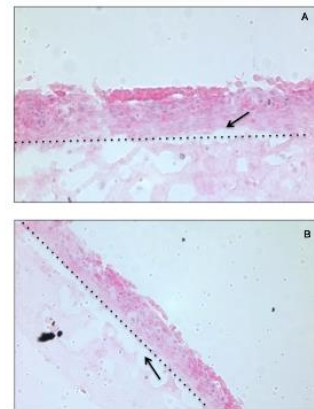


Figure 18 : Analyse histologique d'une stratification de kératinocytes d'un donneur âgé de 3 ans sur derme-équivalent constitué de collagène et fibroblastes d'un donneur âgé de 3 ans. (A et B) correspondent à un unique échantillon. Coloration hématoxyline. Grossissement 20X)

Nous nous sommes alors orientés vers l'utilisation d'un modèle plus sophistiqué de derme-équivalent développé par le Dr O. Damour et composé de chitosan, de collagène et de fibroblastes humains. Malgré un temps de culture relativement long de 35 à 42 jours selon les lignées, aucune stratification concluante n'a pu être observée avec les kératinocytes contrôles ou avec les lignées hiPSCs et ce indépendamment du nombre de passage des cellules (Figures 19 et 20).

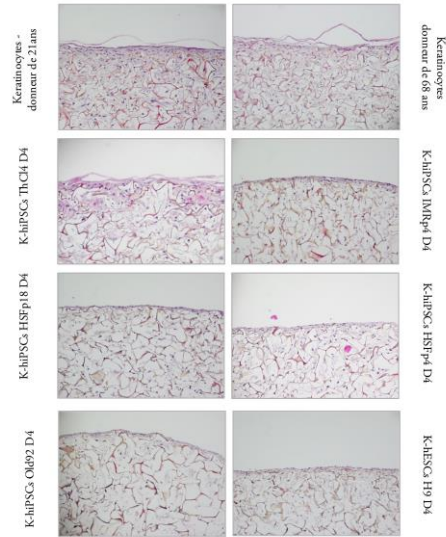


Figure 19 : Analyse histologique du potentiel de stratification en épiderme des kératinocytes dérivés de cellules souches pluripotentes au 4ème passage après induction de la différenciation. La reconstruction de peau est réalisée à partir d'un derme-équivalent constitué de chitosan-collagène et fibroblastes de prépuce humain et maintenue en culture jusqu'au 42ème jour. Les kératinocytes humains contrôles sont issus de donneurs de 21 ans et de 68 ans. Coloration Hématoxyline-Eosine. Grossissement 20X.

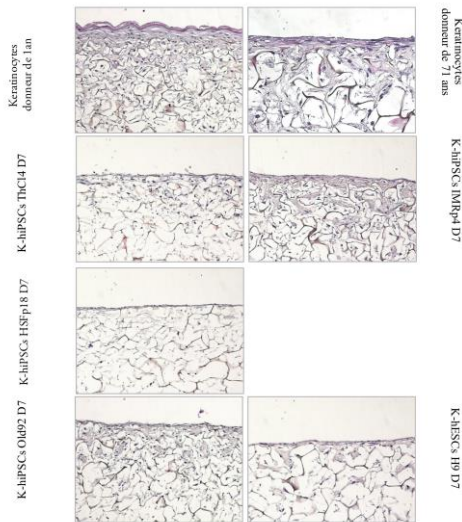


Figure 20 : Analyse histologique du potentiel de stratification en épiderme des kératinocytes dérivés de cellules souches pluripotentes au 7ème passage après induction de la différenciation. La reconstruction de peau est réalisée à partir d'un derme-équivalent constitué de chitosan-collagène et fibroblastes de prépuce humain et maintenue en culture jusqu'au 42ème jour (à l'exception de la condition contrôle de kératinocytes âgés de 71 prélevée au 35ème jour). Les kératinocytes humains contrôles sont issus de donneurs de 21 ans et de 68 ans. Coloration Hématoxyline-Eosine. Grossissement 20X. *Note : la lignée K-iPSCs HSFp4 D4 a été perdue au cours de cette expérience.*

Par ailleurs, aucune mise en place de ces techniques n'a pu être poursuivie car toutes les lignées qui présentaient une morphologie typique du type épithélial après l'induction ont, après quelques passages et un changement de lot de tapis nourricier, changé de phénotype tendant vers une morphologie de type dendritique (Figure 21). Nous développerons dans la discussion l'ensemble des observations présentées ici et nous tenterons de comprendre qu'aucun résultat concluant n'ait pu être obtenu.

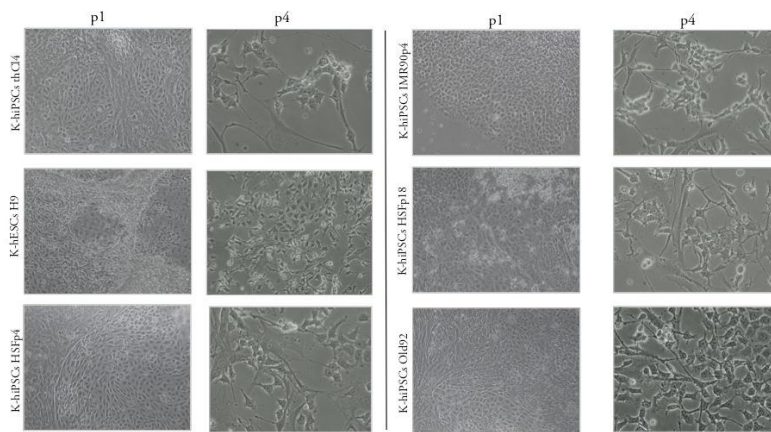


Figure 21 : Changement morphologique des cellules souches différenciées. Les photographies correspondent aux cellules souches pluripotentes humaines (hESCs et hiPSCs) après induction de la différenciation dans le lignage kératinocytaire. Au 1^{er} passage après l'induction de la différenciation (p1), les différentes lignées d'hiPSCs différenciées présentent une morphologie de type épithélial. Au 4^{ème} passage (p4), la morphologie des différentes lignées est dendritique, et les cellules sont moins cohésives. Kératinocytes différenciés à partir d'hESCs H9 ; K-hiPSCs-ThC14 : Kératinocytes différenciés à partir d'hiPSCs Thomson C14 ; K-hiPSCs -IMRp4 : Kératinocytes différenciés à partir d'hiPSCs IMR90p4 ; K-hiPSCs-HSF p4 : Kératinocytes différenciés à partir d'hiPSCs HSFp4 ; K-hiPSCs-HSFp18 : Kératinocytes différenciés à partir d'hiPSCs HSFp18 ; K-hiPSCs -Old92 : Kératinocytes différenciés à partir d'hiPSCs Old92. Microscope à contraste de phase. Grossissement 10X.

Discussion

Nous discuterons tout d'abord dans ce chapitre des résultats obtenus dans le cadre du rajeunissement cellulaire et qui a fait l'objet d'une publication annexée à ce manuscrit. Puis dans une seconde partie des différents protocoles de différenciation vers le lignage épidermal qui j'ai eu à tester afin d'aboutir à une stratégie adaptée à notre problématique du vieillissement. Nous discuterons enfin de l'intérêt d'une telle approche dans le cadre de l'étude du vieillissement ainsi que de l'intérêt d'un point de vue de thérapie cellulaire à partir d'hiPSCs et de leurs dérivés.

Reprogrammation de cellules somatiques sénescents issues de donneurs âgés :

Les dommages au niveau de l'ADN agissent comme des signaux responsables de l'induction de la sénescence cellulaire et, dans certains tissus et participent au vieillissement cellulaire (Moskalev, 2013). Cette entrée en sénescence des cellules découle essentiellement de l'activation du locus INK4/ARF. Cette activation va avoir pour conséquence l'activation des voies anti-prolifératives p16/Rb et p53/p21, qui vont toutes converger pour contribuer à un arrêt du cycle cellulaire. Il a été démontré que les cellules sénescents étaient réfractaires à la reprogrammation, et agissaient comme une barrière en faisant intervenir ces mécanismes qui limitent l'efficacité de reprogrammation. Depuis, de nombreuses études ont permis d'établir la possibilité de générer des hiPSCs à partir des cellules (saines ou pathologiques) issus de donneurs âgés, centenaires et sénescents grâce à des techniques plus robustes (Ohmine et al., 2012; Lapasset et al., 2011; Boulting et al., 2011; Kondo et al., 2013; Kudva et al., 2012; Israel et al., 2012; Okita et al., 2013; Wen et al., 2013; Yagi et al., 2012). Nos travaux ont apporté la première démonstration qu'il était en effet possible de franchir cette barrière de la sénescence cellulaire. Après avoir testé que l'utilisation du cocktail de Thomson (OSNL) ou du cocktail de Yamanaka ne permettait effectivement pas de reprogrammer des cellules en sénescence répliquative (OSKM), nous avons développé une stratégie de reprogrammation en hiPSCs en combinant les deux cocktails de gènes. La combinaison de ces deux groupes de gènes comprenant alors *OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *c-MYC*, *NANOG*, *LIN28* (OSKMNL). Cette combinaison permet d'améliorer l'efficacité de reprogrammation (Liao et al., 2008). Il est suggéré que la surexpression de NANOG permettrait de faciliter la reprogrammation en agissant sur p53, et que celle de LIN28 conduirait aux mêmes effets que l'inhibition de la voie p53/p21 ce qui résulterait sur une augmentation du taux de division cellulaire. L'association de ces deux effets conduirait donc à une accélération de la cinétique d'obtention des hiPSCs, ce qui suggère que l'addition de ces deux facteurs au cocktail classique de Yamanaka puisse en

effet augmenter l'efficacité de reprogrammation et permettrait d'obtenir des hiPSCs à partir de cellules sénescents. Avec cette combinaison, nous avons pu montrer qu'il était possible de générer des hiPSCs à partir de cellules issues de biopsies de donneurs jeunes et âgés (74, 92, 94, 96 et 101 ans) prolifératives ou amenées en sénescence. Les cellules hiPSCs produites n'étaient alors pas distinguables des cellules souches pluripotentes embryonnaires. Toutefois, il n'est pas exclu que parmi les 10 facteurs issus de la 2^{ème} sélection des travaux de Yamanaka ne puisse pas contenir une combinaison alternative conduisant aux mêmes effets que les 6 facteurs que nous avons utilisés.

Rajeunissement après redifférenciation d'hiPSCs dérivées de cellules somatiques sénescents issues de donneurs âgés.

En plus de la caractérisation de l'état pluripotent des cellules obtenues, il a été également mis en évidence au cours d'une différenciation dirigée en fibroblastes, que les cellules souches pluripotentes obtenues avaient effacé les marques initiales du vieillissement cellulaire, et présentaient un profil d'expression génique, un métabolisme mitochondrial, une longueur de télomères restaurée, comparables au profil de fibroblastes juvéniles, issues de cellules souches pluripotentes embryonnaires (Lapasset et al., 2011).

Afin de déterminer clairement le potentiel de différenciation de ces hiPSCs dans le cadre d'une étude comparative d'hiPSCs issues de patients âgés vs jeunes (Phanthong et al., 2013), nous avons dirigées les hiPSCs en différenciation afin de pouvoir obtenir des fibroblastes pouvant être comparés aux fibroblastes d'origine. Nous avons pu ainsi observer que les cellules présentaient un rajeunissement cellulaire dans leur potentiel prolifératif par un rallongement des extrémités télomériques ainsi que dans l'activité mitochondriale.

Développement d'un modèle d'évaluation d'une réversibilité du vieillissement tissulaire.

A partir de cette démonstration d'un rajeunissement cellulaire sur des fibroblastes humains, nous avons cherché à déterminer si un rajeunissement pouvait également être observé au niveau tissulaire. Pour cela, le modèle tissulaire que nous avons choisi est la peau car les critères morphologiques sont bien décrits. Afin d'atteindre cet objectif, nous nous sommes appuyés sur les protocoles déjà décrits sur l'engagement des cellules souches embryonnaires pluripotentes en kératinocyte et la reconstruction épidermique *in vitro* et *in vivo* (Guenou et al.

2009 ; Itoh et al. 2011 ; Metallo et al. 2010b). Aucun protocole utilisant les hiPSCs n'existaient alors, et initialement ainsi la mise en place du premier protocole avec des cellules souches pluripotentes obtenues par reprogrammation cellulaire.

Pour cela, le premier objectif a été de maîtriser la culture primaire de kératinocytes humains et les techniques de caractérisation des kératinocytes. La coculture de kératinocytes avec la lignée de fibroblastes embryonnaires murins 3T3-J2 est adaptée de la technique de culture développée par Rheinwald et Green (Rheinwald and Green, 1975). Cette technique de culture favorise la survie et la prolifération des kératinocytes dans des conditions de culture contenant 10% de sérum et une organisation en colonie au sein de laquelle les kératinocytes vont se diviser toutes les 26h-27h. Ces kératinocytes humains que nous avons cultivés, ont été extraits de prélèvements humains (biopsie) à partir de peau de prépuce d'un donneur de 3 ans. Par la suite, des kératinocytes humains de donneurs de 19 ans et 68 ans ont suivi le même procédé de culture avec 3T3-J2. En parallèle, des fibroblastes humains issus de prépuce de donneur de 3 ans arrêtés en prolifération (par irradiation ou de manière chimique avec la mitomycine) ont été utilisés comme tapis nourricier de coculture. Enfin, la culture des kératinocytes en milieu commercial Epilife ou KSFM (Keratinocytes Serum Free Medium) qui consiste à cultiver les kératinocytes dans un milieu sans sérum et sans adsorption de protéine (directement sur plastique) a également été développée.

A. Développement d'un modèle de différenciation de cellules souches pluripotentes humaines en kératinocytes :

Par la suite, nous avons cherché à développer un protocole de dérivation de cellules souches pluripotentes humaines en kératinocytes exprimant la cytokératine 14, sur la base de plusieurs protocoles différents existant dans le but d'obtenir un modèle tissulaire qui nous permettrait d'étudier les mécanismes moléculaires du vieillissement au sein du tissu. Pour ce faire, nous avons utilisé plusieurs de nos lignées d'hiPSCs précédemment décrites. Afin de mener une étude comparative de tissu issus de la différenciation spécifique, nous avons sélectionné les lignées de cellules souches obtenues à partir de fibroblastes de différents âges décrites dans la précédente étude, à savoir embryonnaires, de patients de 74 ans et 92 ans, sénescents ou prolifératifs.

Un des grands challenges de la biologie des cellules souches est d'identifier des méthodes de différenciation efficace pour pouvoir générer les lignages cellulaires somatiques fonctionnels. De nombreux facteurs de croissances et de molécules de signalisation peuvent induire la différenciation des cellules souches embryonnaires humaines. Cependant, une réponse spécifique et adéquate dépend du temps, de la concentration, de la combinaison des facteurs utilisés, ce qui implique qu'une population pure de progéniteurs d'un lignage spécifique soit difficile à obtenir. De nombreuses études tentent néanmoins d'étudier les différentes voies de signalisation impliquées dans le développement embryonnaire et d'en développer des modèles d'études *in vitro*. Dans l'ensemble des protocoles existants, notamment ceux que nous avons utilisés comme base de travail pour le développement de notre modèle, deux facteurs sont principalement utilisés pour dériver des cellules souches épidermiques en kératinocytes. D'autres protocoles utilisent l'acide ascorbique en complément du BMP4. Le BMP4, un membre de la famille des TGF β (Transforming Growth Factor β) joue un rôle important dans la régulation du destin des cellules chez les mammifères. L'acide rétinoïque est impliqué dans la régulation du destin des cellules souches et joue un rôle pléiotropique dans le développement. L'acide ascorbique est connu comme un anti-oxydant, mais il va également pouvoir agir en favorisant la synthèse de collagène, et la survie (Coraux et al. 2003) mais aussi la différenciation des kératinocytes en absence de l'acide rétinoïque (Guenou et al. 2009).

Les différentes études de différenciation de cellules souches pluripotentes en kératinocytes qui ont pu être développées utilisent le morphogène BMP4 (Bone Morphogenic Protein 4) comme inducteur central du lignage épidermique. Cette utilisation s'appuie sur les nombreuses études qui ont été menés sur les différents lignages au cours du développement embryonnaire. De ces études de nombreuses voies ont pu être décrites, et l'une des plus caractéristique semble être la voie des BMPs (Sasai et al., 1995). La première démonstration du rôle de cette voie a été révélée grâce à des études menées sur le modèle du Xénope. Dans ces travaux, il est observé que l'engagement vers le lignage épidermique du Xénope était possible grâce à des gradients de certains facteurs provenant de la notochorde et intervenant dans les processus de l'organisation des territoires de l'embryon (De Robertis and Kuroda, 2004; Hemmati-Brivanlou and Thomsen, 1995; Wilson and Hemmati-Brivanlou, 1995). Ils montrent que lorsque des cellules d'ectoblastes sont isolées et mises en présence de BMP4, les cellules se différencient en cellules épidermiques, tandis qu'en absence de BMP4, les cellules se dirigent naturellement vers la formation de cellules neuronales (De Robertis and Kuroda, 2004; Hemmati-Brivanlou and Thomsen, 1995). Ces expériences suggèrent donc qu'au cours

du développement, la différenciation neurale est un processus par défaut et confirment ainsi les travaux initiés par Hemmati-Brivanlou (Hemmati-Brivanlou and Thomsen, 1995). En présence de BMP4, cette voie par défaut est bloquée en faveur de l'induction de la formation de la voie épidermale. Ces résultats ont été plus tard confirmés par l'utilisation de différents modèles animaux et de différents outils permettant de bloquer l'expression du BMP4, et qui montrent un engagement neuronal au détriment d'un engagement épidermique (Hawley et al., 1995; Metallo et al., 2008; Sasai et al., 1995). Enfin, l'addition de BMP4 semble également dépendre de sa concentration et du moment où est initiée la différenciation. Il a en effet été montré que sa présence durant les premières étapes de différenciation conduisait à promouvoir la différenciation épidermale (Kawasaki et al., 2000) à des concentrations comprises entre 10 et 100 ng/mL (Hemmati-Brivanlou and Thomsen, 1995) avec un effet optimale dans une intervalle de temps comprise entre le 4^{ème} jour et le 8^{ème} jour d'induction en culture (Coraux et al. 2003).

L'acide rétinoïque est un dérivé de la vitamine A agissant comme un puissant régulateur de la prolifération cellulaire et de la différenciation. Il a été montré qu'il était capable *in vitro* d'inhiber la différenciation terminale des kératinocytes en agissant sur l'expression de l'isoforme $\Delta Np63$ impliqué dans la différenciation terminale des kératinocytes (Bamberger et al., 2002; Metallo et al., 2008) favorisant ainsi un état prolifératif des kératinocytes. Par ailleurs, l'acide rétinoïque semble aussi induire l'expression de p63, marqueur décrit dans l'état souche des kératinocytes et important dans la morphogénèse de l'épiderme (Chen and Lohnes, 2005; Mills et al., 1999). L'acide rétinoïque intervient aussi au cours de nombreux processus du développement notamment dans le développement de l'épiderme (Saitou et al., 1995) ou encore dans le lignage neuronal où il intervient dans la formation du neuroectoderme (Li et al., 2005). Ainsi, l'acide rétinoïque est utilisé en routine comme un agent de différenciation. Il est à noter que dans certaines études *in vitro*, l'acide rétinoïque semble être utilisé afin de dériver les cellules souches embryonnaires vers un lignage plutôt neuronal qu'épidermal (Pankratz et al., 2007). De ce constat, l'équipe du Dr Palecek, a cherché à déterminer si la spécification d'un lignage plutôt qu'un autre pouvait être sous tendu par un effet de la concentration de l'acide rétinoïque ou bien si cela était dû à sa présence à un stade particulier de la différenciation. En testant différentes concentrations, ils observent qu'à de faibles concentrations d'AR ($<10^{-6}$ M), la différenciation était en faveur d'une voie neuronale, tandis qu'à des concentrations de 1 μ M cela favorisait une induction significative des kératinocytes. A cela, ils observent aussi qu'il

existe un effet important de l'application de l'AR dans les premières étapes de la différenciation pour favoriser une dérivation vers la voie kératinocytaire (Metallo et al., 2008).

Les réponses cellulaires du BMP4 et de l'acide rétinoïque sont complexes et dépendent du contexte dans lequel ils agissent. Ces facteurs peuvent individuellement interagir avec de nombreux partenaires (Dabelsteen et al., 2009; Green et al., 2003; Guenou et al., 2009; Iuchi et al., 2006; Kidwai et al., 2013; Metallo et al., 2010a; Torres et al., 2012), mais il a été montré qu'ils agissaient aussi de manière synergique pour potentialiser leurs effets de spécification du lignage notamment pour orienter les cellules vers un destin épidermique (Metallo, 2008).

En 2009, l'équipe de Gilles Waksman, propose la possibilité de différencier des cellules souches embryonnaires humaines en kératinocytes suivant la chronobiologie des kératinocytes au cours du développement. Ils montrent que les kératinocytes qu'ils obtiennent expriment les différents marqueurs principalement retrouvés au niveau des kératinocytes, et surtout que ces kératinocytes sont fonctionnels car capables de reconstituer, par culture organotypique sur insert en polycarbonate, un épiderme pluristratifié comparable à une reconstruction épidermique à partir de kératinocytes primaires (Guenou et al., 2009). Pour obtenir ces résultats, cette équipe a développé un protocole où les cellules souches embryonnaires humaines sont induites en différenciation avec du BMP4 et de l'acide ascorbique durant 40 à 60 jours, sans passage, jusqu'à isolement de colonies de kératinocytes similaires à des kératinocytes normaux et exprimant entre autres la cytokératine 14 et la cytokératine 5. Bien qu'avec un temps de culture long et fastidieux, ce travail a été le point de départ de ce projet où le premier objectif était de reproduire ce protocole à partir de l'une de nos lignées dérivées de fibroblastes sénescents d'un donneur de 74 ans (hiPSCs HSFp18). Après plusieurs tentatives où une forte mortalité était observée et une difficulté de maintenir les colonies d'hiPSCs en culture sur une aussi longue période, ce protocole s'est avéré être validé sur des hESCs mais non transposable aux hiPSCs (communication orale de l'un des auteurs) et par conséquent inapproprié pour notre étude qui nécessitait une application sur plusieurs lignées d'hiPSCs.

