



HAL
open science

Contrôle de l'expansion ex vivo de précurseurs kératinocytaires humains fonctionnels : implication des facteurs de transcription KLF4 et MAD4

Julien Coutier

► **To cite this version:**

Julien Coutier. Contrôle de l'expansion ex vivo de précurseurs kératinocytaires humains fonctionnels : implication des facteurs de transcription KLF4 et MAD4. Organisation et fonctions cellulaires [q-bio.SC]. Université Paris-Saclay, 2020. Français. NNT : 2020UPASS003 . tel-02935728

HAL Id: tel-02935728

<https://theses.hal.science/tel-02935728v1>

Submitted on 10 Sep 2020

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.

Contrôle de l'expansion *ex vivo* de précurseurs
kératinocytaires humains fonctionnels :
implication des facteurs de transcription KLF4 et
MAD4.

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 582 cancérologie : biologie - médecine – santé
(CBMS)

Spécialité de doctorat: Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie
Unité de recherche : Université Paris-Saclay, CEA, Institut de Biologie François-JACOB,
92265, Fontenay-aux-Roses, France.
Référent : Faculté de médecine

**Thèse présentée et soutenue à Evry, le 13 Janvier 2020,
par**

Julien COUTIER

Composition du Jury

Annelise BENNACEUR-GRISCELLI Professeur, Université Paris-Saclay	Présidente
Yves POUMAY Professeur, Université de Namur ASBL	Rapporteur & Examineur
Michel SIMON Docteur, Université Paul Sabatier	Rapporteur & Examineur
Christine BALDESCHI Professeur, Université Evry Val d'Essonne	Examinatrice
Michèle MARTIN Docteur, Université Paris-Saclay	Directrice de thèse CEA
Nicolas FORTUNEL Docteur, Université Paris-Saclay	Co-Directeur de thèse CEA
Jean-Jacques LATAILLADE Professeur, Service de Santé des Armées	Co-Directeur de thèse DGA

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier le Professeur Annelise Bennaceur d'avoir accepté d'endosser le rôle de présidente de mon jury de thèse, et d'examiner mon travail. Je remercie chaleureusement les Docteurs Yves Poumay et Michel Simon pour avoir accepté de consacrer leur temps à lire et surtout à évaluer ma contribution au domaine de la biologie des cellules souches kératinocytaires en tant que rapporteurs. Ensuite, je remercie le Docteur Christine Baldeschi d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse en tant qu'examinatrice. Sa vision de la biologie des cellules souches pluripotentes est un atout important.

Je tiens ensuite à remercier ma directrice de thèse la Docteur Michèle Martin. Merci de m'avoir accueilli pendant ces quatre années au sein de votre laboratoire. Merci de m'avoir accompagné et appris toutes ces connaissances, notamment une grande rigueur dans la culture cellulaire, et de m'avoir accordé votre confiance. Je remercie également mon encadrant coté DGA, le Professeur Jean-Jacques Lataillade, pour ses contributions en tant que médecin, et sa vision clinique des problématiques scientifiques.

Je souhaite exprimer ma gratitude et ma reconnaissance à mon co-directeur, présent au quotidien, le Docteur Nicolas Fortunel. Nicolas, merci pour tous ce que tu as fait pour moi. Je me rappelle mes débuts, et nos discussions rugueuses sur le fond des choses. Ce ne fut pas toujours facile, mais cela m'a permis de beaucoup progresser ! Merci également de m'avoir fait confiance pour m'ouvrir au fascinant monde des cellules souches. Je conserverai la rigueur et la persévérance que tu m'as transmises. Ces quatre années furent une très bonne expérience, tant professionnelle que personnelle, et je t'en suis grandement reconnaissant. Ton encadrement et tes conseils ont été d'une grande qualité et d'une aide précieuse.

Je remercie ensuite tous les membres du LGRK, passés et présents, pour m'avoir encadré, montré de nouvelles techniques et de manière générale, appris de nombreuses choses sur la biologie cutanée. Merci à Sandra, Pascal, Peggy, Françoise, Adeline, Yasmina, Guillaume, Sophie, Lucie, la première stagiaire que j'ai encadré ... Un merci plus particulier à Frédéric, avec qui j'ai de très bons souvenirs : les interminables séances de clonage au cytomètre, avec le « vieille bécane » de Pierre Vaigot, les « Clonothons », le Marathon de Nice, les séances d'activités extraprofessionnel. Merci pour ta gentillesse, tes connaissances techniques et l'or que tu as dans tes mains pour les manips. J'ai aussi une pensée amicale pour les autres thésards de l'IRCM, Jacqueline et Anne, qui m'ont toujours donné de bons conseils, Olivier, Elodie et Omar avec qui j'ai passé de bons moments, et Claude Gazin pour le prêt de son matériel.

Je suis également reconnaissant à Walid Rachidi pour m'avoir orienté vers ce laboratoire afin de réaliser ma thèse de doctorat, et Olivier Alibert, pour le soutien apporté en informatique et bio-informatique. Je remercie également la Fondation des Gueules Cassées qui m'a permis de travailler un an supplémentaire sur ce projet de recherche. Merci également au personnel des plateformes de Genethon, en particulier Christophe Georget, Jérémie Cosette, Simon Jimenez, Peggy Sanatine et Daniel Stockholm, avec qui j'ai travaillé d'une manière plus proche.

Enfin, mon passage au CEA m'a permis de rencontrer quelqu'un qui m'est très cher. Je remercie Charlène, qui me supporte au quotidien depuis maintenant plus de 3 ans, qui me rassure, et qui est toujours là pour moi. Je n'avais pas prévu de rencontrer quelqu'un d'aussi fantastique en mettant les pieds au laboratoire, mais que de bonheur depuis ce moment-là !

Pour finir, je remercie mes amis qui, malgré mes disponibilités limitées, ont été là pour moi, et ma famille, mon père Daniel et ma sœur Anaïs, pour leur amour, leur dévotion et leur soutien. Je dédie ce travail en particulier à ma mère, ancienne professeur de SVT, qui m'a probablement transmis cette passion de la biologie. Maman, j'espère que d'où tu es, tu es fière de moi !

Table des matières

<u>Liste des abréviations</u>	9
<u>Etat de l'art</u>	15
I La peau	17
I.1 Fonctions et structures de la peau.	17
I.1.A Fonctions.	17
I.1.B Structure et organisation.	18
I.1.C La peau murine : comparaisons avec la peau humaine.	25
II Les cellules souches : découverte, fonctionnalités et types de CS.....	28
II.1 Découverte et historique.	28
II.2 Définition et caractéristiques d'une cellule souche.	29
II.2.A L'autorenouvellement et la division asymétrique.....	29
II.2.B La capacité de différenciation.	33
II.2.C La quiescence.	34
II.3 Les différents types de cellules souches.	36
II.3.A Les cellules souches embryonnaires.	36
II.3.B Les cellules souches pluripotentes induites.	38
II.3.C Les cellules souches adultes.	40
III Les cellules souches de l'épiderme.	42
III.1 Les réservoirs de cellules souches épidermiques.....	42
III.1.A Les cellules souches du bulge.....	42
III.1.B Les cellules souches de l'EIF.	44
IV Méthodes d'identification, d'enrichissement et marqueurs des CSK de l'EIF.	51
IV.1 Identification des CSK par des tests fonctionnels.	51
IV.1.A Le critère LRC.....	51
IV.1.B Identification par la capacité clonogénique.	52
IV.1.C Identification par le potentiel à générer un tissu à long-terme.	53
IV.1.D Identification par adhésion à des composants de la matrice extracellulaire.....	53
IV.2 Identification des CSK par des approches moléculaires.....	54
IV.2.A Identification par des marqueurs membranaires.	54
IV.2.B Identification par des effecteurs moléculaires intracellulaires : voies de signalisations et facteurs de transcriptions.	60
IV.2.C Vers un consensus pour l'identification des CSK ?	62
V Culture des kératinocytes et applications en thérapie cellulaire.....	64

- Tables des matières -

V.1	Méthodes de cultures.	64
V.1.A	Méthode de culture « historique » : couches nourricières et sérum.....	64
V.1.B	Evolution vers des milieux standardisés : milieux sans sérum et sans couches nourricières ?.....	65
V.1.C	Problématiques biologiques associées aux méthodes de culture.	67
V.2	De la culture vers les applications biomédicales : la greffe de peau reconstituée.	68
V.2.A	La greffe de peaux reconstituées.	68
V.2.B	Les défis de la thérapie cellulaire cutanée.	71
VI	Voies de signalisation et gènes « stemness » : contrôle du statut de cellule souche.....	73
VI.1	Recherche d'un profil d'expression commun à toutes les CS.	73
VI.2	Voies de signalisation « stemness »	75
VI.2.A	La voie Wnt/ β -caténine : vue générale et fonctions dans la biologie de l'EIF.	75
VI.2.B	La voie TGF-Beta : vue générale et fonctions dans la biologie de l'EIF.	80
VII	Le facteur de transcription KLF4.....	88
VII.1	Description générale et structure de KLF4.	88
VII.2	Processus physiologiques tissulaires associés à KLF4.	89
VII.2.A	Morphogenèse et homéostasie des tissus épithéliaux : hors épiderme.....	89
VII.2.B	Morphogenèse et homéostasie de l'épiderme.	90
VII.3	Fonctions majeures de KLF4.....	92
VII.3.A	Contrôle du cycle cellulaire et inhibition de la prolifération.....	92
VII.3.B	Promotion de la différenciation.	93
VII.4	KLF4 et cellules souches.	94
VII.4.A	Cellules souches pluripotentes.....	94
VII.4.B	Cellules souches adultes.....	95
VII.5	Dualité fonctionnelle de KLF4 dans la carcinogenèse.	96
VII.6	Réseaux de signalisation régulant KLF4 et la biologie des cellules souches	97
VII.6.A	KLF4 et TGF- β	97
VII.6.B	KLF4 et Wnt.	98
VIII	Le réseau MYC/MAX/MAD et le facteur de transcription de MAD4.....	100
VIII.1	Description générale du réseau et des partenaires.	100
VIII.1.A	Structure des acteurs du réseau.	101
VIII.1.B	Régulations entre les partenaires et compétition pour MAX.	103
VIII.1.C	Modulation de la transcription et accessibilité de la chromatine.....	104
VIII.2	La protéine centrale MAX.....	105
VIII.3	La famille des facteurs de transcriptions MYC.	106
VIII.3.A	Membres de la famille MYC.	106

- Tables des matières -

VIII.3.B	Fonctions de c-MYC.....	107
VIII.4	La famille des facteurs de transcription MAD.....	112
VIII.4.A	Membres de la famille MAD.....	112
VIII.4.B	Fonctions générales des MAD.....	113
VIII.4.C	Modèles murins [MXD ^{KO}].....	114
VIII.5	Focus sur le facteur de transcription MAD4.....	115
VIII.5.A	Rôle dans le contrôle du cycle cellulaire et la différenciation.....	115
VIII.5.B	Fonctions dans les cellules précurseurs.....	117
VIII.5.C	MAD4 dans l'épiderme et les kératinocytes.....	118
VIII.6	Interactions entre le réseau MYC/MAX/MAD et les voies TGF- β et Wnt.....	118
	<u>Objectifs de la thèse</u>	121
	<u>Méthodologie</u>	125
	Section 1.....	127
	Section 2.....	141
	Section 3.....	145
	<u>Résultats</u>	149
	Chapitre 1. Identification des gènes <i>KLF4</i> et <i>MXD4</i> en tant que candidats à la régulation du caractère souche des PK.....	151
	Chapitre 2. Rôle du facteur de transcription KLF4 dans le contrôle des fonctionnalités des PK.....	155
	Chapitre 3. Rôle du facteur de transcription MAD4 dans le contrôle des fonctionnalités des PK.....	173
	<u>Discussion/perspectives</u>	199
	<u>Conclusion</u>	217
	<u>Annexes</u>	221
	<u>Références bibliographiques</u>	267
	<u>Résumé</u>	287

LISTE DES ABREVIATIONS

- Liste des abréviations -

- Liste des abréviations -

[<i>KLF4^{KD}</i>] : Contexte cellulaire où KLF4 est réprimé	CDC25 : cell division cycle 25
[<i>KLF4^{OE}</i>] : Contexte cellulaire où KLF4 est surexprimé	CDK/CDKI : kinase dépendante des cyclines / inhibiteur
[<i>KLF4^{WT}</i>] : Contexte cellulaire où KLF4 est normal	CEA : Commissariat à l'Énergie Atomique
[<i>MXD4^{KD}</i>] : Contexte cellulaire où MXD4 est réprimé	CFU : Capacité à former des colonies
[<i>MXD4^{WT}</i>] : Contexte cellulaire où MXD4 est normal	ChIP-seq : Immunoprécipitation de la chromatine couplée au séquençage
³ H-T : Thymidine tritiée	CK1α: casein kinase 1α
3T3 : 3-day transfer, inoculum 3×10 ⁵ cells	CK5: cytokeratin 5
4Mc : 4 mois après culture	CMLV : cellule du muscle lisse vasculaire
8Mc : 8 mois après culture	c-MYC : facteur de transcription de la famille MYC
A83-01 : inhibiteur de la voie TGF-β	CNA : Aberration du nombre de copies
ADH ⁺⁺⁺ : kératinocytes sélectionnés par adhérence sur collagène I	CNV : Variation du nombre de copies
ADN : acide désoxyribonucléique	COLO-320 : lignée cellulaire d'adénocarcinome de colon humain
ADNc : acide désoxyribonucléique codant	CSA : cellule souche adulte
ALV : acute leukosis virus	CSE : cellule souche embryonnaire
AMPc : adénosine monophosphate cyclique	CSH : cellule souche hématopoïétique
AP1 : activating protein 1	CSK/KSC : cellule souche kératinocytaire / keratinocyte stem cell
APC : adenomatosis polyposis coli	CSPr : cellule souche de prostate
ARN : acide ribonucléique	CSR : Consensus Stemness Ranking
ARNm : acide ribonucléique messenger	C-ter : Extrémité c-terminale d'une protéine
AT/TA : cellule d'amplification transitoire / transit-amplifying cell	DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole
Balb/MK : lignée cellulaire épithéliale murine	DED : Derme dé-épidermisé
BCC : Basal Cell Carcinoma, Carcinome Baso-Cellulaire	DGA : Délégation Générale de l'Armement
bHLHZIP : basic Helix Loop Helix Zipper	DKK : Dickkopf protein
BiFC : Bimolecular fluorescence complementation	DMSO : diméthylsulfoxyde
BMP : Bone Morphogenic Protein	DP : doublement de population
BrdU : bromodésoxyuridine	DSG3 : desmogléine 3
<i>Bulge</i> : zone renflée au niveau du follicule pileux, niche des CSK	Dsh : Disheveled
Ca ²⁺ : ion calcium	EB : corps embryoïde
CamKII : protéine kinase Ca ²⁺ /calmoduline-dépendante	EBJ : epidermolyse bulleuse jonctionnelle
CAT: Chloramphenicol acetyltransferase	E-Box : Boite E, site de fixation pour les FdT MYC et MXD
CBP/p300 : complexe protéique ayant une activité HAT	EGF/EGFR : Facteur de croissance épidermique / récepteur
CCNB1: cycline B1	EIF : épiderme interfolliculaire
CCND1 : cycline D1	EPU : unité de prolifération épidermale
CD : cellule différenciée	FAD : milieu de culture semi-défini pour les kératinocytes
CD200 : cluster de différenciation 200	FdT : facteur de transcription
CD34 : cluster de différenciation 34	FGF : facteur de croissance fibroblastique
CD41 : cluster de différenciation 41	FLT3 : Fms-like tyrosine kinase 3
CD71 : cluster de différenciation 71 , récepteur à la transferrine	FOXO : forkhead box O
CDC20 : cell division cycle 20	

- Liste des abréviations -

Fz : Frizzled	LRP : lipoprotein related receptor protein
G1-S-G2-M : phases du cycle cellulaire	LTBP : LTGF-B Binding Protein
GFP/EGFP : green fluorescent protein / enhanced	LTGF- β : latent TGF- β
GKLF : gut-KLF	MAX : MYC associated factor X
GO : gene ontology	MCI : masse cellulaire interne
GSK3-B : glycogen synthase kinase 3- β	MCSP : melanoma associated chondroitin sulfate proteoglycan
HaCat : lignée cellulaire de kératinocytes immortalisés	MELC : multi epitope ligand cartography
HAT : histone acétyltransférase	miR : micro ARN
HDAC : histone désacétylase	MM : matériels et méthodes
HEK293 : lignée cellulaire de rein embryonnaire humain	MOI : multiplicité d'infection
HES : hématoxyline, éosine, safran	MXD1 : MAX Dimerization Protein 1
HF/FP : hair follicle / follicule pileux	MXD3 : MAX Dimerization Protein 3
HL-60 : lignée cellulaire de leucémie humaine	MXD4 : MAX Dimerization Protein 4
IGF-R : récepteur du facteur de croissance à l'insuline	MXI1 : MAX interactor 1
iPSC : cellule souche pluripotente induite	NFAT : nuclear factor of activated T cell
ITA6 : intégrine- α 6	NLS : Nuclear Localisation Sequence
ITB1 : intégrine- β 1	N-MYC : membre de la famille MYC
JDE : jonction dermo-épidermique	N-ter : extrémité N-terminale d'une protéine
KD : knock-down	OCT : optimal temperature cutting compound
KDa : kilo dalton	OHT : 4-hydroxy-tamoxifen
Ker-ES : kératinocyte dérivé de cellule souche embryonnaire	P21 ^{Cip1} : protéine inhibitrice des CDK
KGM-Gold : milieu de culture semi-défini pour kératinocyte	p27 : protéine inhibitrice des CDK
KLF4 : Krüppel Like Factor 4	p53 : connu aussi sous le nom TP53 : tumor protein 53
KO: Knock-out	p57 : protéine inhibitrice des CDK
KRT : kératine	p63 : homologue de p53
KSFM : keratinocyte serum free medium	PCP : planar cell polarity
LacZ : gène de l'opéron lactose, souvent utilisé comme gène rapporteur	PGc : culture pré-greffe
LAMB3 : gène codant une sous unité de la laminine 332	PI3K/AKT: phosphatidylinositol 3-kinase/Protein Kinase B
LAP : Latency associated protein	PK : précurseurs kératinocytaires
LEF/TCF: groupe de FdT impliqué dans la voie Wnt	PLA : proximity ligation assay
LGRK : Laboratoire de Génomique et Radiobiologie de la Kératinoïèse	PLC : pulse label cell
LIF : leukemia inhibitory factor	PP2A : protéine phosphatase 2A
LLC : large latent complex	Pulse-chase : action de marquage au BrdU ou ³ H-T puis suivi du marquage dans le temps
L-MYC : facteur de transcription de la famille MYC	RNA-seq : séquençage de l'ARN
lncRNA : ARN long non codant	ROCK : Rho-associated protein kinase
LRC : label retaining cell	ROI : région d'intérêt
Lrig1 : Leucine Rich Repeats And Immunoglobulin Like Domains 1	RT-dd-PCR : réaction en chaîne par polymérase digitale en gouttelettes après une rétrotranscription

- Liste des abréviations -

RT-q-PCR : réaction en chaîne par polymérase quantitative après une rétrotranscription

SBE : Smad binding element

SCC : squamous cell carcinoma

SD : déviation standard

SEM : erreur standard à la moyenne

shARN : small hairpin ARN

siARN : small interfering ARN

SID : Sin interacting domain

SLC : small latent complex

STAT3 : Signal transducer and activator of transcription 3

Stemness : caractère souche

SVF : serum de veau foetal

TAD : trans activation domain

TAp63 : isoforme de p63 doté d'un domaine transactivateur

TERT : telomerase reverse transcriptase

TEWL : trans epidermal water loss

TFR1: récepteur à la transferrine 1

TGF- β : facteur de croissance transformant β

TRRAP : Transformation/Transcription Domain Associated Protein

UPS : unité pilo-sebacé

UVA/B : rayonnement ultraviolet A/B

WPRE : Woodchuck hepatitis virus post transcriptional regulatory element

WT : wild-type

Y-27632 : inhibiteur de la voie ROCK

YFP : yellow fluorescent protein

ZNF750 : protéine à doigt de zinc 750

Δ n63 : isoforme de p63 dépourvu de la partie N-terminale

ETAT DE L'ART

- Etat de l'art -

I La peau

Cette partie décrit la peau : ses principales fonctions et structures, les composants cellulaires de ce tissu et de ses différents compartiments, avec une emphase particulière sur les compartiments épidermiques. Enfin, une comparaison de la peau humaine et de la peau de rongeur, modèle d'étude de référence en biologie, sera présentée.

I.1 Fonctions et structures de la peau.

I.1.A Fonctions.

La peau est le plus grand organe du corps humain, avec une superficie d'environ 2 m². Cet organe très étendu possède trois fonctions principales :

- Premièrement, la peau joue un rôle de protection vis-à-vis des agressions extérieures. On appelle cela la fonction barrière, assurée par l'épiderme. Les agressions extérieures peuvent être de plusieurs types : stress biologique (contaminations bactériennes et/ou virales), stress mécaniques (coupures, déchirures...), stress chimique (pollution...) ou encore stress radiatif (UVA et UVB émis par le rayonnement solaire par exemple)
- Deuxièmement, la peau possède un rôle de régulation de l'homéostasie corporelle, à deux niveaux. Grâce à des thermorécepteurs, la peau permet une régulation de la température corporelle par le biais de processus tels que la vasoconstriction/dilatation et la sudation. Elle permet aussi de limiter les échanges gazeux avec l'extérieur, et ainsi éviter une déshydratation excessive du corps.
- Troisièmement, la peau assure une fonction sensorielle. Elle possède des récepteurs à la douleur (nocicepteurs) et au toucher, comme les terminaisons nerveuses reliées au poil, et les récepteurs à la pression.

- Etat de l'art – I. La peau

I.1.B Structure et organisation.

La peau est un organe complexe composée de deux compartiments, le derme et l'épiderme, et un compartiment de support appelé l'hypoderme (Figure 1). Chacun de ces compartiments abrite différents types cellulaires (kératinocytes, cellules de Langerhans, mélanocytes, fibroblastes, adipocytes, cellules endothéliales ...) et assure des fonctions spécifiques (barrière, support, thermorégulation, pigmentation, immunité ...). La couche de support, la plus profonde, est l'hypoderme, sur laquelle repose la couche inférieure, le derme. La couche supérieure de la peau s'appelle l'épiderme. L'épiderme est lui-même un tissu pluristratifié, composé de quatre couches. Enfin, des annexes épidermiques, telles que les follicules pileux, les glandes sébacées et les glandes sudoripares, sont implantées profondément à travers le tissu cutané.

Figure 1 : Représentation schématique de la peau : compartiments et annexes épidermiques.

La peau se compose de 2 compartiments : l'épiderme et le derme. L'hypoderme est un tissu de soutien matriciel. La peau est un organe complexe qui contient de nombreux types cellulaires qui forment de multiples annexes épidermiques, telles que les follicules pileux ou les glandes sudoripares.

I.1.B.a L'hypoderme.

L'hypoderme est un tissu d'origine mésodermique, conjonctif et grasseux, qui se situe à l'interface entre le derme et les tissus sous-cutanés, tels que les muscles et les tendons, et permet son ancrage. L'hypoderme est constitué d'un réseau de fibres lâches permettant le passage des vaisseaux sanguins et des nerfs. Ces derniers permettent, respectivement, la vascularisation des tissus et la conduite des messages nerveux, conférant des propriétés sensibles à la peau. L'hypoderme est aussi

- Etat de l'art – I. La peau

composé de cellules stockant de la graisse, les adipocytes. Sa composition en adipocytes peut varier selon les localisations anatomiques et les individus. Il agit comme une couche protectrice contre les chocs et permet le maintien d'une température corporelle stable.

I.1.B.b Le derme.

Le derme est la couche inférieure de la peau, et se situe entre l'hypoderme et l'épiderme. Il est séparé de l'épiderme par la jonction dermo-épidermique, zone permettant des échanges moléculaires entre ces deux compartiments cutanés. C'est un tissu conjonctif d'origine mésodermique, formé de nombreux composants tels que des protéoglycanes, des fibres de collagènes et d'élastines hautement organisées pour former une matrice extracellulaire. Les composants sont sécrétés par des cellules spécialisées : les fibroblastes dermiques, qui sont les cellules présentes majoritairement dans le derme. On retrouve aussi de nombreuses cellules immunitaires telles que des cellules dendritiques, des monocytes et des macrophages. La présence de vaisseaux sanguins est aussi observable dans le derme. Le derme a pour fonction principale d'assurer un support matriciel et nutritif pour la croissance des kératinocytes de l'épiderme par l'intermédiaire des vaisseaux sanguins et de la communication cellulaire, mais aussi un rôle de protection contre les pathogènes.

D'un point de vue structurel, le derme peut être séparé en deux zones : le derme papillaire et le derme réticulaire, composés respectivement de fibroblastes papillaires et réticulaires. Ces deux zones du derme se différencient majoritairement par la composition et l'organisation de la matrice extracellulaire sécrétée par les fibroblastes. Le derme papillaire est caractérisé par une fine couche de fibres de collagène de type I et III, peu organisées, formant des invaginations dans l'épiderme appelées papilles dermiques. Elles augmentent la zone d'échange entre le derme et l'épiderme. Le derme réticulaire, quant à lui, contraste par une organisation importante des fibres de collagène. La composition diffère également, comme par exemple la proportion de fibres de type III ou l'expression d'autres composants de la matrice extracellulaire tels que la déposition de protéoglycanes comme la décorine ou le versican ([Sorrell & Caplan 2004](#)).

Bien que délaissée par le passé, la recherche sur le derme est maintenant un domaine très actif. Des équipes travaillent par exemple à comprendre le rôle des matrices extracellulaires dans le vieillissement cutané ([Haydont et al 2019](#)), ou encore à identifier et caractériser des sous-populations de fibroblastes dermiques et comprendre leur implication dans la régénération épidermique ([Philippeos et al 2018](#)).

- Etat de l'art – I. La peau

I.1.B.c L'épiderme interfolliculaire.

D'origine ectodermique, l'épiderme est la couche la plus superficielle de la peau, percée par des follicules pileux. Par définition, l'épiderme interfolliculaire (EIF) est l'épiderme entre les follicules pileux. Cette distinction est importante car des différences structurelles, fonctionnelles et phénotypiques majeures sont observées entre l'EIF et les follicules pileux. L'épiderme est solidement ancré sur le derme au niveau de la membrane basale. La zone de jonction est appelée jonction dermo-épidermique (JDE), où se situe la lame basale. Cette zone permet des échanges moléculaires entre le derme et l'épiderme. Au niveau de la JDE, l'épiderme peut former des crêtes épidermiques, entre les papilles dermiques, qui augmentent la zone d'échange avec le derme. L'épaisseur de l'épiderme varie en fonction des sites anatomiques, entre 50 µm pour l'épiderme du front ou du visage, et 500 µm pour le bout des doigts ([Whitton & Everall 1973](#)). Chez l'humain, il se renouvelle entièrement en un cycle d'environ 28 jours.

L'épiderme est un tissu pavimenteux, pluristratifié, composé de quatre types cellulaires principaux ([Baroni et al 2012](#)). Les kératinocytes sont les cellules majoritaires de l'épiderme (80 à 90% du tissu). Ce sont eux qui assurent le maintien de l'intégrité du tissu, en permettant un renouvellement constant des kératinocytes lors d'un processus appelé kératinopoïèse. Dans des proportions moindres (5 à 10 %), des cellules appelées mélanocytes secrètent un pigment, la mélanine. Ce pigment est transféré aux kératinocytes adjacents et joue un rôle dans la protection de l'ADN de ces cellules aux expositions ionisantes (rayonnements UVA et B). C'est la mélanine qui donne la coloration à la peau. Des cellules immunitaires sont également présentes dans l'épiderme, comme les lymphocytes et les cellules de Langerhans. Ce sont des cellules présentatrices d'antigènes qui peuvent avoir un rôle pro-inflammatoire ou anti-inflammatoire selon le contexte cellulaire et moléculaire. Enfin, les cellules de Merkel jouent le rôle de mécanorécepteurs. Elles sont responsables de la sensation tactile fine, et coordonnent les dialogues moléculaires entre les kératinocytes et les cellules de Langerhans. L'épiderme peut se décomposer en quatre couches distinctes, de la plus profonde à la plus superficielle ([Figure 2](#)) :

- La couche basale est composée d'une monocouche de kératinocytes nucléés, très resserrés et polarisés. Ces cellules sont ancrées à la membrane basale à l'aide de complexes protéiques appelées hémidesmosomes. D'autre part, les jonctions serrées sont maintenues par les desmosomes et participent à la communication cellulaire, à la résistance mécanique du tissu et à son imperméabilité. C'est la seule couche de l'épiderme abritant des kératinocytes prolifératifs, les précurseurs kératinocytaires (PK) (CSK et

- Etat de l'art – I. La peau

progéniteurs). Cette couche germinative est donc essentielle dans le processus de renouvellement du tissu. Les PK présentent une hétérogénéité phénotypique, fonctionnelle et des mécanismes de régulation spécifiques. Au cours de leur différenciation, les kératinocytes synthétisent des protéines de structures spécifiques appelées kératines. La composition et la structure de ces kératines varie en fonction du niveau de différenciation des kératinocytes. Ainsi, les kératinocytes de la couche basale expriment des kératines spécifiques comme la kératine 5 ou la kératine 14, mais sont dépourvus des kératines 1 et 10, exprimées dans les couches suprabasales. Des mélanocytes sont aussi présents en faible quantité dans la couche basale de l'épiderme.

- La couche présente au-dessus de la couche basale est la couche épineuse. Elle est composée de 5 à 10 kératinocytes d'épaisseur, de forme polygonale dans les premières couches, et qui s'allongent dans les dernières couches. Ces cellules ont perdu leur capacité à proliférer, mais sont toujours vivantes et fonctionnelles et continuent leur processus de différenciation. Ainsi, elles se chargent en divers kératines (kératines 1 et 10), et commencent à produire d'autres protéines de différenciation précoce, comme l'involucrine. Dans les couches les plus supérieures, les kératinocytes de la couche épineuse peuvent commencer à produire des corps lamellaires ([Baroni et al 2012](#)).

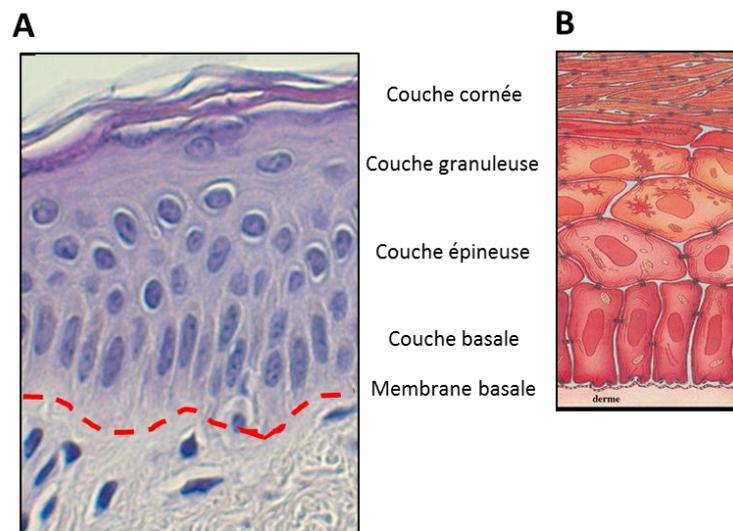


Figure 2 : L'épiderme humain : un tissu pluristratifié.

L'épiderme est un tissu pluristratifié, composé de quatre couches : la couche basale (*stratum basale*), la couche épineuse (*stratum spinosum*), la couche granuleuse (*stratum granulosum*) et la couche cornée (*stratum corneum*). L'épiderme, reposant sur la membrane basale, est majoritairement composé de kératinocytes (80 à 90 %) mais aussi de mélanocytes, de cellules sensibles ou encore de cellules immunitaires. **A.** Coupe d'épiderme humain coloré à l'hématoxyline-éosine-safran. La ligne pointillée représente la jonction dermo-épidermique **B.** Représentation schématique des couches de l'épiderme humain. *Source : CEA-LGRK*

- Etat de l'art – I. La peau

- La couche supérieure est la couche granuleuse, composée d'environ 5 couches de cellules. Les kératinocytes de cette couche sont caractérisés par une sécrétion élevée de protéines structurelles, telles que l'involucrine, la filaggrine et les kératines. Ils se gorgent en éléments du cytosquelette au profit de la perte du noyau, et s'allongent de plus en plus pour présenter finalement une orientation parallèle à la couche cornée. Ils présentent des corps lamellaires nombreux, constitués de lipides, d'enzymes hydrolytiques et de protéines qui servent à la bonne mise en place de la barrière protectrice au niveau de la couche cornée. Des grains de kératohyaline sont également présents dans ces cellules, dans lesquels sont stockés un précurseur de la filaggrine, la profilaggrine. Enfin, des transglutaminases peuvent agir comme agents de réticulation dans la couche supérieure, la couche cornée.
- La couche la plus superficielle de l'épiderme est la couche cornée. Elle se compose de kératinocytes totalement différenciés, anucléés, appelés cornéocytes. Ils sont orientés parallèlement à la membrane basale, et présentent un haut niveau d'organisation général. Ce sont des cellules mortes, composées de molécules produites lors des étapes précédentes de différenciation. A ce stade, des enzymes (transglutaminases) vont lier de manière covalente les kératines, l'involucrine, la filaggrine, la loricrine et les nombreux types de lipides afin de former une couche imperméable de protection. C'est cette couche qui assure la fonction barrière de l'épiderme. La migration des kératinocytes des couches inférieures vers la couche cornée va créer un processus naturel appelé desquamation, au cours duquel les cornéocytes vont être évacués de la surface de l'épiderme pour permettre son renouvellement ([Wickett & Visscher 2006](#)).

I.1.B.d La jonction dermo-épidermique.

La JDE est la zone située entre le derme et l'épiderme. A l'interface de ces deux compartiments se trouve la membrane basale. C'est une matrice extracellulaire hautement spécialisée, principalement sécrétée par les kératinocytes épidermiques de la couche basale. Elle est composée d'un ensemble complexe de protéines telles que la laminine 5, le collagène IV, le nidogen ou encore le perlecan. Cet assemblage moléculaire permet aux kératinocytes de la couche basale de s'ancrer fermement sur le derme par l'intermédiaire des hémidesmosomes. Les hémidesmosomes sont des complexes protéiques cruciaux : ils permettent aux filaments de kératines (5 et 14) présents dans les kératinocytes de la couche basale de se lier à la protéine transmembranaire intégrine $\alpha 6\beta 4$ par

- Etat de l'art – I. La peau

l'intermédiaire de diverses protéines. Cet assemblage interagit avec la laminine 5 de la membrane basale. La JDE possède plusieurs fonctions. Tout d'abord, c'est une zone qui régule les trafics moléculaires et cellulaires entre les compartiments épidermiques et dermiques, permettant d'établir, de maintenir ou de restaurer l'homéostasie cutanée. C'est aussi un élément essentiel pour l'ancrage de l'épiderme sur le derme. La membrane basale joue un rôle important dans les processus de remodelage ou de régénération cutanée en permettant la migration des kératinocytes vers la zone lésée ([Breitkreutz et al 2013](#)).

I.1.B.e Les annexes épidermiques.

Les annexes épidermiques, aussi appelées *adnexa*, sont un groupe de structures d'origine ectodermique. Elles comprennent les glandes sudoripares, les glandes sébacées, ainsi que les phanères (poils et ongles). Le complexe glande sébacée / follicule pileux forme une unité pilo-sébacée. Ces annexes épidermiques sont visibles à la surface de l'épiderme, mais sont ancrées plus profondément dans la peau, jusqu'au derme. Lors des processus de cicatrisation après une blessure, les kératinocytes des annexes épidermiques peuvent contribuer à la réparation de l'EIF par des processus de migration et de plasticité ([Cotsarelis 2006](#), [Ito et al 2005](#)).

Les glandes sudoripares sont des glandes spécialisées dans la production de sueur. Elles ont pour fonction principale d'aider à réguler la température corporelle. Elles se composent d'une section en forme de conduit, ouverte sur la surface de l'épiderme, d'une portion dermale droite, et de la glande sécrétrice en elle-même, enfouie profondément dans le derme.

L'unité pilo-sébacée regroupe plusieurs composants. Une unité fonctionnelle se compose du follicule pileux en lui-même, auquel lui est annexé une glande sébacée et le muscle érecteur du poil. Le follicule pileux se décompose en plusieurs parties ([Figure 3](#)) ([Kolarsick et al](#), [Schneider et al 2009](#)):

- La tige du poil, formée de la médulla au centre, entourée par le cortex et la cuticule. Deux couches de cellules entourent la tige dans les zones les plus profondes du follicule : la gaine interne et la gaine externe, qui se prolonge au niveau de l'EIF.
- L'*infundibulum*, partie supérieure du follicule, comprise entre la glande sébacée et la surface cutanée, permet la sortie du poil à la surface de la peau.
- L'*isthmus*, partie intermédiaire, comprise entre la glande sébacée et la base du muscle érecteur du poil. Cette partie contient une zone importante appelée le *bulge*. Le *bulge* abrite des cellules souches épidermiques qui font partie de la gaine externe ([Ohyama 2007](#)). Ces cellules présentent un phénotype différent des CSK de l'EIF, puisqu'elles sont positives pour la kératine 15, la kératine 19 et le CD200. Elles contribuent à la croissance

- Etat de l'art – I. La peau

de nouveaux poils mais aussi à la régénération cutanée en cas de lésion par un processus de migration des kératinocytes ([Ito et al 2005](#)). L'*isthmus* et l'*infundibulum* forment la partie permanente du follicule pileux.

- La partie inférieure se situe entre le *bulge* et la papille dermique. Cette partie est transitoire car elle dégénère lors de la catagène. Elle est remodelée à chaque nouveau cycle de croissance du poil. Cette partie se compose du bulbe, qui contient les cellules matricielles entourant les côtés et le dessus de la papille dermique. Les kératinocytes matriciels sont extrêmement prolifératifs, et produisent la tige du nouveau poil.

La glande sébacée est adossée au follicule pileux. Elle est constituée de cellules spécialisées dans la sécrétion du sébum que l'on appelle sébocytes. La structure de la glande est telle que les sébocytes vont maturer en se dirigeant vers le centre de la glande. A cours de leur maturation, les sébocytes secrètent le sébum dans leur cytoplasme, se chargent en lipides, et une fois parvenus dans le centre de la glande, dégénèrent pour libérer leur contenu dans l'*infundibulum* via le conduit sécrétoire de la glande. Cette sécrétion permet de lubrifier le poil lors de sa pousse et joue aussi un rôle de protection ([Kolarsick et al 2011](#)).

La pousse des poils suit un cycle permanent de 3 étapes : l'anagène, la catagène et la telogène. L'anagène est la phase de prolifération active, durant laquelle le poil grandit d'environ 0.33 mm par jour. La catagène est une phase d'involution durant laquelle de nombreuses cellules du fuseau externe sont entrées en apoptose. Enfin, la telogène est une phase de repos, dans laquelle les poils peuvent tomber après être poussés par un nouveau poil en anagène.

Le muscle érecteur du poil s'insère au niveau du *bulge* d'un côté, et du derme papillaire de l'autre. En cas de stimulus thermique, le muscle va se contracter ce qui a pour conséquence de relever le poil.

Figure 3 : Représentations d'un follicule pileux : une annexe épidermique complexe.

Le follicule pileux se compose de 3 parties : l'*infundibulum* et l'*isthmus* (qui forment la partie supérieure, permanente), la partie inférieure transitoire qui contient le bulbe pileux. **A.** Coupe sagittale de follicule pileux humain montrant la région permanente et la région transitoire du follicule pileux. Les images de droite sont des grossissements des zones représentées dans les rectangles. BM : membrane basale ; APM : muscle érecteur du poil ; CTS : gaine de tissu conjonctif ; DP : papille dermique ; M : matrice ; HS : tige du poil, IRS : gaine racinaire intérieure ; ORS : gaine racinaire extérieure ; SG : glande sébacée. **B.** Représentation schématique de la structure d'un follicule pileux.

I.1.C La peau murine : comparaisons avec la peau humaine.

I.1.C.a Différences structurelles.

De nombreux travaux sur les cellules souches épidermiques ont été réalisés à l'aide de modèles murins. En effet, il présente plusieurs intérêts : c'est un modèle *in vivo* accessible, pour lequel il est aisé de générer de nouvelles souches d'animaux. De plus, l'étude précise d'un compartiment cellulaire ou d'un gène en particulier peut être facilitée grâce à l'établissement de lignées de souris génétiquement modifiées. Cependant, la peau des modèles murins présente des différences profondes avec la peau humaine. Les découvertes basées sur des modèles murins ne sont donc pas toujours extrapolables directement à l'humain.

- Etat de l'art – I. La peau

La première particularité de la peau murine, comparée à la peau humaine, est macroscopique (**Figure 4**) : c'est une peau percée de très nombreux follicules pileux, recouvrant quasiment l'intégralité du corps de l'individu. Proportionnellement, la souris présente donc très peu de zone d'EIF comparée à l'humain. L'épiderme adulte murin se compose en moyenne de seulement 2 à 3 couches de kératinocytes pour une épaisseur moyenne inférieure à 25 µm, tandis que l'épiderme humain est formé de 6 à 10 couches de kératinocytes (épaisseur supérieure à 100 µm) ([Khavari 2006](#)). De plus, l'expression et la fonction de gènes régulant l'homéostasie épidermique, bien que commune pour certains réseaux, peut aussi différer, comme c'est le cas par exemple pour les facteurs de transcriptions de la famille AP1 (activator protein 1) ([Zenz et al 2005](#)).

Figure 4 : Coupes de peaux murines et humaines : comparaisons anatomiques.

Coupes de peaux murines et humaines (en haut, 5x, en bas, 20x), montrant des différences anatomiques entre les deux espèces. L'épaisseur de l'épiderme et du derme sont différentes. La présence du *panniculus carnosus* est visible chez la souris, ainsi que de nombreux follicules pileux. HF : follicule pileux, BMZ : zone de la membrane basale, B : couche basale, S : couche épineuse, G : couche granuleuse, SC : couche cornée.

La structure des follicules pileux est elle aussi légèrement différente. En effet, le *bulge*, réservoir de CSK commun chez les deux espèces, est anatomiquement peu marqué chez l'humain, mais très visible chez la souris. De plus, les marqueurs moléculaires des cellules du *bulge* présentent également des différences entre les 2 espèces ([Ohyama 2007](#)). Le cycle de croissance des follicules pileux de souris est synchrone et actif surtout pendant les 2 premiers mois chez la souris. Cette situation est différente chez l'humain, où les FP, très peu denses, cyclent généralement de manière asynchrone ([Khavari 2006](#)). Enfin, la majeure partie des mélanocytes murins se trouve au niveau des follicules pileux, contrairement à l'humain, où ils se trouvent dans la couche basale de l'épiderme inter folliculaire.

La souris présente également un muscle cutané exclusif, le *panniculus carnosus*, situé entre le tissu adipeux dermique et les tissus sous-cutanés et le fascia musculaire. Ce muscle, vestigial chez l'humain, permet à l'animal une contraction cutanée, et jouerait un rôle dans la régulation thermique et la revascularisation de blessures profondes ([Greenwood 2010](#), [HUGHES & DANN. 1941](#)).

- Etat de l'art – I. La peau

I.1.C.b Différences fonctionnelles.

Toutes ces différences structurelles (localisation des mélanocytes, épaisseur et organisation de l'épiderme et du derme, marqueurs des CSK ...) ont des conséquences sur les fonctions de la peau murine. En effet, l'épaisseur restreinte de l'épiderme murin et la présence du *panniculus carnosus* pourrait conduire à une fonction barrière moindre chez la souris. De plus, les cellules murines sont plus sensibles aux mutations et aux cancers. La plupart des cancers qui les touchent sont d'origine non-épithéliale, comme des sarcomes ou des lymphomes alors que les cancers humains sont plus souvent d'origine épithéliale (Khavari 2006). De plus, des carcinogènes chez le rongeur ne le sont pas forcément chez l'humain, et inversement ([Anisimov et al 2005](#)). Les propriétés de cicatrisation des tissus murins sont différentes, avec très peu de formation de cicatrices chéloïdes chez les souris en comparaison à l'humain. Pour finir, les marqueurs de CSK, bien qu'une partie soit commune entre la souris et l'humain, présentent également des différences, notamment dans les follicules pileux ([Ohyama 2007](#)).

Ces différences fonctionnelles sont donc essentielles à prendre en considération lors des études portant par exemple sur la cicatrisation, la cancérologie ou encore l'étude des populations de cellules souches épidermiques. Les découvertes en biologie fondamentale basées sur le modèle murin et les applications qui en découlent ne sont pas toutes directement extrapolables à l'humain.

La peau joue un rôle de protection pour l'organisme. Elle est formée du derme, de l'épiderme, et complétée par des annexes épidermiques tels que les follicules pileux. Elle présente des similarités, mais également des différences importantes avec la peau des modèles d'études murins. La fonction barrière est assurée par l'épiderme, constamment renouvelé par les précurseurs de kératinocytes (cellules souches et progéniteurs).

- Etat de l'art – II. Les cellules souches : découverte, fonctionnalités et types de CS.

II Les cellules souches : découverte, fonctionnalités et types de CS.

Cette partie relate la découverte des cellules souches, puis a pour objectif de décrire les fonctions et les caractéristiques propres à une cellule souche. Enfin, elle permettra de décrire les différents types de cellules souches.

II.1 Découverte et historique.

La découverte et les réflexions sur les cellules souches sont des concepts très récents à l'échelle humaine. Le terme « cellule souche » (abrégé « CS ») fut employé la première fois par un médecin et scientifique allemand qui travaillait principalement en biologie du développement, Ernst Haeckel (1834-1919). Dans une de ces lectures ([Haeckel 1868](#)), il utilisa le terme allemand « Stammzelle » (« stem cell » en anglais) pour désigner un ancêtre phylogénique des organismes pluricellulaires. Par la suite, en 1877, il ajusta la définition du terme afin de désigner également l'œuf fertilisé en tant que cellule d'origine de toutes les cellules d'un organisme. Cette définition fut par la suite reprise et popularisée dans le domaine de l'embryologie et de la zoologie, par des médecins et scientifiques élèves de Haeckel, tel que Oscar et Theodor Boveri (1862-1915) ([Boveri 1892](#)). Cependant, ceux-ci ne considéraient pas la recherche sur les cellules souches comme prioritaire. Dans les décennies suivantes, le concept fut repris et développé, avec cependant des variations dans sa définition précise. Cependant, Boveri donna des caractéristiques cellulaires essentielles pour être considéré comme une cellule souche, encore acceptées de nos jours : la capacité d'autorenouvellement, et la capacité à se différencier en cellules somatiques ou germinales spécifiques. Les bases de la biologie moderne des cellules souches étaient jetées. Au début des années 1900, Alexander Maximov (1874-1928), médecin et scientifique russe, proposa que tous les lignages hématopoïétiques originaient du lymphocyte au cours de l'embryogenèse, mais aussi tout au long de la vie de l'individu. Ce fut la première notion de cellule souche adulte, étendue hors du domaine de l'embryogenèse ([Maximow 1909](#)). En 1961, James Till et Ernest McCulloch ont apporté une contribution majeure dans la démonstration fonctionnelle de la présence de cellules souches adultes. Après avoir irradié des souris avec une dose supralétale de radiation, ils ont injecté des quantités croissantes de cellules de moelle osseuse par voie intraveineuse. Dix jours après l'injection, ils ont observé la formation de nodules de cellules prolifératives dans la rate des animaux. Ces colonies, qu'ils supposèrent d'origine clonale au vu du très faible nombre de cellules injectées, comprenaient des cellules érythroblastiques et myéloblastiques, confirmant ainsi la présence de cellules hématopoïétiques capable de former des colonies (CFU ou Colony-Forming Unit) et de se différencier en différents lignages ([Till & Mc Culloch 1961](#)).

- Etat de l'art – II. Les cellules souches : découverte, fonctionnalités et types de CS.

Dans les années 70, Howard Green (1925-2015) fut un des pionniers de la culture de kératinocytes. Avec son collaborateur James Rheinwald, ils identifièrent et isolèrent depuis un tératome de souris une lignée présentant une morphologie épithéliale et parvinrent à la cultiver en présence de couches nourricières de fibroblastes murins 3T3 irradiés ([Rheinwald & Green 1975a](#), [Rheinwald & Green 1975b](#)). Par la suite, Green poursuivit ses travaux et apporta des contributions majeures dans la compréhension de la biologie des précurseurs épidermiques ([Barrandon & Green 1987b](#)), de leur culture ([Green et al 1979](#)) et leurs applications en thérapie pour les soins aux grands brûlés ([Gallico et al 1984b](#)).

II.2 Définition et caractéristiques d'une cellule souche.

Au fil des années et des découvertes successives dans les différents modèles de cellules souches, les scientifiques ont proposé successivement des définitions et caractéristiques pour une cellule souche. Cependant, du fait de la grande diversité, d'une part, des modèles étudiés (souris, humain, drosophile, nématode) et d'autre part, des cellules étudiées (embryonnaires, hématopoïétiques, neurales ou encore épithéliales), il est difficile de définir de manière générale une cellule souche avec précision. L'une des définitions qui semble la plus pertinente est une définition par les caractéristiques fonctionnelles de ces cellules ([Potten & Loeffler 1990](#)). Dès lors, il faut donc tester ces fonctions lors d'expériences, qui par nature peuvent les influencer et les modifier. Néanmoins, en recoupant les études précédentes, il est possible de dégager plusieurs caractéristiques génériques définissant une cellule souche. Les deux premières sont les caractéristiques fondamentales, partagées par toutes les cellules souches (autorenouvellement et potentiel de différenciation). La dernière (quiescence) peut dépendre du type cellulaire, de la localisation des cellules ou encore de conditions particulières (blessure, développement ...).

II.2.A L'autorenouvellement et la division asymétrique.

La caractéristique la plus fondamentale permettant de définir une cellule souche est sa capacité à s'autorenouveler. L'autorenouvellement est un processus aboutissant au maintien d'un nombre constant de CS au sein du tissu qui les abritent. Quand une CS se divise, elle génère deux nouvelles cellules filles, de fonction identique (deux cellules souches) ou différente (une cellule souche et un progéniteur). Un concept directement associé au processus d'autorenouvellement est donc celui de la symétrie de la division lors de la mitose. Lorsqu'une cellule souche se divise, elle donne naissance à deux autres cellules. Les cellules filles peuvent être deux cellules souches immatures, de fonction identique (division symétrique) ou une cellule souche et une cellule plus différenciée qui va proliférer

- Etat de l'art – II. Les cellules souches : découverte, fonctionnalités et types de CS.

activement pendant quelques cycles de division (cellule d'amplification transitoire, ou Transit-Amplifying (TA) cell) pour donner un grand nombre de cellules différenciées (CD) (Figure 5).

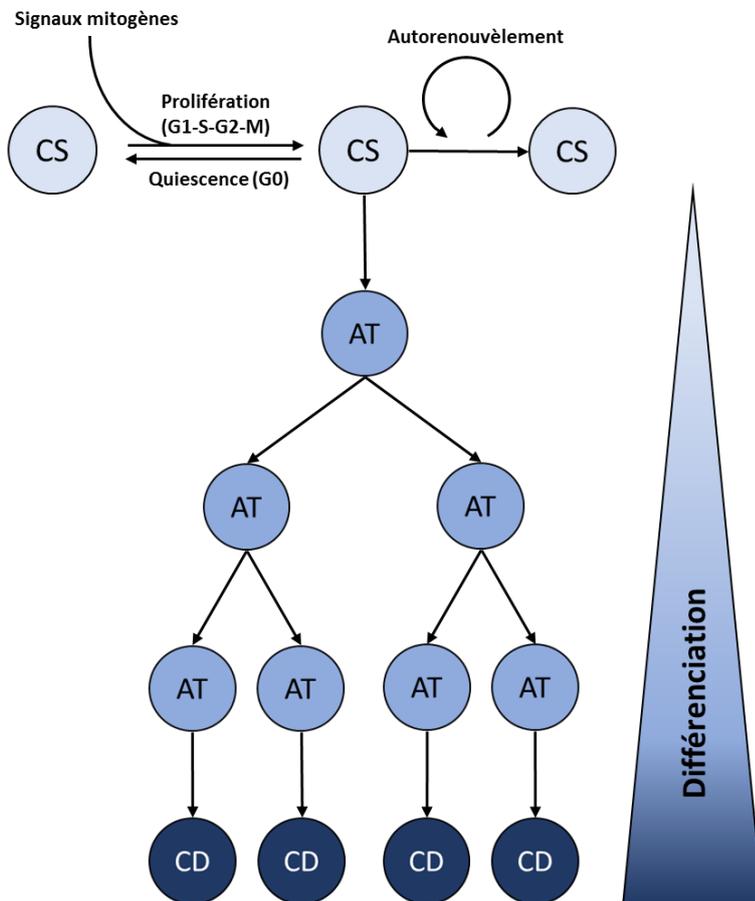


Figure 5 : L'autorenouveaulement et la différenciation des cellules souches.

Sous l'induction de signaux mitogéniques, une cellule souche (CS) quiescente peut être amenée à rentrer dans le cycle cellulaire et proliférer. Elle va se diviser et donner deux cellules filles : une cellule souche de fonction identique, qui va contribuer au maintien de la population de CS, et une cellule d'amplification transitoire (AT), qui va proliférer pendant 4 à 5 cycles de division cellulaire. La cellule AT contribue à l'expansion cellulaire en produisant une descendance qui s'engage dans la voie de la différenciation, pour aboutir à des cellules différenciées (CD).