Au démarrage du projet, notre choix du protocole était restreint par l'absence de protocole démontrant la possibilité de dériver des kératinocytes à partir d'hiPSCs. Or, en 2011, l'équipe d'A. Christiano propose pour la première fois un protocole permettant de générer des

kératinocytes à partir d'hiPSCs et permettant de former un épiderme pluristratifié vers lequel nous nous sommes orientés (Itoh et al., 2011).

Ce protocole présentait également les avantages de proposer un temps d'induction de différenciation plus court permettant d'obtenir des kératinocytes qui expriment les marqueurs spécifiques p63 et la cytokératine 14, et qui sont capables de former un épiderme pluristratifié. Dans cette étude, l'équipe du Dr Christiano a tout d'abord généré des hiPSCs par reprogrammation rétrovirale en utilisant les facteurs c-Myc, Sox2, Oct4, et Klf4 (telle que décrit par Takahashi et al. en 2007) sur des fibroblastes de prépuce humain sain et sur des fibroblastes dermiques issus de donneurs porteurs d'une pathologie cutanée (l'épidermolyse bulleuse). Après une caractérisation complète de leur état pluripotent, ces hiPSCs ont été dérivées en kératinocytes par l'utilisation d'un milieu d'induction constitué d'un milieu de culture de kératinocytes défini commercial (KSFM, Keratinocytes Serum Free Medium), du BMP4 et de l'acide rétinoïque durant 4 jours sur support de matrigel, puis maintenus en culture en KSFM durant 26 jours additionnels en absence de BMP4 et de l'acide rétinoïque. A la fin du processus de différenciation de 30 jours, les kératinocytes obtenus ont étéensemencés sur un support de collagène et de fibronectine, amplifiés, et transférés en culture organotypique en interface air/liquide sur insert en polycarbonate constitué d'une latticede collagène et fibroblastes. Les différents essais que j'ai menés sur la base de ce protocole m'ont permis d'obtenir des cellules dont la morphologie est de type épithélial. Après maintien en culture, une forte mortalité constante et importante tout le long de la culture est observée ce qui créait un microenvironnement trop néfaste pour les cellules. Cet environnement composé de débris cellulaires acidifiant entre autres le milieu de culture était en effet inapproprié car susceptible de générer un stress au niveau des cellules en cours de différenciation. Ainsi stressées, les cellules ne sont pas à même de poursuivre un processus de différenciation normal. Ceci pourrait expliquer que nous ne soyons pas parvenus à obtenir des kératinocytes de morphologie comparable à des kératinocytes normaux malgré les différentes répétitions expérimentales.

Nous nous sommes alors tournés vers les travaux de l'équipe de Palecek qui propose un protocole de différenciation proche de celui d'A. Christiano en utilisant aussi comme inducteurs de différenciation le BMP4 et l'acide rétinoïque. Il diffère cependant dans le milieu d'induction ainsi que sur le temps d'induction. Ils parviennent à obtenir une population de cellules composés de près de 90% de kératinocytes exprimant la cytokératine 14 (contre 45% pour le protocole de Itoh et al. et atteignant 70% après le premier passage, et 60% pour le protocole de Guenou et al. en fin de différenciation). Pour cela les cellules souches embryonnaires humaines

sont induites pendant 7 jours avec un milieu d'induction constitué de DMEM/F12, de supplément N2 (composé d'insuline, de progestérone, d'apotransferrine, de sélénine et de putrescine), ainsi que du BMP4 et de l'acide rétinoïque. En fin d'induction, les auteurs proposent deux options pour poursuivre le processus de différenciation. Soit de le poursuivre sans passage et en maintenant les cellules en culture dans du milieu défini commercial KSFM. Soit en effectuant un premier passage au bout des 7 jours d'induction et en poursuivant la culture des cellules sur support de gélatine dans du milieu défini commercial. Dans un cas ou dans l'autre, les kératinocytes obtenus au 30^{ème} jour expriment la cytokératine 14 et le marqueur nucléaire p63 spécifique des cellules hautement prolifératives. Dans le cadre de ce protocole, j'ai pu observer que les cellules présentaient un profil de type épithélial dès le 3^{ème} jour d'induction. Nous étions également en présence d'une mortalité durant la phase d'induction du processus de dérivation relative à une sélection cellulaire, au-delà de cette phase, aucune mortalité n'est observée. Au cours de la 2^{ème} phase (sans induction au BMP4 et l'acide rétinoïque), nous avons choisi d'expérimenter les 2 options proposées. Dans la 1^{ère} option, j'ai maintenu les cellules en culture en milieu défini commercial jusqu'au 30^{ème} jour et j'ai pu observer que les cellules présentaient progressivement un profil de cellules entrant en sénescence (étalement des cellules) qui pourrait être confirmé par un marquage β -galactosidase. Dans la 2^{ème} option, après passage enzymatique à la dispase, les cellules sont maintenues en culture et sont au bout de quelques jours passées d'un aspect épithélial à un aspect fibroblastique où les cellules présentaient une morphologie allongée à croissance comparable à une culture de fibroblastes classiques. Or les fibroblastes et les kératinocytes ont des cinétiques de prolifération totalement différentes. Les fibroblastes prolifèrent beaucoup plus rapidement que les kératinocytes ce qui empêcheraient une croissance linéaire des kératinocytes pouvant être présents au sein de la population de cellules pour pouvoir les isoler. La gélatine est formée de l'hydrolyse du collagène un des constituants majeurs de la matrice extracellulaire nécessaire à l'ancrage des kératinocytes, ce qui exclurait en soi son impact sur cette dérivation en fibroblastes. En revanche, le stress des passages associé à la perturbation du passage d'un support de matrigel à un support de gélatine nécessitant un temps d'adaptation pourrait favoriser une transition épithélio-mésenchymateuse des cellules encore instable du fait de leur phase de transition en différenciation.

Ces deux protocoles décrits démontrent tous deux qu'il est possible de dériver des kératinocytes à partir de cellules souches pluripotentes capables d'exprimer la cytokératine 14 et de générer un épiderme pluristratifié sur insert en polycarbonate.

Dans un cas, il s'agit d'un protocole applicable uniquement aux hESCs dont la différenciation en kératinocytes semble mettre en avant une récapitulation de la chronobiologie de la formation de kératinocytes à partir de cellules souches embryonnaires humaine au cours du développement. Le processus de différenciation *in vitro* s'étend sur 40 jours voire 60 jours avec une induction de la différenciation avec le BMP4 et l'acide ascorbique. Pour cela, ce protocole nécessite une coculture des cellules en différenciation avec un support cellulaire (tapis nourricier constitué de fibroblastes murins 3T3-J2) et un milieu avec sérum dont les facteurs vont favoriser la prolifération et la différenciation des kératinocytes. Le deuxième protocole quant à lui démontre son application avec des hiPSCS. Sur la base d'un support biologique acellulaire, ils parviennent à dériver des kératinocytes avec une période d'induction avec le BM4 et l'acide rétinolique sur un temps très court avec une formation des kératinocytes exprimant la kératine 14 en 30 jours.

De manière routinière, les cellules épidermiques humaines normales sont cultivées sur une couche nourricière de cellules murines dont la prolifération est arrêtée. L'utilisation de 3T3-J2 apporte un soutien mécanique pour le maintien des kératinocytes en colonie et leur assure un site d'ancrage, *via* la matrice extracellulaire permettant de mimer l'équivalent de la lame basale retrouvée sur un épiderme *in vivo*. L'utilisation des fibroblastes 3T3-J2 est très commune compte tenu de leur disponibilité, mais également car il s'agit du premier modèle cellulaire qui a permis la culture de kératinocytes tout en limitant la prolifération de fibroblastes et prévenant l'invasion des kératinocytes (Bisson et al., 2013; Thomson et al., 1998). Cette technique de culture assure surtout la survie des kératinocytes et leur prolifération, grâce à des facteurs présents dans le sérum (Bagutti et al. 2001 ; Schuldiner et al. 2000), et sécrétés par les 3T3-J2 qui ne sont pas retrouvés qu'en nombre réduit dans les milieux commerciaux, conférant aux kératinocytes un doublement de population (DP) très supérieur en comparaison à un milieu défini (98 DP contre 14 à 33 DP selon le milieu défini) (Bisson et al., 2013).

Les milieux de culture commerciaux proposés aujourd'hui offrent l'avantage de pouvoir cultiver les kératinocytes de manière exempt de coculture avec ces cellules murines. Or, ils présentent l'inconvénient de vite engager les kératinocytes vers le processus de différenciation et de les mener trop rapidement en différenciation terminale et/ou en sénescence (Bisson et al.,

2013; Metallo et al., 2010a). Dans un souci de pouvoir maintenir les cellules en expansion avec un haut potentiel prolifératif, j'ai cherché à développer les conditions expérimentales qui permettraient de différencier les cellules souches embryonnaires et à pluripotence induite en une population de kératinocytes d'un haut potentiel prolifératif. Le maintien des cellules sur des passages longs nous permettrait de pouvoir mener les cellules en sénescence répllicative dans une perspective de pouvoir en analyser les caractéristiques moléculaires liées à cette sénescence (longueur de télomères, expression de β -galactosidase et des protéines p16 et p21...) en fonction de l'âge du donneur et des passages en culture.

C'est pourquoi nous avons au cours de ce projet, pris le parti d'appliquer la méthode de culture utilisant un tapis nourricier afin de pouvoir maintenir suffisamment longtemps les cellules en culture et en expansion (de 14 à 18 passages contre 5-6 passages en milieu défini). Ainsi pour pouvoir parvenir à notre objectif, et en absence d'une ligne directrice précise des protocoles existants, la mise au point de notre protocole a nécessité de tester différents paramètres de culture, notamment les conditions d'oxygène, le mode de passage des cellules, et le stade de différenciation où les cellules pouvaient être passées.

L'oxygène peut agir comme un signal extracellulaire. L'épiderme utilise des niveaux d'oxygène inférieurs en comparaison aux tissus des organes internes et est capable de capter l'oxygène de l'air ambiant. En culture, ceci se traduit par des niveaux élevés d'oxygène qui induisent la différenciation des cellules épidermales en culture, tandis que des concentrations d'oxygène inférieur à 5% induit la prolifération (Bragulla and Homberger, 2009). Ainsi, pour parvenir au résultat souhaité, les conditions de culture en hypoxie (5% d'oxygène) et normoxie (20% d'oxygène) pendant l'induction, mais également pendant la phase d'induction terminale (2^{ème} phase du protocole) ont été testées. De nos observations, une condition à 5% d'O₂ permettait de ne pas déstabiliser les cellules souches pluripotentes et favoriser une induction optimale. En effet, le transfert de cellules pluripotentes de leur condition initiale de culture (5% d'O₂) à 20% d'O₂ nécessite une phase d'adaptation durant laquelle une dérivation des cellules en fibroblastes ou neurones peut-être observée. Afin de maintenir les colonies d'hESCs et d'hiPSCs stables et homogènes nous sommes arrivés à la conclusion qu'une condition à 5% d'O₂ permettrait une différenciation spécifique vers un unique lignage de manière homogène sous l'effet des inducteurs jusqu'à l'obtention de cellules épithéliales. En fin d'induction, les cellules épithéliales obtenues sont amenées à maturité par passage sur tapis nourricier et

enincubation à 20% d'oxygène durant toute la phase de différenciation terminale selon les conditions de culture des kératinocytes normaux connues et utilisées en routine.

Afin de définir les conditions de passage optimales, nous avons testé les deux techniques de passage enzymatique, la trypsine utilisée pour les kératinocytes normaux, et la dispase aux effets clivants plus doux que la trypsine (Sinclair et al., 2013). Après traitement à la dispase en fin d'induction, les cellules maintenues à 5% d'O₂ présentaient la morphologie attendue mais une croissance lente, tandis qu'à 20% d'O₂ les cellules se rapprochaient de kératinocytes normaux. Les mêmes conclusions ont pu être observées selon les mêmes paramètres mais après traitement à la trypsine.

Ainsi, parmi les 9 conditions évaluées (cf. Approches expérimentale : Tableau 7), et décrites précédemment dans la partie des approches expérimentales, les conditions N°4 et N°9 ont été les plus concluantes, où nous avons effectivement pu observer des colonies apparaître. Cette population cellulaire dérivée présente une morphologie cellulaire comparable à des kératinocytes humains issus de biopsie.

De plus, par analyse immunocytochimique nous avons pu observer qu'une fois différenciées, toutes les lignées dérivées des cellules pluripotentes ainsi que les souches embryonnaires humaines exprimaient un marqueur structural des kératinocytes basaux ainsi qu'un marqueur structural des kératinocytes suprabasaux. Ainsi, à leur état prolifératif, nous avons choisi d'utiliser la protéine de structure la cytokératine 14. Ce marqueur cytoplasmique a en effet été fortement impliqué dans le renouvellement permanent de l'épiderme et est notamment retrouvé au niveau de la couche basale de l'épiderme. Après avoir quitté la couche basale et s'être engagées dans leur programme de différenciation, les kératinocytes expriment normalement la cytokératine 1. L'analyse a pu montrer que les kératinocytes dérivées de nos lignées hiPSCs et hESC exprimaient toutes cette protéine. En plus de leur morphologie, nous avons pu ainsi déterminer que le protocole de dérivation des cellules souches pluripotentes humaines que nous avons développé présentait des caractéristiques moléculaires communes à des kératinocytes normaux. La capacité proliférative de ces lignées a également été évaluée. J'ai pu montrer que ces cellules pouvaient être cultivées en culture pendant au moins 8 passages (environ 53 doublements de population) en milieu FAD sur 3T3-J2 sans perdre leur phénotype.

B. Evaluation du potentiel clonogénique des kératinocytes dérivés d'hiPSCs par observation directe et comptage manuel :

L'étape suivante a été de déterminer quel est le potentiel de prolifération de ces cellules, et ainsi déterminer si ces cellules présentaient un potentiel à former des colonies. Pour analyser ce potentiel, la méthode la plus probante est le test de clonogénicité. Ce test de clonogénicité permet d'évaluer la capacité proliférative d'une population de kératinocytes afin d'en déduire son potentiel prolifératif. Les conditions de culture développées pour la première fois par Barrandon Y. et Green H. consistent à ensemercer des kératinocytes (100, 500 ou 1000 cellules isolées) dans des conditions permettant de distinguer 3 types de clones (ou colonies). Les holoclones, cellules à fort potentiel prolifératif, les paraclones, cellules partiellement différenciées à faible potentiel prolifératif, et les méroclones au profil de prolifération intermédiaire. La taille et la morphologie des colonies issues d'une cellule permettent, par observation directe une corrélation avec le potentiel prolifératif et/ou le stade de différenciation. Les colonies constituées de kératinocytes hautement prolifératif (état dit souche ou progéniteurs) seront de grande taille et de circonférence régulière, et les colonies plutôt constituées de kératinocytes différenciés ou engagés dans le programme de différenciation auront une taille plus limitée aux contours plus irréguliers (Barrandon and Green, 1987). En plus d'être une approche qualitative, cette méthode permet une analyse quantitative qui définit l'efficacité de formation des colonies (CFE : Colony-Forming Efficiency) qui décrit le taux de colonies formées par rapport au nombre de cellules isolées ensemençées, ou encore le nombre de colonies formées (CFU : Colony-Forming Units) par comptage direct des colonies observées. Dans un contexte expérimental utilisant des kératinocytes à faible passage et de donneur jeune, la proportion d'holoclones pouvant être générée se situe approximativement à 25%. Dans notre cas, suite à un détachement et une mortalité accrus des 3T3-J2 en cours d'expérimentations, une stratégie alternative de culture pour l'application du protocole a dû être adoptée. Ce choix s'est notamment imposé après avoir procédé à différents tests de contrôles afin de définir la source d'un tel détachement. Après avoir exclu la présence d'une contamination, et après s'être assuré que les éléments composants le milieu n'étaient pas en cause, nous avons testé différents lots de 3T3-J2. Sans succès, nous avons dû alors adopter une stratégie alternative pour la culture des kératinocytes et la mise en place du test de clonogénicité. Pour cela, nous nous sommes appuyés sur les travaux du Dr O. Damour, qui démontrent que l'utilisation de fibroblastes humains comme tapis nourricier pour la culture des kératinocytes est comparable à celle de l'utilisation de 3T3-J2 (Bisson et al., 2013). Ainsi, en

adaptant le protocole de Barrandon Y. et Green H., l'analyse du potentiel clonogénique des cellules dérivées d'hiPSCs a permis l'observation d'un nombre important de colonies de petite taille au cours des passages (2^{ème} au 8^{ème} passage) semblant plutôt correspondre à des paraclones. La même observation a pu être faite avec les kératinocytes contrôles jeunes où un profil d'holoclones était attendu. De ce constat, nous avons émis l'hypothèse que l'utilisation d'un tapis nourricier de cellules humaines allogéniques pouvait conduire les cellules vers le programme de différenciation. C'est ainsi que nous avons conduit chacune de nos lignées d'hiPSCs vers une différenciation dirigée en fibroblastes que nous avons utilisés comme tapis nourricier avec les K-hiPSCs correspondantes. Nous avons ainsi pu observer que les colonies formées étaient moins nombreuses avec un plus grand diamètre répondant aux critères de diamètre minimum définissant les holoclones. Bien que les résultats ne reflètent pas ce qui étaient attendus, il s'agit là de la seule démonstration à notre connaissance ayant permis de caractériser les cellules de type kératinocytaire dérivées d'hiPSCs avec ce test, et montrer qu'elles étaient capables de former des colonies et ce même après 8 passages.

Une optimisation des conditions de culture est à présent nécessaire, afin de pouvoir exécuter tout le processus expérimental de différenciation et d'amplification des cellules sur un tapis nourricier unique et validé. Ceci permettra de définir le réel profil prolifératif des cellules au cours des passages excluant l'influence de tous facteurs stressants provenant de la manipulation des cellules ou du changement de l'environnement de culture. Les efforts de mise au point de cette technique reste à poursuivre vers l'obtention d'un protocole approprié et standardisé pour notre étude.

D'autant plus que nous avons constaté qu'une perturbation des conditions de culture ont conduits nos kératinocytes différenciés de cellules souches pluripotentes vers un changement de phénotype en adoptant une morphologie dendritique avec la perte des jonctions cellulaires. Ce changement phénotypique suggère une instabilité des cellules et/ou une susceptibilité importante aux transitions épithélio-mésenchymateuses. Les différentes études proposant des protocoles de différenciation dans le lignage épidermales et sur lesquels nous nous sommes appuyés ne font pas état de ces observations.

Ils seraient donc intéressants d'évaluer ces protocoles sur la durée afin d'en déterminer la stabilité sur de longs temps de culture. La seule démonstration apportée que des kératinocytes obtenus après différenciation ne pouvaient être maintenus suffisamment longtemps en culture a été apportée par les travaux de Palecek où décrit une entrée en sénescence des cellules dès le 4^{ème} passage après le début de l'induction en différenciation

(Metallo et al., 2010b). Dans un cas ou dans l'autre, il est donc important de poursuivre les efforts afin de développer une stratégie de différenciation optimisée et standardisée permettant d'obtenir des kératinocytes pouvant être maintenues sur de longue période en culture sans risque de changement phénotypique ou d'entrée en sénescence prématurée. Dans ce sens, il est important de considérer les observations apportées par Selekmán et al. (2013) qui ont analysées l'effet de la densité de cellules utilisée pour mener un programme de différenciation vers le lignage épidermale. L'induction de la différenciation avec une densité inférieure à 6500 cellules/cm² conduit au 7^{ème} jour d'induction à la formation d'une population de cellules constituée entre autres de cellules mésenchymateuses avec absence d'expression d'E-cadhérine ou p63. A une densité \geq à 6500 cellules/cm², la population de cellules est essentiellement constituée de cellules épithéliales exprimant la E-cadhérine et dont plus de 95% des cellules expriment la cytokératine 18 et p63 (Selekmán et al., 2013). Une stratégie de différenciation optimisée associée à une purification rigoureuse permettrait l'obtention d'une population pure de kératinocytes. Parvenir à un tel résultat nécessiterait également une sélection de marqueurs spécifiques. A l'heure actuelle, l'ensemble des études s'oriente à utiliser les marqueurs p63, CK5/14 et Lam-332 pour caractériser les kératinocytes prolifératifs, or ces marqueurs sont également retrouvés au niveau des glandes mammaires, des cellules trachéobronchiales et de l'urothélium (Dabelsteen et al., 2009).

C. Développement d'un modèle de peau reconstruite :

L'ingénierie tissulaire contribue au développement de nouvelles reconstructions tridimensionnelles. La reconstruction de peau repose sur l'isolement de cellules humaines ayant de grandes capacités de prolifération et de renouvellement (Beauparlant, 2001).

L'une des autres approches du projet consistait à mettre en évidence les propriétés fonctionnelles de ces kératinocytes dérivés en démontrant leur capacité à générer un épiderme pluristratifié *in vitro*, et de pouvoir en évaluer les caractéristiques morphométriques et moléculaires. Au cours du vieillissement, l'une des caractéristiques principales retrouvée au niveau de la peau est une réduction de l'épaisseur de l'épiderme. La reconstruction de peau à partir de kératinocytes dérivés d'hiPSCs générés de donneurs âgés prolifératifs ou sénescents nous permettrait d'évaluer le potentiel de stratification de ces cellules. Pour cela, différents modèles de reconstruction d'épiderme ont été explorés parmi ceux décrits dans la littérature.