Ce mécanisme est essentiel dans la biologie des cellules souches, puisqu'il permet, en condition d'homéostasie, de maintenir la population de cellule souche, mais aussi de temporairement augmenter celle-ci en cas de nécessité, en situation de cicatrisation par exemple, où de nombreuses cellules sont nécessaires à la réparation du tissu lésé. Les mécanismes qui déterminent le choix d'une cellule à se diviser de manière asymétrique sont régis notamment par l'orientation du fuseau mitotique. Le modèle qui a permis d'en apprendre le plus sur ces mécanismes est le neuroblaste de drosophile ([Horvitz & Herskowitz 1992](#)). Ce modèle est intéressant car il permet d'étudier le devenir de cellules souches pendant la neurogenèse embryonnaire en observant les mitoses consécutives, nombreuses lors du développement. Chez les mammifères, l'étude de la division asymétrique est techniquement plus difficile à réaliser, car les cellules souches adultes ont souvent des cycles cellulaires très longs, voire sont en état de quiescence. Cependant, le modèle de référence reste le développement de l'épiderme de souris, où les cellules de la couche basale peuvent effectuer des divisions symétriques ou asymétriques. Ainsi, dans l'épiderme, les divisions symétriques permettent le maintien du nombre

- Etat de l'art – II. Les cellules souches : découverte, fonctionnalités et types de CS.

de CS (homéostasie) ou l'augmentation de la surface de celui-ci lors du développement ([Poulson & Lechler 2010](#)). La division asymétrique quant à elle contribue directement à la stratification de l'épiderme et à la différenciation des kératinocytes en poussant les kératinocytes en position apicale, générant ainsi les couches suprabasales de l'épiderme ([Lechler & Fuchs 2005](#)) (Figure 6).

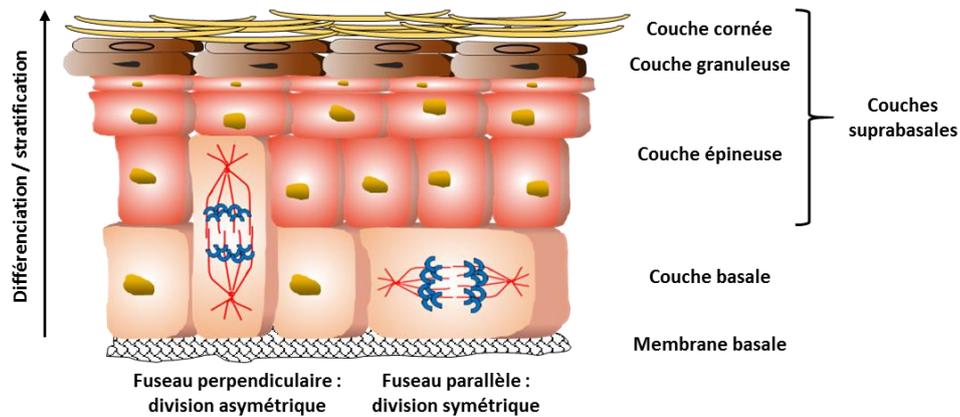


Figure 6 : Contribution de la division asymétrique à la stratification et différenciation de l'épiderme interfolliculaire.

Lors de la mitose, les kératinocytes de la couche basale peuvent orienter le fuseau mitotique perpendiculaire à la membrane basale et conduire à une division asymétrique, résultant en une cellule restant dans la couche basale et une cellule en voie de différenciation, poussée vers les couches supérieures. Ce processus s'appelle la stratification. A l'inverse, le fuseau peut être orienté parallèlement à la membrane basale, et ainsi donner deux kératinocytes qui vont rester dans la couche basale pour maintenir ou augmenter la population de cellules immatures.

La nature de la division est gouvernée par l'orientation du fuseau mitotique : si le fuseau est parallèle à la membrane basale, la division sera symétrique. Si le fuseau est perpendiculaire, la division sera asymétrique. L'orientation du fuseau semble être contrôlée par deux mécanismes différents : l'un intrinsèque à la cellule (ségrégation de déterminants moléculaires), l'autre extrinsèque (environnement de la cellule au moment de la division) (Figure 7).

Les mécanismes intrinsèques à la cellule reposent sur une ségrégation inégale des régulateurs de l'autorenouvellement lors de la mitose, résultant dans la répartition asymétrique de ceux-ci dans les deux cellules filles. Ce mécanisme induit une différence de fonctionnalités entre les deux cellules filles. Les cellules qui se divisent asymétriquement par ce mécanisme utilisent la polarité apico-basal ou planaire du tissu environnant pour définir un axe de polarité ([Fleming et al 2007](#)). Cet axe est ensuite utilisé pour répartir les déterminants moléculaires dans les cellules filles, de manière à ce qu'une seule des deux cellules filles hérite de ceux-ci (Figure 7A). De nombreux régulateurs de l'autorenouvellement ont été identifiés, principalement dans les neuroblastes de drosophile. Il peut

- Etat de l'art – II. Les cellules souches : découverte, fonctionnalités et types de CS.

s'agir par exemple du complexe protéique Par ([Kuchinke et al 1998](#), [Petronczki & Knoblich 2001](#), [Schober et al 1999](#), [Wodarz et al 1999](#)), qui adresse d'autres régulateurs dans le pôle basal des neuroblastes, de Numb ([Rhyu et al 1994](#)), un répresseur de la voie Notch, ou encore de Prospero et Inscutable. Les mécanismes de régulation intrinsèque sont des processus largement conservés au cours de l'évolution, et les régulateurs de l'autorenouveau ont donc généralement des analogues dans les autres espèces, notamment les mammifères ([Betschinger & Knoblich 2004](#), [Lechler & Fuchs 2005](#)).

Les mécanismes extrinsèques de régulation de l'autorenouveau quant à eux dépendent de l'environnement de la cellule en question au moment de sa division. L'environnement, appelé « niche », est la zone où résident les cellules souches dans les tissus adultes ([Schofield 1978](#)). La niche est une structure anatomique et fonctionnelle qui assure la maintenance, la protection et la régulation des fonctions des cellules souches. C'est une zone hautement interactive, entre les cellules souches et les cellules environnantes, appelées cellules de soutien, enrichie par des facteurs solubles. Les niches sont retrouvées dans de nombreux systèmes, comme le système hématopoïétique et la peau (*bulge* du follicule pileux). Dans le cas d'une division asymétrique régulée par un mécanisme dit extrinsèque, la cellule va orienter son fuseau mitotique et se diviser selon un axe qui va conduire la cellule fille à quitter la niche afin de subir un nouveau devenir ([Betschinger & Knoblich 2004](#)). Cette orientation est guidée notamment par les interactions physiques et les signaux moléculaires générés par la niche en elle-même ([Figure 7B](#)).

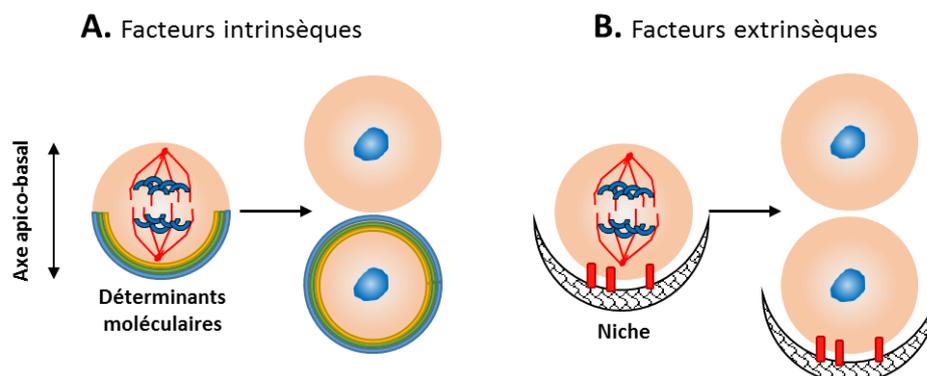


Figure 7 : Facteurs régulateurs de la division asymétrique.

Deux mécanismes peuvent être à l'origine d'une division asymétrique. **A.** La répartition de déterminants moléculaires (par exemple, Par, Numb, Prospero, Inscutable) spécifiquement au pôle basal ou apical d'une cellule en mitose contribue à l'orientation du fuseau mitotique. Ce sont des facteurs intrinsèques. **B.** L'autre mécanisme repose sur des facteurs extrinsèques à la cellule, comme des interactions physiques avec la niche ou des signaux moléculaires provenant des cellules voisines

- Etat de l'art – II. Les cellules souches : découverte, fonctionnalités et types de CS.

II.2.B La capacité de différenciation.

La deuxième fonction essentielle d'une cellule souche est sa capacité de différenciation, nécessaire pour maintenir et réparer les tissus dans lesquelles elle réside. Elles peuvent être classées en plusieurs catégories selon leur potentiel de différenciation. En effet, selon l'état de non-différenciation d'une cellule souche, celle-ci aura le potentiel pour donner un ou plusieurs types cellulaires, et un ou plusieurs tissus, issus des différents feuilletts embryonnaires. Il est possible de distinguer quatre degrés de « potence » : totipotente, pluripotente, multipotente et unipotente (Figure 8).

La totipotence : c'est la capacité d'une CS à se différencier en cellule embryonnaire mais aussi extra-embryonnaire, c'est-à-dire en tous les types de cellules et tissus d'un organisme (feuilletts ectodermique, mésodermique et endodermique) y compris les annexes embryonnaires. Seules ces cellules peuvent assurer la génération et la survie d'un organisme fertile et viable, car elles permettent la mise en place notamment du placenta. Les seules cellules totipotentes sont le zygote (œuf fertilisé) et les cellules issues du zygote durant les tout premiers stades de divisions.

La pluripotence : les cellules souches pluripotentes sont la descendance des cellules souches totipotentes. La pluripotence est la capacité à se différencier en toutes les cellules d'un organisme, c'est-à-dire en toutes les cellules issues des trois feuilletts embryonnaires (ectoderme, mésoderme et endoderme). Les cellules souches embryonnaires (CSE) et les cellules souches pluripotentes induites (iPSC) sont des exemples de pluripotence.

La multipotence : c'est la capacité d'une cellule souche à donner plusieurs types cellulaires d'un même lignage afin de générer et maintenir un organe ou tissu. Ces cellules souches peuvent se différencier seulement en un nombre limité de types cellulaires, qui sont apparentés. Les CS hématopoïétiques sont un exemple de cellules souches adultes multipotentes. Elles sont présentes dans les niches hématopoïétiques de la moelle osseuse et dans le sang circulant, et peuvent se différencier dans tous les lignages cellulaires composant le sang ([Hartenstein 2006](#)). Il existe aussi dans la peau des CS multipotentes : ce sont les CS localisées dans le *bulge* des follicules pileux, qui peuvent se différencier en sébocytes, en cellules kératinisées formant le poil ou encore participer à la réparation de l'EIF ([Oshima et al 2001](#), [Rochat et al 1994](#), [Taylor et al 2000](#))

L'unipotence : c'est la capacité d'une cellule souche à donner un seul et unique type cellulaire, tout en étant capable de s'autorenouveler. C'est une propriété des cellules souches somatiques adultes les moins immatures. C'est le cas par exemple des cellules souches musculaires, ou de la

- Etat de l'art – II. Les cellules souches : découverte, fonctionnalités et types de CS.

plupart des tissus épithéliaux, tels que les cellules souches de l'EIF, qui, en condition d'homéostasie, ne donneront que des kératinocytes ([Blanpain et al 2007](#)).

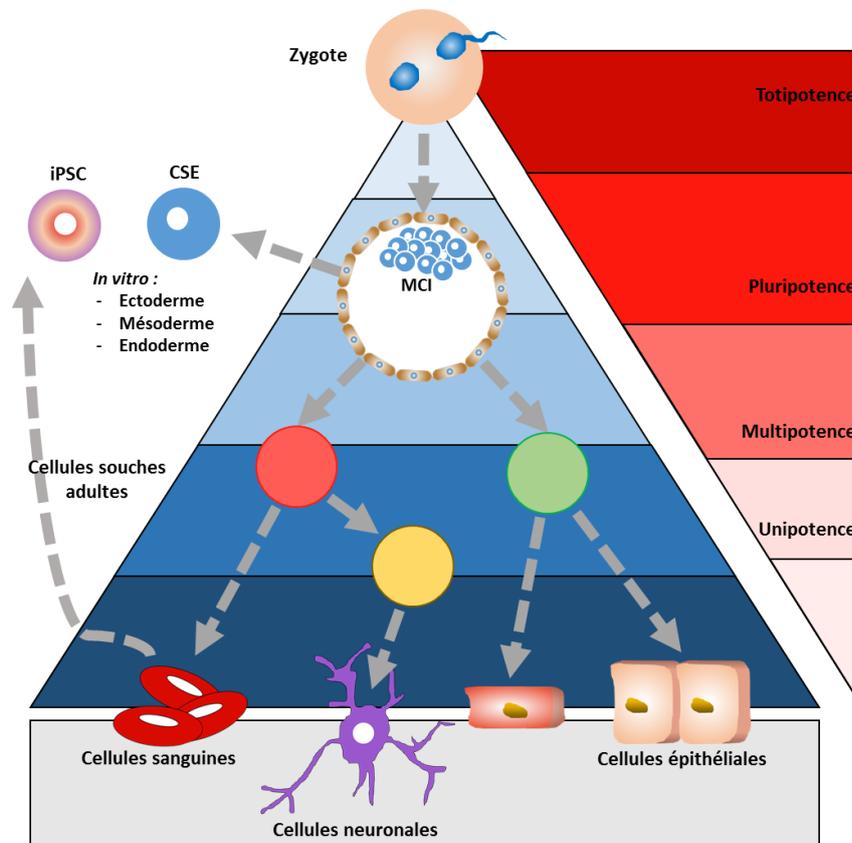


Figure 8 : Capacité de différenciation des cellules souches.

Le zygote et le stade *morula* précoce sont **totipotents**. Ils peuvent donner tous les types cellulaires d'un organisme, y compris les annexes extra-embryonnaires (placenta). Les cellules de la masse cellulaire interne (MCI), qui peuvent être extraites de l'embryon et propagées *in vitro* (cellules souches embryonnaires), et les cellules souches pluripotentes induites (iPSC), sont **pluripotentes**. Elles peuvent se différencier pour donner tous les types cellulaires des 3 feuillets embryonnaires. Les cellules souches adultes (CSA) peuvent être **multipotentes** (CS hématopoïétiques), générant tous les types cellulaires d'un même lignage, ou **unipotentes** (CS de kératinocytes), ne générant qu'un seul et unique type cellulaire.

II.2.C La quiescence.

La quiescence ([Figure 9](#)) est un état de dormance cellulaire transitoire, où la cellule n'est pas en état de prolifération active. C'est une phase particulière en marge du cycle cellulaire qui correspond à la phase G₀. Elle peut durer de quelques semaines à plusieurs années *in vivo*, en fonction du type cellulaire, des pressions extérieures exercées par la niche ou encore des stimuli comme une blessure. Cette propriété n'est cependant pas partagée par toutes les cellules souches. Par exemple, lors des phases de développement embryonnaire, le zygote est en prolifération très active afin d'augmenter

- Etat de l'art – II. Les cellules souches : découverte, fonctionnalités et types de CS.

considérablement le nombre de cellules pour générer les différents feuillets embryonnaires. De plus, durant l'embryogenèse, les organes ont également un besoin accru en cellules afin d'augmenter en taille et en superficie. Lors du développement, la quiescence n'est donc pas une propriété caractéristique des cellules souches.

Figure 9 : La quiescence et le cycle cellulaire.

Une cellule souche peut être engagée dans le cycle cellulaire (G1-S-G2-M) ou retirée du cycle, dans un état transitoire de dormance appelée quiescence. L'entrée et la sortie de la quiescence sont contrôlés par des facteurs intrinsèques (facteurs de transcriptions, kinases dépendantes des cyclines ...) ou extrinsèques à la cellule (sécrétions de facteurs solubles, réponse à une blessure).

Au contraire, les cellules souches adultes, présentes au sein des tissus, sont généralement quiescentes. Cependant, sous l'influence de signaux mitogéniques, elles ont la capacité de ponctuellement rentrer en division pour maintenir la population de cellules souches ou produire rapidement de nouvelles cellules pour réparer une lésion ou simplement maintenir l'intégrité d'un tissu. Le concept de quiescence a évolué au cours du temps : alors qu'au début, la quiescence était perçue comme un état « par défaut », imposé à la cellule par un manque de nutriments par exemple, elle est maintenant perçue comme un paramètre essentiel aux cellules souches adultes pour préserver leurs fonctions à long terme.

La compréhension des mécanismes de régulation de la quiescence est majeure pour mieux appréhender la biologie des CSA. Ces mécanismes peuvent être induits par des sources extrinsèques (niche, blessure ...) ou intrinsèques (réseaux de signalisation, facteurs de transcriptions ...). Les signaux extrinsèques peuvent être de nature variée, comme une sécrétion d'hormones, de cytokines et de messages moléculaires divers, ou une réponse à un stress (oxydatif, blessure ...). Des voies de signalisation importantes ont été identifiées comme la voie du TGF- β ([Blank et al 2008](#)), des BMP ([Zhang et al 2003](#)) ou encore la voie Wnt/ β caténine ([Kirstetter et al 2006](#)). Les signaux intrinsèques sont des réseaux de signalisation intracellulaires connus pour réguler la quiescence. Ils sont multiples, et certains ont été bien identifiés et documentés. Des approches d'inactivation génétique ont permis de démontrer par exemple que dans les cellules souches hématopoïétiques, une répression de p53 promeut l'entrée dans le cycle cellulaire, conduisant à une déplétion de la population de CSH ([Liu et al](#)

- Etat de l'art – II. Les cellules souches : découverte, fonctionnalités et types de CS.

[2009](#)). D'autres facteurs essentiels au maintien de la quiescence ont été identifiés, tels que p21^{Cip1}, p27 ou p57, des inhibiteurs des kinases dépendantes des cyclines (Cyclin-Dependant Kinases, CDK) ([Cheng et al 2000](#)).

II.3 Les différents types de cellules souches.

II.3.A Les cellules souches embryonnaires.

Dans les années 1960, la première lignée de cellules souches pluripotentes fut établie à partir de cellules de carcinome embryonnaires de souris, dérivées du compartiment indifférencié de tumeurs germinales ([Finch & Ephrussi 1967](#)). Ces cellules pouvaient être maintenues en culture à long terme, et pouvaient être différenciées, avec les signaux moléculaires adéquats, dans les trois feuillets embryonnaires ([Kleinsmith & Pierce 1964](#)). Ces travaux pionniers dans l'isolation et la culture de cellules pluripotentes permirent dans les années suivantes l'isolation et la culture de cellules souches embryonnaires de souris ([Evans & Kaufman 1981](#), [Martin 1981](#)), puis humaine ([Thomson et al 1998](#)).

Les cellules souches embryonnaires sont pluripotentes. Elles peuvent être obtenues de deux manières différentes. La première est l'utilisation de blastocystes préimplantatoire surnuméraires, initialement prévus pour une fécondation *in vitro*, et qui ne sont plus destinés à être implantés. Le blastocyste est une sphère de cellules, entourée de cellules trophoblastiques qui formeront le placenta. L'intérieur de cette sphère est appelé la masse cellulaire interne (MCI), depuis laquelle sont dérivées les cellules souches embryonnaires ([Figure 10A](#)). Ce sont les cellules de la MCI qui vont former l'embryon à terme, et sont capable de se différencier en tous les types cellulaires d'un individu. La deuxième méthode d'obtention de cellules souches embryonnaires est l'utilisation d'une méthode appelée le transfert de noyau de cellule somatique, communément appelé clonage ([Figure 10B](#)). Cette méthode a notamment donné naissance à la célèbre brebis Dolly ([Campbell et al 1996](#)). Brièvement, elle consiste à prélever un oocyte non fécondé dont on retire le noyau. En parallèle, le patrimoine génétique d'intérêt est extrait d'une cellule somatique. Ce noyau est ensuite transféré dans l'oocyte énucléé, qui va se développer pour donner forme à un embryon. Les cellules de la MCI peuvent être dérivées de la même manière que précédemment. Cette méthode est notamment utilisée pour générer par exemple des cellules murines génétiquement modifiées (modèles « knock-in » et « knock-out ») pour les études fonctionnelles de gènes spécifiques ([Figure 10C](#)) ([Thomas & Capecchi 1987](#)).

Figure 10 : Méthodes d'obtention des cellules souches embryonnaires.

Les CSE peuvent être obtenues de trois manières. **A.** Après fécondation et développement jusqu'au stade de blastocyste, les cellules de la MCI peuvent être extraites et cultivées *in vitro*. **B.** Après énucléation d'un ovocyte et récupération du noyau d'une cellule somatique donneuse, les deux composants cellulaires sont fusionnés. La cellule résultante se développe jusqu'au stade blastocyste, puis dérivées comme précédemment. **C.** Le matériel génétique peut être modifié par des techniques d'édition du génome par exemple, afin de générer des lignées de cellules ES ou des souches de souris modifiées.

Ces cellules ont suscité un intérêt croissant pour les chercheurs. Elles sont utilisées à des fins de recherche fondamentales pour comprendre l'embryogenèse et le développement, mais aussi pour générer des organoïdes en culture *in vitro* afin de modéliser des maladies ou des organes. Elles sont aussi porteuses d'espoir pour la thérapie cellulaire, puisqu'elles sont capables de générer, virtuellement, n'importe quel organe tout en maintenant constante la population de cellules souches. Elles présentent donc un intérêt potentiel pour la thérapie cellulaire et la médecine régénérative ([Rippon & Bishop 2004](#)). Des protocoles de différenciation en multiples types cellulaires sont maintenant connus (revue ([Murry & Keller 2008](#))). Bien que les connaissances les plus avancées soient sur le modèle murin, il est par exemple possible de générer des kératinocytes à partir de cellules souches embryonnaires humaines ([Guenou et al 2009](#)).

Cependant, l'utilisation de ces cellules posent certains problèmes techniques, mais aussi des questionnements d'ordre éthique. Les protocoles de différenciation utilisés peuvent dans certains cas donner des rendements assez faibles. Dès lors, il est important de s'assurer que la population finale qui sera étudiée ou qui pourrait potentiellement être amenée en clinique soit une population pure de cellules différenciées. En effet, la présence fortuite de cellules souches embryonnaires non différenciées dans la préparation pourrait conduire à des interprétations erronées des résultats, et dans le cas d'une utilisation clinique, à de potentiels processus de cancérisation. Un deuxième point

- Etat de l'art – II. Les cellules souches : découverte, fonctionnalités et types de CS.

technique, pour leur potentielle utilisation en clinique, concerne leur origine. Ces cellules seront toujours d'origine hétérologue par rapport aux patients traités, ce qui pourrait conduire à des phénomènes de rejet de greffes. Enfin, la recherche sur les cellules souches embryonnaires fait face au sein de la société à des problèmes éthiques. En effet, l'une des méthodes d'obtention des CSE implique la destruction d'un embryon humain afin de récupérer les cellules de la masse cellulaire interne. Cette méthode est très mal perçue, surtout d'un point de vue religieux. La méthode alternative du transfert de noyau de cellule somatique pose elle aussi des questionnements. Cette méthode de clonage a été interdite dans la plupart des états occidentaux à la seule perspective de permettre le clonage d'êtres humains ([Andorno 2002](#)).

Il existe une autre source de cellules pluripotentes plus récemment découvertes, qui pourraient contribuer à supprimer les problèmes éthiques et réduire le risque de rejet de greffe : les cellules souches pluripotentes induites.

II.3.B Les cellules souches pluripotentes induites.

Shinya Yamanaka et son équipe décrivent qu'il était possible de reprogrammer des cellules murines différenciées, spécialisées, en cellules pluripotentes (**Figure 11**) ([Takahashi & Yamanaka 2006](#)). Tout d'abord, ils identifient quatre facteurs de transcriptions (Oct3/4, c-MYC, KLF4 et Sox2) majeurs pour la maintenance de la pluripotence des cellules souches embryonnaires. L'expression de ces facteurs dans des fibroblastes embryonnaires ou adultes de souris permet l'induction de la pluripotence de ces cellules, appelées « cellules souches induites à la pluripotence ». La démonstration de la pluripotence de ces cellules fut obtenue par des études fonctionnelles : formation de tumeurs contenant des cellules des 3 feuillets embryonnaires après injection en sous-cutanée chez la souris, et participation à l'embryogenèse quand injectées dans un blastocyste murin, conduisant à des souris chimériques. Seulement un an plus tard, la même équipe réussit à reprogrammer des fibroblastes adultes humains ([Takahashi et al 2007](#)). L'obtention d'iPSC est également confirmée par l'équipe de James Thomson en 2007 grâce à l'introduction dans les cellules, des facteurs de transcription Oct4, Sox2, Nanog et Lin-28, permettant d'éviter l'expression des oncogènes c-MYC et Klf4 ([Yu et al 2007](#)). Les années suivantes permirent des avancées dans ce domaine, notamment en terme d'efficacité de reprogrammation, par exemple par manipulation de mécanismes épigénétiques favorisant la

- Etat de l'art – II. Les cellules souches : découverte, fonctionnalités et types de CS.

pluripotence ou inhibant la différenciation, comme l'ARN long non-codant LincRoR ([Loewer et al 2010](#)) ou le réseau Let-7/LIN-41 ([Worringer et al 2014](#)).

Figure 11 : Méthode d'obtention et applications potentielles des cellules souches induites à la pluripotence.

Les cellules souches induites à la pluripotence (iPSC) sont obtenues en forçant l'expression des gènes Oct3/4, Sox2, Klf4 et c-Myc dans des cellules différenciées provenant d'un donneur. Les iPSC peuvent ensuite être différenciées en cellules spécialisées (peau, foie, neurones etc...). Les iPSC ouvrent des perspectives en recherche fondamentale ainsi que pour des études toxicologiques, ou encore en thérapie cellulaire du fait de leur origine (greffe autologue).

Cette technologie a ouvert de nouvelles perspectives pour la recherche fondamentale, et pourrait aussi être utilisée pour la thérapie cellulaire ([Dinella et al 2014](#)). Au niveau fondamental, cette technologie permet de mieux comprendre certaines maladies génétiques en facilitant leurs modélisations. En effet, des cellules différenciées de patients atteints de nombreuses pathologies génétiques ont déjà été reprogrammées en iPSC ([Park et al 2008](#)). Ces lignées pluripotentes porteuses des mutations génétiques délétères peuvent ensuite être différenciées dans le type cellulaire impacté par la maladie, dans des modèles de culture *in vitro* ou des transplantations *in vivo*. Par exemple, des équipes ont montré qu'il était possible de produire des kératinocytes à partir d'iPSC en orientant leur différenciation par ajout d'acide rétinoïque et de BMP4 ([Kogut et al 2014](#)). Ces kératinocytes, sains ou malades, peuvent ensuite permettre d'étudier des maladies génétiques telle que l'épidermolyse bulleuse jonctionnelle, une maladie de l'épiderme où les kératinocytes ne produisent plus de laminine 5, un complexe protéique de la matrice extracellulaire permettant l'ancrage de l'épiderme sur le derme ([Itoh et al 2011](#), [Kogut et al 2014](#), [Tolar et al 2013](#)).

- Etat de l'art – II. Les cellules souches : découverte, fonctionnalités et types de CS.

Pour d'éventuelles perspectives en thérapie cellulaire, les iPSC présentent également des avantages par rapport aux cellules ES. La reprogrammation en cellule iPSC est réalisée à partir des cellules différenciées d'un patient. Ceci présente deux avantages : premièrement, les cellules somatiques prélevées sont facilement accessibles, comme une biopsie cutanée ou un prélèvement sanguin. Le prélèvement est donc peu invasif, et l'obtention des cellules d'origine ne nécessite pas la destruction d'embryons. Elle est donc éthiquement compatible. Deuxièmement, dans un cas de greffe, les cellules obtenues sont immunocompatibles avec le patient, puisque provenant à l'origine de celui-ci (autogreffe).