Le premier modèle d'épiderme différencié reconstruit *in vitro* développé consistait à l'ensemencement de kératinocytes sur un derme humain mortifié désépidermisé (DED pour Dead de-Epidermized Dermis). Ce support biologique acellulaire présente l'avantage de préserver l'essentiel des composants de la jonction dermo-épidermique et ainsi apporter une zone d'ancrage optimale afin de favoriser une différenciation épidermique plus importante et une reconstruction épidermique proche de ce que l'on peut observer *in vivo* (Prunieras et al., 1983). Les premiers essais que nous avons menés avec ce type de modèle, nous a en effet permis d'apprécier une stratification des kératinocytes contrôlés testés. Cette stratification n'était cependant pas uniforme sur l'ensemble de la surface, et présentait l'inconvénient d'observer un agencement et une prolifération dans les invaginations constituant l'emplacement des follicules pileux. Depuis, de nombreux modèles commerciaux ont été mis au point proposant la mise en culture des kératinocytes sur des supports synthétiques constitué d'une membrane en polycarbonate montée sur un insert (Rosdy and Clauss, 1990). La mise en application d'un tel modèle, nous a rapidement permis de constater que l'absence d'une réelle lame basale pour l'ancrage des kératinocytes ne permettait pas d'obtenir de stratification. Afin de favoriser l'adhésion et la prolifération et la différenciation des kératinocytes, ce type de support a évolué vers de nouveaux modèles où ce type de support synthétique et inerte est recouvert d'un support d'origine biologique, le collagène retrouvé en grande quantité au niveau de la lame basale de la jonction-épidermique et participant à l'ancrage des cellules de la couche basale de l'épiderme (Tinois et al., 1991). Expérimentalement, aucune lame basale bien défini n'a pu être observée, et les stratifications probablement mal ancrées n'ont pu être observées.

La plupart des supports tentant de mimer un derme assurant l'ancrage et la prolifération des kératinocytes vers un épidermique pluristratifié ont évolué vers l'utilisation de substrats dermiques récapitulant les composants essentiels retrouvés dans le derme. Ces nouveaux modèles de dermes « reconstruits » suggèrent l'ensemencement de kératinocytes à la surface de matrice de (lattice) de collagène (Bell et al., 1979), ou encore sur des éponges de collagène (Berthod and Damour, 1997). Dans le modèle de matrice de collagène (de type I), des fibroblastes sont intégrés, puis s'y organisent en remaniant le collagène jusqu'à contraction du collagène dont la polymérisation et l'organisation finale forme un derme-équivalent. Ainsi, dans un cas ou dans l'autre de ces deux modèles de derme-équivalent reconstruit, l'ensemencement et la culture de kératinocytes en interface air/liquide permet de conduire à la formation de peaux reconstruites dites entières, avec épiderme et un derme composé de fibroblastes ainsi que d'une lattice de collagène (Bell, 1979; Pigeon, 2005; Prunieras, 1983) ou

composé d'éponges de collagène (Saintigny et al., 1993; Shahabeddin et al., 1990). L'utilisation d'une matrice de collagène intégrant les fibroblastes assurant la synthèse de la matrice extra-cellulaire testée nous a permis d'observer une stratification des cellules après 15 jours de culture. Or, l'une des premières constatations qui a pu être faite est le détachement de l'épiderme de la matrice de collagène, suggérant un faible ancrage des cellules de la couche basale du fait d'une absence d'une jonction dermo-épidermique. Le support à base d'éponges de collagène (biopolymères à base de collagène) est constitué essentiellement de chondroïtine-4-sulfate, de chondroïtine-6-sulfate, de collagène de type I et III et de chitosan. Ce modèle développé par le laboratoire du Dr O. Damour, ne permet aucune contraction du collagène à l'état inerte. En revanche, après réhydratation de l'éponge et ensemencement de fibroblastes, ces cellules vont d'une part permettre la réorganisation de l'éponge, mais également assurer la production de la matrice extracellulaire, formant ainsi un derme-équivalent. Ces modèles figurent parmi les quelques modèles où les fibroblastes assurent la synthèse de la matrice extra-cellulaire sans support matriciel pré-existant. L'utilisation de l'acide ascorbique dans le milieu de culture favorise la prolifération des fibroblastes ainsi que la synthèse de la matrice extra-cellulaire (Michel et al., 1999 ; Philips et al., 1994). En collaboration avec le laboratoire du Dr O. Damour, les kératinocytes de donneurs jeune et âgé, ainsi que ceux dérivés d'hiPSCs, ont été testés sur ces supports. Aucune stratification convaincante n'a pu être observée aussi bien sur les contrôles que sur les cellules issues de différenciation, malgré le temps long de culture en air/liquide qui aurait pu permettre une stratification complète avec l'apparition d'une couche cornée, ainsi que l'utilisation de milieu FAD favorisant la prolifération des kératinocytes.

Ainsi, sur l'ensemble des modèles de reconstruction d'épiderme testés, nous avons pu constater la difficulté de l'approche à générer un épiderme pluristratifié compatible avec notre sujet, ce qui ne nous permet pas de conclure sur le potentiel fonctionnel de nos cellules dérivées.

D. Conclusion :

Durant cette thèse, nous avons développé un protocole de différenciation in vitro permettant d'obtenir une population de kératinocytes à partir de cellules souches embryonnaires humaines, de cellules souches pluripotentes établies par reprogrammation de fibroblastes prolifératifs embryonnaires, postnataux, de donneurs âgés de 74 ans et 92 ans et ainsi que de fibroblastes sénescents de donneur âgé de 74 ans. Chaque lignée dérivée a montré une adaptation stable en coculture selon les conditions décrites et utilisées en routine pour les

kératinocytes normaux durant 8 passages. La caractérisation moléculaire de ces lignées a montré une expression des cytokératines 14 et 1 ce qui révèle une population de cellules prolifératives pouvant entrer dans un processus de différenciation. Ce résultat est à corréler à leur capacité à former des colonies où on a pu observer qu'elles étaient plutôt de type paraclone. Bien que cela n'ait pas pu être observé en culture air/liquide, nous avons pu observer une stratification au centre de la colonie en condition de culture en immersion.

Le modèle de peau reconstruite selon la méthode d'assemblage semble prometteur. Cependant, la manipulation des cellules pour l'ensemencement des cellules constitue un signal de stress pour les kératinocytes qui les engage dans leur programme de différenciation, et par conséquent par une perte du potentiel prolifératif qui se répercute essentiellement sur le potentiel de stratification. C'est pourquoi il est nécessaire de considérer l'utilisation d'un tel modèle avec précaution, et de concentrer les efforts à développer un modèle de peau où les conditions de culture permettraient de maintenir un potentiel prolifératif optimal dans le cadre de reconstruction de peau. S'il est certain qu'il est aujourd'hui possible de générer un épiderme pluristratifié fonctionnel, décrits par certains auteurs de type foetal (Coraux et al. 2003), il ne s'agit pas d'un tissu complet comparable à un épiderme *in vivo*. Il serait intéressant de déterminer l'impact d'un épiderme reconstruit au sein de la peau, et inversement l'impact de l'environnement tissulaire sur le potentiel de renouvellement de cet épiderme reconstruit notamment en considérant l'origine cellulaire des hiPSCs.

Nous avons vu que les cellules étaient capables d'un changement morphologique passant d'un type épithélial à un type plutôt mésenchymateux. La détermination de la source de cette instabilité permettrait de pouvoir agir sur ce changement phénotypique. La reprogrammation cellulaire pour la formation des hiPSCs est facilitée selon le type cellulaire utilisée. Et même si l'ensemble des équipes génèrent aujourd'hui des hiPSCs à partir des fibroblastes, il a été décrit que l'utilisation de kératinocytes pour la formation d'hiPSCs permet une augmentation de l'efficacité de reprogrammation (Aasen et al. 2008). De la même manière que nous l'avons effectué dans la précédente étude avec une reprogrammation à partir de fibroblastes et une redifférenciation en fibroblastes pour une étude comparative, il serait intéressant de dériver hiPSCs sans intégration virale à partir de kératinocytes (jeunes et âgés), puis de les redifférencier en kératinocytes pour pouvoir ainsi comparer les deux populations selon les différents critères que nous nous sommes fixés. Ceci permettrait peut-être d'assurer une stabilité phénotypique aux cellules et de déterminer s'il existe une mémoire phénotypique. Une analyse caryotypique stricte afin de vérifier qu'aucune aberration chromosomique au cours

de la manipulation des cellules est également nécessaire afin d'exclure toute instabilité ou transformation.

CONCLUSION GENERALE et PERSPECTIVES :

Ainsi, au cours du vieillissement cellulaire, et du vieillissement cutané notamment, les cellules subissent de nombreuses transformations, signes précurseurs d'une entrée en sénescence et synonyme à terme d'une perte de fonctionnalité du tissu. C'est pourquoi modéliser et comprendre les mécanismes cellulaires, physiologiques ou pathologiques, associés au vieillissement et la sénescence sont un enjeu aussi bien médical que sociétal et même économique. Bien que de nombreuses questions restent ouvertes, plusieurs études ont cependant permis une avancée considérable dans ce domaine. Ceci a été, entre autre possible grâce à l'extraordinaire potentiel apporté par la reprogrammation des cellules somatiques dont la technologie n'a cessé d'évoluer. Nos travaux, ont même pu faire état d'un effacement des marques du vieillissement et d'un rajeunissement des cellules issues de patients âgés et sénescents alors même que la sénescence était décrite comme une barrière à la reprogrammation cellulaire. L'opportunité unique d'une telle ressource technologique dans l'étude des mécanismes du vieillissement ouvre également de nombreuses voies vers la compréhension de modèles pathologiques associés au vieillissement, avec la possibilité additionnelle de pouvoir proposer aux patients des applications thérapeutiques concrètes. La poursuite de ces travaux menés sur une différenciation spécifique en kératinocytes vers une reconstruction organotypique d'un épiderme permettrait de voir s'il est possible de faire état d'un tel rajeunissement au niveau tissulaire. L'utilisation de ce potentiel des cellules souches pluripotentes comme ressource biologique dans le cadre de protocoles de thérapie cellulaire cutanée mais également comme outil pour étudier les mécanismes moléculaires tissulaires et/ou impliqués dans la formation d'un tissu tel que l'épiderme chez l'humain est un véritable défi. Que ce soit dans le domaine du vieillissement, de la dermatologie, ou de ces deux domaines à la fois, l'utilisation de cellules hiPSCs et des progéniteurs qui en dérivent, présentent un grand champ d'application. L'utilisation d'une telle approche dans le cas d'une pathologie telle que cela a été fait dans le cas de la dégénérescence maculaire associée à l'âge, en est un exemple probant, où les recherches intenses dans ce domaine ont pu être concrétisées par un premier essai clinique chez l'Homme autorisé en septembre 2014 pour l'équipe du Pr Yamanaka S., mené par le Dr Takahashi K.

Ce premier essai clinique utilisant la technologie des hiPSCs sur une patiente de 70 ans atteinte de dégénérescence maculaire liés à l'âge afin de faire la preuve de son utilisation possible en thérapie cellulaire est en cours et continue à être suivi. Récemment, le 12 septembre 2015, un an après cette première greffe, les premières conclusions rapportent que la patiente n'a présenté à ce jour aucune complication ou anomalie clinique ainsi qu'aucun signe de cancer lié à ces cellules dérivées. D'un point de vue sensoriel, la patiente ne présente non plus aucune aggravation dans la détérioration de sa vue, et décrit même une amélioration et un élargissement de sa vision. Notons néanmoins, que lors de la programmation d'un second essai clinique sur un autre patient, une analyse des cellules a mis en évidence des mutations qui ont conduit à l'arrêt des essais utilisant ces cellules.

A ce jour d'autres essais cliniques sont en cours qui laissent aussi penser de l'importance de continuer à développer cette technologie jusqu'à l'associer à une correction génique dans un cadre thérapeutique. Dans ce sens la technologie de correction génique appelée CRISPR existe déjà et apporte des résultats encourageants sur des souris atteintes de déranocytose qui ont pu être traitées avec succès après transplantation de cellules hématopoïétique dérivées d'hiPSCs ayant subi une correction génique (Hanna et al., 2007).

ANNEXES :
Informations supplémentaires
à l'article Lapasset et al. 2011

SUPPLEMENTAL INFORMATIONS

SUPPLEMENTAL FIGURE LEGENDS

Figure S1. Cell cycle profile of 74 proliferative and replicative senescent fibroblasts

(A-B) Cell cycle distribution analyzed by FACS using PI staining in 74 P and 74S fibroblasts. **(A)** Representative FACS results. **(B)** Cell cycle distribution. Shown are the results of two independent experiments performed in duplicate. Error bar show the range. **(C-D)** Senescence markers in 74-year-old proliferative (74P) and senescent (74S) cells. **(C)** Images of SA- β -gal stained cells. **(D)** Increase of p21^{CIP1} and p16^{INK4A} protein expression in 74S cells compared to 74P cells. Western blot analysis using β -actin, as a loading control. Percentage of positive cells are indicated in the inset.

Figure S2. Reprogramming Efficiency

(A-B) Reprogramming efficiency was analyzed 35 days after infection with 4 factors (OCT4, NANOG, SOX2, LIN28) or 6 factors (4 factors supplemented with KLF4 AND c-MYC) on 74P and S cells using alkaline phosphatase staining. **(A)** Representative alkaline phosphatase staining. **(B)** Percentage of reprogramming efficiency. Shown are the results of two independent experiments performed in duplicate. Error bar show the range.

Figure S3. Reprogramming of IMR90 proliferative and replicative senescent fibroblasts

(A) Senescence markers in IMR90 proliferative (Fib IMR90 P) and senescent (Fib IMR90 S) fibroblast. (1) Images of SA- β -gal stained cells. Percentage of SA- β -gal-positive cells is indicated in insert. (2) Increase of p21^{CIP1} and p16^{INK4A} protein expression in IMR90 S cells compared to IMR90 P cells. Western blot analysis using β -actin as a loading control. (3) Detection of SAHF by indirect immunofluorescence of H3K9me3 (red) and Hoechst (blue) in proliferative, senescent and transduced senescent IMR90 cells (IMR90 S inf) by the six factors. Note, seven days after transfection, no SAHF were detected. **(B)** iPSCs derived colonies from IMR90 proliferative and senescent fibroblasts generated by the six factors show strong immunoreactivity for surface markers (TRA-1-60 and SSEA-4). **(C)** Quantitative RT-PCR analysis of endogenous expression

levels of pluripotency markers in iPSCs derived from IMR90 cells compared to parental cells. Human ES cells (H1 and H9) and iPSC IMR90 clone 4 (iPSC TH 4) cells were used as controls. Transcript levels were normalized to GAPDH expression. Error bars indicate standard deviations from duplicate experiments. **(D)** Bisulfite sequencing analysis of the *OCT4* and *NANOG* promoter regions showing demethylation in iPSCs generated from proliferative and senescent IMR90 cells (lower panel) compared to parental fibroblasts (upper panel). Numbers on the left of each column indicate CpG localization relative to the transcriptional start site.

Figure S4. Additional treatments do not allow reprogramming with 4 factors

(A) Quantitative RT-PCR analysis of transgene transcripts expression in senescent 74-year-old cells (74S) after transduction by the four gene set used by Thomson JA (*OCT4*, *SOX2*, *NANOG*, and *LIN28*) or by our six gene set (*OCT4*, *SOX2*, *NANOG*, *LIN28*, *c-MYC* and *KLF4*). Transcript levels were normalized to GAPDH expression. Error bars indicate standard deviations from duplicate experiments. **(B)** Quantitative RT-PCR analysis of endogenous transcript expression in senescent 74-year-old cells (74S) 30 days after transduction by the four gene set used by Thomson JA (*OCT4*, *SOX2*, *NANOG*, and *LIN28*) alone (-) or in combination with VPA, 5-aza-dC, Wnt3A or BIO or by our six genes set (*OCT4*, *SOX2*, *NANOG*, *LIN28*, *c-MYC* and *KLF4*). Endogenous transcripts expression of the iPSC 74S Cl F, selected from the 74S reprogramming assay with 6 factors is shown. Transcript levels were normalized to GAPDH expression. Shown are the results of two independent experiments performed in duplicate. Error bar show the range.

Figure S5. Demethylation of CpG in the *OCT4*, *NANOG* promoter regions in reprogrammed centenarian-derived cells

Bisulfite sequencing analysis of *OCT4* and *NANOG* promoter regions showing demethylation in iPSCs from extremely aged, 92-, 94-, 96- and 101-year-old donors, compared to parental fibroblasts.

Figure S6. iPSC characterization of reprogrammed centenarian-derived cells

(A) Colonies of iPSCs generated by six factors show strong immunoreactivity for surface markers (TRA-1-60 and SSEA-4). **(B)** *In vitro* differentiation experiments of iPSCs generated by 6 factors reveal their potential to generate cell derivatives of all three primary germ cell layers.

Immunofluorescence analysis shows expression of endoderm (SMA, upper panel), ectoderm (MAP2, middle panel) and mesoderm (FoxA2, lower panel) markers. Hoechst labelling was used for nuclear staining (blue). Two independent clones are shown.

Figure S7. Disappearance of the senescence markers p21^{CIP1} and p16^{INK4A} in derived iPSCs from senescent and aged donor fibroblasts

Western blot of senescence markers from the indicated cell lines, showing no protein expression of p21^{CIP1} and p16^{INK4A} in iPSCs derived from IMR90 (A) and aged donor fibroblasts (B).

Figure S8. Telomere size resetting

Mean terminal restriction fragment (TRF) size analysis of iPSCs by Southern blot showing telomere size elongation compared to H9 hESC and parental fibroblasts in IMR90 (A) and aged donor's fibroblasts (B). Distances are in kilobases (Kbp).

Figure S9. Variations in telomere lengthen through reprogramming

Telomere southern blot in iPSC 74P Cl A, iPSC 74S Cl M and iPSC 101 Cl 4 showing telomere length increased compared to H9 hESC.

Figure S10. Karyotypes analysis

R-banded karyotypes and metaphase plates from hiPSC lines IPSC 74P Cl H, IPSC 74S Cl F and IPSC 96 Cl 1, showing the normal 46, XY chromosomal constitution.

Figure S11. Teratomas

Histological analysis of teratomas from iPSC 74P Cl H, iPSC 74S Cl F and iPSC 96 Cl 1, showing structures from all three germ layers.

Figure S12. Quantitative RT-PCR analysis of transgene transcripts expression in iPSCs derived from old donor fibroblasts

Extinction of transgenes was revealed whereas endogenous genes were activated with specific primers (Supplementary Table 4). Transcript levels were normalized to GAPDH expression. Error bars indicate standard deviations from duplicate experiments.

Figure S13. Regulation of specific associated pluripotency genes expressed in hESCs and iPSCs

Heat map showing 73 upregulated probsets from the study of Guenther et al. (Guenther et al. 2010) (fold change superior to 100) in pluripotent cells compared to fibroblasts. Cells used here are iPSCs and hESCs, proliferative and senescent 74- and 96-year-old fibroblasts and their corresponding iPSCs (Supplementary Table 2). Expression data were ordered by the magnitude of differential expression between pluripotent cells (hESCs or iPSCs) and fibroblast cells.

Non supervised hierarchical clustering depicting genes associated with telomere metabolism in 74P, 74S and 96-year-old corresponding iPSCs in comparison with iPSCs and hESCs of the generated data set (Supplementary Table 2).

Figure S14. Global gene expression analysis

Non supervised hierarchical clustering of the global gene expression profiles in fibroblasts, iPSCs, hESCs and 74- and 96-year-old fibroblasts and their corresponding iPSCs.

Figure S15. Regulation of specific genes associated with telomere metabolism and maintenance in hESCs and iPSCs

Hierarchical clustering depicting genes associated to telomere metabolism (Vaziri et al. 2010) in 74P, 74S and 96-year-old corresponding iPSCs in comparison with iPSCs and hESCs of the the generated data set (Supplemental Table 2). Each gene is represented by their corresponding probsets.

Figure S16. hTERT gene expression

hTERT expression based on microarray analysis on iPSC 96 Clone 1, iPSC 74P Clone H, iPSC 74S Clone F, parental fibroblasts and hESC 4, hESC 5 from the Compendium facility (see Supplemental Table 2).

Figure S17. Telomere-specific quantitative fluorescence in situ hybridization (Q-FISH) in iPSC and hESC H1 nuclei preparations

(A) Representative images of interphasic nuclei showing easily discernible fluorescent telomere spots, labelled with FITC. (B) Mean fluorescence intensity (F.I.) of telomeres in the 3 iPSC lines iPSC 96 Clone 1, iPSC 74P Clone H, iPSC 74S Clone F and the control hESC H1 line. The difference in telomere spot intensities was statistically significant ($P < 0.05$) between hESC H1 cells and iPSC lines. The fluorescence intensity detected is directly proportional to the size of telomere repeats. Bars indicate standard deviations from duplicate experiments.

Figure S18. Regulation of specific genes associated with oxidative stress and mitochondrial functions in hESCs and iPSCs.

Hierarchical clustering depicting transcripts related to the oxidative stress and to mitochondrial biogenesis (Prigione et al. 2010) in fibroblasts, iPSCs and hESCs of the compendium, 74P, 74S and 96-year-old fibroblasts and their corresponding iPSCs. Each gene is represented by the average of signals of their corresponding probsets.

Figure S19. Reprogramming of mitochondrial function in iPSCs derived from IMR90P and IMR90S cells.

JC-1 fluorescence. Red fluorescence indicates a normal membrane potential and green fluorescence indicates mitochondrial membrane depolarization. A decrease in the ratio of red/green fluorescence determined by FACS analysis is a measure of the extent of mitochondrial membrane depolarization. iPSC mitochondrial membrane potential is compared to H1 hESC line used as control for reprogramming of mitochondrial physiology. Experiments performed in triplicate. +/- SD for standard deviation.