Bien que très utiles pour la recherche fondamentale en facilitant l'étude et la modélisation de certaines maladies, l'utilisation des iPSC en thérapie cellulaire devra être soumise à des contrôles de biosécurité pour être utilisée sans risque pour les patients. Tout comme avec les cellules ES, le problème de sécurité majeur est le risque de formation de tératome une fois administré au patient si la population de cellules différenciées contient encore des cellules souches pluripotentes. De plus, une équipe a démontré l'accumulation de CNV (Copy Number Variations) dans des iPSC au cours de la reprogrammation et des passages successifs en culture, pouvant conduire à une instabilité génomique ([Hussein et al 2011](#)). Le risque de transformation des cellules iPSC en cellules tumorales pourrait aussi être une conséquence de l'insertion des oncogènes *KLF4* et *MYC* dans les cocktails de reprogrammation ([Pasi et al 2011](#)). Au Japon, un essai clinique utilisant des cellules pigmentaires de rétine dérivés d'iPSC a d'ailleurs été stoppé récemment après des doutes quant à la sécurité de l'utilisation de ces cellules ([Mandai et al 2017](#)). Des efforts sont fait dans le sens d'une reprogrammation plus sûre, en développant par exemple des méthodes de reprogrammation qui n'utilisent pas de vecteurs lentiviraux intégratifs, ou par addition de cocktails de reprogrammation directement dans les cellules ([Huangfu et al 2008](#)).

II.3.C Les cellules souches adultes.

Les cellules souches adultes (aussi appelées cellules souches somatiques ou tissulaires) sont des populations de cellules immatures, rares, présentes tout au long de la vie d'un individu. Elles sont douées d'autorenouvellement, mais possède un potentiel de différenciation plus restreint que les cellules souches embryonnaires ou les iPSC. La plupart des CSA sont multipotentes (cellules souches hématopoïétiques) ou unipotente (cellules souches kératinocytaires) et contribuent au maintien du tissu dans lequel elles résident. Leur descendance remplace les cellules manquantes suite à une perte normale (dans le cas de la peau, la desquamation) ou une blessure. Des cellules souches adultes ont été identifiées dans de nombreux tissus, tels que la moelle osseuse, le muscle, l'intestin ou encore la peau ([Montagnani et al 2016](#)). Cependant, il est difficile d'isoler et de purifier les cellules souches

- Etat de l'art – II. Les cellules souches : découverte, fonctionnalités et types de CS.

adultes de certains tissus du fait d'un manque de marqueurs spécifiques et de l'hétérogénéité de ces populations. Dans les tissus adultes, les CSA résident dans des zones souvent bien définies anatomiquement, les « niches » ([Schofield 1978](#)). La niche est un microenvironnement abritant les CS. Elle est constituée des CS, mais également de cellules de support adjacentes, d'une matrice extracellulaire, et enrichie en facteurs solubles. Les niches possèdent de multiples fonctions, telles que la protection physique des CS, et jouent également un rôle majeur dans le maintien de la fonctionnalité des CS à court et long-terme. Elles influencent la division, la migration, la quiescence, l'autorenouvellement et la capacité de régénération des CS. La niche la mieux caractérisée est celle des cellules souches hématopoïétiques, au niveau de la moelle osseuse. L'épiderme abrite également des niches. Dans l'EIF, les CS furent initialement décrites comme étant présentes au fond des crêtes épidermiques ([Lavker & Sun 1983](#)). La niche épidermique la plus documentée est le *bulge* du follicule pileux.

Découvertes très récemment, les cellules souches sont caractérisées par une capacité à s'autorenouveler, un potentiel de différenciation variable, et parfois un état quiescent. Les cellules souches connues aujourd'hui peuvent être classées selon leur capacité de différenciation : totipotence, pluripotence, multipotence, unipotence. Il existe les cellules souches embryonnaires, les cellules souches pluripotentes induites, et les cellules souches adultes, qui résident dans les niches des tissus adultes.

III Les cellules souches de l'épiderme.

Cette partie présentera les zones réservoirs de cellules souches dans l'épiderme (follicule pileux et EIF), et les modèles de classification des cellules précurseurs dans l'EIF : l'Unité de Prolifération Epidermique (EPU : Epidermal Proliferative Unit), la vision hiérarchique incluant les holoclones, et le modèle stochastique des progéniteurs équipotents.

III.1 Les réservoirs de cellules souches épidermiques.

L'épiderme adulte comprend une multitude d'unités pilo-sébacée, chacune entourée d'une zone d'EIF. L'EIF contient, dans la couche basale aussi appelée couche germinative, sa propre population de précurseurs de kératinocytes unipotents qui assurent le renouvellement du tissu en condition d'homéostasie normale. Les follicules pileux contiennent une population de cellules souches multipotentes dotées d'une potentialité plus élevée, activées lors du début d'un nouveau cycle de croissance du poil ou mobilisées lors de processus de réparation cutanée suite à des blessures. L'épiderme comprend donc deux réserves de cellules souches. L'une est présente dans la couche basale de l'EIF, et l'autre dans le *bulge* du follicule pileux. La dualité de ces zones de réserve est conservée au niveau des modèles qui permettent leurs études. De manière générale, le modèle humain est plus utilisé pour décrypter les mécanismes dans l'EIF, alors que le modèle murin est plus adapté à l'étude du compartiment de cellules souches présentes dans le follicule pileux. Cette spécificité des modèles s'explique simplement par la densité de répartition des follicules pileux. La souris en présente de très nombreux comparée à l'humain, ce qui favorise son utilisation pour l'étude des cellules souches du *bulge*.

III.1.A Les cellules souches du bulge.

Le follicule pileux se décompose en 3 parties : l'isthmus, la zone contenant la papille dermique et l'infundibulum. C'est dans cette dernière, entre la glande sébacée et la base du muscle érecteur du poil, que se localise une zone essentielle au renouvellement des follicules pileux, appelée le *bulge*. Le *bulge*, la niche des CS du follicule pileux, est une zone assez difficile à localiser chez l'humain, contrairement à la souris où il est très bien défini d'un point de vue anatomique. De plus, la souris possède une densité de follicule bien supérieure à l'humain, ce qui en fait le modèle de prédilection pour l'étude des CS du *bulge*.

- Etat de l'art – III. Les cellules souches de l'épiderme -

Les CS du follicule pileux furent localisées dans le *bulge* par une méthode de marquage de l'ADN cellulaire lors de la division (méthode LRC) (Figure 12) (Bickenbach 1981). Cette méthode sera traitée dans une partie postérieure, car elle constitue un des marqueurs fonctionnels qui permet d'identifier des cellules souches *in vivo*. Brièvement, elle consiste en des injections répétées d'analogues de nucléotides (comme la thymidine tritiée ^3H ou le 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)) à des souris nouveau-nées (phase de « *pulse* »). A ce stade, tous les kératinocytes de l'épiderme sont en hyper prolifération. De ce fait, toutes les cellules (souche ou non) vont incorporer les traceurs dans les ADN synthétisés. Après une période de chasse (phase de « *chase* », méthode du « *pulse-chase* ») de plusieurs semaines/mois, les tissus sont collectés et analysés. Les cellules qui ne se divisent pas ont gardé le marquage, tandis que les cellules en prolifération transmettent à leur descendance puis desquament à la surface de l'épiderme, conduisant à une perte du marquage. Les cellules gardant le marquage sont appelées LRC (pour « Label-Retaining Cell), et sont définies comme des cellules souches du fait de leur très faible activité mitotique. Cotsarelis et al. ont ainsi appliqué cette méthode pour localiser des cellules LRC dans les follicules pileux murins. Les auteurs ont conclu que la population de cellules du FP se situait en fait dans le *bulge* et non pas dans la partie inférieure du bulbe, hypothèse principale jusqu'alors (Cotsarelis et al 1990). Peu de temps après, une autre équipe a montré que les CS du *bulge* pouvaient retenir le marquage pendant 14 mois dans la souris, période correspondant quasiment à la durée de vie entière d'un animal (Morris & Potten 1999).

Figure 12 : Localisation des LRC dans le *bulge* des follicules pileux.

A. Coupe de peau (paraffine) d'une souris âgée de 5 jours qui a été injectée en sous-cutané avec du BrdU deux fois par jour pendant 3 jours. Toutes les cellules en prolifération active (i.e. les basales) sont marquées. **B.** Coupe de peau d'une souris marquée comme en A suivie d'une période de « *chase* » de 8 semaines : seules les cellules du *bulge* ont retenu le marquage BrdU. **C.** Agrandissement de l'un des follicules pileux du panel B. Seules les cellules du *bulge* sont marquées par le BrdU. **E :** épiderme, **UF :** follicule supérieur, **SG :** glande sébacée.

- Etat de l'art – III. Les cellules souches de l'épiderme -

Les recherches s'orientèrent par la suite sur la fonctionnalité des cellules LRC. En effet, la définition fonctionnelle d'une CS s'articule autour de potentiels prolifératifs et régénératifs très élevés. A l'aide d'une méthode de tri par cytométrie en flux basée sur des marqueurs des cellules du *bulge* (notamment l'intégrine- $\alpha 6$ et CD34), il fut démontré dans le modèle murin que les holoclones, une définition fonctionnelle proposée par Barrandon et Green ([Barrandon & Green 1987b](#)) dérivait majoritairement des cellules basales LRC du *bulge*. De plus, *in vitro*, ces cellules présentaient un potentiel de prolifération très élevé, et une capacité à générer un épiderme et des follicules pileux ([Blanpain et al 2004](#)).

Plusieurs approches furent mises en place afin de démontrer le niveau de potentiel de différenciation des CS du *bulge*. Par exemple, une technique de double marquage (BrdU et ^3H -thymidine) a permis de démontrer que les CS du *bulge* donnaient naissance au follicule pileux, mais contribuaient également à l'EIF ([Taylor et al 2000](#)). Une autre approche, exploite un des avantages du modèle murin, à savoir les lignées de souris transgéniques. Les CS du *bulge* d'une souris exprimant de manière constitutive LacZ (gène rapporteur) furent récupérées par microdissection depuis les vibrisses murines. Elles furent ensuite transplantées dans les vibrisses ou l'épiderme de souris non modifiées. Les CS LacZ positives contribuèrent à la mise en place des follicules pileux, y compris les glandes sébacées et l'EIF ([Oshima et al 2001](#)). Cependant, les CS du FP ne contribuent pas à l'homéostasie de l'EIF, mais peuvent être mobilisées pour le réparer en cas de blessure. La déplétion des cellules du *bulge* conduit à une perte des follicules pileux, alors que l'EIF n'est pas impacté ([Ito et al 2005](#)). Ces études aboutirent à documenter la présence et la multipotence des cellules souches du *bulge*, majoritairement dans le modèle murin. Cependant, des observations cliniques chez l'humain, comme le fait que des kératinocytes dérivés du follicule pileux peuvent repeupler des blessures ([Cotsarelis 2006](#)) ou être utilisés pour traiter des lésions comme les ulcères de jambes ([Limat et al 2003](#)) laissent penser que les CS humaines du *bulge* pourraient avoir des propriétés similaires aux CS murines.

III.1.B Les cellules souches de l'EIF.

L'intégrité de l'EIF est maintenue tout au long de la vie d'un individu, ce qui implique la présence d'une population de cellules souches capable de s'autorenouveler. Cette population est abritée dans la couche basale, aussi appelée couche germinative. A certaines localisations anatomiques, la couche basale peut former des invaginations profondes dans le derme, les crêtes épidermiques, facilitant l'ancrage de l'épiderme sur le derme. Les CS sont réparties d'une manière qui semble aléatoire dans les crêtes épidermiques, mais aussi dans les zones plates de l'épiderme. Leur répartition spatiale et leur fréquence au sein de cette couche sont encore insuffisamment

- Etat de l'art – III. Les cellules souches de l'épiderme -

documentées à cause de la difficulté à les identifier. Les paragraphes suivants s'attelleront à présenter les différents modèles qui ont été proposés concernant la régulation des cellules souches de l'EIF.

III.1.B.a Hiérarchie fonctionnelle *in vivo* : L'unité de prolifération épidermique, ou EPU.

Durant les années 1970 émergèrent les premières observations de cellules quiescentes au sein de la couche basale de l'épiderme. Elles furent en premier identifiées et décrites dans l'EIF murin ([Allen & Potten 1974](#), [Bickenbach 1981](#), [Lavker & Sun 1982](#), [Mackenzie 1970](#), [Potten 1974](#)) en utilisant la méthode LRC. Les chercheurs identifièrent ainsi des cellules particulières dans la couche basale de l'épiderme qui renaissent sur le long-terme les traceurs radioactifs intégrés dans leur matériel génétique. Assez rare, ces cellules dispersées dans la couche basale s'organisent en structure fonctionnelle bien définie, appelée l'unité de prolifération épidermique par Potten (EPU pour Epidermal Proliferative Unit) ([Figure 13](#)). Potten décrit l'EPU à partir notamment de critères fonctionnels (LRC) et structuraux. Une EPU est une structure hexagonale, verticale, constituée de 4 à 6 couches de cellules cornées (CD). Sous cette couche supérieure se situent plusieurs cellules en différenciation. Enfin, au niveau de la couche basale se situent une dizaine de cellules non LRC, qui prolifèrent activement (AT) pour remplacer les cellules supérieures qui desquament. Elles entourent une unique cellule basale LRC (CS). Le modèle EPU fut le premier à mettre en lumière un modèle de hiérarchie fonctionnelle dans l'épiderme, basé sur la capacité des cellules souches à maintenir pendant des périodes prolongées un état non cyclant (LRC). De plus, les auteurs de ces travaux prirent une position contraire à la vision de l'époque concernant la couche basale de l'épiderme, en suggérant que sa population était plutôt hétérogène et non pas homogène. Ils avancèrent que l'hétérogénéité était due à plusieurs critères, en particulier la présence de cellules en prolifération et en différenciation ([Christophers 1971](#)) ainsi qu'en l'existence possible de cellules en phase G0, présumées cellules souches. Ces découvertes suggèrent donc un modèle hiérarchisé pour l'EIF, où la transition du statut de CS à celui de TA puis de CD se ferait d'une manière unidirectionnelle, avec à son sommet la CS.

L'existence de l'EPU et de cellule souche LRC dans la couche basale de l'EIF murin fut également confirmée par d'autres études *in vivo*. Après plusieurs injections de BrdU dans des souris nouveau-nées suivie d'une période de « chase » d'environ 70 jours, des échantillons de peau de différentes localisations anatomiques furent collectés, et des coupes réalisées. Des kératinocytes positifs pour le BrdU furent observés dans le *bulge*, mais également dans l'EIF ([Braun et al 2003](#)). Une autre étude particulièrement élégante fut réalisée par Ghazizadeh ([Ghazizadeh & Taichman 2001](#)). Ils utilisèrent une technique de transfert de gène *in situ* par des rétrovirus pour marquer avec le gène rapporteur

- Etat de l'art – III. Les cellules souches de l'épiderme -

LacZ les CS épidermiques de souris. Ils ont suivi le destin cellulaire de la descendance [*LacZ*⁺] après 37 cycles de renouvellement épidermique, en réalisant des coupes de follicule pileux et d'EIF. Ils purent observer des structures colonnaires dans l'EIF, correspondant aux EPU (Figure 13).

Figure 13 : L'Unité de Prolifération Epidermique (EPU).

A. Représentation schématique de l'EPU. L'EPU s'organise en structure hexagonale, centrée sur une cellule souche LRC (jaune) dans la couche basale. Autour se retrouve une dizaine de cellules d'amplification transitoire (TA) (bleues), activement proliférative. Les TA migrent ensuite dans les couches supérieures de l'épiderme et se différencient en kératinocytes matures (vertes). B. Coupe de peau murine dont les kératinocytes ont été marqués pour Ki67 (rouge) et LRC (vert), montrant le centre des EPU dans l'EIF murin. C. Observation de l'EPU sur des coupes d'épiderme murin transduits avec le gène rapporteur LacZ (cellules bleues).

- Etat de l'art – III. Les cellules souches de l'épiderme -

Néanmoins, la mise en évidence de la présence de cellules LRC chez l'humain n'est pas possible, à cause de considérations éthiques mais aussi techniques. Les chercheurs ont donc été contraints de développer des méthodes alternatives afin de détecter et caractériser l'organisation des EPU *in vivo* dans les tissus humains. Des prépuces humaines ont été marquées génétiquement avec un lentivirus codant la GFP (gène rapporteur) et greffés sur des souris. Après une période de 28 jours, les chercheurs ont cartographié les structures colonnaires marquée par la GFP, qui correspondent aux EPU. En remontant la descendance jusqu'aux cellules basales, ils ont déterminé que les cellules souches sont dispersées dans la couche basale, sans localisation particulière. De plus, la taille des EPU est très variable selon les localisations anatomiques, les plus étroites se situant au fond des crêtes épidermiques. ([Ghazizadeh & Taichman 2005](#)).

Ces différents travaux sont donc en faveur d'un modèle hiérarchisé des cellules souches de l'épiderme, des CS vers les TA vers les CD. Le modèle proposé serait celui d'un gradient de potentiel basé sur le cycle cellulaire. Les CS, quiescentes (LRC), vers des progéniteurs précoces puis tardifs (appartenant à la classe TA), activement cyclants, puis les CD, les cellules différenciées. Cependant, il est difficile *in vivo* d'associer un potentiel prolifératif/régénératif à chaque classe de cellule. Des études *in vitro* ont donc été menées pour tenter de caractériser ces paramètres.

III.1.B.b Hiérarchie fonctionnelle *in vitro* : le modèle des holoclones.

Une des caractéristiques fonctionnelles d'une cellule souche de kératinocyte est sa capacité à former des clones à partir d'une cellule unique. On appelle cela le potentiel clonogénique. Ce test a été initialement développé dans le système hématopoïétique ([Till & Mc Culloch 1961](#)). Extrapolé au modèle épidermique, ce test fait partie d'un panel de méthode permettant de qualifier fonctionnellement les précurseurs épidermiques.

Pendant les phases de culture, les kératinocytes présentent souvent une morphologie hétérogène du fait des degrés de différenciation différents. Les kératinocytes les plus immatures sont des cellules circulaires, de petite taille, et poussent en colonies très denses. Au cours de leur différenciation, les kératinocytes vont peu à peu grossir. Leur potentiel de prolifération est directement lié à leur état de différenciation. Ainsi, les petites cellules immatures ont globalement un potentiel de prolifération beaucoup plus important que les gros kératinocytes ([Barrandon & Green 1985](#)). Afin de rendre compte de cette hétérogénéité, à la fois morphologique mais également fonctionnelle, les chercheurs ont développé des méthodes pour mesurer la capacité clonogénique individuelle des kératinocytes.

- Etat de l'art – III. Les cellules souches de l'épiderme -

Les pionniers furent Barrandon et Green ([Barrandon & Green 1987b](#)), qui, en 1987, réalisèrent des tests de colonies successifs pour déterminer l'aptitude de cellule unique à former des colonies ([Figure 14A](#)). Un unique kératinocyte estensemencé par boîte de culture et cultivé pendant une à deux semaines. La colonie résultante est trypsinée et les kératinocytes repiqués dans des boîtes de Pétri. Après 12 jours de culture supplémentaire, les clones secondaires sont colorés et leur taille est mesurée. Les auteurs ont classifié en 3 catégories les cellules d'origine, en fonction de la taille des clones secondaires et de la fréquence des colonies abortives.

Les holoclones : un holoclone est défini par un taux de colonies abortives compris entre 0 et 5% des colonies secondaires totales. Les clones secondaires formés sont larges (10-30 mm²) et contiennent un nombre élevé de cellules. Les cellules les composant sont de petites tailles et poussent en colonies très denses. Les colonies sont régulières et présentent une forme quasiment circulaire. Les cellules centrales sont empilées, larges et positives pour l'involucrine, un marqueur de différenciation terminale. Un holoclone correspond à la définition fonctionnelle d'une cellule souche de kératinocyte.

Les paraclones : un paraclone est défini par un taux de colonies abortives de 100% des colonies secondaires totales. Il est caractérisé par des colonies secondaires de petite taille (5 mm²), abortives et non prolifératives. Leur périmètre est irrégulier. Les cellules composants les colonies sont larges, plates, et toutes sont positives pour le marqueur de différenciation involucrine. Un repiquage consécutif des cellules de ces colonies ne produit aucune colonie, démontrant un potentiel de prolifération épuisé. La cellule initiale est ce qui se rapproche le plus d'un kératinocyte différencié, doté d'un potentiel de croissance très faible, voire inexistant.

Les meroclones : un meroclone est défini par un taux de colonies abortives compris entre 5 et 99% des colonies secondaires totales. Il présente une forte hétérogénéité dans la croissance des colonies secondaires. Certaines vont progresser jusqu'à donner des colonies macroscopiquement visibles, comparables en taille à celles générées par des holoclones. D'autres vont arrêter de proliférer très rapidement. Les meroclones correspondent à la descendance de cellules d'amplification transitoire. Il est intéressant de noter un très fort gradient de potentiel clonogénique dans cette population, à mettre en relation avec la nature des cellules, progéniteurs précoces (immatures) ou tardifs (plus différenciés).

- Etat de l'art – III. Les cellules souches de l'épiderme -

Le modèle proposé par Barrandon et Green a permis de poser les bases de la hiérarchie fonctionnelle de l'EIF, sous forme de continuum cellulaire et fonctionnel. Les CSK, cellules les plus immatures (holoclone), donneraient naissance aux progéniteurs (TA), de statut d'immaturation variable (meroclone), qui eux-mêmes donneraient naissance aux cellules différenciées (paraclone), non pourvues de capacité clonogénique et prolifératives.

Figure 14 : Le modèle hiérarchique dans l'épiderme interfolliculaire.

En 1987, Barrandon et Green proposèrent une vision hiérarchisée de l'organisation fonctionnelle de l'épiderme. **A.** Cultures clonales secondaires démontrant le gradient de prolifération au sein de l'épiderme. Les holoclones possèdent le potentiel prolifératif le plus fort, les paraclones le plus faible. **B.** Les holoclones possèdent des capacités de régénération épidermique à long-terme (b) comparé aux meroclones (a). Les holoclones peuvent être cultivés à plus de 100 DP (c), sont plus immatures ([ITA6⁺⁺⁺]) (e) et maintiennent leur intégrité génomique à long terme (d).

Par la suite, de nombreuses études ont visé à approfondir la définition des holoclones, en cherchant à déterminer plus amplement leurs propriétés et leur phénotype, notamment leur capacité de reconstruction tissulaire ([Fortunel et al 2010](#), [Papini et al 2003](#), [Pellegrini et al 2001](#)). Ces études ont apporté des précisions en termes de potentiel fonctionnel des holoclones et de leur descendance. Les holoclones peuvent être maintenus en culture à long-terme, jusqu'à plus de 100 doublements de population (DP), démontrant une forte aptitude d'autorenouvellement (**Figure 14B**). Durant les amplifications massives à long terme, ils maintiennent leur intégrité génétique. Ils peuvent être discriminés de leur proche descendance, les meroclones, par des niveaux très élevés du facteur de transcription nucléaire p63. Les holoclones sont également capables, même après des phases d'amplification en culture (50 DP) de reconstruire un épiderme normal. La démonstration de l'ensemble de ces critères permet de faire correspondre un holoclone avec la définition fonctionnelle d'une CSK.

De plus, une étude particulièrement intéressante a permis d'établir un lien entre les cellules LRC (Label Retaining Cell) et le potentiel clonogénique des holoclones ([Morris & Potten 1994](#)). Ils ont

- Etat de l'art – III. Les cellules souches de l'épiderme -

identifié deux populations de cellules au sein de l'EIF murin : l'une LRC, encore détectable 8 semaines après injection de ³H-thymidine pendant 2 jours à des souris nouveau-nées, l'autre, PLC (Pulse Labeled Cell), détectées une heure après injection de ³H-thymidine dans des souris âgées de 8 semaines. Les cellules furent récupérées des tissus par action enzymatique et mises en culture à faible densité. Tous les jours, les cultures furent fixées et observées au microscope afin de suivre la prolifération des deux types cellulaires. A 2 jours, les deux populations cellulaires furent observées au stade de cellule unique. A 5 jours, les cellules LRC furent observées par paires ou en clusters, donnant naissance à des clones, alors que les cellules PLC ne se divisaient pas. Cette étude a permis de mettre en évidence que les cellules LRC étaient clonogéniques, contrairement aux cellules PLC, les suggérant comme CSK.

III.1.B.c Remise en question du modèle hiérarchisé : le modèle des progéniteurs équipotents.

Bien que la vision du modèle hiérarchisé semble être la plus acceptée dans le domaine scientifique, elle fut remise en question récemment par une étude proposant un modèle tout à fait opposé : le modèle des progéniteurs équipotents ([Clayton et al 2007](#)). Les auteurs ont utilisé un modèle murin transgénique pour suivre les divisions successives de cellules uniques de la couche basale. A partir de leurs observations, ils ont établi un modèle mathématique permettant de modéliser le taux de divisions symétriques et asymétriques. Ils ont conclu ce travail par une nouvelle hypothèse, où l'épiderme est maintenu par une seule population de progéniteurs, qui possèdent tous les mêmes fonctionnalités et les mêmes proportions dans la symétrie de leur division. Néanmoins, il est à noter que de très nombreuses données, et certaines très récentes, indiquent que le modèle hiérarchisé semble être le plus probable ([Hirsch et al 2017](#)).

Ce socle de données *in vivo* et *in vitro* à contribuer à générer une vision hiérarchisée des cellules souches kératinocytaires, qui se déclinent en un gradient à la fois morphologique, fonctionnel et phénotypique. Cette vision est actuellement le modèle de référence permettant d'expliquer l'organisation hiérarchique des CSK et progéniteurs dans la couche basale. Cependant, la caractérisation notamment des CSK *versus* les progéniteurs a mis en évidence une forte hétérogénéité dans les populations kératinocytaires.

IV Méthodes d'identification, d'enrichissement et marqueurs des CSK de l'EIF.

Cette partie a pour but de décrire les tests fonctionnels, les méthodes et les marqueurs, membranaires ou intracellulaires, actuellement connus pour l'identification des cellules souches de l'EIF.

Aujourd'hui, il n'existe pas de méthodes universelles ni de combinaisons de marqueurs consensus pour isoler une population pure de CSK de l'EIF. Néanmoins, depuis une trentaine d'années, les chercheurs ont mis au point un ensemble d'approches et de critères permettant d'identifier et d'isoler une population enrichie en kératinocytes très immatures (CS et progéniteurs précoces). Il existe d'ailleurs plusieurs revues assez exhaustives sur le sujet ([Ghadially 2012](#), [Kaur 2006](#)). Ces approches peuvent être classifiées en deux catégories : d'une part, celles basées sur l'identification des CS par des tests fonctionnels, et d'autre part, des méthodes basées sur l'expression de marqueurs phénotypiques. Cette partie se concentrera uniquement sur l'EIF qui nous intéresse plus particulièrement. Il est toutefois bon de noter que les marqueurs de CSK du *bulge* murin sont bien décrits, et varient par rapport à ceux de l'EIF.

IV.1 Identification des CSK par des tests fonctionnels.

Au regard de la littérature et du grand nombre de marqueurs décrits, mais du peu de recoupements disponibles, il semble qu'une CSK soit le mieux définie par ses caractéristiques fonctionnelles (autorenouvellement, potentiel de prolifération, quiescence) plutôt que par un panel de marqueurs bien précis. Ici seront exposés les principaux tests mis en œuvre par les chercheurs pour identifier les CSK.