Figure S20. Resetting of mitochondria mass

Quantitative real-time PCR measuring the relative levels of mtDNA versus nuDNA in iPSC 96 Clone 1, iPSC 74P Clone H, iPSC 74S Clone F and parental fibroblasts representative of the mitochondrial mass relative of the number of cells. Shown are the results of two independent experiments performed in duplicate, presented as A. U. Error bar show the range.

Figure S21. Electron microscopy of iPSC clones for Mitochondria visualization

iPSCs generated from aged proliferative or senescent fibroblasts present similar mitochondrial morphology and distribution to the H1 hESC line.

Figure S22. Telomere attrition

TRF analysis of iPSCs derived fibroblasts in proliferation PD 10 and in replicative senescence (PD 58, 60) compared to the corresponding iPSCs, hESC H9 and proliferative post-natal fibroblasts HFFSM3; TRF length is in kilobases (Kbp).

Figure S23. Regulation of specific genes associated with oxidative stress and mitochondrial functions in parental fibroblasts and corresponding iPSC-derived fibroblasts.

Non supervised hierarchical clustering restricted to oxidative stress and mitochondrial biogenesis transcripts (Prigione et al. 2010) with iPSCs re-differentiated into fibroblasts, their 74P, 74S and 96-year-old parental fibroblasts, post-natal fibroblasts and embryonic fibroblasts differentiated from H1 hESC (Supplemental Table 2). Each gene is represented by the average of signals of their corresponding probsets.

Supplemental Table 1: STR Analysis

DNA fingerprinting was performed on 74P, 74S and 96-year-old fibroblasts and their corresponding iPSCs by analyzing 15 polymorphic short tandem repeat (STR) DNA loci, which confirmed genetic identity of iPSC lines to parental fibroblasts.

	D8S1179	D21S11	D7S820	CSF1P0	D3S1358	TH01	D13S317	D16S539	D2S1338	D19S433	vWA	TPOX	D18S51	D5S818	FGA
74 P	11-14	30-30	10-12	10-11	14-16	07-08	11-12	08-13	18-25	12-13	17-19	08-08	15-15	11-11	24-26
74 S	11-14	30-30	10-12	10-11	14-16	07-08	11-12	08-13	18-25	12-13	17-19	08-08	15-15	11-11	24-26
96	10-14	30-33,2	09-09	10-11	17-17	06-07	11-11	10-13	23-23	14-14	17-18	08-08	12-19	12-12	21-24
iPSC 74 P Cl H	11-14	30-30	10-12	10-11	14-16	07-08	11-12	08-13	18-25	12-13	17-19	08-08	15-15	11-11	24-26
iPSC 74 S Cl F	11-14	30-30	10-12	10-11	14-16	07-08	11-12	08-13	18-25	12-13	17-19	08-08	15-15	11-11	24-26
iPSC 96 Cl 1	10-14	30-33,2	09-09	10-11	17-17	06-07	11-11	10-13	23-23	14-14	17-18	08-08	12-19	12-12	21-24

Supplemental Table 2: Description of cell lines used in this study.

Non public microarray data generated for this study (temporary GSE27924) are in green.

CELL LINE	CELL TYPE	GEO
hESC 1	Human Embryonic Stem Cells	GSM 194308
hESC 2	Human Embryonic Stem Cells	GSM 194307
hESC 3	Human Embryonic Stem Cells hESC HS181	GSM 452691
hESC 4	Human Embryonic Stem Cells hESC HD90	GSM 388581
hESC 5	Human Embryonic Stem Cells hESC HD83	GSM 388638
hESC 6	Human Embryonic Stem Cells hESC HS235	GSM 452261
hESC 7	Human Embryonic Stem Cells hESC HD129	GSM 388636
iPSC 1	Human induced Pluripotent Stem Cells	GSM 257521
iPSC 2	Human induced Pluripotent Stem Cells	GSM 248205
iPSC 3	Human induced Pluripotent Stem Cells	GSM 248203
iPSC 4	Human induced Pluripotent Stem Cells	GSM 257522
iPSC 5	Human induced Pluripotent Stem Cells	GSM 245339
iPSC 6	Human induced Pluripotent Stem Cells	GSM 248217
iPSC 7	Human induced Pluripotent Stem Cells	GSM 257520
iPSC 8	Human induced Pluripotent Stem Cells	GSM248216
iPSC 9	Human induced Pluripotent Stem Cells	GSM 245342
iPSC 10	Human induced Pluripotent Stem Cells	GSM 257523
Fib 1	Human neonatal dermal fibroblasts	GSM 288878
Fib 2	Human neonatal dermal fibroblasts	GSM 29027
Fib 3	Human neonatal dermal fibroblasts	GSM 257524
Fib 4	Human neonatal dermal fibroblasts	GSM 245341
Fib 5	Fibroblasts from HESC differentiation	GSM 248204
Fib 6	Fibroblasts from HESC differentiation	GSM 248202
Fib 7	Fibroblasts from HESC differentiation	GSM 248201
Fib 8	Human neonatal fibroblasts HFF SM3	GSM689442
Fib 74P	Proliferative 74-year-old fibroblasts	GSM689395
Fib 74S	Senescent 74-year-old fibroblasts	GSM689396
Fib 96	Proliferative 96-year-old fibroblasts	GSM689384
Fib IMR90P	Proliferative IMR90 fibroblasts	GSM797977
iPSC 74P C1 H	iPSC from 74P fibroblasts	GSM689366
iPSC 74S C1 F	iPSC from 74S fibroblasts	GSM689383
iPSC 96 C1 1	iPSC from 96 fibroblasts	GSM689384

iPSC IMR90P Cl C	iPSC from IMR90P fibroblasts	GSM797978
<i>Dif</i> iPSC 74P Cl H	Fibroblasts from iPSC differentiation	GSM689064
<i>Dif</i> iPSC 74S Cl F	Fibroblasts from iPSC differentiation	GSM689409
<i>Dif</i> iPSC 96 Cl 1	Fibroblasts from iPSC differentiation	GSM689441

Supplemental Table 3: Rejuvenated mitochondrial function in fibroblasts re-differentiated from iPSCs

JC-1 fluorescence ratio determined by FACS analysis of fibroblasts from differentiated iPSCs compared to hESC H1 that had been differentiated into embryonic fibroblasts. Experiments performed in triplicate. +/- SD for standard deviation.

	Ration Red/Green JC-1
Diff hESC H1 into Fibroblast	0.79 ± 0.12
Diff iPSC 74P Cl-H into Fibroblast	0.80 ± 0.14
Diff iPSC 74S Cl-F into Fibroblast	0.66 ± 0.11
Diff iPSC 96 Cl-1 into Fibroblast	0.72 ± 0.14

Supplemental Table 4: Primers used in this study

Primer	Sequence (5' to 3')	Applications
GAPDH-S	CTC TGC TCC TCC TGT TCG AC	GAPDH quantitative RT-PCR
GAPDH-AS	ACG ACC AAA TCC GTT GAC TC	
end OCT4-S	CCT GTC TCC GTC ACC ACT CT	Endogene OCT4 quantitative RT-PCR
end OCT4-AS	GGC ACA AAC TCC AGG TTT TC	
end SOX 2-S	GAA AGA AAG GGA GAG AAG TTT GAG	Endogene SOX2 quantitative RT-PCR
end SOX 2-AS	GCA AAC TGG AAT CAG GAT CAA	
end NANOG-S	TTG GAA GCT GCT GGG GAA G	Endogene NANOG quantitative RT-PCR
end NANOG-AS	GAT GGG AGG AGG GGA GAG GA	
end LIN 28-S	AAT CTC AGG GAT AGC CAG CA	Endogene LIN28 quantitative RT-PCR
end LIN 28-AS	CTC TCC ACG GTG GCA AAA	
end REX 1-S	GGC CTT CAC TCT AGT AGT GCT CA	Endogene REX1 quantitative RT-PCR
end REX 1-AS	CTC CAG GCA GTA GTG ATC TGA GT	
end KLF4-S	ACA CTG TCT TCC CGA TGA GG	Endogene KLF4 quantitative RT-PCR
end KLF4-AS	TGG GAA CTT GAC CAT GAT TG	
end C-Myc-S	GAG ATC CGG AGC GAA TAG G	Endogene C-MYC quantitative RT-PCR
end C-Myc-AS	GCT ATG GGC AAA GTT TCG TG	
tr OCT4-S	TAT GGG AGC CCT CAC TTC AC	Transgene OCT4 quantitative RT-PCR
tr OCT4-AS	TAG ATG CAT GCG GAT CCT TC	
tr SOX 2-S	ACC TCC GGG ACA TGA TCA GC	Transgene SOX2 quantitative RT-PCR
trSOX 2-AS	GCA TGC GGA TCC TTC GAA CT	
tr NANOG-S	TTG GAA GCT GCT GGG GAA G	Transgene NANOG quantitative RT-PCR
tr NANOG-AS	GCC CTA GAT GCA TGC GGA TCC	
tr LIN 28-S	GCA TCA GCC ATA TGG TAG CC	Transgene LIN28 quantitative RT-PCR
tr LIN 28-AS	GCA TGC GGA TCC TTC GAA CT	
tr C-MYC-S	AAG AGG ACT TGT TGC GGA AA	Transgene C-MYC quantitative RT-PCR
tr C-MYC-AS	TTT CCT TAC GCG AAA TAC GG	
tr KLF4-S	GAC CAC CTC GCC TTA CAC AT	Transgene KLF4 quantitative RT-PCR
tr KLF4-AS	TTT CCT TAC GCG AAA TAC GG	
bi OCT4-S	TAG TTG GGA TGT GTA GAG TTT GAG A	Bisulfite sequencing
bi OCT4-AS	TAA ACC AAA ACA ATC CTT CTA CTC C	
bi NANOG-S	GAG TTA AAG AGT TTT GTT TTT AAA AAT TAT	Bisulfite sequencing
bi NANOG-AS	TCCCAAATCTAATAATTATCATATCTTTC	

ND5-S	AGG CGC TAT CAC CAC TCT GTT CG	mtDNA Copy Number
ND5-AS	AAC CTG TGA GGA AAG GTA TTC CTG	
CF-S	AGC AGA GTA CCT GAA ACA GGA A	mtDNA Copy Number
CF-AS	AGC TTA CCC ATA GAG GAA ACA TAA	

SUPPLEMENTAL MATERIALS AND METHODS

Cell culture

Cells from aged donors were obtained from the Coriell Institute for Medical Research (NJ, USA). H9 and H1 human embryonic stem cells were obtained from the WiCell Research Institute (WI, USA). Human primary fibroblasts were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Invitrogen) containing 10% heat-inactivated Fetal Bovine Serum (FBS, PAA), 2 mM L-Glutamine, 1% penicillin and streptomycin (all from Invitrogen).

Human ES cells and iPSCs were maintained on mitomycin-C treated OF-1 mouse embryonic fibroblasts (MEF) in KnockOut DMEM culture medium supplemented with 20% KnockOut serum replacement, 0.1 mM non-essential amino acids, 2 mM L-glutamine (all from Invitrogen), 0.1 mM β -mercaptoethanol and 10 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF, Peprotech). Feeder-free culture on matrigel (BD Biosciences) with chemically defined mTeSR (Stemcell technologies) medium was as previously described (Ludwig et al. 2006).

Generation of human iPSCs

Lentiviral vectors containing cDNAs of human *OCT4*, *SOX2*, *NANOG* and *LIN28* genes were obtained from Addgene and previously described by Yu et al., *KLF4* and *C-MYC* cDNAs were subcloned into the same vector backbone from vectors described by Takahashi et al., (Takahashi et al. 2007; Yu et al. 2007). The 293T cell line (Invitrogen) was used to produce transgene-expressing lentiviruses. Human primary fibroblasts were seeded at 2×10^5 cells per 35 mm dish one day before transduction. Equal amounts of supernatants containing each of the six lentiviruses were mixed, transferred to the fibroblast dish, and incubated overnight. Twenty-four hours after transduction, the lentivirus-containing medium was replaced with the second supernatant. Six days after transduction, fibroblasts were harvested by trypsinization and replated in a 100 mm dish on a feeder layer. The next day, medium was replaced with hESCs medium supplemented with 10 ng/ml bFGF. The medium was changed every other day. Thirty to forty days after transduction, colonies were picked and transferred into 35 mm dish on a feeder layer with 2 ml of hESC medium supplemented with 10 ng/ml bFGF.

Flow cytometry analysis

Cells were analyzed with a FACS Calibur II (BD Biosciences). To analyze the cell cycle, trypsinized cells were fixed with cooled 70% EtOH for at least 15 min at 4°C. Fixed cells were centrifuged and resuspended in PBS before staining with Propidium Iodide (10 µg/ml) plus RNase A (250 µg/ml) for 30 min and analysis by flow cytometry.

Senescence-Associated β -Galactosidase assay

Senescence-Associated β -Galactosidase activity was detected as previously described (Matsuura et al. 2007). Briefly, fixed cells were immersed in X-Gal staining solution (pH 6.0) (2 mM MgCl₂, 150 mM sodium chloride, 5 mM potassium ferricyanide, 5 mM potassium ferrocyanide, and 1 mg/ml X-gal, pH 6.0). After incubation in the dark at 37°C for 16–18 h, cells were washed in PBS and observed using bright field microscopy at 10 \times magnification. SA-beta-GAL-positivity was quantified by manual counting and expressed as the percent of positive cells over the total cells counted.

Immunoblot analysis

The cells were lysed with RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40 (NP-40), 1% sodium deoxycholate, and 0.1% SDS), supplemented with 'protease inhibitor cocktail' (Sigma). Protein extracts were resolved by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes (Hybond-C Extra, Amersham Biosciences). Membranes were blocked in 5% milk powder, 0.05% Tween-20 in PBS (PSBT) for 1 h and incubated with primary antibodies at 4°C overnight. After washing with PBST, membranes were incubated with either anti-mouse or anti-rabbit secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase (HRP) for 1 hr at room temperature. Signals were detected with 'chemiluminescent' (Thermo Scientific). Antibodies used for detection were anti-p21 (1:500, SC469, Santa Cruz Biotechnology), anti-p16 (1:500, SC467, Santa Cruz Biotechnology), anti- β -actin (1:20000, AC-74, Sigma), anti-mouse IgG-HRP (1:10000, 0867428, MP Biomedicals), anti-rabbit IgG-HRP (1:10000, 0861202, MP Biomedicals).

In vitro differentiation assays

For *in vitro* differentiation, embryoid bodies (EBs) were generated from iPSCs by harvesting cells and seeding them onto low-attachment dishes in differentiating medium corresponding to hESC culture medium without bFGF supplementation. One week later, EBs were plated onto gelatin-coated tissue culture dishes and grown for an additional 2 weeks into the differentiating medium.

For differentiation into fibroblast-like cells iPSCs were cultured in differentiating conditions for one week. Undifferentiated colonies were then manually removed and fibroblast-like cells were grown in DMEM medium with 10% FBS and subcultured according to regular fibroblast cell culture protocols.

Reprogramming efficiency

Reprogramming efficiency was analyzed 35 days after infection with 4 factors (OCT4, NANOG, SOX2, LIN28) or 6 factors (4 factors supplemented with KLF4 AND c-MYC) on 74P and 74S cells. Alkaline phosphatase staining was performed using the Quantitative Alkaline Phosphatase ESC characterization Kit (Millipore) following manufacturer's instructions.

Teratoma formation assay

For the teratoma formation assay, between 2 to 3 X 10⁶ undifferentiated cells were injected into rear leg muscles of NOD/SCID mice. Tumors were resected 2 to 4 months after injection and fixed in 4% paraformaldehyde in PBS before paraffin embedding. Sections were subjected to hematoxylin and eosin staining before analysis under microscope (Nikon 90i, Champigny sur Marne, France).

Karyotypes

Colonies were cultured in media containing 0.1mg/ml colcemide for 16 hours at 37°C, 5%CO₂. Colonies were then mechanically isolated and transferred into fresh hESC media. After centrifugation at 1000 rpm for 10 min, the pellet was carefully re-suspended with hypotonic solution (0.075 M KCl). Cells were incubated for 20 min at 37°C and then fixed with 1ml of cold fixative solution (methanol glacial acetic acid 3:1). The fixing procedure was repeated 3 times. Finally, the pellet was re-suspended in a final volume of 1ml of fixative. The cells were dropped

onto cleaned glass microscope slides, and processed for R-banding according to standard cytogenetic procedure. At least 25 metaphases were analyzed for each cell line using a conventional microscope and the IKAROS-software (Metasystems).

Immunofluorescence analysis

Cells were fixed in 4% (w/v) paraformaldehyde for 20 min. An additional permeabilization step (0.2% (v/v) Triton X-100 in PBS) was performed prior to staining with antibodies for internal cell markers. Incubation in 1% (w/v) bovine serum albumin was then performed to block nonspecific antibody binding. Cells were incubated with primary antibodies overnight and secondary antibodies for 30-60 min. Antibodies used in this study were anti-SSEA-4 (1:200, MAB4304, Millipore), anti-TRA-1-60 (1:200, MAB4360, Millipore), anti-MAP2 (1:200, MAB3418, Millipore), anti-Smooth Muscle Actin (1:200, CBL171, Millipore), anti-FoxA2 (1:200, AB40874, Abcam), anti-mouse and anti-rabbit IgG-FITC conjugated (1:50000, Invitrogen). The nuclei were stained with Hoechst 33342 (Sigma). For senescence analysis, H3K9me3 antibody (Santa Cruz Biotechnology) was used as recommended.

Bisulphite sequencing

Genomic DNA (500 ng) was treated with EZ-DNA Methylation Kit (Zymo Research) according to the manufacturer's recommendations. The promoter regions of the human *Oct3/4* and *Nanog* genes were amplified by PCR. The PCR products were subcloned into the pGEM-T Easy vector system (Promega). Blue-white selection was applied to eliminate false positives, and 10 random clones were picked and verified by sequencing with the T7 universal primer. Primer sequences used for PCR amplification were provided in Supplemental Table 4.

RNA preparation and analysis

RNA was extracted using RNeasy Mini Kit (Qiagen). 1 µg of total RNA of each sample was used for reverse transcription, which was performed as described in the manufacturer's instructions (Superscript II kit, Invitrogen). Gene expression analysis was performed using Sybr Green PCR master mix (Sigma). All primers are detailed in Supplemental Table 4. cDNA of hESCs was used as relative reference and the expression of interested genes was normalized to that of GAPDH expression in all samples.

Microarray analysis

Total RNA was extracted from hESC or iPSC colonies and fibroblast cells with RNeasy MiniKit (Qiagen). The quality of each purified RNA sample was checked with NanoDrop Agilent BioAnalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). An average of 2 µg of total RNA from each sample was prepared and hybridization with Affymetrix HG-U133 Plus 2.00 GeneChip (Santa Clara, CA) was performed according to the manufacturer's protocol. This microarray contains 54,656 probes corresponding to 47,400 human transcripts. Hybridized probes were scanned at a resolution of 3 µm using a confocal scanner (Affymetrix GeneChip Scanner 3000 7G). Affymetrix microarrays were processed in the Microarray Core Facility of the Institute for Research in Biotherapy of Montpellier (<http://irb.chu-montpellier.fr/>).

Affymetrix GeneChip data analysis and filtering

Data were normalized with the GeneChip Operating Software (GCOS) algorithms. Then, the converted digital intensity values were stored as image data files and converted into cell intensity files using the Microarray Affymetrix Software 5.0 (MAS5). MAS5 labels each transcript as “present” (P), “marginal” (M) or “absent” (A) by taking into account the average difference value calculated between the perfect match (PM) and the mismatch (MM) as detailed in the Affymetrix Genechip procedure (www.Affymetrix.com). A p-value risk was associated with the signal intensity. For each gene, the mean signal expression and standard deviation (SD) were calculated.

Gene profiling

The gene expression profile of each group was established using the Cluster and Treeview software programs.

Quantification of mtDNA Copy Number

mtDNA copy number was quantified as previously described (Prigione et al. 2010) Primer sequences are reported in Supplemental Table 4.

Mitochondrial membrane potential

Mitochondrial membrane potential was measured with the cationic dye JC-1 (Molecular Probes/Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations. Briefly, cells were incubated with 0.77 μ M JC-1 for 20 min and washed with HBSS. Fluorescent probes were detected by immunofluorescence microscopy or FACS. For FACS analysis, the fluorescence at 585 nm (FL2) and 525 nm (FL1) was measured for the JC-1 treated cells as well as the mock-treated cells. To correct for autofluorescence, the FL2 and FL1 values from the JC-1-treated cells were subtracted with those from the mock treated cells. The $\Delta\Psi_m$ was determined by dividing the corrected FL2 value by the corrected FL1 value as a pertinent indicator of mitochondrial function.

Telomere length analysis

Telomere length analysis was measured using TeloTAGGG Telomere length kit (Roche) according to the manufacturer's recommendations.

Telomere length was also assessed by quantitative fluorescence in situ hybridization (Q-FISH) on interphase nuclei preparations from iPS and control hESc H1, using consensus telomeric probes labelled with FITC (Applied Biosystems, Boston, MA). Fluorescence signals were visualized and captured with a fluorescence ZEISS Axioplan 2 imaging microscope (Carl Zeiss, Gottingen, Germany). The mean fluorescence intensity (F.I.) of telomere spots was quantified using the ISIS software (Metasystems, Altusheim, Germany) and expressed in fluorescence units (F.U.).

STR (short tandem repeat) analysis

STR experiments and analysis were performed by following standard procedures in collaboration with Biomnis (Lyon, France).

Electron microscopy for Mitochondria visualization

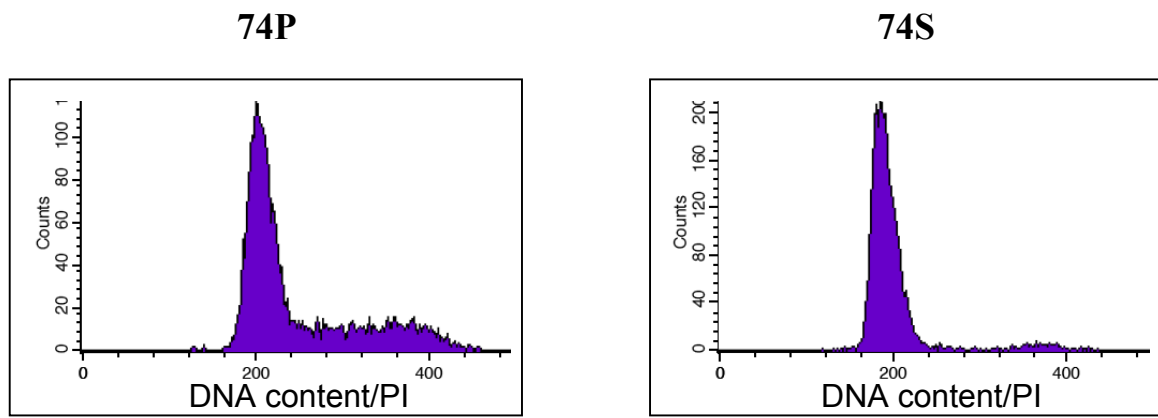
Cells were immersed in a solution of 2.5% glutaraldehyde in Sorensen's buffer (0.1M, pH 7.4) overnight at 4°C. They were then rinsed in Sorensen's buffer and post-fixed in a 0.5% osmic acid for 2 h in the dark and room temperature. After two rinses in Sorensen's buffer, the cells were dehydrated in a graded series of ethanol solutions (30-100%). The cells were embedded in EmBed 812 using an Automated Microwave Tissue Processor for Electronic Microscopy, Leica

EM AMW. Thin sections (70 nm; Leica-Reichert Ultracut E) were collected at different levels of each block. They were counterstained with uranyl acetate and observed using a Hitachi 7100 transmission electron microscope in the Centre de Ressources en Imagerie Cellulaire de Montpellier (France).

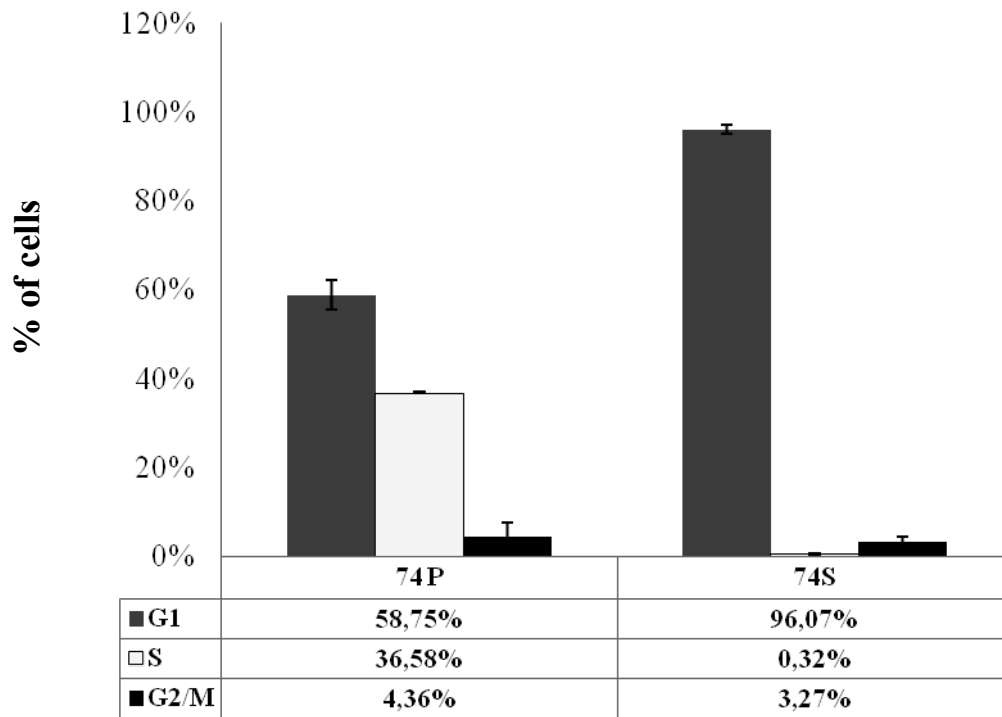
SUPPLEMENTAL REFERENCES

- Guenther, M.G., Frampton, G.M., Soldner, F., Hockemeyer, D., Mitalipova, M., Jaenisch, R., and Young, R.A. 2010. Chromatin structure and gene expression programs of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **7**(2): 249-257.
- Ludwig, T.E., Bergendahl, V., Levenstein, M.E., Yu, J., Probasco, M.D., and Thomson, J.A. 2006. Feeder-independent culture of human embryonic stem cells. *Nat Methods* **3**(8): 637-646.
- Matsuura, F., Hirano, K., Ikegami, C., Sandoval, J.C., Oku, H., Yuasa-Kawase, M., Tsubakio-Yamamoto, K., Koseki, M., Masuda, D., Tsujii, K. et al. 2007. Senescent phenotypes of skin fibroblasts from patients with Tangier disease. *Biochem Biophys Res Commun* **357**(2): 493-498.
- Moiseeva, O., Bourdeau, V., Roux, A., Deschenes-Simard, X., and Ferbeyre, G. 2009. Mitochondrial dysfunction contributes to oncogene-induced senescence. *Mol Cell Biol* **29**(16): 4495-4507.
- Prigione, A., Fauler, B., Lurz, R., Lehrach, H., and Adjaye, J. 2010. The senescence-related mitochondrial/oxidative stress pathway is repressed in human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* **28**(4): 721-733.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**(5): 861-872.
- Vaziri, H., Chapman, K.B., Guigova, A., Teichroeb, J., Lacher, M.D., Sternberg, H., Singec, I., Briggs, L., Wheeler, J., Sampathkumar, J. et al. 2010. Spontaneous reversal of the developmental aging of normal human cells following transcriptional reprogramming. *Regen Med* **5**(3): 345-363.
- 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**(5858): 1917-1920.

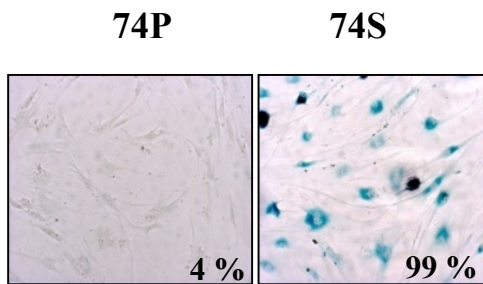
A



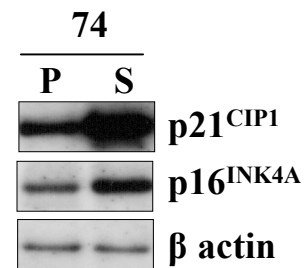
B

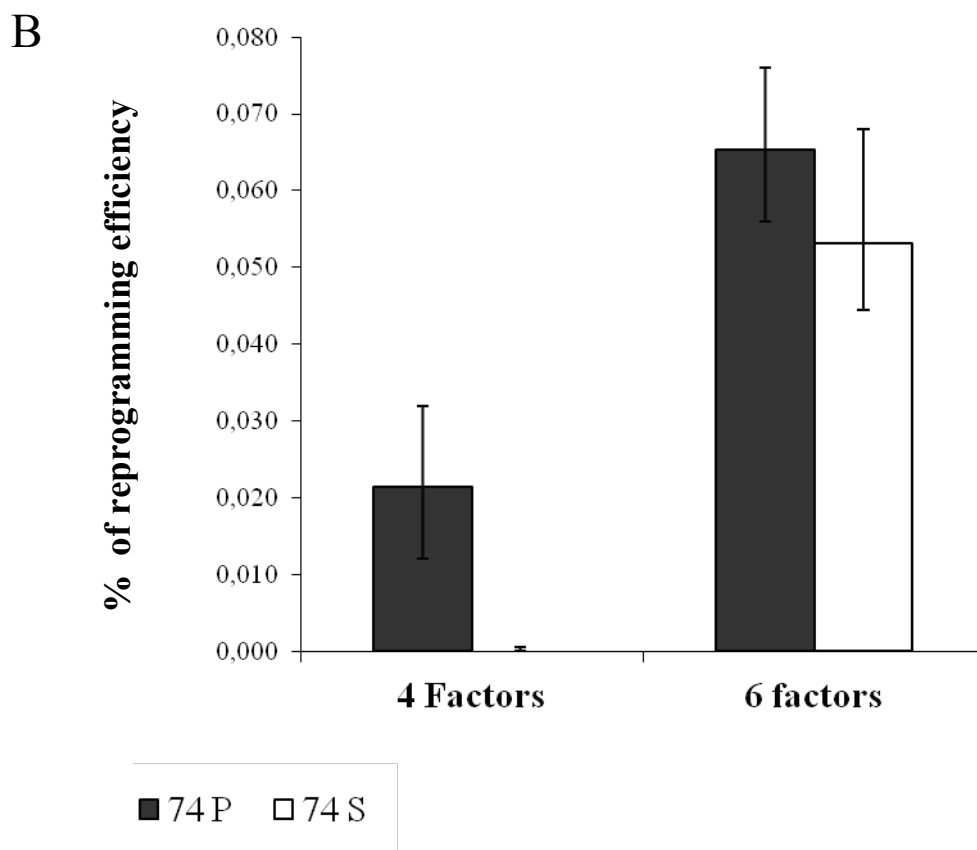
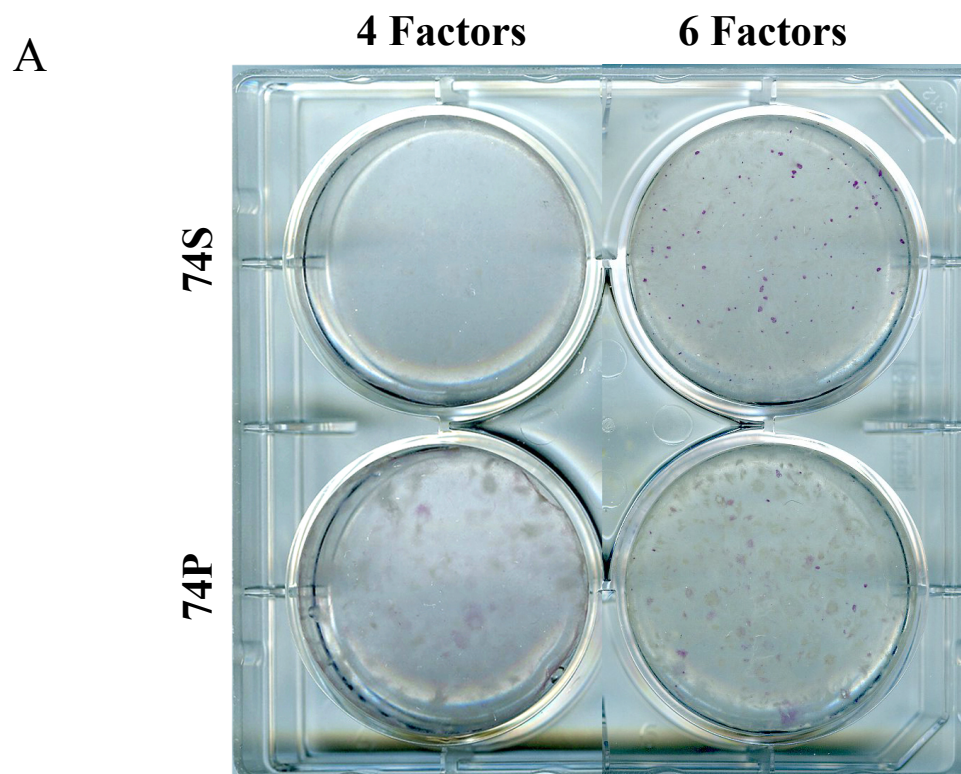


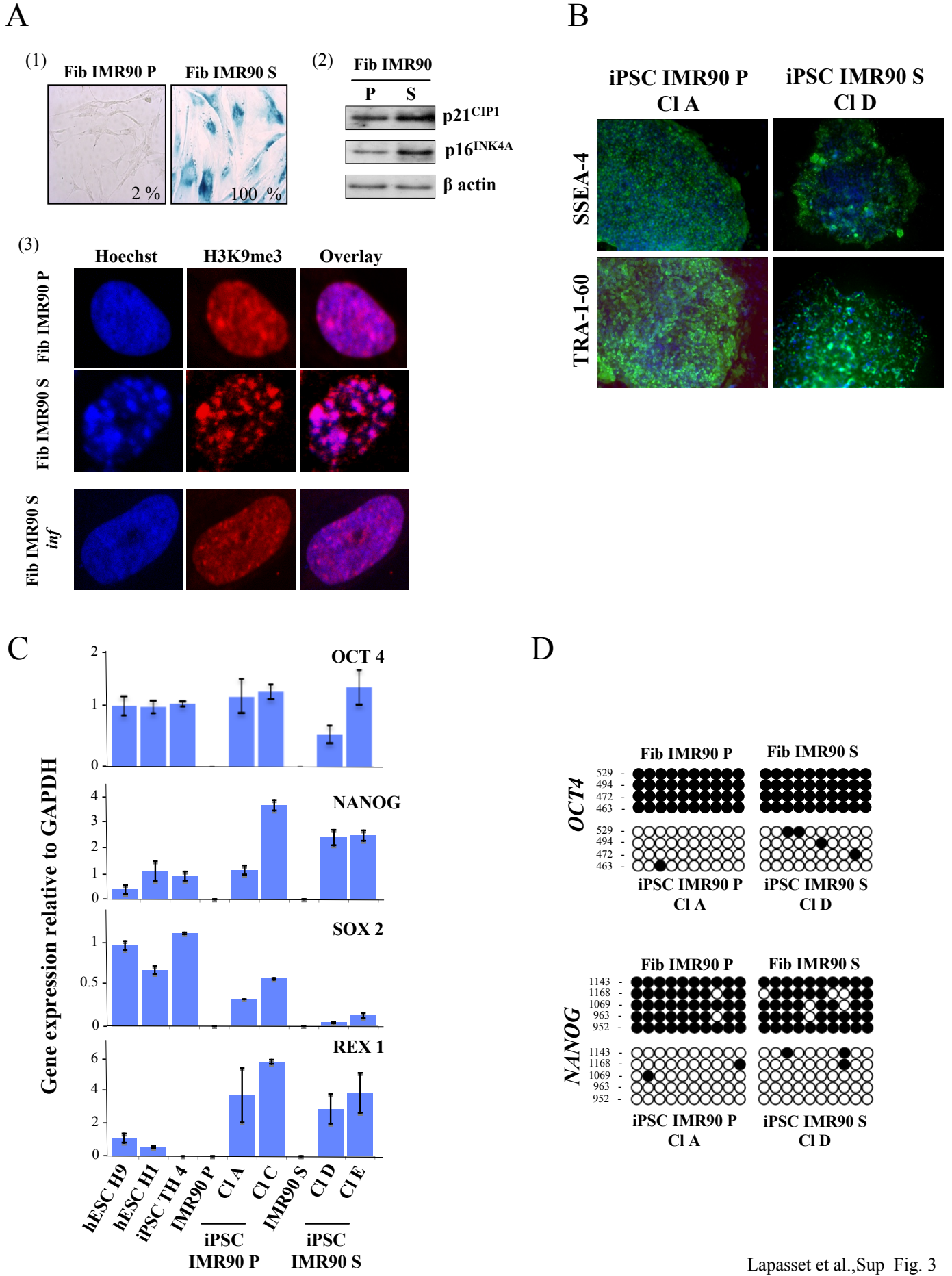
C

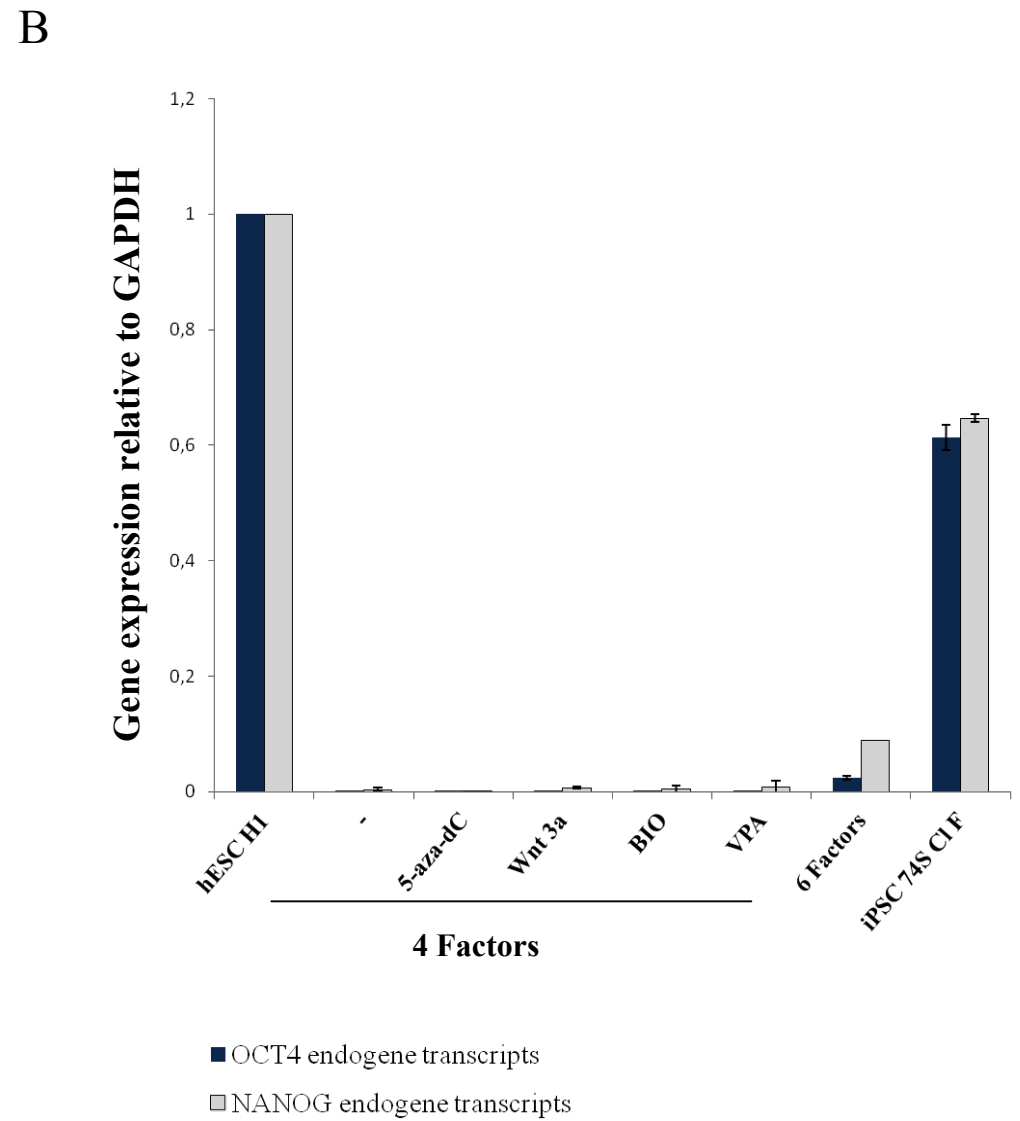
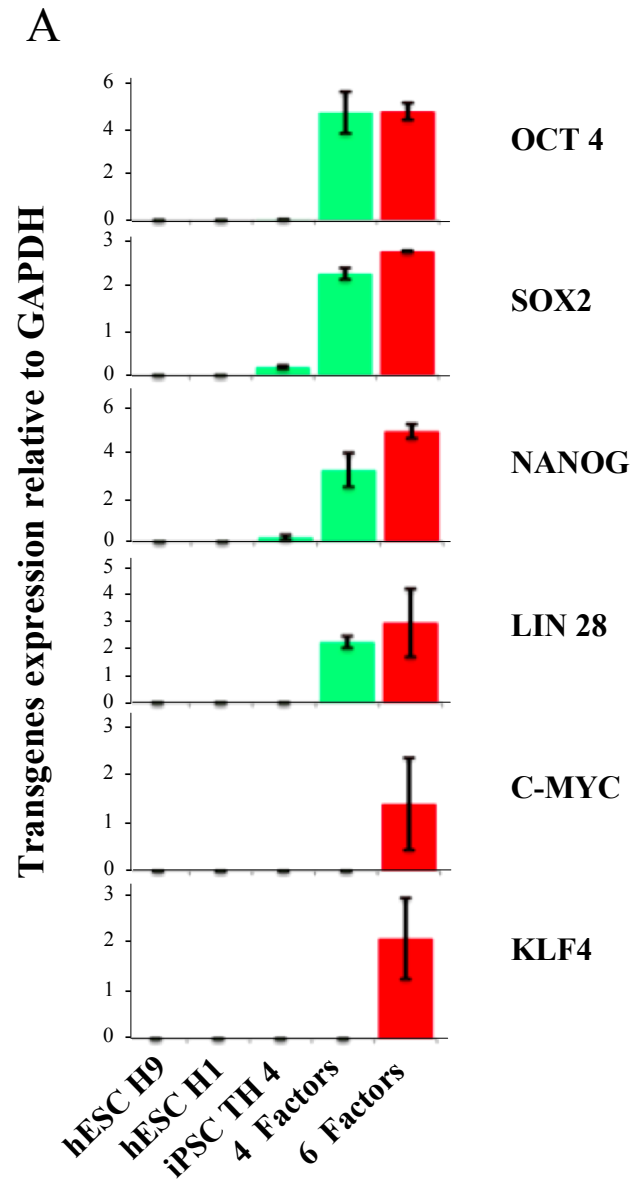