IV.1.A *Le critère LRC.*

Une des caractéristiques des CSK est leur état quiescent. Ponctuellement, sous l'influence de signaux mitogènes ou lors du développement, les CSK peuvent rentrer dans le cycle cellulaire et donner deux cellules filles. Leur aptitude à ponctuellement se diviser a été mise à profit pour les identifier dans l'épiderme *in vivo*. La découverte de zones anatomiques abritant des cellules LRC dans l'EIF et le *bulge* a déjà été traitée précédemment ([Figure 12](#)). Ici, je donnerai donc une description un peu plus complète de la méthode. Elle consiste en des injections répétées d'analogues de nucléotides (³H-thymidine ou BrdU) dans des souris nouveau-nées. Lors des premiers jours après la naissance, l'épiderme des souris est en développement actif. La totalité des kératinocytes sont en prolifération, y compris les cellules souches. Lors de la phase de répliation de l'ADN, les cellules vont incorporer les

- Etat de l'art – IV. Méthodes d'identification des CSK de l'EIF -

analogues de nucléotides. La collection d'échantillons cutanés permet ensuite de tracer les cellules ayant incorporées les marqueurs *in vivo*. Les cellules en prolifération active vont se différencier et être éliminées par desquamation, tandis que les cellules qui se divisent beaucoup moins souvent (assimilées aux CS) vont conserver les traceurs dans leur génome, pour des périodes pouvant aller jusqu'à 14 mois. Les cellules conservant le marquage ont été nommées cellules LRC. Cette méthode a permis d'identifier plusieurs populations de cellules souches dans l'épiderme murin, notamment au niveau du *bulge* des follicules pileux et dans la couche basale de l'EIF.

IV.1.B Identification par la capacité clonogénique.

Les cellules souches sont également caractérisées par un potentiel de croissance très fort. Ainsi, l'exploitation de cette caractéristique, notamment par des tests de CFU, peut permettre d'isoler des CSK. Néanmoins, ces méthodes permettent l'identification de CSK de manière rétroactive : ce n'est qu'après avoir réalisé les tests fonctionnels que l'on connaît la nature des cellules en question.

Une des méthodes de caractérisation des kératinocytes fut proposée par Barrandon et Green en 1987 ([Figure 14](#)) ([Barrandon & Green 1987b](#)). Brièvement, à partir de l'isolation et la mise en culture de cellule unique et l'observation phénotypique de la descendance clonale, il est possible de classer les cellules d'origine en 3 types, liés à leur croissance *in vitro* : les holoclones (CS), les meroclones (TA) et les paraclones (CD).

Notre laboratoire a confirmé ces résultats en poussant plus loin le système ([Fortunel et al 2010](#)). L'analyse de centaines de kératinocytes à l'échelon de la cellule unique dans un système de microcultures clonales parallèles a permis d'isoler plusieurs holoclones ([Figure 15](#)). De plus, les fonctionnalités des clones primaires ont ensuite été caractérisées plus en détails en réalisant (1) des microcultures clonales parallèles secondaires, (2) des tests de colonies, (3) de l'expansion de masse à long-terme et (4) de la reconstruction épidermique ([Figure 14B](#)). Le point (4) sera développé à part dans le paragraphe suivant. Les points (1), (2) et (3) permirent de démontrer une capacité de croissance nettement supérieure des holoclones comparés aux clones plus différenciés (meroclones et paraclones), à la fois en termes de CFU mais aussi de croissance de masse à long terme, où les holoclones pouvaient être cultivés pendant plus de 150 DP (correspondant à plus de 4 mois de culture). De manière rétroactive, ces méthodes d'identification permettent donc d'isoler un ou plusieurs holoclones, correspondant à la définition fonctionnelle d'une cellule souche.

Figure 15 : Gradient de potentiel clonogénique des kératinocytes basaux.

Les kératinocytes basaux humains présentent une hétérogénéité dans leur aptitude à générer un clone à partir d'une cellule unique (capacité clonogénique). Profil de prolifération clonale de kératinocytes basaux [ITA 6⁺⁺⁺] après 14 jours de culture. Distribution de la taille des clones mesurés à partir de 887 clones primaires, issus de 7 donneurs différents. Photographies représentatives de clones.

IV.1.C Identification par le potentiel à générer un tissu à long-terme.

Le renouvellement perpétuel de l'épiderme est assuré par les CSK. Celles-ci sont capables de s'autorenouveler afin de maintenir l'intégrité de l'épiderme *in vivo*. De plus, *in vitro*, l'aptitude à reconstituer un épiderme est conditionnelle à la présence de ces cellules. Obtenir une mesure de ce paramètre est donc essentiel pour documenter la présence et la capacité d'autorenouvellement de cellules souches au sein de cultures *in vitro*. L'une des méthodes de mesure est l'aptitude des CS à la régénération épidermique après des phases d'amplification massive en culture. Elle repose sur des évaluations quantitatives et qualitatives des peaux reconstituées, permettant d'estimer la présence ou l'absence de cellules très immatures dotées de capacités de reconstruction.

Ainsi, notre équipe a montré que des kératinocytes issus d'un meroclone (clone prolifératif) avec un nombre de doublements restreint (moins de 20) avaient la capacité de reconstruire un épiderme normal *in vitro*. De plus, quand une culture de kératinocytes issue d'un holoclone est amplifiée en masse jusqu'à environ 50 DP, les kératinocytes sont toujours capables de reconstruire un épiderme normal *in vitro*, attestant de la présence de cellules très immatures dans les cultures (maintenance d'une population de CSK) ([Fortunel et al 2010](#)).

IV.1.D Identification par adhésion à des composants de la matrice extracellulaire.

In vivo, les kératinocytes de la couche basale de l'épiderme sont en contact avec la membrane basale, une matrice extracellulaire riche, ce qui assure l'ancrage de l'épiderme au tissu dermique sous-jacent. Cette matrice est composée de très nombreuses protéines, et notamment un large panel de collagènes. Un réseau d'interactions protéiques est tissé entre ces collagènes et des protéines présentées par les kératinocytes basaux, par exemple les intégrines et les laminines, assurant leur

- Etat de l'art – IV. Méthodes d'identification des CSK de l'EIF -

adhésion à la matrice. Cette propriété d'adhésion des kératinocytes basaux a notamment été mise à profit par plusieurs équipes dans le but d'isoler des populations de précurseurs épidermique à partir d'échantillons de tissus.

Il fut tout d'abord documenté que les kératinocytes perdaient leur propriété d'adhésion au cours des processus de différenciation ([Adams & Watt 1990](#)). La corrélation entre un fort potentiel clonogénique et l'adhésion rapide à des supports matriciels (collagène IV, fibronectine ...) fut ensuite établie ([Jones & Watt 1993](#)). Des kératinocytes basaux furent triés par cytométrie en flux et ils observèrent que les kératinocytes exprimant de forts niveaux d'intégrines $\beta 1$ adhéraient plus vite sur les supports de culture recouverts de divers matrices extracellulaires (notamment collagène IV et fibronectine). Dans les jours suivants l'ensemencement, les kératinocytes ayant adhéré le plus vite présentaient également la plus forte capacité clonogénique, démontrant un lien entre adhésion et clonogénicité.

D'autres méthodes d'enrichissement par adhésion furent proposées, par exemple par adhésion au collagène de type I ([Fortunel et al 2003a](#)). Les auteurs combinèrent une étape d'enrichissement par adhésion rapide au collagène de type I (enrichissement en kératinocytes ADH⁺⁺⁺), suivie d'une étape de tri par cytométrie en flux à l'aide de l'expression du récepteur mitogénique EGFR (enrichissement en kératinocytes EGFR^{low/-}). La stratégie d'enrichissement combinée permet d'isoler une population capable de reconstruire un épiderme *in vitro* à des passages plus tardifs que les kératinocytes ayant adhésés mais exprimant de forts niveaux d'EGFR.

Les différentes approches fonctionnelles permettent d'enrichir une population de kératinocytes en kératinocytes basaux très immatures, dotés de capacité de régénération et de prolifération accrue. Cependant, l'ensemble de ces méthodes présentent des inconvénients dans l'identification spécifique et instantanée des CSK, ce qui présente un verrou majeur pour permettre leurs études. Il semble donc primordial de compléter les approches fonctionnelles par des approches moléculaires.

IV.2 Identification des CSK par des approches moléculaires.

IV.2.A Identification par des marqueurs membranaires.

Les kératinocytes de la couche basale de l'EIF sont en communication permanente avec les cellules voisines, l'environnement cellulaire et matriciel avoisinants, et sensibles aux signaux moléculaires et physiologiques que peut subir l'épiderme. Afin de détecter et transmettre ces informations, les

- Etat de l'art – IV. Méthodes d'identification des CSK de l'EIF -

kératinocytes expriment à leur surface des protéines diverses. Je décrirai ici les marqueurs membranaires couramment utilisés, y compris au cours de ma thèse.

IV.2.A.a Molécules impliquées dans l'adhésion

i. Adhésion cellule-matrice : les intégrines

Les propriétés d'adhésion rapide des kératinocytes basaux ont rapidement amené les chercheurs à considérer certaines molécules impliquées dans ce phénomène, les intégrines, comme de potentiels marqueurs de CSK. Les intégrines sont des protéines transmembranaires composées d'une sous-unité α et d'une sous-unité β .

L'équipe de Fiona Watt a beaucoup contribué à la connaissance du rôle des intégrines dans l'épiderme. Son équipe a démontré que les kératinocytes perdent l'expression de certaines intégrines, notamment l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, lors de la différenciation ([Adams & Watt 1990](#)). Le même groupe a ensuite exploré le rôle des sous-unité $\beta 1$ dans la biologie des kératinocytes basaux. Ils ont isolé par cytométrie en flux des sous-populations de kératinocytes sur la base de l'expression de l'intégrine- $\beta 1$ (sous-populations [ITB1^{fort}], [ITB1^{faible}] et [ITB1^{neg}]) et comparé leur potentiel à former des colonies. Ils identifièrent la sous-population [ITB1^{fort}] comme celle avec le potentiel clonogénique le plus élevé et l'adhésion la plus rapide. De plus, ces cellules sont négatives pour la kératine 10, un marqueur des kératinocytes épineux, et n'incorporent pas le BrdU (quiescence). Enfin, elles sont capables de reconstruire un épiderme normal après xénotransgreffe chez la souris ([Jensen et al 1999](#), [Jones et al 1995](#), [Zhu et al 1999](#)). Au vu de l'ensemble de ces résultats, ils suggérèrent l'intégrine $\beta 1$ comme marqueur de CSK ([Jones & Watt 1993](#)). Néanmoins, une proportion élevée de kératinocytes (environ 40%) expriment fortement l'intégrine- $\beta 1$, la désignant plutôt comme un marqueur associé à l'immaturité des kératinocytes de la couche basale plutôt qu'un marqueur spécifique des CSK.

Une autre intégrine basale a été proposée comme marqueur d'immaturité des kératinocytes. Il s'agit de l'intégrine- $\alpha 6$. En se basant sur l'expression de l'intégrine- $\alpha 6$ et du récepteur à la transferrine CD71, Li et Kaur ont isolé une population enrichie en précurseurs de kératinocytes issus de la couche basale. Cette population [ITA6^{fort}/CD71^{faible}] présente le potentiel de croissance le plus fort, représente une sous-population (environ 10%) des kératinocytes basaux, et sont quiescentes au moment de l'extraction depuis le tissu, comme indiqué par des analyses de cycle cellulaire ([Li et al 1998](#)). Par la suite, des études apportèrent des compléments sur le phénotype de ces cellules. Elles constituent une sous-population de kératinocytes positifs pour la kératine 14 (population basale), et n'expriment pas le marqueur de différenciation kératine 10. Une étude comparative des potentiels de croissance des kératinocytes [ITA6^{fort}/CD71^{faible}], [ITA6^{fort}/CD71^{fort}] et [ITA6^{faible}] révéla un gradient de

- Etat de l'art – IV. Méthodes d'identification des CSK de l'EIF -

potentiel entre ces populations. L'équipe de Kaur suggéra donc les kératinocytes [ITA6^{fort}/CD71^{faible}] comme potentielles CS, les cellules [ITA6^{fort}/CD71^{fort}] comme cellules d'amplification transitoire, et les [ITA6^{faible}] comme kératinocytes différenciés (Figure 16) (Webb et al 2004). Il est intéressant de noter que cette description est en accord avec le modèle hiérarchisé des holoclones proposé par Barrandon et Green en 1987.

Bien qu'il ne semble pas exister dans la littérature d'études fonctionnelles comparant les sous-populations de kératinocytes [ITA6^{fort}] et [ITB1^{fort}], ces études mettent en lumière un recoupement des marqueurs d'immaturité.

Figure 16 : Isolation de sous-populations de kératinocytes selon l'expression de l'intégrine- α 6 et le CD71.

Des kératinocytes primaires humains ont été extraits depuis une biopsie mammaire, et marqués par des anticorps anti-intégrine- α 6 et anti-CD71, puis triés par cytométrie en flux. **A.** Graphique de cytométrie représentant les différentes sous-populations kératinocytaires. Axe x : intensité du marquage intégrine- α 6. Axe y : intensité du marquage CD71. R2 : sous-population enrichie en cellules souches [ITA6^{fort}/CD71^{faible}] R3 : sous-population enrichie en cellules d'amplification transitoires [ITA6^{fort}/CD71^{fort}] R4 : sous-population enrichie en kératinocytes différenciés [ITA6^{faible}]. **B.** LA CFU des différentes fractions a été calculée. La fraction [ITA6^{fort}/CD71^{faible}] présente le potentiel clonogénique le plus élevé.

ii. Adhésion cellule-cellule.

1. La desmogléine 3

Dans l'épiderme, les kératinocytes forment des jonctions afin de maintenir la structure du tissu et lui conférer ses propriétés de résistance mécanique. Ces jonctions sont constituées de nombreuses molécules de structures telles que des cadhérines, des protéines transmembranaires qui font le lien entre les deux membranes cellulaires. La zone de jonction entre les deux membranes est constituée d'une plaque protéique de desmoplakines et de desmogléines. Cette structure, le desmosome, permet l'ancrage des filaments de kératines. Un nombre croissant de desmosomes est observé au cours de la

- Etat de l'art – IV. Méthodes d'identification des CSK de l'EIF -

différenciation du kératinocyte. Les chercheurs ont émis l'hypothèse que l'absence de desmogléines pourrait être un marqueur de CSK.

Une équipe a étudié le profil d'expression de la desmogléine 3 (DSG3) dans des sous-populations de kératinocytes basaux. L'expression des molécules impliquées dans les desmosomes est beaucoup plus faible dans les kératinocytes sélectionnés par leur propriété d'adhésion au collagène. De plus, DSG3 peut être utilisée pour trier des kératinocytes par cytométrie de flux. Les kératinocytes [DSG3^{faible/-}] montrent un potentiel clonogénique et de croissance en masse beaucoup plus élevé que les cellules positives pour ce marqueur. Combiné avec l'expression forte de l'intégrine-β1, ce marqueur a permis d'enrichir encore en une sous-population de CSK putatives ([Wan et al 2003](#)). Les kératinocytes [DSG3^{faible/-}] montrent également une meilleure aptitude à reconstituer un épiderme sur un derme dé-épidermisé (De-Epidermalized Dermis, DED) et une forte similarité fonctionnelle avec les cellules [ITA6^{fort}/CD71^{faible}] ([Wan et al 2007](#)).

2. Les kératines spécifiques.

Les kératines (KRT) sont des protéines structurelles fibreuses. Ce sont des acteurs-clés de la structure des phanères (poils, ongles, plumes, becs ...) mais également de l'épiderme. Etant insolubles dans l'eau, elles assurent la fonction de barrière et de protection conférée par l'épiderme. Les monomères de kératines s'assemblent en filaments intermédiaires, qui peuvent jouer des rôles variés, comme dans l'assemblage des desmosomes ou la différenciation des kératinocytes ([Fuchs & Green 1980](#)). Dans l'épiderme, de nombreux types de kératines sont exprimés. Ils sont spécifiques des couches de l'épiderme et varient selon les degrés de différenciation des kératinocytes.

Certaines kératines ont été identifiées spécifiquement dans la couche basale de l'épiderme. C'est le cas des kératines 5 et 14. Une équipe s'est intéressée au rôle de la kératine 14 sur l'homéostasie épidermique. L'expression de la KRT14 dans des kératinocytes en culture a été réprimée par interférence à l'ARN et l'impact sur la fonctionnalité des cellules a été observé. Une diminution de la kératine 5, une réduction de la prolifération et un retard dans la progression du cycle cellulaire ont été observés. L'expression de l'involucrine et de la kératine 1, des marqueurs de différenciation, est augmentée. Ces impacts fonctionnels, liés à une modification de la phosphorylation de Akt, a permis à l'équipe de proposer la voie PI3K comme mécanisme de régulation potentiel ([Alam et al 2011](#)).

Au contraire, certaines kératines sont exclusivement exprimées dans les couches supra basales de l'épiderme, telles que les kératines 1 et 10. Elles pourraient être utilisées comme marqueurs négatifs de kératinocytes basaux. Il a été montré qu'une expression forcée de la kératine 10 dans des kératinocytes en culture ralentit la progression dans le cycle cellulaire ([Paramio et al 1999](#)). De manière intéressante, ce mécanisme est causé par une inhibition de Akt par la kératine 10 ([Paramio et al 2001](#)),

- Etat de l'art – IV. Méthodes d'identification des CSK de l'EIF -

ce qui semble désigner la voie PI3K comme importante dans la régulation du cycle cellulaire des kératinocytes, par l'intermédiaire des kératines 5/14 et 1/10.

IV.2.A.b Récepteurs mitogéniques.

Une des caractéristiques des CSK *in vivo* est leur état de dormance, ou quiescence. La quiescence et l'entrée dans le cycle cellulaire résulte d'une balance régulée entre et par des signaux mitogéniques et des inhibiteurs du cycle cellulaire. Cet équilibre entre quiescence et prolifération fait notamment intervenir des récepteurs à des facteurs de croissance. C'est le cas par exemple du système hématopoïétique, qui implique le couple FLT3 (« Fms-like tyrosine kinase 3 ») ([Rosnet et al 1991](#)) et son ligand FL ([Lyman et al 1993](#)), mais aussi des CS de la pulpe dentaire où l'inhibition de l'IGF-R (insulin growth factor 1 receptor) stimule la sortie de la phase G0 ([Vandomme et al 2014](#)). Ainsi, le phénotype [récepteur mitogénique^{fort/faible}] pourrait être un bon complément aux marqueurs membranaires d'adhésion dans le but d'isoler des CSK vivantes. Ce phénotype a été exploré dans le système kératinocytaire en conjugaison avec les molécules d'adhésion.

i. Le récepteur à la transferrine CD71.

Lors de la prolifération, les cellules ont un besoin accru en fer afin de synthétiser correctement l'ADN lors de la mitose. L'apport en fer est médié par un complexe protéique appelé la transferrine, qui se lie à son récepteur membranaire, le récepteur à la transferrine. Après liaison entre la transferrine et son récepteur, le fer est internalisé par endocytose et le récepteur est recyclé vers la membrane. Il a été montré que CD71 est fortement exprimé à la surface des cellules en prolifération active ([Trowbridge & Omary 1981](#)). Cette distribution est exemplifiée dans le système hématopoïétique où les CSH, quiescentes, présentent beaucoup moins de CD71 à leur surface comparées aux cellules progénitrices ([Lansdorp & Dragowska 1993](#)).

Une faible expression de CD71 a également été documentée dans une sous-population de kératinocytes basaux et utilisée afin d'isoler des CSK putatives. L'expression de CD71 a été combinée avec l'expression de l'intégrine- $\alpha 6$ et a permis d'identifier deux sous-population de kératinocytes basaux : une population [ITA6^{fort}/CD71^{faible}], qui montre toutes les fonctions des CSK, et une population [ITA6^{fort}/CD71^{fort}], qui semble correspondre à des cellules d'amplification transitoire, avec un potentiel de croissance à long terme moindre. Une étude transcriptomique comparative de ces deux sous-populations, auxquels a été rajoutée la population de kératinocytes différenciés [ITA6^{faible}], confirme que la première sous population est quiescente, la deuxième cyclante et la troisième en cours de différenciation. Un apport important de cette étude a été de montrer que la population [ITA6^{fort}/CD71^{faible}] avait le plus fort potentiel de régénération de l'épiderme dans un modèle *in vivo*,

- Etat de l'art – IV. Méthodes d'identification des CSK de l'EIF -

notamment à long terme. La seconde population quant à elle régénèrait l'épiderme le plus rapidement, mais perdait cette capacité sur le long terme ([Schluter et al 2011](#)).

L'utilisation du phénotype [ITA6^{fort}/CD71^{faible}] constitue à ce jour le critère de sélection des CSK le plus documenté dans le domaine des cellules souches de l'EIF ([Figure 16](#)) ([Kaur 2006](#), [Li et al 1998](#), [Schluter et al 2011](#), [Webb et al 2004](#)). C'est également le phénotype couramment utilisé au laboratoire ([Harfouche et al 2010](#), [Rachidi et al 2007](#)), et qui a été utilisé à de nombreuses reprises au cours de ce travail de thèse.

ii. Le récepteur au facteur de croissance épidermique (Epidermal Growth Factor Receptor)

La recherche de marqueurs en lien avec l'équilibre prolifération/quiescence a conduit à l'étude d'un autre récepteur mitogénique dans l'épiderme : le récepteur au facteur de croissance épidermique, EGF-R.

L'EGF-R est un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase de la famille des récepteurs Rb. Il a pour ligand l'EGF (Epidermal Growth Factor). Ce couple récepteur/ligand joue un rôle central dans la biologie des kératinocytes. En effet, l'EGF est impliqué dans le contrôle de la prolifération et de la motilité des kératinocytes ([Barrandon & Green 1987a](#)), mais il participe également au maintien de l'immaturité des kératinocytes basaux ([Peus et al 1997](#)). Ainsi, la voie de signalisation EGF/EGF-R est nécessaire au maintien de la fonctionnalité (croissance et régénération) des kératinocytes épidermiques ([Haase et al 2003](#)).

Fortunel et al ([Fortunel et al 2003a](#)) ont réalisé un tri par cytométrie en flux sur la base de l'expression de l'EGF-R à partir d'une population de kératinocytes basaux enrichie par la méthode d'adhésion sur collagène [ADH⁺⁺⁺]. Ce tri a permis d'isoler et quantifier la fonction de deux sous-populations de kératinocytes [ADH⁺⁺⁺/EGFR^{fort}] et [ADH⁺⁺⁺/EGFR^{faible}]. Les analyses fonctionnelles classiques permirent d'identifier la sous-population [ADH⁺⁺⁺/EGFR^{faible}] comme répondant à la définition fonctionnelle des CSK (croissance et régénération épidermique long terme) ([Figure 17](#)). J'ai également utilisé ce phénotype de tri au cours de ce travail de thèse, notamment en parallèle mais aussi en conjugaison avec le phénotype de Kaur basé sur l'intégrine- α 6 et le CD71.

Figure 17 : Isolation de sous-populations de kératinocytes selon leur propriété d'adhésion et l'expression de EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor).

Des kératinocytes primaires humains ont été séparés selon leur capacité d'adhésion au collagène I. Une fraction possède une faible adhésion (fraction ADH^{-/+}), l'autre fraction une forte adhésion (fraction ADH⁺⁺⁺). La fraction ADH⁺⁺⁺ a été marquée par un anticorps anti-EGFR. **A.** Quatre sous-populations ont été isolées selon leur niveau d'expression de EGFR. **B.** La fraction [ADH⁺⁺⁺ EGFR^{-/+}] présente la plus forte croissance long terme. **C.** La fraction [ADH⁺⁺⁺ EGFR^{-/+}] présente le plus fort potentiel de régénération épidermique, même après des phases d'expansion massives (7 passages en culture).

IV.2.B Identification par des effecteurs moléculaires intracellulaires : voies de signalisations et facteurs de transcriptions.

IV.2.B.a Effecteur aval de la voie Wnt : la β -caténine.

La voie Wnt sera développée plus en détails dans une partie ultérieure. C'est une voie de signalisation intercellulaire qui commence par la liaison d'un facteur soluble Wnt avec son récepteur membranaire, Frizzled. C'est une voie de signalisation majeure pour le bon établissement de la morphogenèse embryonnaire de la peau ([DasGupta & Fuchs 1999](#)), durant laquelle la voie Wnt contrôle la prolifération et la migration cellulaire et la polarisation du tissu. L'effecteur aval de la voie Wnt canonique est la β -caténine. Quand la voie Wnt est inactive (i.e. pas de liaison Wnt/Frizzled), la β -caténine, responsable de la transduction du signal, est dégradée dans le cytoplasme, et la transduction du signal n'a pas lieu. En revanche, quand la voie est activée, la β -caténine n'est plus dégradée, s'accumule dans le cytoplasme, et transloque vers le noyau, où elle agit comme un activateur de la transcription. L'équipe de Fiona Watt a proposé le phénotype [β -caténine^{faible}] comme un marqueur de CSK. En effet, ils ont montré que dans des coupes de peau, les kératinocytes basaux [intégrine β -1^{fort}] présentaient un phénotype [β -caténine^{faible}] ([Moles & Watt 1997](#)). La β -caténine a également été proposée comme régulateur de la taille de la population de précurseurs en contrôlant l'expression de

- Etat de l'art – IV. Méthodes d'identification des CSK de l'EIF -

c-MYC, connu pour stimuler la prolifération et ainsi pousser les kératinocytes vers le compartiment de progéniteurs cyclants ([Gandarillas & Watt 1997a](#)).

IV.2.B.b Les facteurs de transcriptions.

Plusieurs facteurs de transcriptions ont été identifiés pour jouer un rôle dans la régulation du caractère souche des kératinocytes. L'un des régulateurs fondamentaux dans la biologie des kératinocytes est le gène *TP63*, codant le FdT p63. C'est un homologue du FdT p53 (gène suppresseur de tumeurs *TP53*), avec qui il partage une structure commune ([Yang et al 1998](#)). p63 est composé de trois domaines distincts : un domaine N-terminal transactivateur, un domaine de liaison à l'ADN au centre de la protéine et un domaine d'oligomérisation à l'extrémité C-terminale. Il existe deux promoteurs alternatifs pour ce gène, qui conduisent à l'expression de deux formes de p63 : une forme à activité transactivatrice nommée TAp63, et une forme dénuée du domaine activateur en N-ter, notée Δ Np63. L'épissage alternatif du côté 3' des deux formes conduit à 3 isoformes, α , β et γ ([Yang et al 1998](#)). La forme la plus importante dans l'épiderme humain est Δ Np63, qui joue de nombreux rôles au cours du développement embryonnaire et également dans l'homéostasie épidermique adulte.

En effet, il a été démontré que l'ablation génétique *in vivo* de la forme Δ Np63 dans un modèle murin conduit à (1) une létalité dans les heures suivant la naissance des souris, (2) des malformations sévères des membres et du crâne et (3) l'absence d'un épiderme stratifié mature ([Romano et al 2012](#)). Une autre étude a permis d'identifier une balance entre TAp63 et Δ Np63, qui régulerait à la fois la différenciation des cellules ectodermiques lors du développement en kératinocytes, et l'initiation du processus de différenciation terminale des kératinocytes ([Koster & Roop 2004](#)).

Chez l'humain, p63 a été proposé comme discriminant les CSK *versus* TA ([Figure 18](#)) ([Pellegrini et al 2001](#)). *In vivo*, p63 est fortement exprimé dans les CSK de la couche basale de la cornée, et une chute rapide de son expression est observée lors de l'initiation de la différenciation en cellule d'amplification transitoire. p63 n'est pas détectable dans les kératinocytes différenciés. Cette observation a été complétée par des expériences *in vitro* basées sur la capacité clonogénique des cellules. La CFU de deux populations de kératinocytes a été comparée : des kératinocytes normaux et des kératinocytes immortalisés (donc dotés d'une capacité d'autorenouvellement accrue). Il s'avère que les kératinocytes immortalisés donnent naissance à beaucoup plus d'holoclones que les kératinocytes contrôles. De plus, ils maintiennent l'expression de p63 à un niveau très élevé comparés aux kératinocytes contrôles, même en condition de culture à long terme.

Figure 18 : Le niveau d'expression du facteur de transcription p63 permet de discriminer les CSK des TA.

Analyse par WB de l'expression de p63 dans des sous-cultures issues d'holoclonnes (H), de paraclones (P) et de meroclones (M) de kératinocytes humains primaires de deux donneurs (LC3 et LC5). p63 est fortement exprimé dans les CSK (holoclone) et indétectable dans les cellules d'amplifications transitoires tardives (paraclone). Dans les meroclones, stades intermédiaires entre les holoclonnes et les paraclones, le niveau de p63 est également intermédiaire. Pan : contrôle de charge par la détection de la protéine 14-3-3.

IV.2.C Vers un consensus pour l'identification des CSK ?

Malgré un panel de marqueurs de CSK en constante augmentation, des tests fonctionnels adaptés, l'apport des nouvelles technologies et une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires du contrôle du statut de CS, il n'est toujours pas possible d'isoler à ce jour une population pure de CSK. L'absence d'une approche fiable et robuste pour identifier les CSK de l'EIF sur la base phénotypique est donc un verrou que la communauté scientifique tente de lever.

Une élégante étude se basant sur une multitude de marqueurs de CSK a été menée récemment. Elle a eu pour but de déterminer la localisation et le phénotype des différentes sous-populations de kératinocytes dans l'EIF humain *in situ*. Pour cela, les auteurs ont utilisé une technologie de microscopie haut débit pour l'analyse du protéome ([Schubert et al 2006](#)). Les auteurs ont marqué des coupes de tissu de 7 donneurs différents, et analysé l'expression spatiale de nombreux marqueurs de CSK de la littérature, comme CD71, Ki67, intégrine- $\alpha 6$, intégrine- $\beta 1$, p63, β -caténine nucléaire et MCSP.

Cette étude ([Ruetze et al 2010](#)) révèle la présence simultanée d'environ 10 sous-populations de kératinocytes dans la couche basale, et qu'aucune d'elle n'exprime tous les marqueurs de CSK simultanément ([Figure 19](#)). Néanmoins, des cellules de phénotype [Ki67⁻] [CD71⁻] [ITA6⁺] [ITB1⁺] [p63⁺] ont été détectées dans la couche basale de l'épiderme, sans localisation précise dans cette couche. Cette population représente environ 6% des cellules basales, suggérant ces cellules comme des CSK. Les kératinocytes adjacents présentent un phénotype similaire à l'exception près de la perte

- Etat de l'art – IV. Méthodes d'identification des CSK de l'EIF -

d'expression de l'intégrine- $\alpha 6$ ou de p63. Ces cellules encore immatures pourraient correspondre aux TA et suggèrent que la sous-population précédente pourrait correspondre aux cellules centrales dans l'EPU. L'étude fut ensuite poursuivie *in vitro*. Après une étape de sélection par adhésion sur collagène, les kératinocytes furent ensemencés et l'expression de p63 quantifiée. Dans les cultures initiales, les cellules [p63⁺] représentent environ 7% des cellules totales. Après 2 repiquages successifs, le pourcentage de colonies correspondant à des holoclones est également et constamment de 7%. Les auteurs ont donc proposé que les cellules [p63⁺] pourraient être des holoclones, dotés d'une forte capacité à maintenir leur population au vu du pourcentage constant retrouvé dans les sous-cultures successives.

Figure 19 : Représentation de l'hétérogénéité de la couche basale de l'épiderme.

La détection des marqueurs de cellules souches kératinocytaires CD71, Ki67, intégrine- $\alpha 6$, intégrine- $\beta 1$, p63, β -caténine nucléaire et MCSP a été réalisée par la technique MELC (Multi Epitope Ligand Cartography). Le profil de localisation de 10 sous-populations discrètes de kératinocytes basaux a été représenté sur les coupes de peaux par différentes couleurs. Chaque couleur désigne une population spécifique, présentant une combinaison unique parmi les 7 marqueurs étudiés. La distribution des populations révèle une très forte hétérogénéité et montre que les cellules de toutes les populations sont disséminées dans toute la couche basale, sans localisation préférentielle.

L'ensemble de ces études nous permettent d'avoir une vision globale des tests fonctionnels, des marqueurs moléculaires (membranaires ou intracellulaires), et des technologies émergentes qui peuvent être mis en œuvre dans le but d'isoler et purifier des sous-populations de kératinocytes. Bien qu'il n'existe pas à l'heure actuelle une combinaison universelle pour isoler des CSK, ces marqueurs ont permis de mettre en évidence une forte hétérogénéité des kératinocytes, tant dans leurs fonctions que dans leur phénotype.

V Culture des kératinocytes et applications en thérapie cellulaire.

Cette partie a pour but de présenter les différentes méthodes et milieux de cultures disponibles, leurs avantages et inconvénients, et les approches mises en place pour développer de nouvelles méthodes de cultures alliant la conservation de la fonctionnalité des kératinocytes et la sécurité nécessaire pour la thérapie cellulaire. Elle présentera également les applications biomédicales qui découlent de la culture de kératinocytes, et les défis associés.

V.1 Méthodes de cultures.

V.1.A *Méthode de culture « historique » : couches nourricières et sérum.*

Au cours des années 1970, Howard Green et James Rheinwald parvinrent à isoler une lignée cellulaire depuis un tératome de souris ([Rheinwald & Green 1975a](#)). Celle-ci présentait une morphologie typique de cellule épithéliale, et une analyse au microscope électronique leur permit de déterminer la présence de grains de kératohyaline, de desmosomes et également de tonofilaments dans les cellules, les identifiant comme des kératinocytes ([Figure 20](#)) ([Green et al 1979](#)). Cependant, ces cellules ne pouvaient être guère maintenues en culture, car les flacons étaient rapidement contaminés par des fibroblastes, le type cellulaire majoritairement obtenu par dérivation depuis un tératome. Néanmoins, l'observation de la présence de fibroblastes au sein des cultures de kératinocytes ne fut pas sans intérêt.

Figure 20 : Identification d'une lignée kératinocytaire issu de tératocarcinome murin.

A. Culture de kératinocytes dérivés d'un tératocarcinome murin. Les kératinocytes poussent en colonies denses de cellules, en présence d'une couche de cellules nourricières, des fibroblastes murins 3T3. **B.** Une analyse des colonies par microscopie électronique a permis d'attribuer un phénotype épithélial aux cellules dérivées. Elles contiennent une agrégation de tonofilaments et des grains de kératohyalines.

- Etat de l'art – V. Culture des kératinocytes et applications en thérapie cellulaire -

En effet, ils mirent au point un système de coculture entre kératinocytes et fibroblastes. Afin d'empêcher les fibroblastes d'envahir totalement les cultures tout en permettant un soutien de la croissance des kératinocytes, leur prolifération fut arrêtée par irradiation ([Todaro & Green 1963](#)). L'utilisation de fibroblastes dont la croissance a été stoppée (par irradiation ou par administration de mitomycine-C) ([Jozefczuk et al 2012](#)) est une méthode très robuste pour la culture de kératinocytes, et également de cellules souches pluripotentes. Les fibroblastes, appelés cellules nourricières ([Rheinwald & Green 1975b](#)), ont pour fonction d'aider à l'adhésion des kératinocytes, mais également de soutenir leur croissance. Ils secrètent des protéines de matrice extracellulaire, des facteurs de croissance, permettent l'élimination des métabolites toxiques et retardent la différenciation terminale des kératinocytes ([Masson-Gadais et al 2006](#)). Les couches nourricières sont généralement obtenues à partir de fibroblastes murins de la lignée 3T3, mais des fibroblastes humains peuvent également être utilisés.

Ce système de culture utilise un milieu nourricier portant le nom de son créateur, le milieu Green. Les composants de base, et notamment du sérum de veau fœtal (SVF), sont aujourd'hui encore présents. Cependant, il fut amené à évoluer au fur et à mesure de l'identification des cytokines et facteurs de croissance favorisant la croissance des kératinocytes. Ainsi, le milieu d'origine était complété par l'addition d'EGF, permettant d'accroître la croissance des kératinocytes de 40 à 150 doublements de population ([Rheinwald & Green 1977](#)). D'autres composants furent également ajoutés, tels que de l'insuline, de l'hydrocortisone ([Vaughan et al 1981](#)) ou encore des molécules stimulant la production d'AMPc (adénosine monophosphate cyclique) comme l'isoprotérénol ([Green 1978](#)).

Quarante ans plus tard, l'utilisation de couches nourricières et de milieu « Green » reste encore le standard dans la culture de kératinocytes, permettant une amplification de PK fonctionnels *in vitro* à long terme. Néanmoins, il nécessite l'utilisation de sérum bovin et de fibroblastes murins. Ainsi, les efforts sont portés vers le développement de milieux dont la composition est définie afin d'éviter l'utilisation de composants d'origine xénogénique.

V.1.B Evolution vers des milieux standardisés : milieux sans sérum et sans couches nourricières ?

Afin d'éviter la variabilité biologique du sérum et l'utilisation de matériels d'origine xénogénique, plusieurs approches ont été proposées. Des équipes ont tenté de remplacer le sérum par de l'albumine purifiée à partir de sérum bovin ([Castro-Munozledo et al 1997](#)) ou de l'extrait pituitaire bovin ([Peehl & Ham 1980](#)). Cependant, ces études ne s'affranchissent pas totalement des couches nourricières, ou utilisent du milieu conditionné par celles-ci pour favoriser la pousse des

- Etat de l'art – V. Culture des kératinocytes et applications en thérapie cellulaire -

kératinocytes. L'usage de fibroblastes humains irradiés a été proposé pour réduire l'utilisation de matériel d'origine xénogénique. L'équipe de Lucie Germain a comparé la croissance de kératinocytes en présence de fibroblastes 3T3 murins, de fibroblastes humains irradiés, ou sans couches nourricières. Utiliser des fibroblastes d'origine humaine n'impacte pas la croissance à long-terme des kératinocytes comparés à ceux cultivés en présence de 3T3 ([Bisson et al 2013](#)). Néanmoins, une étude a montré que des kératinocytes amplifiés dans un milieu « xeno-free » (sérum et couches nourricières humain) ont un potentiel clonogénique similaire à ceux amplifiés en milieu Green, mais présentent une expression plus faible de l'intégrine- $\alpha 6$ ([Cheshire et al 2019](#)).

Le traitement des surfaces de culture *in vitro* avec du collagène IV, un substitut de sérum (Ultroser G) et du KGF (Keratinocyte Growth Factor) permet une amplification des kératinocytes en absence de sérum et de couches nourricières. Ils possèdent la capacité à reconstruire un épiderme pluristratifié *in vitro* ([Coolen et al 2007](#)). Une étude a comparé l'expansion et l'expression de l'intégrine- $\alpha 6$ de kératinocytes primaires amplifiés en milieu Green *versus* en milieu sans matériel xénogénique (« xeno-free » : sérum et couches nourricières d'origine humain).

Très récemment, des études ont également mis en avant l'utilisation de molécules chimiques impactant des voies de signalisation, comme les inhibiteurs de la voie Wnt et les inhibiteurs de ROCK (Rho-associated protein kinase). Ces inhibiteurs permettent de favoriser grandement la prolifération et la fonctionnalité des kératinocytes en absence totale de sérum et de couches nourricières. La première étude présentée ici utilise un milieu sans sérum et sans couches nourricières. Il contient par ailleurs très peu (0.07 mM) de calcium Ca^{2+} , connu pour favoriser la différenciation des kératinocytes en culture ([Bikle et al 2012](#)), et il est complété par une drogue inhibitrice de l'action des kinase Rho, le ROCK inhibitor Y-27632. La combinaison proposée dans ce travail permet de cultiver les kératinocytes pendant au moins 30 jours supplémentaires et de retarder leur différenciation, tout en maintenant leur potentiel de reconstruction épidermique, comme démontré par des expériences de reconstruction cutanée ([Strudwick et al 2015](#)). Une autre équipe a également utilisé un milieu faible en calcium, la molécule Y-27632, et une molécule inhibant la voie TGF- β (A83-01). Cette combinaison permet ainsi de cultiver des cellules épithéliales (kératinocytes, cellules épithéliales de prostate, bronchiales et mammaires) pendant des durées très largement supérieures (plusieurs semaines supplémentaires, correspondant à plusieurs dizaines de doublement de populations) au milieu sans sérum standard (type KSFM) ([Figure 21](#)) ([Zhang et al 2018](#)).

Figure 21 : Maintien de potentiel de croissance à long terme de cellules épithéliales par utilisation de petites molécules inhibitrices des ROCK.

Plusieurs types de cellules épithéliales (kératinocytes épidermiques, cellules épithéliales de prostate) ont été cultivées dans du milieu sans sérum et sans couche nourricière (KSM). Un arrêt de la croissance des cellules est constaté après 30 à 40 jours de culture. Un criblage de petites molécules chimiques a permis d'identifier deux molécules favorisant largement la croissance épithéliale : A83-01 (inhibiteur de TGF- β) et Y-27632 (inhibiteur de ROCK). Le milieu EpiX a été généré par addition de ces molécules dans du milieu KSM, et a permis de soutenir la croissance épithéliale pendant plus de 100 jours en l'absence totale de sérum et couches nourricières.

V.1.C Problématiques biologiques associées aux méthodes de culture.

L'utilisation de sérum et de couches nourricières a l'avantage de permettre de générer des grandes quantités de cellules fonctionnelles, utilisables en thérapie cellulaire comme en recherche sur les cellules souches. Cependant, elle a pour inconvénient principale d'utiliser du sérum, un fluide biologique soumis à la variation des lots produits et dont la composition exacte est inconnue. L'utilisation de couches nourricières d'origine murine pourrait introduire des pathogènes xénogéniques dans les préparations cellulaires. Bien que cette méthode de culture soit autorisée pour des usages thérapeutiques à l'heure actuelle ([Hirsch et al 2017](#)), il est nécessaire de faire des avancées en ce sens.

Les milieux semi-définis ou définis n'incorporent pas de sérum pour supporter la pousse des kératinocytes. Ainsi, ils présentent l'avantage de posséder une composition mieux connue, contrôlée et contrôlable, plus standardisée. La non-utilisation du sérum permet de rendre ces milieux plus robustes, puisque non dépendant de la variation biologique des lots. Ces milieux s'affranchissent également de l'utilisation des couches nourricières, indépendamment de leur origine. Ces avantages les orientent donc plutôt vers un usage destiné aux applications cliniques. Néanmoins, ils ne permettent pas une amplification à long terme d'aussi bonne qualité que les milieux contenant du sérum. Le principal problème de ces milieux s'avère être la piètre qualité des kératinocytes produits, qui présentent des altérations morphologiques, une faible prolifération, et une perte de fonctionnalité,

- Etat de l'art – V. Culture des kératinocytes et applications en thérapie cellulaire -

notamment au niveau de la capacité à reconstruire un épiderme (Figure 22) (Lamb & Ambler 2013). Une autre équipe a comparé la prolifération sur 3 passages consécutifs de plusieurs lignées de kératinocytes dans 3 milieux commerciaux (semi-défini ou défini) et le milieu Green. Deux milieux sur 3 permirent une amplification correcte des kératinocytes en termes de nombre de cellules comparé au milieu Green. Cependant, la capacité de régénération épidermique des différentes préparations n'a pas été testée (Lenihan et al 2014). Il est donc important de développer de nouveaux milieux, permettant d'allier la qualité contrôlée des milieux définis avec la qualité de l'amplification des milieux historiques.

Figure 22 : Inaptitude des kératinocytes cultivés en milieu sans sérum et sans couches nourricières à former un épiderme correctement pluristratifié.

Des kératinocytes ont été cultivés sur des DED dans plusieurs milieux différents, avec ou sans sérum, et avec ou sans calcium, nécessaire à l'initiation de la stratification épidermique : **A.** milieu FAD complet ($[Ca^{2+ \text{ fort}}]$ /10% SVF). La stratification de l'épiderme est correcte, avec les 4 couches épidermiques bien visibles. **B.** milieu KGM-Gold ($[Ca^{2+ \text{ faible}}]$ /sans sérum). Les kératinocytes ne parviennent pas à initier le processus de différenciation en conditions sans sérum et sans calcium. **C.** milieu KGM-Gold ($[Ca^{2+ \text{ fort}}]$ /sans sérum). L'addition de calcium seul ne permet pas d'initier le processus de stratification épidermique. **D.** milieu KGM-Gold ($[Ca^{2+ \text{ fort}}]$ /10% SVF). L'addition de sérum et de calcium permet une stratification correcte de l'épiderme, similaire à celle obtenue en A.

V.2 De la culture vers les applications biomédicales : la greffe de peau reconstituée.

V.2.A *La greffe de peaux reconstituées.*

Suivant leurs avancées scientifiques dans le domaine de la culture *in vitro* de kératinocytes, Howard Green et son équipe se sont ensuite rapidement tourné vers les applications cliniques découlant de l'amplification des kératinocytes, notamment la transplantation. Ainsi, dans une publication datant de 1979, Green calcula de manière théorique le rendement d'amplification et la

- Etat de l'art – V. Culture des kératinocytes et applications en thérapie cellulaire -

surface d'épithélium théoriquement produit à partir d'une biopsie de seulement 1 cm² : selon ses calculs, il serait possible de produire jusqu'à 3 m² de tissu épithélial greffable en seulement 12 jours ([Green et al 1979](#)). A cette époque, les greffons consistaient simplement en un feuillet épidermique de kératinocytes cultivés sur une surface plastique ([Figure 23](#)). Par la suite, ils greffèrent sur des blessures cutanées de souris athymiques des feuillets épidermiques humains reconstitués ([Banks-Schlegel & Green 1980](#)). Les greffons perdurèrent en place pendant 108 jours, apportant la preuve de principe de la greffe de peau reconstituée. Dans les années qui suivirent, les premières greffes de peaux humaines sur des patients très largement brûlés au 3ème degré furent réalisées avec succès, et les greffes restèrent de manière pérennes pendant le temps de suivi de l'étude (8 mois) ([Gallico et al 1984a](#), [O'Connor 1981](#)). Les épidermes greffés reprirent leur cycle de desquamation, et leur maintien à long-terme attesta de la présence de cellules souches dans les greffons.

Figure 23 : Feuillet épidermique obtenu en culture.

Photo d'un feuillet épidermique de kératinocytes obtenu en culture. Le feuillet peut ensuite être détaché du support par action enzymatique de la trypsine.

Le protocole de culture et de greffons initialement développé par Green est encore majoritairement utilisé aujourd'hui, bien qu'il ait subi des améliorations au cours des années. En effet, il fut rapporté que l'échec des greffes de peaux étaient souvent dû à une mauvaise préparation du lit de la blessure et de l'activité d'organismes dégradant la matrice extracellulaire, empêchant l'adhérence des greffons. L'addition d'une composante matriciel de support sous la forme d'un gel de fibrine solide fut donc une addition importante au modèle de Green ([Ronfard et al 2000](#)). La fonctionnalité des kératinocytes était préservée, et les greffons rendus plus facilement manipulables et décollables de leur support de culture.

Récemment, l'équipe de De Luca a publié une élégante étude dans Nature ([Hirsch et al 2017](#)) combinant thérapie génique et cellulaire pour sauver la vie d'un enfant atteint d'épidermolyse bulleuse jonctionnelle (EBJ), et utilisant l'occasion pour accroître les connaissances sur le modèle des holoclones. L'EBJ est causée par des mutations dans les gènes codant les protéines impliquées dans la formation de la lame basale, conduisant à une incapacité de l'épiderme à adhérer au derme. Après avoir extrait les kératinocytes d'une biopsie de peau du patient, ils ont introduit le gène *LAMB3* par un vecteur rétroviral, codant la sous-unité β3 de la laminine, dont la déficience est une des causes de la

- Etat de l'art – V. Culture des kératinocytes et applications en thérapie cellulaire -

maladie. Les kératinocytes corrigés ont ensuite été amplifiés *ex vivo*. Ils ont généré des greffons d'épidermes reconstitués qui ont été placés sur l'enfant, et effectué un suivi des greffes sur plusieurs années. 4 mois plus tard, l'épiderme est toujours en place et ne présente plus aucun phénotype pathologique. De plus, ils ont prélevé à 4 et 8 mois des échantillons de l'épiderme corrigé du patient, et effectué une étude génomique comparative des sites d'intégrations des vecteurs. Leur hypothèse était que si l'épiderme était reconstitué par des progéniteurs équipotents ([Clayton et al 2007](#)), ils détecteraient une multitude de sites d'intégrations différents dans les cellules. Au contraire, si l'épiderme est maintenu par une très petite population de cellules souches d'origine clonale (holoclone), elle prendrait le dessus et ils détecteraient un nombre beaucoup plus restreint de sites d'intégration, à cause d'une sélection clonale, où, à long terme, les merocolones et paraclones auraient le même profil que les holoclones initiaux. Ils démontrèrent ainsi que les greffons d'épidermes étaient maintenus par les holoclones au cours du temps, et que c'était bien cette population rare qui était majeure pour l'intégrité épidermique ([Figure 24](#)).

Le fruit d'un travail entre notre laboratoire et celui de Jean-Jacques Lataillade à l'hôpital Percy, Clamart, a permis de développer un modèle de reconstruction épidermique composé d'un épiderme reposant sur une matrice de gel de fibrine obtenue à partir de plasma sanguin humain, dans lequel sont enchâssés des fibroblastes ([Alexaline et al 2015](#)). Cette étude démontre que les substituts épidermiques permettent une bonne régénération cutanée, et proposent des contrôles qualités fonctionnels tout au long de la génération des épidermes, permettant de s'assurer de la présence des kératinocytes clonogéniques dans le greffon. C'est ce modèle qui a été utilisé au cours de ce travail de thèse.

Figure 24 : Profil d'intégration des vecteurs dans les CSK et les TA.

Le génome des kératinocytes transduits a été séquencé afin de dresser une cartographie des sites d'intégrations des vecteurs viraux. Le génome a été séquencé au moment des cultures pré-greffons (PGc), 4 mois après la prise de greffe (4Mc), et 8 mois après la prise de greffe (8Mc). Les diagrammes montrent le pourcentage d'intégrations détectés dans les holoclones retrouvés dans les meroclones et les paraclones. PGc : une forte hétérogénéité des sites d'intégration est détectée, du fait de l'hétérogénéité de la population de kératinocytes. 4Mc et 8Mc : les similitudes de sites d'intégration retrouvés dans les meroclones/paraclones comparés aux holoclones augmentent progressivement au cours du temps, indiquant que la maintenance à long terme de l'épiderme greffé est dû aux holoclones.

V.2.B Les défis de la thérapie cellulaire cutanée.

Les buts principaux de la thérapie cellulaire cutanée sont une prise de greffe robuste et à long-terme des greffons, une reconstitution complète de la complexité de la peau, et un non-rejet de greffe par le patient. Une vision globale de la littérature scientifique suggère ainsi plusieurs défis importants à surmonter dans les années à venir.

La reconstruction épidermique actuelle permet de sauver la vie de patients gravement brûlés. Néanmoins, la peau cicatrisée présente souvent des tissus cicatriciels excessifs, et ne possède pas les propriétés de lubrification, de régulation de la température corporelle, de rôle senseur ou encore de pigmentation ([Blais et al 2013](#)). Ces déficits sont notamment causés par la non-existence des cellules spécialisées dans ces tâches au sein des greffons, tels que les mélanocytes par exemple. Dans ce sens, les chercheurs concentrent maintenant leurs recherches sur des améliorations de la composante dermique, mais à terme, il serait bénéfique que les substituts cutanés possèdent également les annexes épidermiques, les nerfs et le réseau vasculaire nécessaires à toutes les fonctions de la peau ([Kamel et al 2013](#)).

Des études cliniques rétrospectives ont montré des taux de prise de greffes très variables, allant de 0 à 100% des surfaces greffées ([Atiyeh & Costagliola 2007](#), [Auxenfans et al 2015](#), [Cirodde et al 2011](#)). Le succès d'une greffe de peau repose en partie sur la préservation des fonctionnalités des PK au cours des étapes d'amplification *ex vivo* ([Fuchs 2012](#)). En effet, pour disposer de suffisamment de matériel cellulaire pour générer des substituts épidermiques à partir de la biopsie d'un patient, une phase d'expansion *ex vivo* des kératinocytes est requise. Or, lors de la culture, ceux-ci peuvent se différencier et perdre une partie de leur potentiel régénératif. Cela est plus particulièrement vrai lorsque des milieux sans sérum et sans couches nourricières sont utilisés pour les phases d'expansion. L'un des principaux enjeux pour la thérapie cellulaire cutanée est donc de développer des méthodes

- Etat de l'art – V. Culture des kératinocytes et applications en thérapie cellulaire -

de culture qui permettent l'amplification des kératinocytes sans perte de fonctionnalité dans des milieux contrôlés, sans sérum et sans composants xénogéniques.

Enfin, une origine alternative à l'autogreffe de kératinocytes pourrait être l'utilisation de kératinocytes dérivés à partir de cellules souches pluripotentes (CSE ou iPSC). Certains protocoles permettent déjà de produire ce type de cellules, qui sont capables de générer un épiderme *in vitro* ([Guenou et al 2009](#)). L'utilisation de cette source pourrait permettre de s'affranchir des étapes d'amplification des kératinocytes en utilisant des banques de CSP générées au préalable. Néanmoins, la présence de kératinocytes précurseurs très immatures au sein des cultures utilisées pour la génération des épidermes n'a pas été démontrée. De plus, les milieux de culture pour les kératinocytes dérivés de CSP sont également des milieux sans sérum et sans couches nourricières, et à ce titre, ne permettent pas un maintien optimal de l'immaturité cellulaire. Enfin, le problème de l'immuno-compatibilité est également important, car les cellules greffées ne proviennent pas du patient traité mais d'une allobanque.

Il existe deux approches pour la culture de kératinocytes : des milieux utilisant des couches nourricières et du sérum, qui permettent une expansion préservant la fonctionnalité des cellules à long terme ; et des milieux sans sérum et sans couches nourricières, dont la composition est mieux contrôlée, mais qui ne permettent pas une expansion de qualité. A l'avenir, il est nécessaire de développer de nouveaux milieux de culture dans cette optique. La greffe de substituts épidermiques a été développée suite à la culture de kératinocytes, et permet maintenant de traiter des patients grands brûlés. Les recherches s'orientent maintenant vers le raffinement des substituts cutanés et leur immuno-compatibilité.

VI Voies de signalisation et gènes « stemness » : contrôle du statut de cellule souche.