D

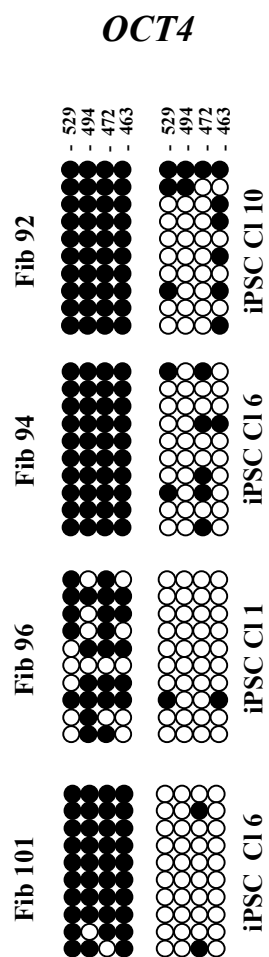




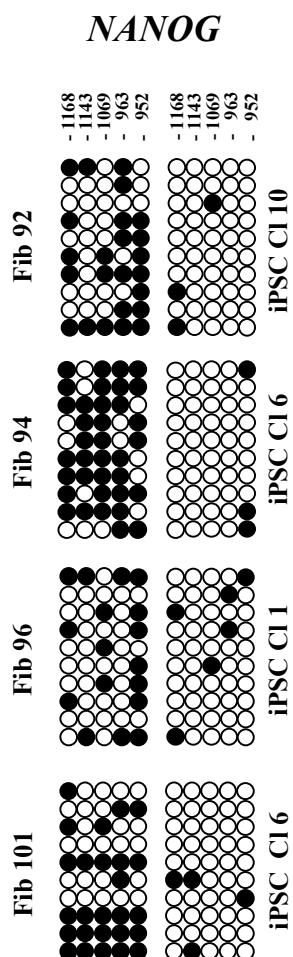




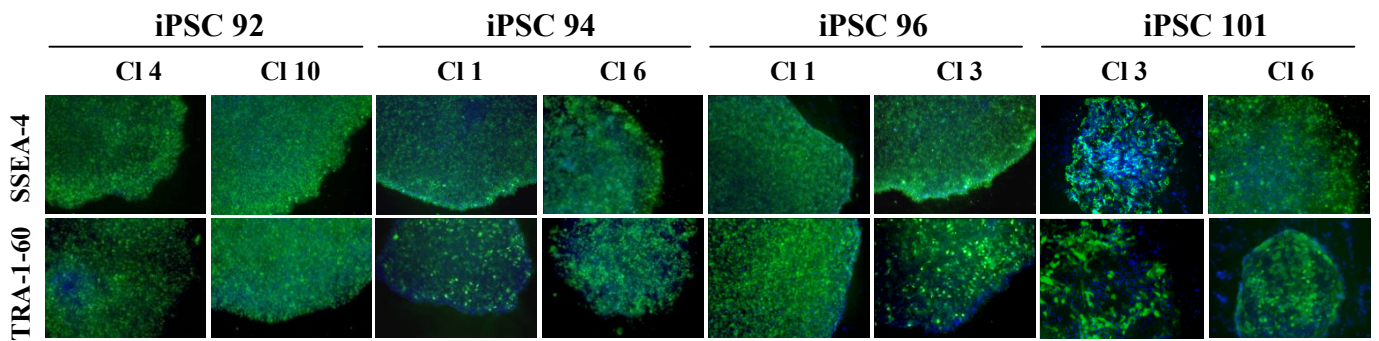
A



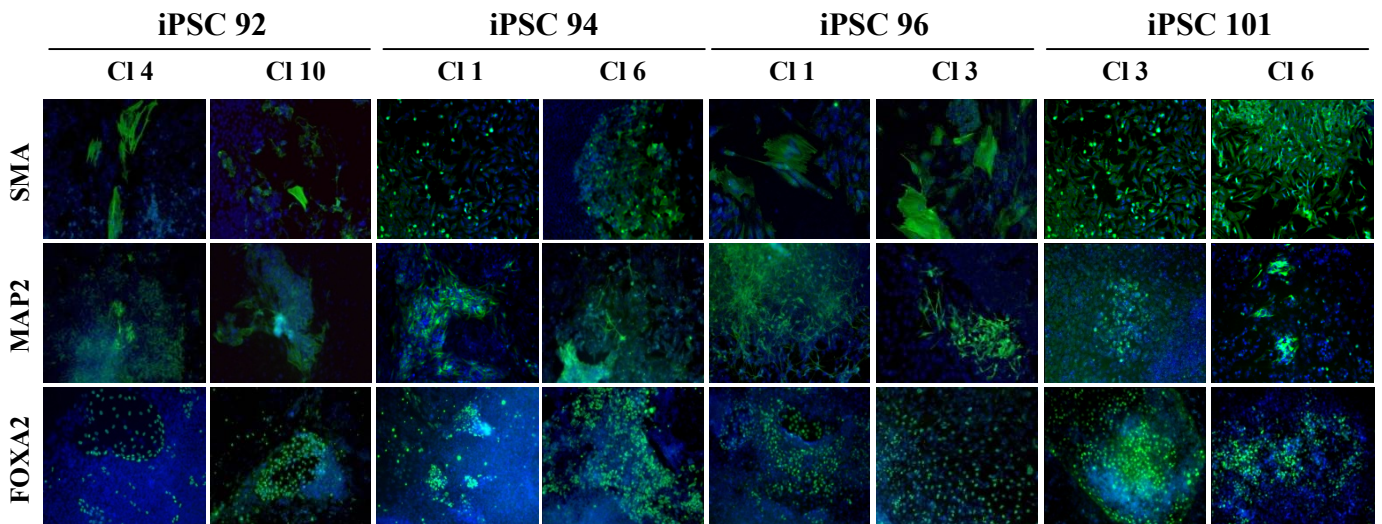
B



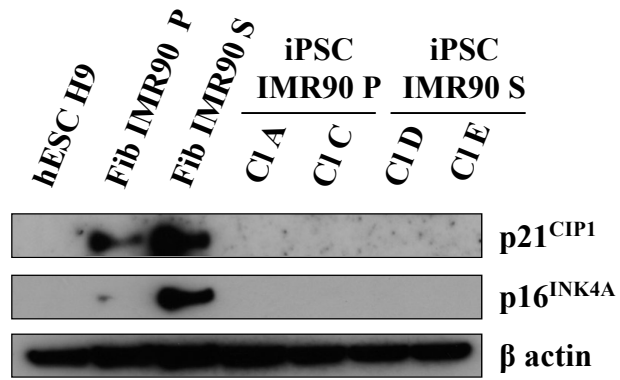
A



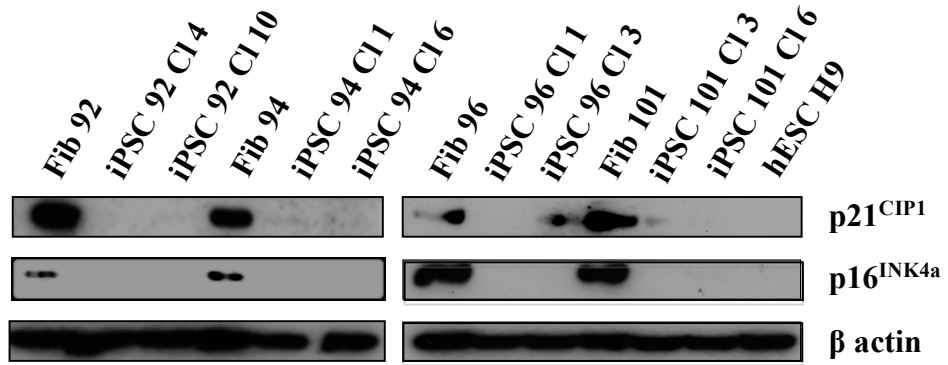
B



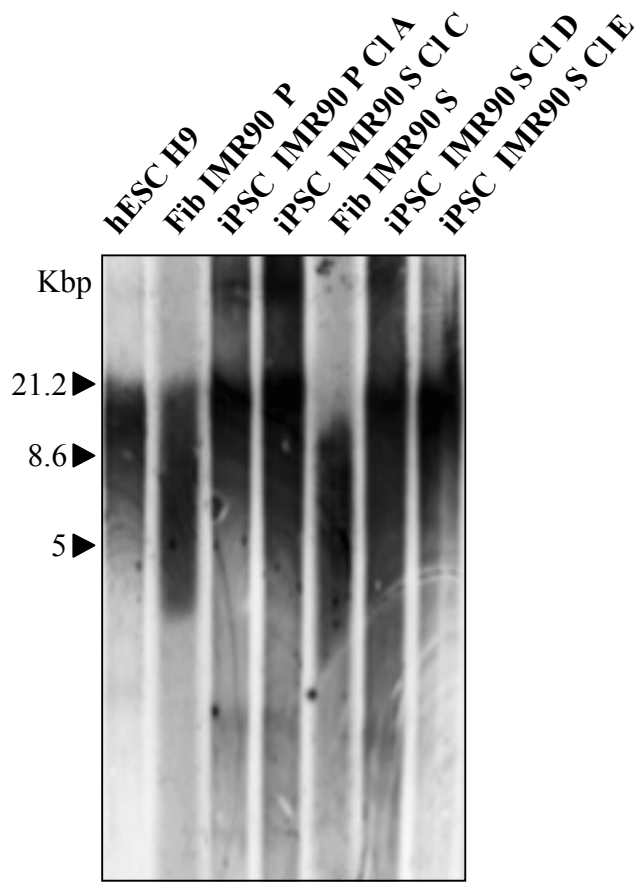
A



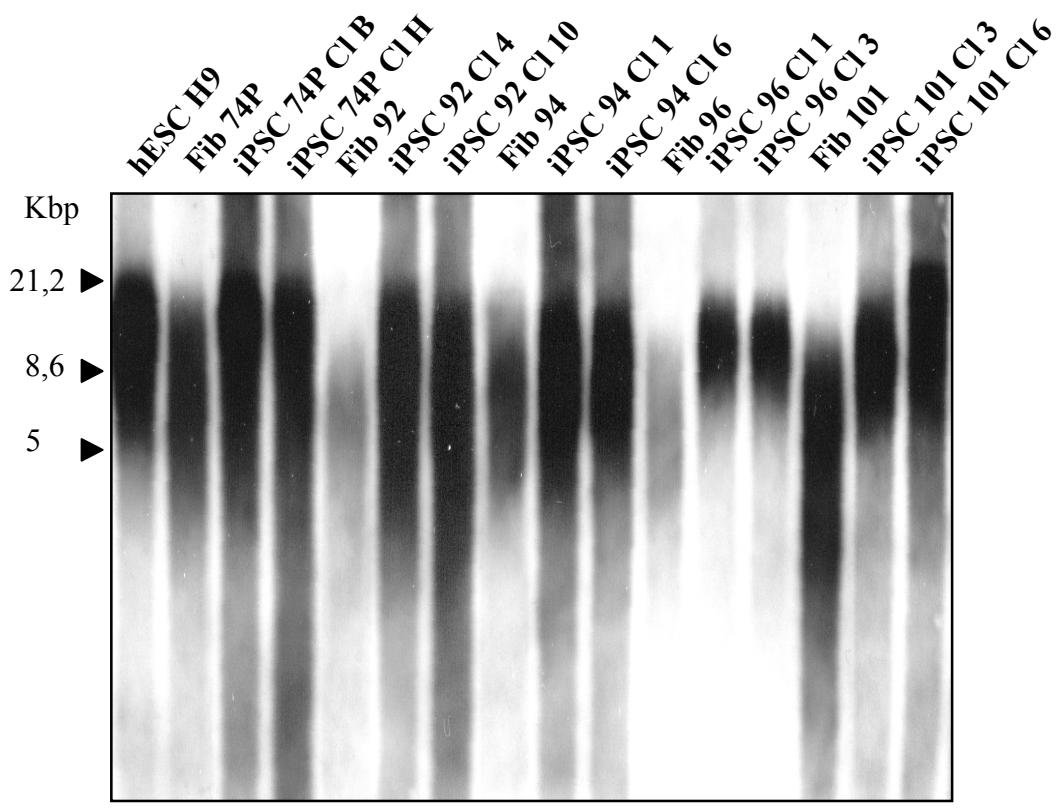
B

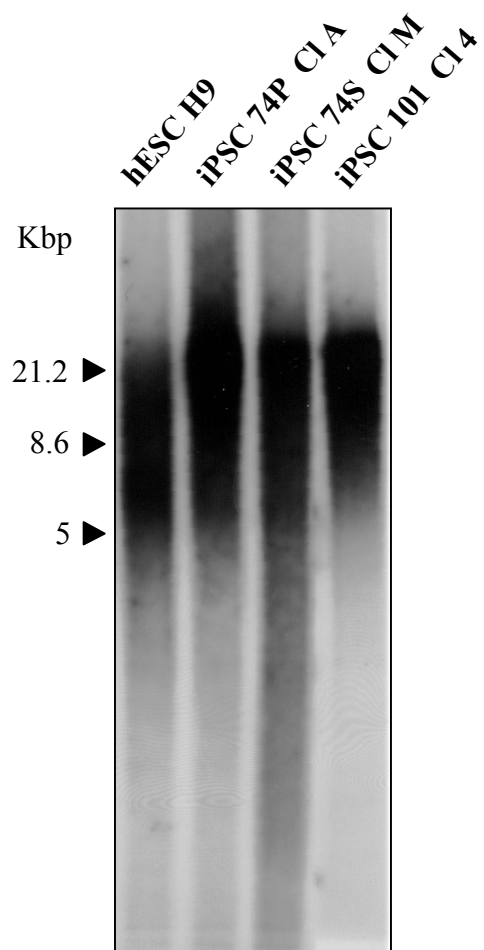


A

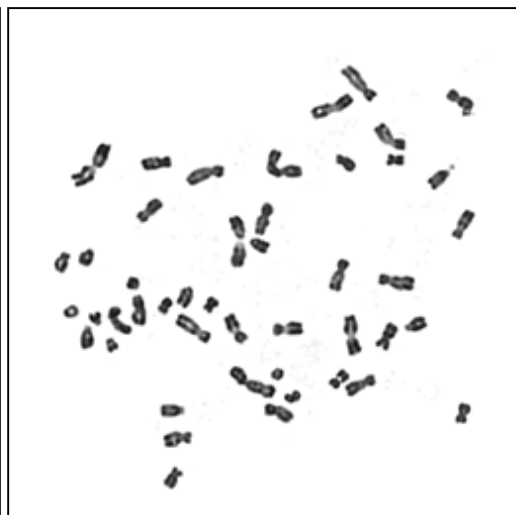
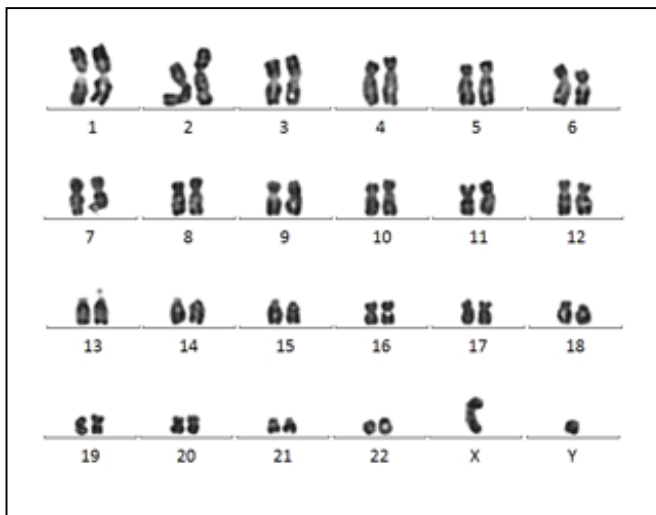


B

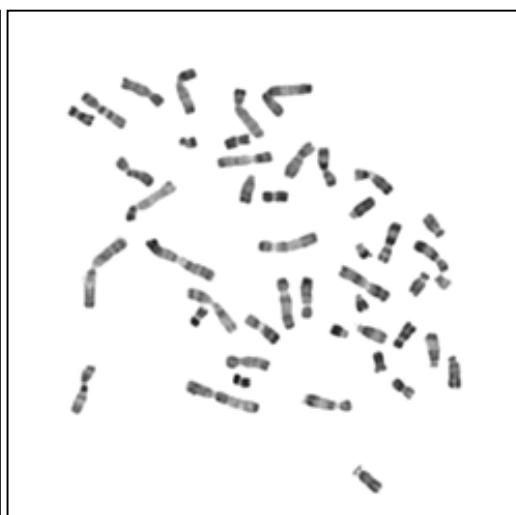
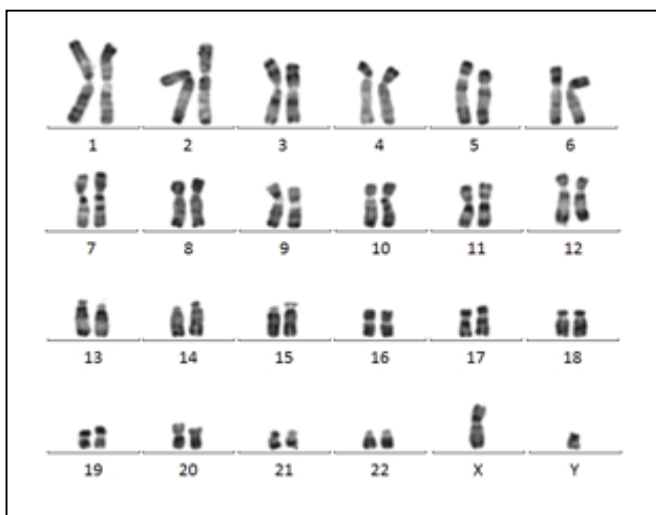




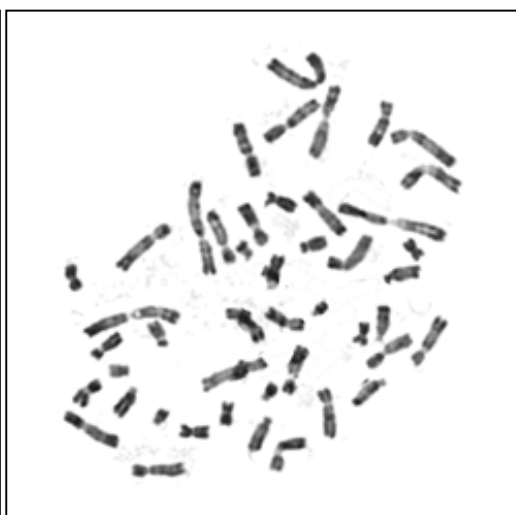
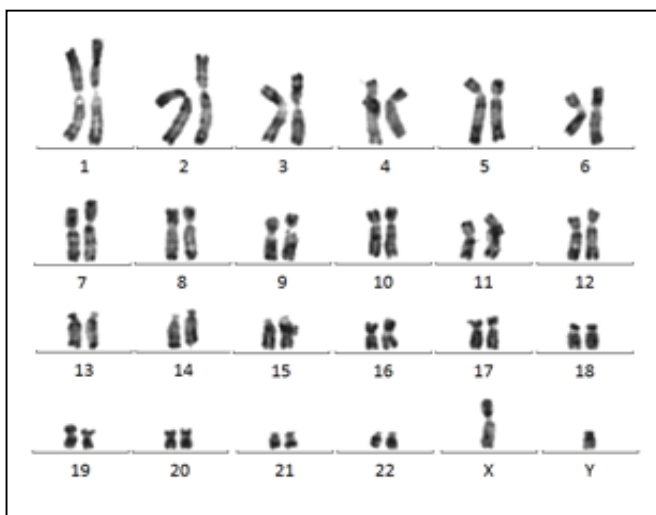
iPSC 74P ClH



iPSC 74S ClF



iPSC 96 Cl1

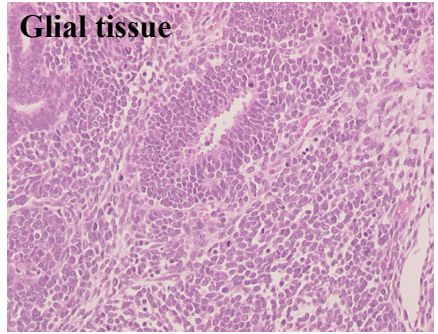
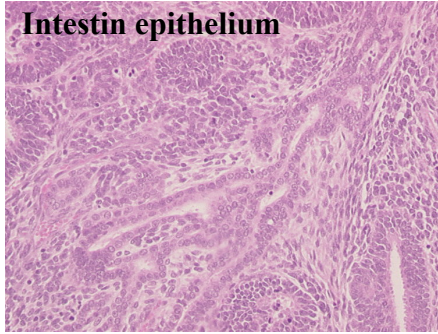


Mesoderm

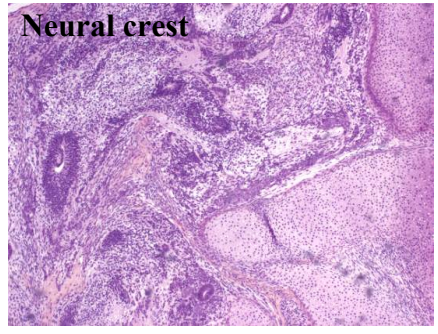
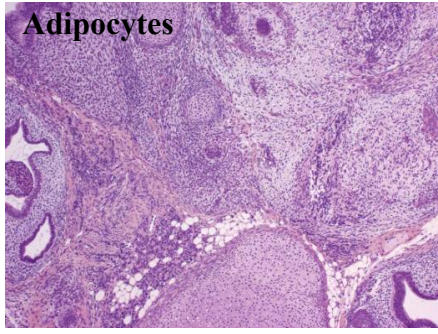
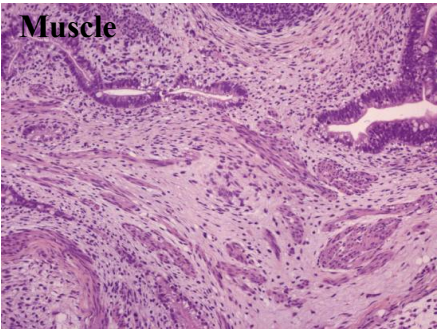
Endoderm