Cette partie a pour but d'exposer les stratégies mises en place pour identifier des gènes « stemness » universels en comparant plusieurs types de CS, puis de présenter certaines des voies importantes dans le maintien du statut souche des kératinocytes.

Le fait de partager des fonctions communes à amener les chercheurs à émettre l'hypothèse que toutes les cellules partageaient également un programme moléculaire commun. Ce programme moléculaire se décline au niveau génétique et épigénétique. L'étude de ce programme « souche » (désigné en anglais par le terme « stemness ») a pour but de comprendre le rôle des différents gènes impliqués dans les fonctions communes aux CS, mais également ce qui leur confère leur spécificité dans les différents tissus.

VI.1 Recherche d'un profil d'expression commun à toutes les CS.

Dès lors, de nombreuses équipes se sont attelées à identifier un patron d'expression commun à toutes les CS à l'aide d'approches globales. L'accès à des technologies de séquençage à haut débit a notamment ouvert la porte à des études génomiques et transcriptomiques comparatives à grande échelle dans le but de dresser des listes de gènes « stemness ». En 2002 et 2003, l'approche comparative pour étudier le programme génétique exprimé par plusieurs types de CS a été proposée par plusieurs équipes indépendantes. Deux équipes ([Ivanova et al 2002](#), [Ramalho-Santos et al 2002](#)) ont réalisé dans le modèle murin, une étude globale à l'aide de puces à ADN. Ils ont caractérisé et comparé l'expression génétique de trois types de CS : des CSE, des CS neurales dérivés de neurosphères, et des CSH. Ils ont proposé une liste de gènes « stemness » pour chacun des types de CS. Ces listes ont ensuite été recoupées afin de lister les gènes « stemness » communs. Cette étude a permis d'ouvrir le débat sur l'existence de gènes communs à tous les types de CS.

Dans le but de compléter et affiner cette liste de gènes « stemness », une étude complémentaire à celles citées précédemment a été réalisée dans le modèle murin également. Elle a porté sur la comparaison de l'expression du programme génétique entre des CSE, des CNS et des CS de ganglions rétinal (CSR) ([Fortunel et al 2003b](#)). Après avoir défini des profils d'expression des gènes pour chaque type de CS, ils ont été comparés avec celui de cellules différenciées du même type tissulaire. Pour chaque type de CS, une liste des gènes spécifiquement exprimés dans celui-ci a pu être dressée. Puis les listes ont été intersectées pour proposer une liste de gènes « stemness » universels.

- Etat de l'art – VI. Voies de signalisation et gènes « stemness » -

Un atout majeur de l'étude fut de proposer une analyse collective des données générées indépendamment par ces 3 groupes. Après avoir déterminé les listes de gènes exprimés par chaque type de CS, les études ont été croisées. Deux résultats principaux ont été obtenus. Les études concordent bien lorsqu'il s'agit d'identifier des gènes pour un type de CS donné. Environ 250 transcrits par type de CS sont identifiés en commun par les 3 études, dont certains déjà connus pour leur rôle dans la pluripotence, comme Oct-3/4, Nanog et sox2. Cependant, de manière surprenante, quand les listes de chacun des types de CS sont recoupées pour identifier des transcrits universellement exprimés par les CS (indépendamment de leur type), le nombre de transcrits communs chute fortement. Quand deux types de CS sont entrecroisés, une dizaine de transcrits communs sont identifiés, et seulement un transcrit commun est détecté quand les listes issues des 3 types cellulaires sont recoupés. Il s'agit de l'intégrine- $\alpha 6$ (Figure 25).

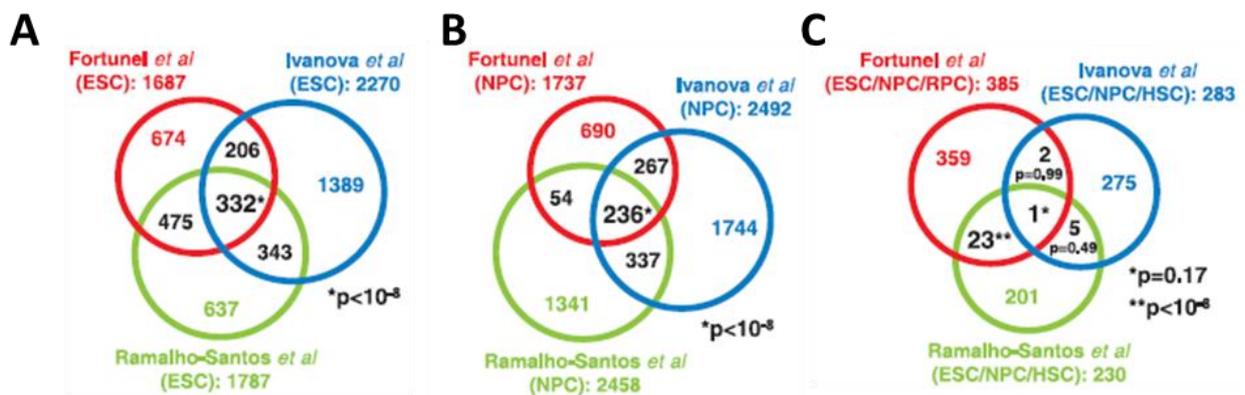


Figure 25 : Diagrammes de Venn représentant le chevauchement des gènes « stemness » retrouvés par 3 groupes indépendants.

Trois études ont eu pour but de dresser une liste des gènes « stemness » en séquençant le transcriptome de différents types de cellules souches et en le comparant à leur descendance différenciée. **A-B.** Quand les 3 listes sont recoupées pour un seul type de cellule souche, le chevauchement est bon, avec plusieurs centaines de transcrits communs. **C.** Quand les 3 études sont recoupées pour identifier des transcrits « stemness » universels à tous les types de CS et à toutes les études, un seul transcrit commun est détecté. Il s'agit de l'ARNm codant l'intégrine- $\alpha 6$. Source : Fortunel et al, 2003.

L'identification du transcrit *ITA6* est particulièrement intéressante dans le contexte de la biologie des CS. En plus de sa fonction dans l'épiderme, il a été montré que l'intégrine- $\alpha 6$ est utilisée pour enrichir en certaines sous populations de CSN (Hall et al 2006), et joue également un rôle dans la niche des CSH (Qian et al 2006).

L'identification d'un seul gène stemness commun à 3 types de CS n'exclut pas l'hypothèse de l'existence d'un programme commun. En effet, il semblerait que l'identification de gènes stemness ne soit pas facilitée par la comparaison avec un type cellulaire différencié. De plus, ces études comparent

- Etat de l'art – VI. Voies de signalisation et gènes « stemness » -

le panel d'expression de CSA avec des CSE. Comme décrit précédemment, la plupart des CSA ont des propriétés fonctionnelles qui peuvent être assez différentes des CSE. L'inclusion des CSE dans ces études pourrait être remplacée par d'autres types de CSA. Enfin, ces études se sont concentrées spécifiquement sur l'expression génique. Une approche plus globale au niveau des voies de signalisations communes à ces différents types cellulaires aurait pu être envisagée, permettant de mettre à profit toutes les informations obtenues par les séquençages haut débit.

VI.2 Voies de signalisation « stemness »

La mise en relation de ces listes de gènes stemness avec un apport d'études plus récentes a permis d'identifier de nombreuses voies et réseaux de signalisations régulant le caractère souche des CS. La plupart de ces voies de signalisation sont des voies essentielles lors de la morphogénèse embryonnaire, qui sont conservées ensuite dans les tissus adultes afin de réguler l'homéostasie tissulaire. Il apparaît que ces voies sont très largement conservées, tant entre les espèces ([Chakraborty & Agoramoorthy 2012](#)) qu'entre les types cellulaires ([Fortunel et al 2003b](#), [Shats et al 2011](#)). Parmi ces voies de signalisations, on retrouve très couramment la voie Wnt/ β -caténine, TGF- β /BMP, Notch ou encore SonicHedgeHog. Elles interviennent dans le contrôle des balances « immaturité/différenciation » et « prolifération/quiescence » qui sont essentielles au maintien de la fonctionnalité des CS. Dans la biologie de l'EIF, les voies Wnt/ β -caténine, Notch et TGF- β sont particulièrement importantes.

VI.2.A La voie Wnt/ β -caténine : vue générale et fonctions dans la biologie de l'EIF.

La voie Wnt/ β -caténine est un réseau de signalisation fortement conservé au cours de l'évolution, qui régule des aspects cruciaux de détermination du destin cellulaire, de la migration et la polarité cellulaire et tissulaire, ou encore l'organogénèse embryonnaire. Plus récemment, elle a été identifiée comme jouant un rôle important dans l'autorenouvellement des CS. Elle est essentielle au développement de la peau, et joue notamment un rôle majeur dans la mise en place des FP et leur cycle de renouvellement. Cependant, cette partie se concentrera particulièrement sur le rôle de la voie Wnt/ β -caténine dans l'EIF et ses cellules souches.

VI.2.A.a Description générale de la voie Wnt/ β -caténine : une voie de signalisation complexe.

La voie Wnt est un réseau hautement conservé dans la biologie des animaux métazoaires, de la drosophile à l'être humain. Les ligands à l'origine de l'activation de la voie sont appelés Wnts. Ce

- Etat de l'art – VI. Voies de signalisation et gènes « stemness » -

sont des glycoprotéines sécrétées, qui comprennent une large famille de 19 protéines chez l'humain. Elles peuvent se lier à 10 récepteurs de la famille Frizzled (Fz) ([He et al 2004](#)). Cette abondance de ligands et récepteurs aboutit à une intense complexification du réseau moléculaire, et pourrait expliquer son importance majeure dans un grand nombre de processus biologiques fondamentaux. L'activation de la voie commence quand un ligand extracellulaire Wnt se lie à un récepteur membranaire. La transduction du signal induit une cascade de signaux intracellulaires, aboutissant à l'activation de la voie Wnt non-canonique (indépendante de la β -caténine) ([Figure 26](#)) et/ou de la voie Wnt canonique (dépendante de la β -caténine) ([Figure 27](#)). La voie non-canonique peut être elle-même décomposée en deux branches distinctes : le réseau connu sous le terme anglo-saxon de « Planar Cell Polarity », et le réseau Wnt/ Ca^{2+} .

i. La voie non-canonique : « Planar Cell Polarity » (PCP) et Wnt/ Ca^{2+} .

La voie Wnt non-canonique, souvent appelée la voie indépendante de la β -caténine, peut être séparée en deux branches distinctes : « Planar Cell Polarity » et Wnt/ Ca^{2+} .

Le réseau PCP fut identifié pour la première fois chez la drosophile, au cours d'une étude mettant en lumière des mutations dans les composants de la voie tels que Frizzled ou Dishevelled. Une conséquence de ces mutations fut une désorganisation spatiale de manière aléatoire des structures épidermiques ([Seifert & Mlodzik 2007](#)). En effet, les cellules épithéliales sont caractérisées par une forte polarisation au niveau cellulaire (polarité pico-basale) mais également à un niveau plus global, le long du plan du tissu épidermique. Cette organisation à deux niveaux gouverne l'orientation des structures épidermiques. Le rôle principal de cette branche de la voie Wnt est notamment d'organiser le cytosquelette d'actine au sein des cellules, afin d'organiser la polarisation des structures et diriger la migration des cellules. Il a été mis en évidence que cette branche est essentielle lors de la gastrulation ([Wallingford et al 2002](#)).

Figure 26 : Schéma de la voie Wnt non-canonique.

La liaison d'un ligand Wnt avec son récepteur Frizzled (Fz) peut conduire à l'activation de la voie Planar Cell Polarity (PCP) ou dépendante du calcium. **A.** La transduction du signal à travers Fz conduit à l'activation de Dsh, médiateur de l'activation de la voie ROCK. Ces signaux sont nécessaires pour la polarisation cellulaire et l'organisation des tissus au cours de la gastrulation. **B.** L'activation de Dsh par les protéines G provoque une cascade signalisation aboutissant au relargage de calcium intracellulaire, qui inhibe les fonctions de la β -caténine.

- Etat de l'art – VI. Voies de signalisation et gènes « stemness » -

La seconde branche non-canonique est appelée Wnt/Ca²⁺. Tout comme le PCP, ce réseau est important lors de l'embryogenèse, où il a pour rôle de moduler la voie canonique pour contrôler la mise en place des axes de symétrie et les migrations cellulaires lors de la gastrulation. Cette branche de signalisation, dépendante de protéines G, a pour spécificité le relargage intracellulaire de calcium par la liaison des récepteurs Wnt aux ligands Fz ([Slusarski & Pelegri 2007](#)). L'accumulation intracellulaire de calcium active ensuite des protéines sensibles à celui-ci, telle que la kinase II dépendante du calcium/calmoduline (CamKII). Ces protéines vont à leur tour activer des facteurs de transcription comme NFAT qui vont, par exemple, contrôler le destin des cellules de la face ventrale dans l'embryon ([Saneyoshi et al 2002](#)).

Figure 27 : Schéma de la voie Wnt canonique.

Le cascade de transduction du signal Wnt canonique est médié par la β -caténine : à gauche, en absence de ligand Wnt, à droite en présence de ligand Wnt. Quand la voie Wnt est inactive (absence de ligand), un complexe protéique composé de l'axine, APC, GSK3- β , CK1 et β -caténine est localisé dans le cytosol. La β -caténine est phosphorylée et adressée à la dégradation par le protéasome et à l'absence de transduction du signal canonique. La liaison de Wnt à son récepteur Fz et ses corécepteurs LRP5/6 cause la déstabilisation du complexe axine/APC/GSK3- β , CK1. La β -caténine n'est plus dégradée, s'accumule dans le cytoplasme et transloque vers le noyau, où elle se complexe à LEF pour jouer son rôle de modulation de la transcription sur les gènes cibles.

- Etat de l'art – VI. Voies de signalisation et gènes « stemness » -

ii. La voie canonique Wnt/ β -caténine.

La voie principale, appelée voie canonique, est dépendante de la β -caténine, une molécule qui peut circuler entre le noyau et le cytoplasme. Après sécrétion des ligands et liaison de ceux-ci avec leurs récepteurs, la transduction du signal peut avoir lieu dans la cellule, afin de moduler la transcription des gènes cibles de la β -caténine qui a transloqué dans le noyau.

1. Production et sécrétion des ligands Wnt.

Les ligands Wnt sont produits et stockés dans le cytoplasme des cellules. Afin de pouvoir être sécrétés et être actifs (i.e. se lier avec leur récepteur), ils subissent de nombreuses modifications post-traductionnelles comme des étapes de glycosylation et de palmitoylation ([Herr & Basler 2012](#)) au niveau du reticulum endoplasmique, sous l'action d'une protéine appelé la Porcupine. Les ligands sont ensuite transférés vers le Golgi, où ils se complexent avec une protéine transmembranaire essentielle à leur sécrétion, Wntless ([Banziger et al 2006](#)). Une fois les ligands Wnt liés avec Wntless, ils sont transportés jusqu'à la membrane, où ils peuvent être sécrétés et agir de manière autocrine ou paracrine.

2. Transduction du signal par interaction de Wnt et Fz.

La signalisation par la voie Wnt commence quand un des ligands Wnt se lie à son récepteur Fz, où à l'un de ses corécepteurs, comme LRP-5/6 (lipoprotein related receptor protein) ou ROR2 (receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2). Cette liaison peut être modulée, voir bloquée, par des régulateurs solubles sécrétés, dont les plus connus sont notamment Dkk (Dickkopf protéines) ou WIF (Wnt Inhibitory Factor) ([Hsieh et al 1999](#)). La liaison entre Wnt et Fz est le point de départ commun aux deux voies Wnt, canonique et non-canonique. La voie canonique, qui semble être la plus conservée entre les espèces, dépend de la β -caténine pour la transduction du signal. Ce processus est axé autour de la stabilisation de la β -caténine, une protéine très particulière du fait de son rôle : en effet, elle joue un rôle à la fois à la membrane dans des phénomènes d'adhésion, mais peut aussi, une fois transloquée dans le noyau, agir comme un facteur de transcription et influencer sur la transcription des gènes.

En absence de ligands Wnt, la β -caténine libre est phosphorylée dans le cytoplasme par un complexe de destruction composée de l'axine, CK1 α (casein kinase 1 α), APC (adenomatosis polyposis coli), PP2A (protein phosphatase 2A) et GSK3 β (glycogen synthase kinase 3 β). La phosphorylation adresse la β -caténine vers une dégradation médiée par le protéasome.

Au contraire, en présence d'un ligand de la famille Wnt lié à son récepteur, la protéine Dishevelled (Dvl) est recrutée et inhibe la dégradation de la β -caténine. La β -caténine s'accumule dans

- Etat de l'art – VI. Voies de signalisation et gènes « stemness » -

le cytoplasme et transloque vers le noyau, où elle agit comme un co-activateur transcriptionnel auprès de la famille des FdT LEF/TCF.

VI.2.A.b Fonctions de la voie Wnt/ β -caténine dans l'épiderme.

i. Rôle de la voie Wnt/ β -caténine dans la morphogenèse épidermique.

Dès les premiers stades de développement s'instaure un dialogue moléculaire entre l'épiderme embryonnaire et le derme sous-jacent. Cette communication permet notamment la mise en place de la membrane basale, des FP et participe à l'amorçage de la stratification de l'épiderme. L'épiderme est d'origine ectodermique, et la spécification vers le lignage épidermique est accomplie par la voie Wnt. En effet, les cellules ectodermiques reçoivent depuis l'endoderme sous-jacent des signaux moléculaires FGF (Fibroblast Growth Factor). La voie Wnt permet d'inhiber ces signaux. En l'absence de signaux FGF, les cellules ectodermiques vont exprimer des BMP (Bone Morphogenic Protein), et s'orienter vers un lignage épidermique, où elles vont exprimer des kératines spécifiques de la couche basale de l'épiderme (KRT 5/14) ([Byrne et al 1994](#)). Il a d'ailleurs été démontré à l'aide de modèles murins transgéniques où la production de Wnt est perturbée dans les cellules de la couche basale que la production de Wnt active une cascade de signalisation BMP-FGF dans le derme. Cette étude a permis de mettre en évidence une boucle de rétroaction de Wnt sur les voies BMP et FGF, indispensable à la mise en place subséquente de la couche épineuse ([Zhu et al 2014](#)).

Il est important de noter que la voie Wnt est surtout connue pour son rôle dans la mise en place des FP et le bon déroulement du cycle pileux. C'est d'ailleurs cette fonction qui est la plus documentée à ce jour. Il a été démontré qu'une surexpression ou une expression forcée de la voie Wnt induisait un nouveau cycle de croissance des FP ([Lo Celso et al 2004](#)).

ii. Rôle de la voie Wnt/ β -caténine dans l'EIF adulte et les CSK.

Une élégante étude ([Lim et al 2013](#)) a montré un rôle central de la voie Wnt dans le contrôle des balances « prolifération/quiescence » et « immaturité/différenciation ». Les auteurs ont utilisé un modèle d'épiderme plantaire (dépourvu de FP) murin génétiquement modifié *Axin2-CreERT*. Cette construction permet d'induire le marquage GFP dans les cellules exprimant l'*axin2* après injection de tamoxifen à l'animal. Il est important de savoir que l'*axin2* est une cible aval de la voie Wnt/ β -caténine. Le choix de la zone corporelle et de la construction moléculaire a permis de mettre en évidence que certains kératinocytes de la couche basale de l'EIF murin exprimaient fortement l'*axin2*, étaient encore détectables après une période de 'chase' de jusqu'à un an, et formaient de nombreux clones dans l'EIF, les désignant comme CSK. De plus, en inactivant le gène encodant la β -caténine dans les cellules exprimant l'*axin2*, la densité cellulaire des épidermes mutants est plus faible comparé aux épidermes

- Etat de l'art – VI. Voies de signalisation et gènes « stemness » -

contrôles, et un nombre de cellules plus restreint expriment le marqueur de prolifération Ki67. Enfin, les kératinocytes mutés pour la β -caténine ont tendance à surexprimer la kératine 10, indiquant une différenciation précoce des cellules. L'ensemble de ces résultats suggère que l'activation de la voie Wnt/ β -caténine permettrait de maintenir un état prolifératif dans les kératinocytes basaux, et jouerait également un rôle dans la différenciation.

Le rôle de la voie Wnt/ β -caténine dans la différenciation kératinocytaire a également été documenté dans un modèle murin. En inhibant la β -caténine spécifiquement dans les kératinocytes épidermiques en utilisant le promoteur *KRT14*, les chercheurs ont montré que l'absence de la β -caténine conduit à une diminution de la population des CS du FP. Cette diminution a pour conséquence une perte des FP, un arrêt de la croissance des poils, ainsi qu'une propension des CS à s'orienter vers une différenciation en kératinocyte présentant un phénotype de l'EIF ([Huelsken et al 2001](#)). Dans ce contexte de développement épidermique, l'inhibition de la β -caténine conduit à une hyperprolifération de l'EIF.

Enfin, une étude menée par Fiona Watt ([Zhu & Watt 1999](#)) dans des kératinocytes humains en culture suggère que la voie Wnt/ β -caténine jouerait un rôle dans le maintien de la population de CS de l'EIF. La comparaison de la distribution de la β -caténine cytoplasmique libre entre les TA et les CSK indiquent que ces dernières possèdent plus de β -caténine. La surexpression de la β -caténine augmente la proportion de CSK par rapport aux TA mais ne causerait pas d'altération de la différenciation.

En plus du rôle essentiel de la voie Wnt dans les FP, les nombreuses études portant sur la voie Wnt/ β -caténine la désigne comme une voie majeure dans le contrôle des balances 'quiescence/prolifération' et 'immaturité/différenciation' des CSK de l'EIF. Néanmoins, le niveau précis de régulation de la voie requis pour la maintenance des CSK de l'EIF semble encore difficile à déterminer. Cependant, l'équipe de Watt ([Niemann & Watt 2002](#)) a proposé un modèle qui permettrait de voir un peu plus clair dans le rôle de la voie Wnt : un contexte de forte activation de la voie stimulerait les CS à se différencier vers un lignage folliculaire ([Gat et al 1998](#)) tandis qu'une expression faible, voire nulle, orienterait plutôt vers une différenciation en sébocytes et en kératinocytes de l'EIF ([Huelsken et al 2001](#), [Niemann et al 2002](#)).

VI.2.B La voie TGF-Beta : vue générale et fonctions dans la biologie de l'EIF.

VI.2.B.a Description générale de la voie TGF- β .

La voie TGF- β doit son nom à la superfamille des ligands TGF- β /BMP. Cette famille comprend une trentaine de membres très conservés au cours de l'évolution. Bien que les membres de cette

- Etat de l'art – VI. Voies de signalisation et gènes « stemness » -

famille présentent des similitudes dans leurs structures, le grand nombre de ligands confère à cette voie des fonctions régulatrices très différentes au sein de fonctions cellulaires majeures. La voie TGF- β est par exemple très importante pour la prolifération, la différenciation et la migration dans de nombreux systèmes cellulaires. Cette superfamille peut être décomposée en deux branches principales : la famille des ligands TGF- β (comprenant par exemple les TGF- β , activines, Nodal ou encore les inhibines) et la famille des ligands BMP (Bone Morphogenetic Protein, Growth Differentiation Factor et Anti-Mulherian Hormon) ([Massague & Chen 2000](#)). Ajoutant un niveau de complexification, il existe des isoformes de nombreux ligands, tels que les 3 isoformes du TGF- β (1, 2 et 3), qui peuvent avoir des fonctions différentes selon le contexte cellulaire.

i. Production et sécrétion du TGF- β .

Les TGF- β et BMP sont produits dans la cellule, puis sécrétés dans le milieu extracellulaire. Cependant, avant d'être secrété, ils doivent subir des étapes de maturation pour être fonctionnels et se lier à leurs récepteurs et ainsi assurer la transduction du signal. Par exemple, le TGF- β 1 est produit sous la forme d'un précurseur, le pré-pro-TGF- β 1. Il est composé de 3 régions. La région N-terminale présente un peptide signal de sécrétion de la molécule. Au milieu du précurseur se trouve une région contenant une séquence LAP (Latency-Associated Peptide). Enfin, en position C-terminale se trouve le peptide TGF- β mature. Après sécrétion, le pré-pro-TGF- β va subir une première protéolyse qui conduit à l'élimination du peptide signal de sécrétion. A ce stade, le TGF- β est sous une forme inactive, le LTGF- β (Latent TGF- β). Il peut être retrouvé sous la forme de deux complexes : le SLC (Small Latent Complex) composé du TGF- β et du peptide LAP, ou le LLC (Large Latent Complex), composé d'un complexe SLC lié à une protéine de séquestration appelée LTBP (LTGF-B Binding Protein). C'est par l'intermédiaire de ces LTBP que le TGF- β peut s'ancrer à la matrice extracellulaire et ainsi être stocké ([Kanzaki et al 1990](#)). Enfin, une deuxième protéolyse ou une interaction avec les intégrines transmembranaires ([Munger et al 1999](#)) permet au TGF- β d'adopter sa forme active en séparant celui-ci des complexes LAP et LTBP. La régulation des formes actives et inactives du TGF- β est une balance fine qui varie en fonction des besoins cellulaires. Ainsi, la majeure partie du TGF- β est stockée sous forme inactive et activée quand le besoin s'en fait sentir. La plupart des ligands de cette superfamille suivent un processus similaire de stockage et activation ([Figure 28](#)).

ii. Transduction du signal.

La propagation du signal TGF- β ([Figure 29](#)) commence par la liaison d'un dimère de ligands TGF- β /BMP, actifs, à la partie extracellulaire de leur récepteurs située à la membrane de la cellule. Il existe plusieurs types de récepteurs, et ceux qui interagissent directement avec les ligands sont appelés récepteur de type II (TGF- β RII ou BMPRII). Ils sont également présents sous la forme de dimère

- Etat de l'art – VI. Voies de signalisation et gènes « stemness » -

de récepteurs et possèdent tous une activité serine thréonine kinase ([Massague & Chen 2000](#)). La liaison entre le ligand et son récepteur va contribuer à l'activation de celui-ci, qui va phosphoryler le domaine intracellulaire d'un deuxième récepteur, appelé récepteur de type I (TGF- β RI ou BMPRI). Il existe également des corécepteurs (TGF- β RIII ou BMPRIII) qui ont pour fonction de faciliter l'accès des ligands aux récepteurs de type II. Il est décrit dans la littérature un très grand nombre de ligands, et un nombre plus restreint de récepteurs ([Weiss & Attisano 2013](#)). Cependant, la combinaison des différents récepteurs (types I, II et III) permet une régulation fine et très spécifique de la transduction du signal.

Figure 28 : Production et stockage du TGF- β 1.