Ectoderm

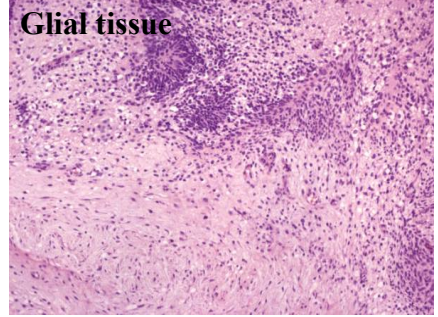
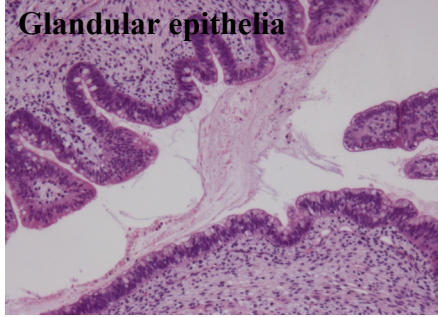
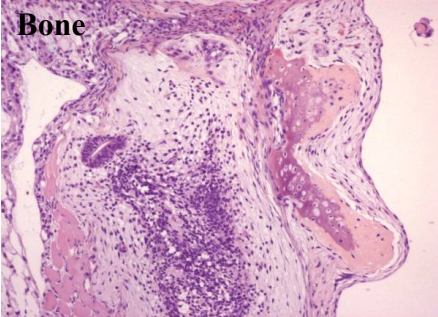
iPSC 74 P ClH

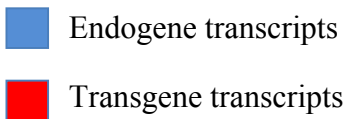
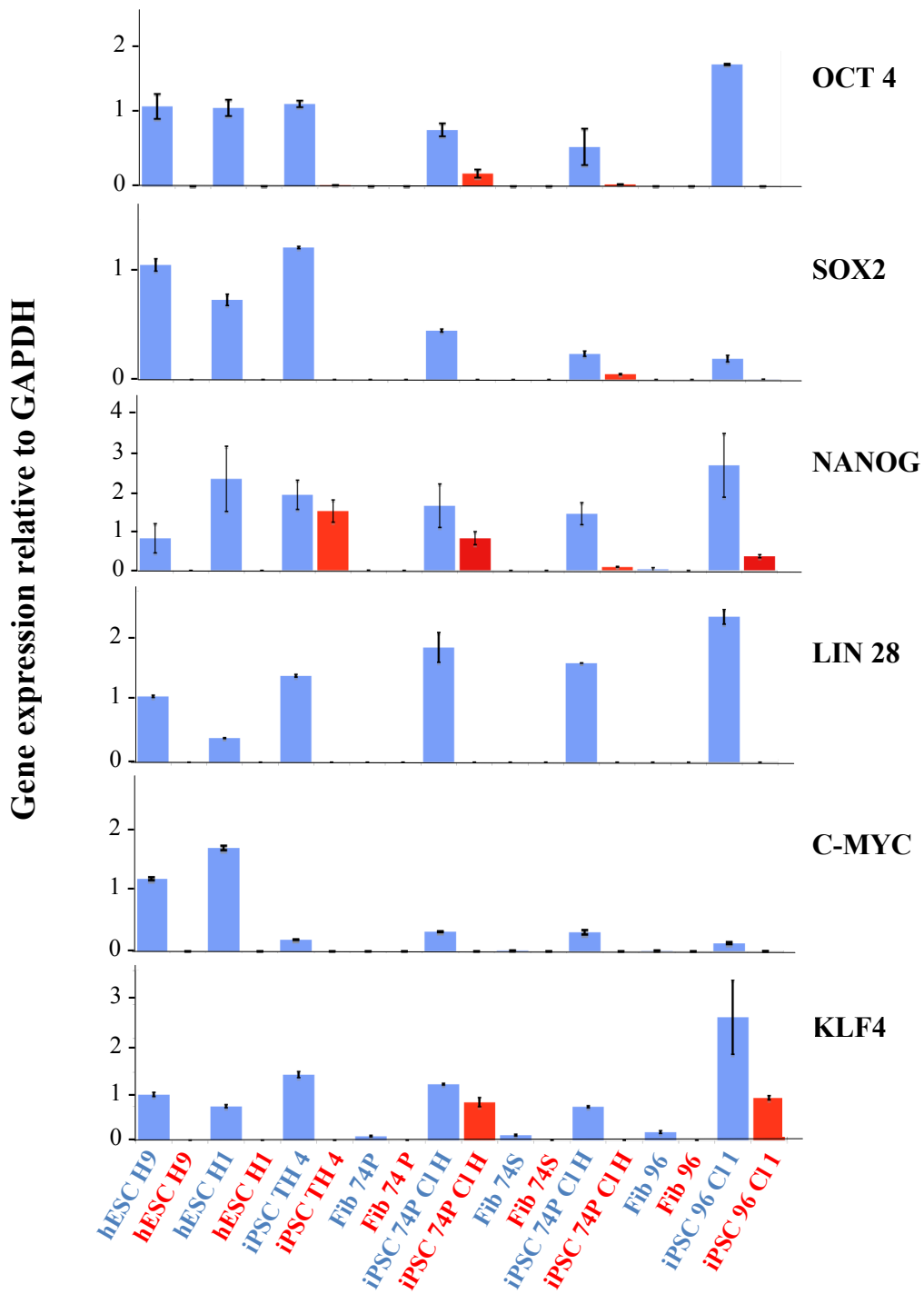


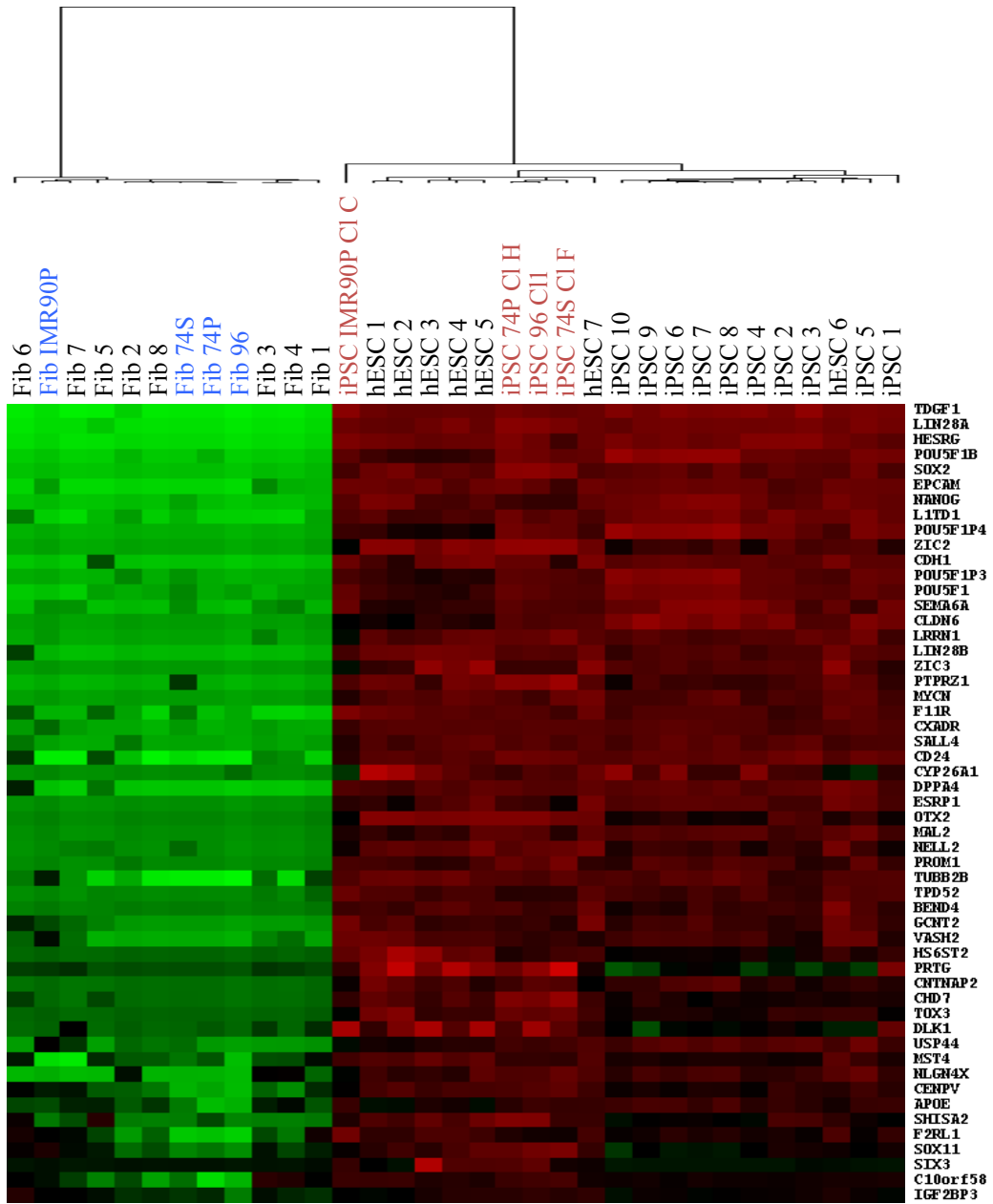
iPSC 74 S ClF

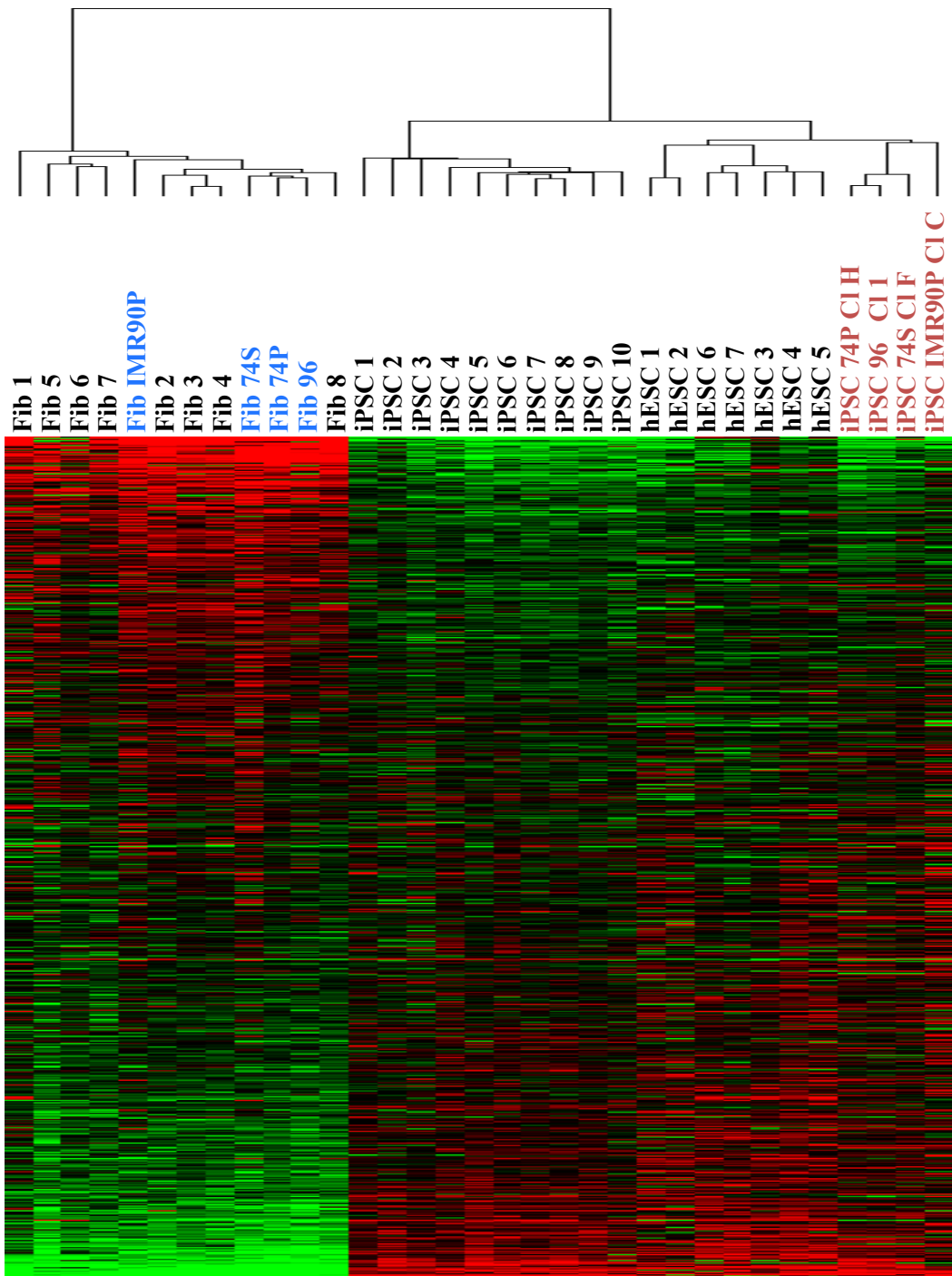


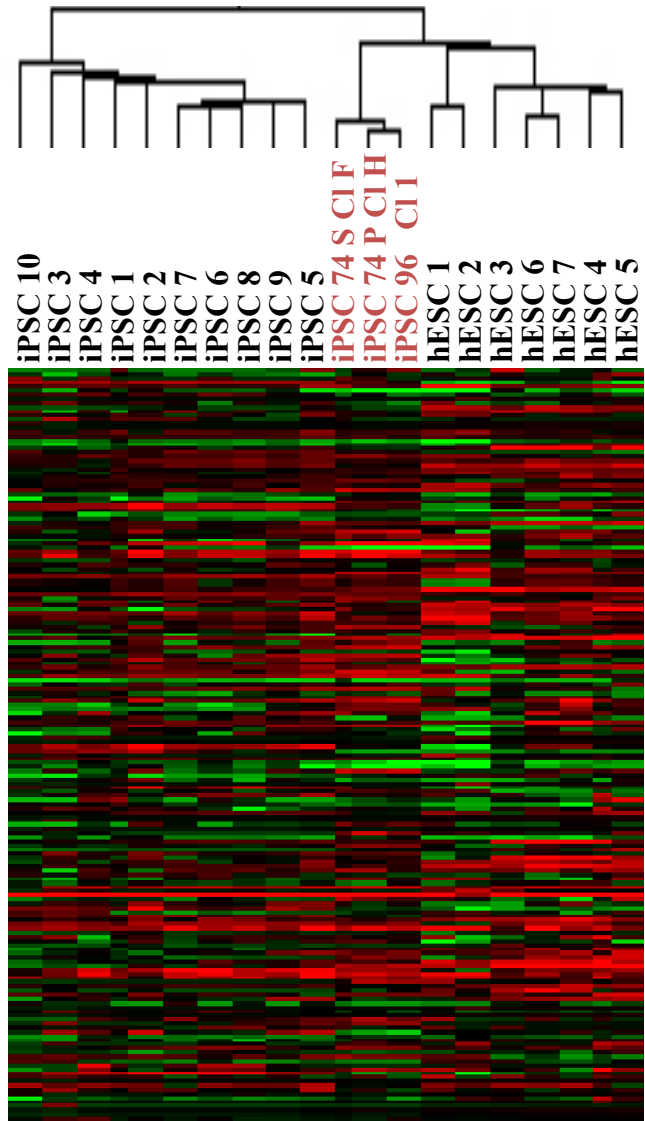
iPSC 96 Cl 1

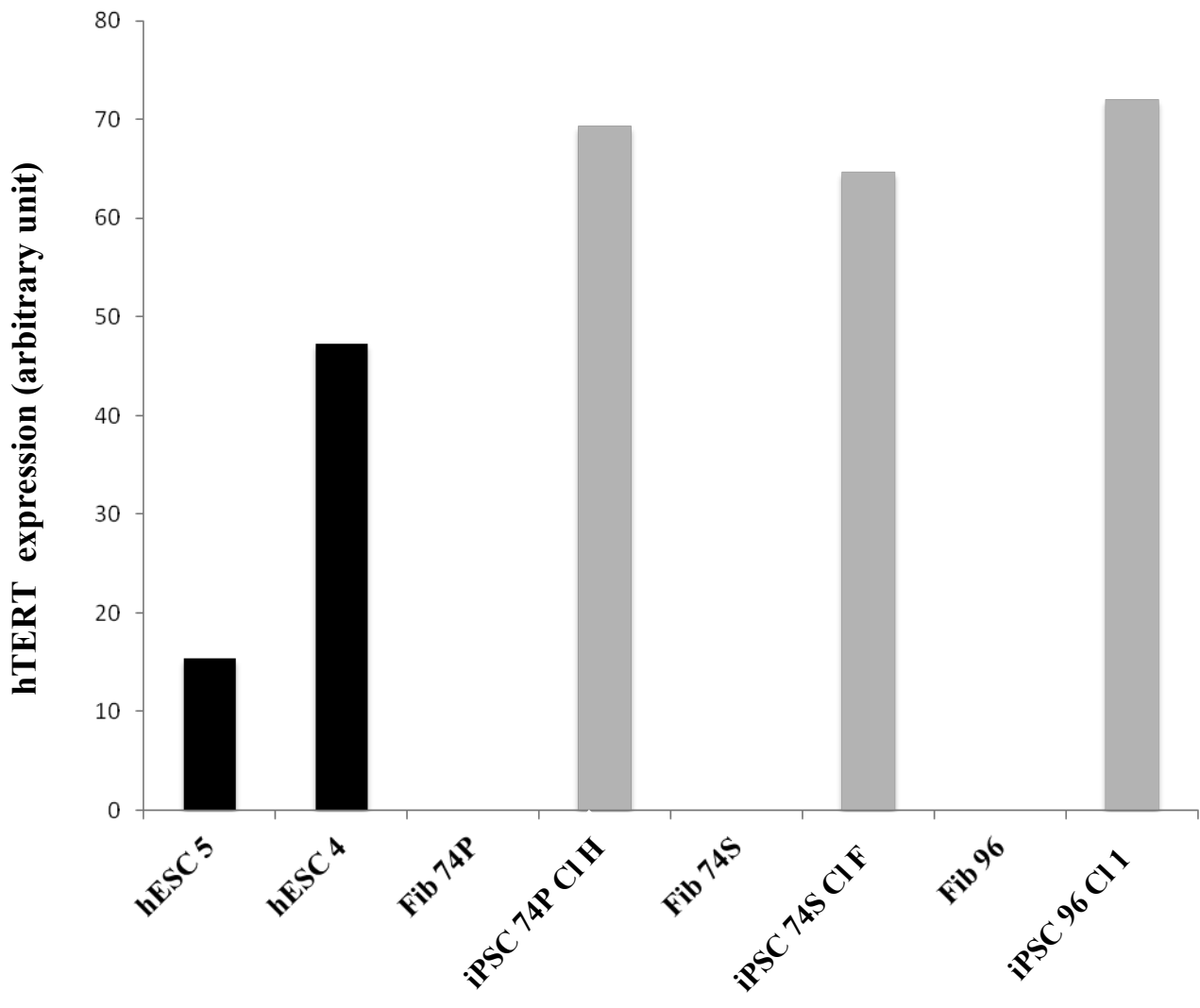




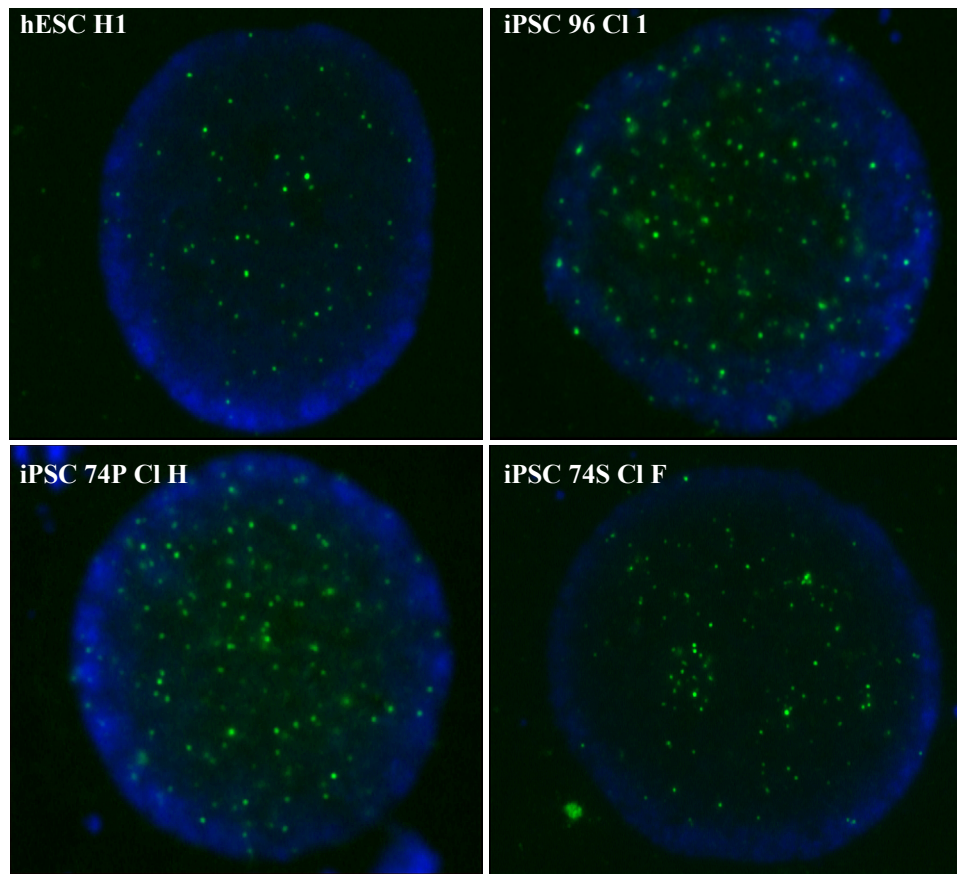




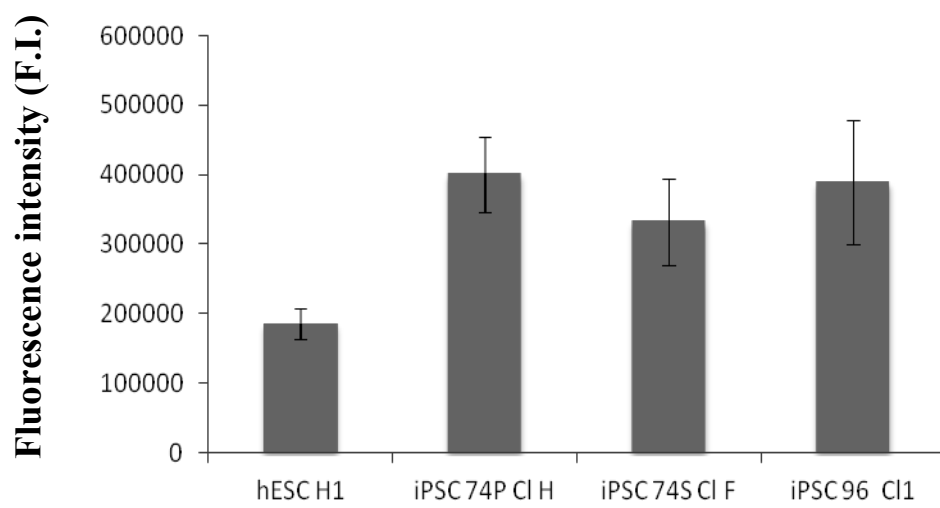


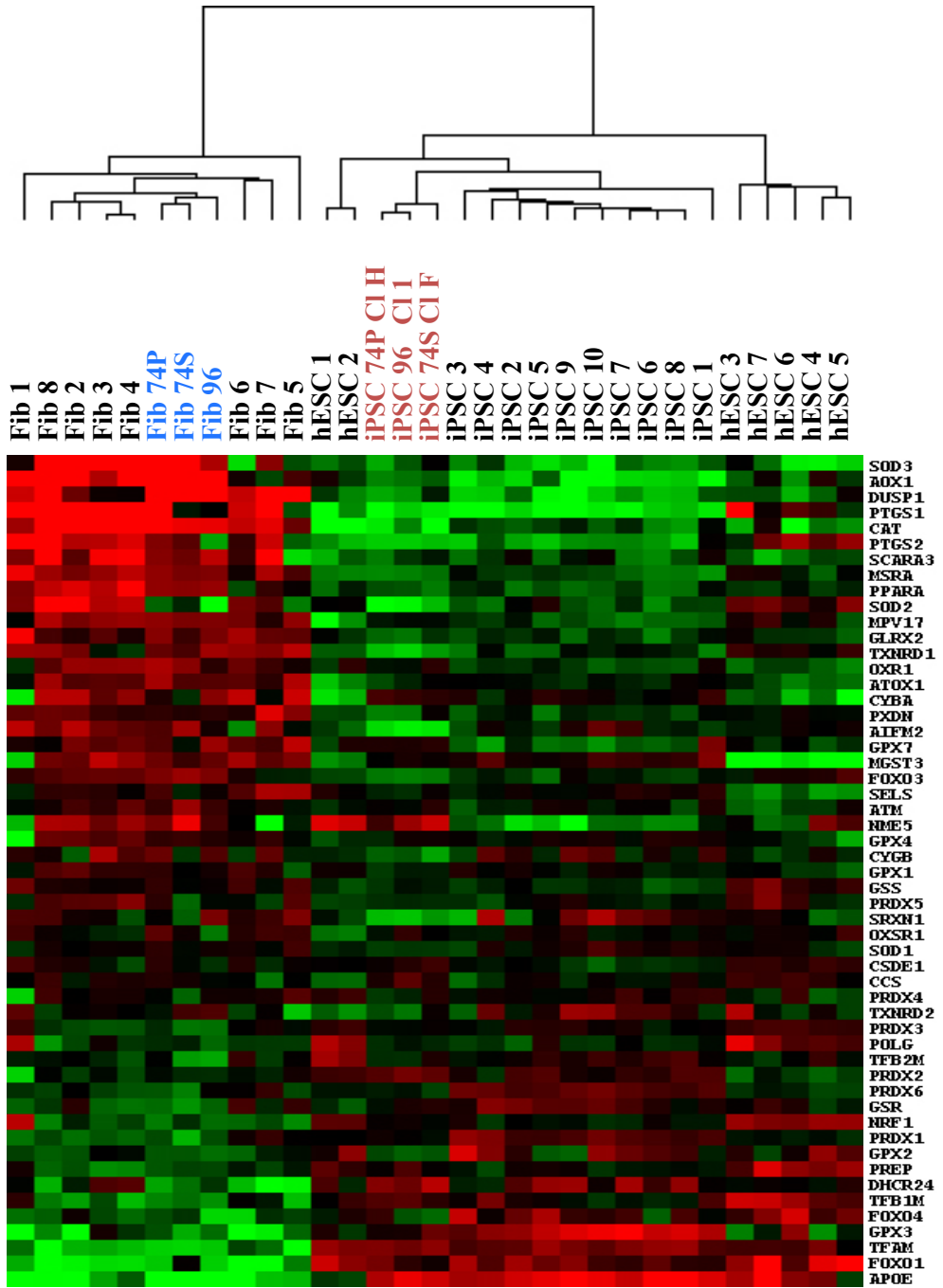


A



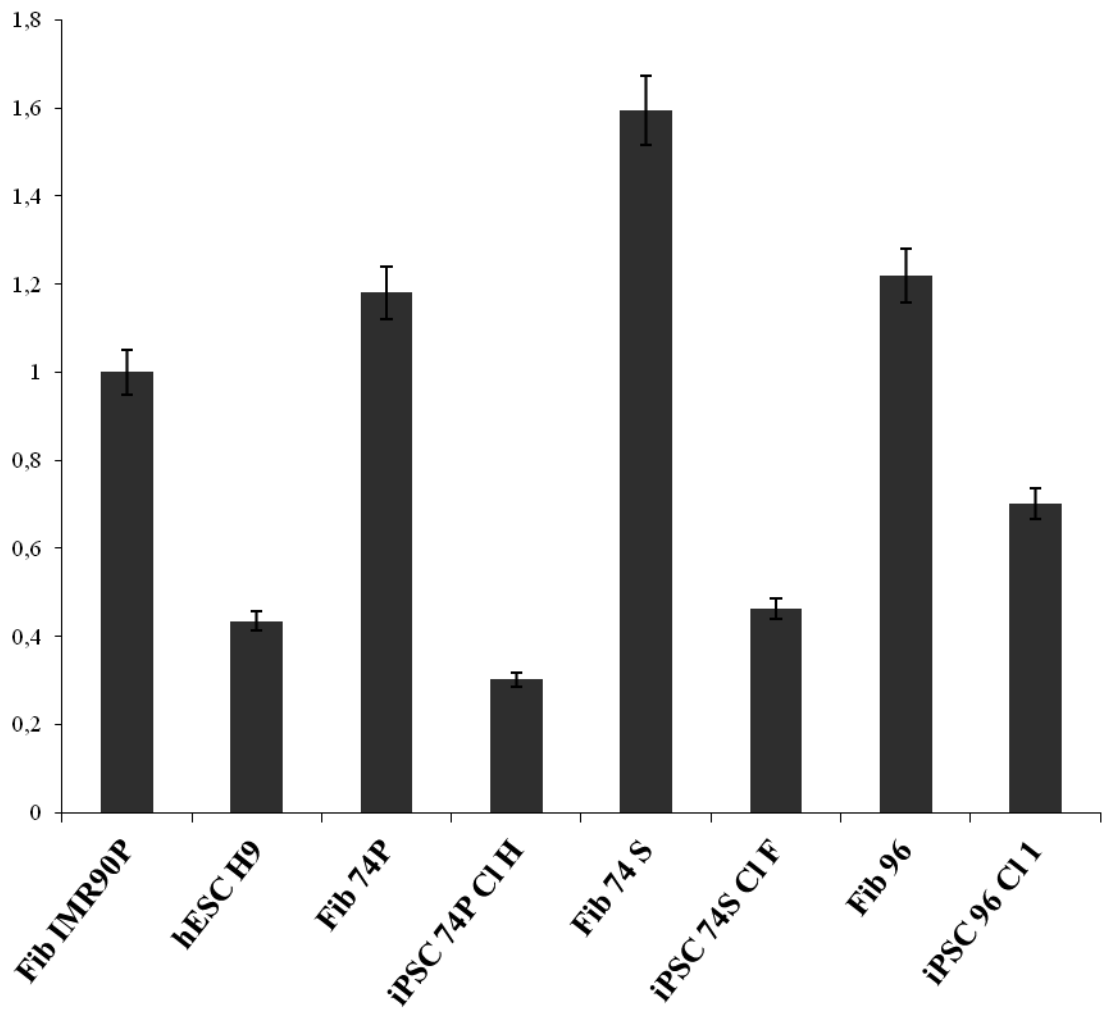
B



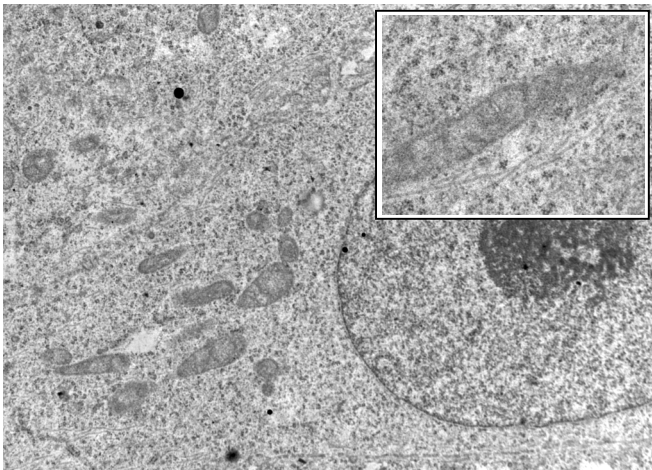


	JC-1 Green	JC-1 red	Overlay	Ratio
Fib IMR90P				0.63 ± 0.08
Fib IMR90S				0.26 ± 0.05
iPSC IMR90P CI A				0.88 ± 0.13
iPSC IMR90S CI D				0.85 ± 0.09
hESC H1				1.06 ± 0.11

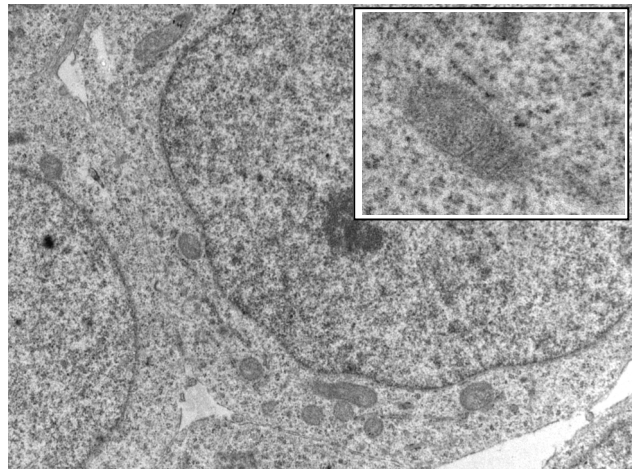
mtDNA copy number (rel. to proliferative IMR90 fibroblasts)



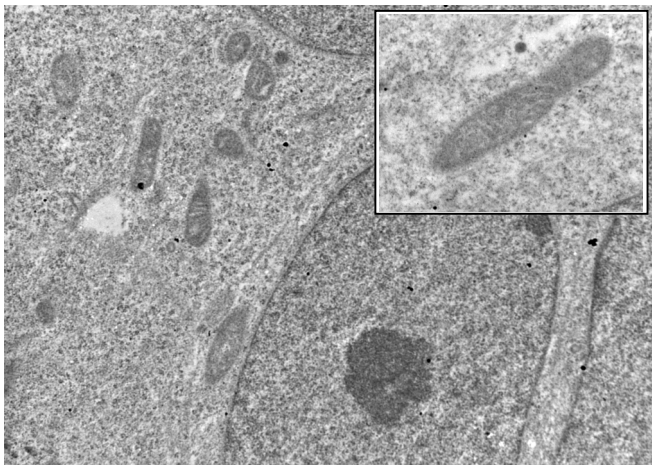
hESC H1



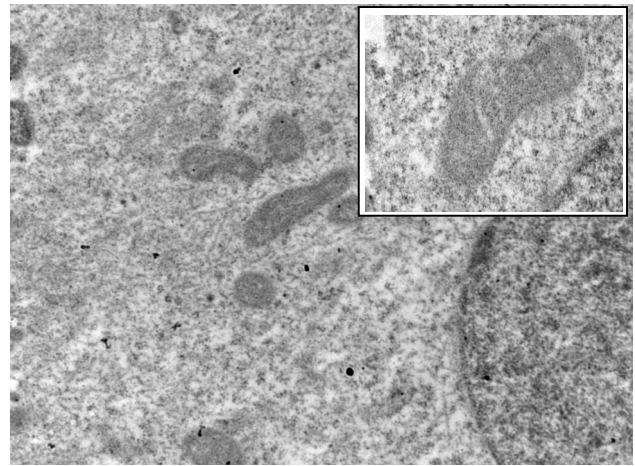
iPSC 96 Cl 1

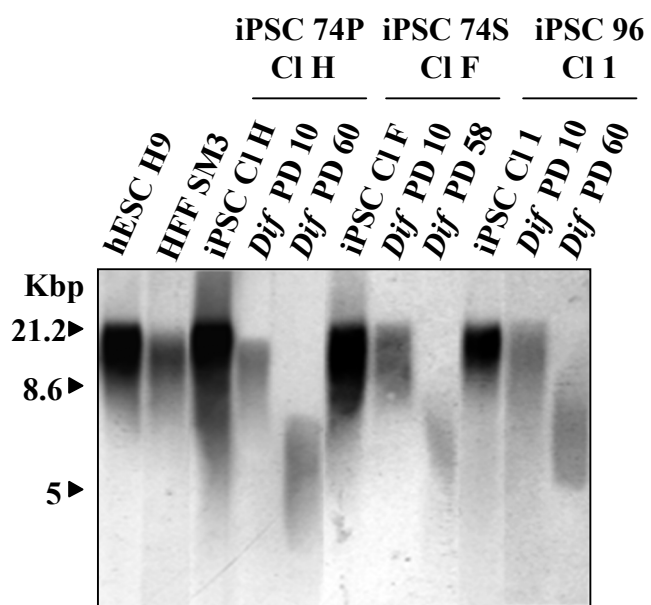


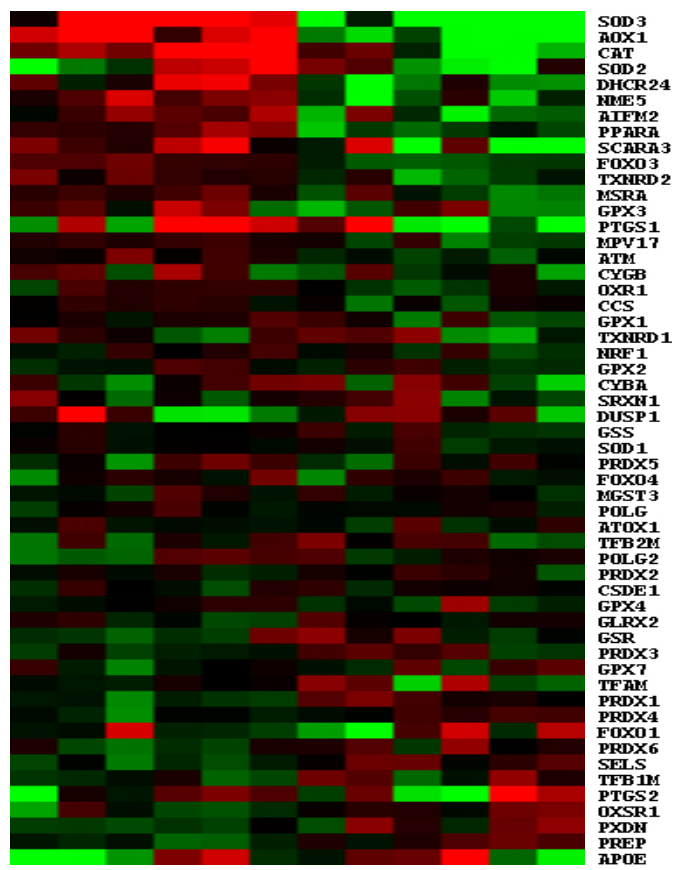
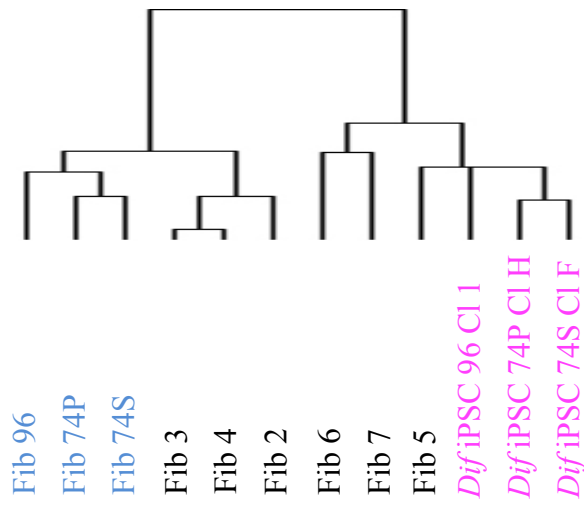
iPSC 74P Cl H



iPSC 74S Cl F







Le mot de la fin...

Le mot de la fin sera pour moi. Cela semble prétentieux ! Oui et pourquoi pas ? De temps en temps ça fait du bien. Une touche d'humour bien entendu. En tout cas j'y tenais.

Je citais Gaston Bachelard, au concours de l'école doctorale pour l'obtention de ma bourse de thèse. Il disait, je cite « une expérience scientifique est une expérience qui contredit l'expérience commune ». Une hypothèse de travail prémonitoire pour moi ? Surtout qu'on entend souvent qu'une thèse est une expérience unique. Je m'y étais préparée. Pour moi, elle fût unique et particulière. Elle m'a apporté, elle m'a appris la plus belle chose que l'on peut espérer dans la vie, dans une carrière, et lorsque l'on veut mener de futurs projets. Cet échec qui dure et qui nous tient, sans oublier tout ce qui s'y associe. Ce projet, cette thèse, ont été comme une longue chute dans le vide où il n'y a ni parachute de soutien, ni de filet qui nous rattrapera, et dont on contemple impuissant chaque instant qui passe. Ce long parcours qui nous agite et nous possède. Adeptes de sports extrêmes et de sensations fortes, je peux dire que c'est un moment rare. Je ne dramatiserai rien, je n'angéliserai rien. Je ne dirais pas que cette thèse a été difficile. Elle aura été parfaite car instructive.

Je remercie au fond de moi chacun pour le rôle qu'il y a joué, quelle qu'en soit la forme. Cela me permet de ne plus avoir à citer G. Bachelard mais de le confirmer. Et surtout poursuivre mon chemin à faire ce que j'aime le plus, penser, entreprendre et vivre des projets.

...A mon neveu, Bilal.

Résumé

En dehors du cadre pathologique, la notion de temps est la base essentielle dans le processus de vieillissement de l'organisme et des systèmes associés. Ces derniers vont progressivement présenter un déclin de leur(s) fonction(s) où de nombreux mécanismes complexes vont intervenir à différents niveaux. Parmi les premiers constats proposés, le vieillissement est la conséquence d'un processus inéluctable, d'une succession d'agressions au niveau cellulaire qui pourraient être réparées voire évitées, ouvrant ainsi la voie à de futures études qui permettront à terme de proposer une explication plus détaillée, de ce processus. Pour exemple, les travaux que nous avons menés tentent d'apporter un élément de réponse afin d'établir un lien entre sénescence et vieillissement, avec pour base de générer par reprogrammation cellulaire des cellules hiPSCs à partir de cellules issues de biopsies de patients jeunes, âgées, sénescents ou prolifératives. Outre la caractérisation de leur état pluripotent comparable à celui des cellules souches embryonnaires, nous avons également mis en évidence après une différenciation spécifique en fibroblastes, que les caractéristiques cellulaires de ces fibroblastes présentaient un effacement des marques du vieillissement, signe d'une plasticité cellulaire possible au cours du vieillissement vers un rajeunissement cellulaire. A présent, notre second objectif est d'étendre cette étude au modèle tissulaire cutané par la mise en place de stratégie de différenciation dans le lignage épidermique récapitulant les étapes du développement. Une telle étude permettra de mieux comprendre et mieux appréhender les mécanismes pathologiques associées au vieillissement, et ainsi proposer un outil qui permettra de proposer à l'avenir une médecine appropriée et concrète aux patients.

Mots-clés : vieillissement - sénescence - cellules souches à pluripotence induite - reprogrammation cellulaire - différenciation - kératinocytes - peau

Abstract

Beside the pathological context, time is the essential basis in the aging process of the body and associated systems. These will gradually introduce a decline in function(s) where many complex mechanisms will take part at different levels. Among proposed findings, aging is the result of an inevitable process, a succession of cellular stress that could be prevented or repaired, opening the way for future studies that will eventually offer an explanation detailed, clear and complete which occur. For example, our work provide a response element to establish a link between senescence and aging, based on the generation of hiPSCs by cellular reprogramming of cells from biopsies of young, older, senescent and proliferating cells patients. Further characterization of their pluripotent state comparable to that of human embryonic stem cells, we have also showed by a specific differentiation into fibroblasts, that cellular characteristics of those fibroblasts had erased aging features. Next step is to extend such study in cutaneous tissue model by the introduction of differentiation strategies in the epidermal lineage which will able us to better understand aging-associated diseases, and thus bring the ability to propose tools for an appropriate and concrete medicine to aged patients.

Key words: ageing - senescence - human induced pluripotent stem cells - cellular reprogramming – differentiation – keratinocytes - skin