Le TGF- β 1 est un membre de la superfamille des cytokines TGF (Transforming Growth factor). Il est produit sous la forme de pré-pro-TGF- β . Il présente un peptide signal de sécrétion à l'extrémité N-terminale, une séquence LAP (Latency-Associated Peptide) et une le TGF- β mature à l'extrémité C-terminale. Après protéolyse du peptide signal, le TGF- β est sous une forme inactive, le LTGF- β . Il peut être retrouvé sous la forme de deux complexes : le SLC (Small Latent Complex) et le LLC (Large Latent Complex), composé d'un SLC et d'une protéine de séquestration appelée LTBP. Le LLC+LTBP peut ainsi être stocké à la membrane, et libéré quand le besoin cellulaire est accru. *Source : site Web Biolegend*

- Etat de l'art – VI. Voies de signalisation et gènes « stemness » -

La voie principale de la transduction de ce signal, qui peut être divisée en deux branches (TGF- β et BMP), implique la famille des protéines Smads. Cette famille se compose de 8 protéines réparties en 3 classes : les récepteurs R-Smads (Smad 1, 2, 3, 5 et 8), la protéine centrale commune co-Smad (Smad4) et les Smad inhibiteurs (Smad 6 et 7) ([Weiss & Attisano 2013](#)). Les protéines Smad de la transduction du signal sont phosphorylées par les récepteurs de type I, et vont former des oligomères avec Smad4. L'identité des Smad liées avec Smad4 est spécifique de la branche du signal qui est activée : de manière générale, un ligand TGF- β activera préférentiellement les Smad 2 et 3, tandis qu'un ligand BMP activera plutôt les Smad 1, 5 et 8. Un contrôle négatif est exercé par les Smad 6 et 7 qui entrent en compétition pour la liaison avec le récepteur de type I, ou en contribuant à la dégradation du récepteur. Smad7 interfère également avec la voie Wnt, en favorisant la dégradation de la β -caténine ([Owens et al 2008](#)). Une fois le complexe Smad-R-Smad formé, il transloque dans le noyau et agit comme un modulateur de la transcription des gènes en recrutant une large variété de partenaires au niveau des sites de liaison appelés SBE (Smad Binding Élément). Ces partenaires possèdent des fonctions diverses et parfois opposées : il peut s'agir d'activateur (HAT, CBP/p300...) mais également de répresseurs de la transcription (HDAC...). La multiplicité des ligands, des Smads et des partenaires recrutés au niveau de l'ADN pourrait permettre d'expliquer notamment la pléiotropie de cette voie dans le système hématopoïétique ([Coomes & Moore 2010](#), [Fortunel et al 2000](#)) ou l'épiderme ([Fortunel et al 2003a](#)).

Figure 29 : Transduction du signal de la voie TGF- β /BMP.

La transduction du signal commence quand un ligand (TGF- β s, nodal, activines ou BMPs) se lie à un récepteur de type II, membranaire. La liaison permet le recrutement d'un récepteur de type I, qui est phosphorylé par le complexe (activation). Les récepteurs de type I activés vont à leur tour phosphoryler les effecteurs de la transduction du signal, les Smads. Les ligands TGF- β activent préférentiellement les R-Smad 2 et 3, les ligands BMP plutôt les R-Smad 1, 5 et 8. Une régulation négative est exercée par i-Smad 6 et 7. Les Smads se complexent ensuite avec le co-Smad 4. Cet hétérodimère transloque vers le noyau, pour réguler la transcription des gènes cibles. *Source : Villapol et al, 2013.*

- Etat de l'art – VI. Voies de signalisation et gènes « stemness » -

VI.2.B.b Principales fonctions du TGF- β .

i. Contrôle de la balance prolifération/quiescence par le TGF- β .

En partie à cause de la grande conservation de la voie TGF- β au cours de l'évolution, la majorité des cellules humaines sont sensibles à ses effets. L'un des rôles les plus connus pour ce réseau de signalisation est son effet antiprolifératif sur de nombreux systèmes cellulaires tels que les cellules épithéliales, hématopoïétiques ou encore neurales ([Shiple et al 1986](#)). Le TGF- β peut exercer son effet antiprolifératif à deux niveaux : un mécanisme moléculaire, où il va contribuer à la régulation de molécules inhibitrices du cycle cellulaire (CDKI), et un mécanisme de régulation de gènes pro- et/ou antiprolifératifs, tels que *MYC*. Dans les deux cas, cela conduit à un arrêt du cycle cellulaire et un blocage de celui-ci en phase G0/G1.

La progression dans le cycle cellulaire est régulée principalement par des cyclines dépendantes des kinases (CDK) et leurs inhibiteurs (CDKI). Dans les kératinocytes, il a été documenté que le TGF- β activaient certaines CDKI, par exemple, p15^{INK4b} et p21^{Cip1}. L'activation de p15^{INK4b} et p21^{Cip1} va conduire à une répression des CDK, nécessaires au passage des différents checkpoints du cycle cellulaire et à sa progression. La régulation transcriptionnelle des CDKI fait notamment intervenir les protéines Smad3/4 en combinaison avec les facteurs de transcription FoxO ([Seoane et al 2004](#)).

Le deuxième mécanisme de contrôle du cycle cellulaire s'effectue au niveau de la transcription de gènes cibles importants pour la prolifération, comme le mitogène *MYC* dans les cellules épithéliales. Un des effecteurs aval du TGF- β , le couple Smad3/4, possède un rôle central dans la régulation de ce processus. En effet, en conjugaison avec plusieurs facteurs de transcription comme MIZ1 ou les divers produits du gène *FOXO*, Smad3/4 va réguler la transcription d'un panel de gènes médiateurs de réponses aux stress, à la prolifération ou encore à l'adhésion, comme *MYC*, p21^{Cip1}, ou encore des gènes codant des intégrines ([Gebhardt et al 2006](#), [Gomis et al 2006](#)). Des réseaux parallèles de contrôle du cycle cellulaire sont également en interaction avec certains cofacteurs des Smad, tel que le réseau AKT, ce qui permet d'exercer un contrôle positif sur le cycle en modulant l'action des CDKI ([Viglietto et al 2002](#)). De plus, l'inhibition de la progression du cycle par le TGF- β est transitoire. Quand il est retiré du milieu de culture, les kératinocytes rentrent de nouveau dans le cycle cellulaire ([Fortunel et al 2003a](#)). En conjugaison avec d'autres réseaux moléculaires, le TGF- β exerce donc un rôle central dans le contrôle de la balance « prolifération/quiescence » des cellules épithéliales.

- Etat de l'art – VI. Voies de signalisation et gènes « stemness » -

ii. Contrôle de la balance immaturité/différenciation par le TGF- β .

Afin de déterminer le rôle du TGF- β dans la différenciation des kératinocytes, les différents auteurs eurent recours à la même stratégie de génomique fonctionnelle : invalider ou surexprimer les effecteurs principaux de la transduction du signal TGF- β : les Smad.

Ainsi, un laboratoire a généré des modèles murins transgéniques pour différents Smad : Smad2^{-/-}, Smad3^{-/-} et un modèle inducible de surexpression de i-Smad7. La perturbation de la transduction du signal de la voie TGF- β (Smad2 supprimé, Smad3 supprimé ou i-Smad7 surexprimé) conduit à des anomalies de la différenciation kératinocytaire *in vitro*, notamment une diminution de l'expression de la loricrine et de MAD1, un antagoniste de c-MYC. En croisant des souris Smad2^{-/-} et Smad3^{-/-} afin de générer un double KO (Knock-out), les auteurs observèrent dans les embryons survivants une réduction drastique de la loricrine et de la filaggrine. Ils démontrèrent également que le contrôle de la différenciation par Smad2/3 se faisait de manière conjointe (rôles redondants de Smad 2 et 3) et que Smad4, le médiateur central, n'était pas requis dans ce processus ([Descargues et al 2008](#)). Il se pourrait donc que la différenciation induite par le TGF- β soit médié par une voie parallèle à Smad4, et proposent comme axe TGF- β /Smad2-3/IKK α .

Une autre étude a utilisé une approche similaire, mais dans le modèle humain des kératinocytes HaCaT. Ils ont généré des lignées HaCaT n'exprimant plus, de manière simultanée, Smad2, 3 et 4, ou surexprimant Smad7. Après avoir vérifié que les modulations des Smads avaient un effet sur la transduction du signal (détection des formes phosphorylées), ils ont utilisé les lignées modifiées dans un modèle de culture organotypique cutanée à long-terme ([Stark et al 2006](#)) afin d'observer d'éventuelles anomalies au niveau tissulaire. L'utilisation des lignées modifiées résultent en de grosses anomalies de différenciation au niveau de la reconstruction cutanée : hyperplasie, hyperprolifération (non limitée à la couche basale), diminution de l'expression des kératines 1 et 10, des desmogléines ou encore de la loricrine ([Buschke et al 2011](#)).

Cependant, la plupart de ces études utilisent des modèles « extrêmes » dans la modulation de la voie TGF- β : modèle murin knock-out ou expression forcée. Ces modulations ne sont probablement pas très représentatives des expressions des Smad en conditions physiologiques. En effet, il a été montré, dans des kératinocytes, que des modulations plus fines de la voie pouvaient, selon le contexte, conduire à une favorisation de la différenciation ou à une inhibition de celle-ci, selon la concentration en calcium du milieu, facteur pro-différenciant notoire ([Matsumoto et al 1990](#)). De plus, de très faibles concentrations de TGF- β semblent promouvoir l'immaturité des kératinocytes ([Fortunel et al 2003a](#)).

- Etat de l'art – VI. Voies de signalisation et gènes « stemness » -

VI.2.B.c Localisation du TGF- β dans l'épiderme et rôle dans les CSK.

Cartographier la localisation du TGF- β dans l'EIF constitue un point important pour comprendre comment et où celui-ci agit dans la régulation des balances précitées. Ainsi, le TGF- β est assez peu exprimé dans l'EIF. Par des techniques d'immunohistochimie, il n'est pas détectable dans la couche basale de l'EIF, contrairement aux couches suprabasales ([Han et al 2005](#)). Cependant, la non-détection du TGF- β dans la couche basale de l'EIF ne signifie pas que celui-ci n'est pas présent. En effet, les techniques de détection utilisées peuvent ne pas être assez sensibles pour détecter des quantités très faibles de TGF- β . Cette observation peut d'ailleurs être reliée au fait qu'il a été montré qu'une quantité extrêmement faible de TGF- β 1 avait un rôle très puissant dans la régulation de la prolifération et la différenciation des kératinocytes en culture ([Fortunel et al 2003a](#)).

Un des outils principaux qui a été utilisé pour comprendre les fonctions du TGF- β dans l'épiderme est l'utilisation de modèles murins transgéniques, à la fois pour l'étude dans les CS du FP mais également celle de l'EIF. Ainsi, une délétion du TGF- β 2 a permis de montrer son rôle dans la génération des FP ([Foitzik et al 1999](#)), par l'activation des complexes Smad et l'inhibition des signaux BMP ([Oshimori & Fuchs 2012](#)). Certains effecteurs de la voie sont également surexprimés dans les CS du *bulge*, tels que Smad 2 et LTBP ([Tumbar et al 2004](#)).

Un autre modèle murin dans lequel TGF- β RII est délété (inhibition de la voie TGF- β) a montré une importante désorganisation du compartiment basal de l'EIF. Les CSK murines identifiées sont hyperprolifératives, et ce phénomène est contrebalancé par une suractivation de l'apoptose ([Guasch et al 2007](#)). Une étude transcriptomique réalisée cette fois sur des cellules humaines a montré que les CSK [ITA6^{fort}/CD71^{faible}] exprimaient fortement plusieurs effecteurs aval de la voie TGF- β , tels que, de nouveau, LTBP ([Schluter et al 2011](#)). La forte expression de cette protéine de stockage du TGF- β sous forme inactive pourrait être à mettre en relation avec une faible activité TGF- β dans la couche basale de l'EIF. Enfin, un effet double du TGF- β a été mis en évidence dans un système de culture de kératinocytes humains. Des doses infinitésimales de TGF- β promeuvent la croissance des CSK [ADH⁺⁺⁺ EGFR^{faible}] et leur maintien à un stade immature, comme indiqué par de fortes expressions des intégrines α 6 et β 1. Au contraire, des kératinocytes traités par de fortes concentrations de TGF- β présentent un phénotype et des fonctions opposés (baisse de la prolifération, accroissement de la différenciation) ([Fortunel et al 2003a](#)).

- Etat de l'art – VI. Voies de signalisation et gènes « stemness » -

Des approches globales de génomique et transcriptomiques, combinées aux modèles *in vitro* et *in vivo* ont permis de confirmer certaines grandes voies de signalisation importantes dans la biologie des cellules souches, telles que les voies TGF- β et Wnt/ β -caténine. L'interprétation exhaustive de leurs rôles dans le contrôle des fonctions cellulaires est difficile du fait de la complexité de ces réseaux moléculaires et de leurs multiples interactions

VII Le facteur de transcription KLF4.

Cette partie a pour but de décrire la structure du FdT KLF4 qui lui permet d'effectuer ses fonctions modulatrices de la transcription. Elle décrira ensuite le rôle de KLF dans la morphogénèse des tissus épithéliaux, et dans le contrôle des balances « prolifération/quiescence » et « immaturité/différenciation ». Le rôle de KLF4 dans les différents types de CS sera traité. Sa nature d'oncogène ou suppresseur de tumeurs de manière contexte-dépendant sera présenté. Enfin, un paragraphe décrira les interactions entre KLF4 et les voies TGF- β et Wnt.

VII.1 Description générale et structure de KLF4.

Le facteur de transcription KLF4 fait partie de la famille des FdT Krüppel-like Factor. Tous les FdT de cette famille possèdent une structure en doigt de zinc, qui leur permet de se fixer sur les zones cibles de l'ADN. KLF4 fut identifié chez la souris pour la première fois en 1996, par deux équipes différentes, dans plusieurs organes comprenant des tissus épithéliaux, tels que l'intestin ([Shields et al 1996](#)) et la peau ([Garrett-Sinha et al 1996](#)). Lors de ses premières identifications, il fut nommé GKLF (Gut-KLF) et EZF (Epithelial Zinc Finger). Chez l'humain il est mis en évidence pour la première fois en 1998 dans des cellules endothéliales ([Yet et al 1998](#)).

Le gène *KLF4* est situé sur le chromosome 9, et sa transcription résulte en un seul ARNm, composé de 5 exons. La traduction de l'ARNm conduit à la production d'une protéine de 50 kDa environ, pour 470 acides aminés. La protéine KLF4 est composée de plusieurs domaines fonctionnels. En région N-terminale se présente un domaine transactivateur. Au milieu, un domaine central de répression de la transcription est flanqué par une séquence NLS (Nuclear Localisation Signal) d'adressage au noyau. Enfin, en partie C-terminale, se trouve une région composée de 3 motifs à doigts de zinc, qui permettent l'interaction du FdT avec les nucléotides de l'ADN ([Figure 30](#)).

- Etat de l'art – VII. Le facteur de transcription KLF4 -

La fonctionnalité de modulation transcriptionnelle de KLF4 lui est conférée par ses différents domaines. Afin d'exercer son activité, l'interaction directe entre KLF4 et les régions promotrices cibles dans le génome est requise, médiée par les 3 motifs en doigts de zinc. Les sites de fixation dédiés, décrits dans la littérature, sont les séquences CACCC et RRGYGY (R=G ou A et Y=C ou T) ([Shields & Yang 1998](#)). Une fois liée à la région promotrice, KLF4 peut exercer une action activatrice de la transcription du gène cible (domaine activateur en N-ter) ou une action de répression de la transcription du gène cible (domaine répresseur central). Ces deux domaines particuliers confèrent à KLF4 une régulation génique parfois opposée sur les mêmes gènes cibles, dépendamment du contexte cellulaire ([Black et al 2001](#)) et des interactions avec d'autres molécules.

Figure 30 : Structure de KLF4.

KLF4 appartient à la famille des facteurs de transcriptions KLF. Il présente à l'extrémité N-terminale un domaine d'activation de la transcription, suivi par un domaine répresseur de la transcription, contenant deux résidus lysine en position 225 et 229. Ces résidus peuvent être acétylés par p300/CBP, qui interagit avec le domaine activateur. Entre les deux domaines se trouve une séquence PEST, ciblant la protéine pour dégradation. Du côté C-ter, un domaine de liaison à l'ADN contient 3 doigts de zinc, qui reconnaissent la séquence cible GC / CACCC. Une séquence d'adressage au noyau (NLS) est située entre le domaine répresseur et le domaine de liaison à l'ADN.

VII.2 Processus physiologiques tissulaires associés à KLF4.

VII.2.A Morphogenèse et homéostasie des tissus épithéliaux : hors épiderme.

Des études se sont intéressées à l'expression spatiale de KLF4 dans l'intestin murin. Ainsi, KLF4 est exprimé dans les cellules épithéliales post-mitotiques, pleinement différenciées, de forme colonnaire ([Ghaleb et al 2011](#)). Dans l'intestin, KLF4 joue un rôle important dans l'homéostasie épithéliale, notamment dans le développement et la différenciation terminale des cellules en gobelets

- Etat de l'art – VII. Le facteur de transcription KLF4 -

([Katz et al 2002](#)). Des études de délétion génique de KLF4 spécifiquement dans l'intestin dans des modèles murins ont permis de mettre en évidence son rôle dans la différenciation terminale des entérocytes et également dans l'organisation architecturale de l'intestin. Sa délétion provoque une inhibition de l'expression des marqueurs de différenciation des entérocytes, et aboutit à une architecture épithéliale altérée, où les cellules de Paneth sont mal positionnées. D'une manière plus générale, cette étude montre que l'inhibition de *KLF4* aboutit à une répression globale des gènes associés à la différenciation dans l'intestin ([Ghaleb et al 2011](#)).

KLF4 joue également un rôle très important dans la biologie de la cornée, qui est également un tissu de type épithélial. *KLF4* est un des gènes le plus exprimé dans la cornée murine ([Norman et al 2004](#)). Sa fonction a été explorée par une délétion conditionnelle de *KLF4* spécifiquement dans les structures de l'œil, incluant la cornée, la lentille et le tissu conjonctif. Elle a conduit à des déficits oculaires multiples comme une fragilité de la cornée, des défauts dans la lentille et une perte des cellules en gobelets du tissu conjonctif ([Swamynathan et al 2007](#)). Au niveau mécanistique, *KLF4* est un régulateur majeur d'un réseau de gènes nécessaire à l'homéostasie oculaire et à la différenciation des kératinocytes de la cornée ([Swamynathan et al 2008](#)). Enfin, *KLF4* contribue à la mise en place de la fonction barrière de la cornée en stimulant l'expression de gènes codant des protéines de jonctions cellulaires et de matrices extracellulaires ([Swamynathan et al 2011](#)).

VII.2.B Morphogenèse et homéostasie de l'épiderme.

KLF4 est fortement exprimé dans l'EIF. Chez la souris, son expression dans des coupes de tissus a été détectée uniquement dans les couches suprabasales épineuses et granuleuses ([Segre et al 1999](#)), contrairement à la peau humaine, où *KLF4* est aussi exprimé dans la couche basale de l'EIF ([Figure 31 et 32A](#)) ([Huang et al 2005](#)).

Sa fonction dans la peau fut explorée pour la première fois à l'aide d'un modèle murin présentant une délétion homozygote constitutive de *KLF4*, et a permis d'établir un rôle majeur pour *KLF4* dans la mise en place de la fonction barrière de l'épiderme. En effet, les conséquences du phénotype [*KLF4*^{-/-}] furent majeures pour les souriceaux, qui ne survivaient pas dans les heures suivant la naissance, du fait d'une perte hydrique excessive (fonction barrière déficiente) ([Figure 32B](#)) ([Segre et al 1999](#)). Une étude proposant l'approche inverse, à savoir une expression ectopique de *KLF4* dans les kératinocytes de la couche basale, montre une accélération de la mise en place de la fonction barrière de la peau ([Jaubert et al 2003](#)). Des études complémentaires ont permis de documenter une partie des mécanismes par lesquels *KLF4* régule ces fonctions. Notamment, l'induction de *KLF4* se fait en réponse au facteur de transcription ZNF750, une cible de p63, pour diriger et orchestrer la différenciation

- Etat de l'art – VII. Le facteur de transcription KLF4 -

épidermique terminale ([Sen et al 2012](#)), tandis qu'une déficience en *KLF4* corrèle avec une prolifération cellulaire accrue ([Li et al 2012b](#)).

Les résultats de ces dernières études, en accord avec celles réalisées sur d'autres types de tissus épithéliaux, mettent en lumière le rôle essentiel de *KLF4* dans la différenciation terminale, notamment des kératinocytes. Le contrôle du destin cellulaire et l'induction de la différenciation sont en particulier régulés par un contrôle exercé par *KLF4* sur le cycle cellulaire.

Figure 31 : Expression de KLF4 dans l'épiderme humain.

Des coupes de peaux humaines obtenues **A.** à partir d'une biopsie mammaire saine ou **B.** par excision de la peau non impliquée adjacente à un SCC, ont été marquées avec un anticorps anti-KLF4. Le marquage spécifique est détecté sous la forme d'un précipité brun-rouge. L'accolade représente les zones de prédominance du marquage. La flèche noire représente la jonction dermo-épidermique. KLF4 est principalement détecté dans les couches suprabasales de l'épiderme. Cependant, un marquage plus faible est visible dans la couche basale.

Figure 32 : KLF4 est essentiel à la mise en place de la fonction barrière lors du développement.

Une lignée murine mutée pour le gène *KLF4* [*KLF4*^{-/-}] a été comparée avec une lignée sauvage [*KLF4*^{wt}]. **A.** Des coupes de peaux prélevées sur des souriceaux ont été marquées avec un anticorps anti-KLF4. KLF4 est détecté dans les souris sauvages, et n'est pas détecté dans les souris mutées. KLF4 présente un marquage nucléaire, localisé dans les noyaux des kératinocytes suprabasaux uniquement. Il n'est pas détecté dans la couche basale. **B.** Expérience d'exclusion d'un colorant bleu pour tester la fonction barrière. Le principe est le suivant : l'embryon est mis en contact avec un colorant bleu. Si l'embryon se teinte en bleu, cela indique que le colorant a traversé son épiderme, et révèle une fonction barrière déficiente ou inexistante. On constate la mise en place de la fonction barrière entre E16.5 et E17.5 dans les embryons [*KLF4*^{wt}]. Cependant, dans les embryons [*KLF4*^{-/-}], on remarque un déficit de fonction barrière même après la naissance des souriceaux.

VII.3 Fonctions majeures de KLF4.

VII.3.A Contrôle du cycle cellulaire et inhibition de la prolifération.

Le facteur de transcription KLF4 possède un rôle important dans la progression du cycle cellulaire, notamment en contribuant à sa régulation négative. Ainsi, une étude a montré que l'expression de KLF4 est presque indétectable dans des fibroblastes 3T3 en prolifération active. Cependant, dans des cellules dont le cycle cellulaire a été arrêté par privation en sérum ou inhibition de contact, des niveaux beaucoup plus élevés de KLF4 sont détectés ([Zhang et al 2000](#)). De manière logique, une expression ectopique de KLF4 conduit à un ralentissement de la prolifération cellulaire ([Chen et al 2001](#), [Dang et al 2003](#)).

L'un des mécanismes principaux par lequel *KLF4* contribue à l'arrêt du cycle cellulaire est par une activation de l'expression du gène *CDKN1A*, encodant la protéine p21^{Cip1}, un inhibiteur des cyclines ([Chen et al 2009](#)). Ces mécanismes furent notamment mis en lumière par des études s'intéressant à l'arrêt du cycle cellulaire après des dommages à l'ADN induits par des drogues. Après avoir traité les cellules en culture avec des drogues provoquant des cassures de l'ADN, il fut montré

- Etat de l'art – VII. Le facteur de transcription KLF4 -

que KLF4 recrutait p53 sur le promoteur de *CDKN1A*, activant sa transcription ([Yoon et al 2003](#), [Zhang et al 2000](#)). L'activation de p21^{Cip1} à la suite de dommages à l'ADN cause un arrêt du cycle au niveau des checkpoints de transition G1/S et G2/M. De plus, KLF4 inhibe l'expression des gènes *CCND1* et *CCNB1* (cyclines D et B) dont la fonction est de promouvoir l'avancée dans le cycle cellulaire ([Shie et al 2000](#)). Aux vues de ces études, KLF4 semble donc jouer un rôle important dans la balance 'prolifération-quiescence' des cellules. De plus, il est intéressant de noter que p21^{Cip1} est une cible commune de KLF4 et du TGF- β dans l'inhibition du cycle cellulaire, suggérant de probables interactions entre ces derniers.

VII.3.B Promotion de la différenciation.

Un couple d'études ayant pour objectif de déterminer les facteurs moléculaires contribuant à la formation de la fonction barrière de l'épiderme lors du développement a permis de mettre en évidence un certain nombre de gènes impliqués dans les processus de différenciation et régulés par KLF4 ([Djalilian et al 2006](#), [Patel et al 2006](#)). Après avoir observé des modifications dans la temporalité de la mise en place de la fonction barrière de l'épiderme de souris [*KLF4*^{-/-}] et [*K5-KLF4*], les équipes ont procédé à des études du transcriptome des kératinocytes murins. La répression de *KLF4* favorise par exemple l'expression de la connexine 26 (Cx26), une protéine impliquée dans les jonctions communicantes. La répression de Cx26 est nécessaire à l'initiation du processus de différenciation. De plus, une expression forcée de Cx26 en situation de blessure conduit à un épiderme hyperprolifératif et à des anomalies de remodelage du tissu ([Djalilian et al 2006](#)). En conjugaison avec la prise de corticostéroïdes, KLF4 active l'expression d'un jeu de gènes impliqués dans la stratification épidermique ([Patel et al 2006](#)). Certains de ces gènes possèdent même des régions promotrices présentant un site de fixation pour KLF4, tel que *Far2* (*fatty Acyl-CoA Reductase 2*) et *Sprr2a* (*small-proline rich protein 2a*), des gènes impliqués dans le métabolisme des acides gras et la différenciation kératinocytaires (couches épineuses et granuleuses) ([Koizumi et al 1996](#)).

KLF4 agit également comme un régulateur positif pour d'autres facteurs de différenciation terminale, comme l'involucrine. Il a été montré que l'expression de l'involucrine corrèle directement avec l'augmentation ou la répression de KLF4 dans des kératinocytes humains, et que ce contrôle est exercé par la protéine kinase C ([Chew et al 2011](#)). Dans une étude complémentaire menée par la même équipe, les auteurs ont également mis en évidence une zone riche en GC dans le promoteur du gène de l'involucrine, permettant la fixation de KLF4 pour exercer ses fonctions transactivatrices. De plus, une forme transcriptionnellement inactive de KLF4 est incapable d'induire l'expression de l'involucrine, mettant en lumière son rôle direct dans la régulation de cette protéine critique dans les processus de différenciation terminale des kératinocytes ([Chew et al 2013](#)).

- Etat de l'art – VII. Le facteur de transcription KLF4 -

Ces études ont permis de mettre en évidence que KLF4 pouvait réguler de manière positive ou négative des gènes impliqués dans la différenciation. Cette double fonctionnalité pourrait s'expliquer en partie par la présence à la fois d'un domaine activateur et d'un domaine répresseur sur le facteur de transcription KLF4. Néanmoins, au vu de ces deux fonctions opposées, KLF4 pourrait également contrôler l'expression génique de manière différentielle en interagissant avec d'autres complexes protéiques et exercer un contrôle épigénétique sur ses gènes cibles. Ainsi, le rôle complexe de KLF4 dans la différenciation kératinocytaire est relativement documenté, bien que des progrès restent encore à faire pour comprendre en détails les mécanismes impliqués. De plus, très peu d'études se sont intéressées à l'autre plateau de la balance « immaturité/différenciation » dans les CS adultes, et le rôle de KLF4 dans le contrôle du statut souche des kératinocytes est inconnu.

VII.4 KLF4 et cellules souches.

VII.4.A Cellules souches pluripotentes

L'importance de KLF4 comme facteur déterminant pour le maintien de la pluripotence des cellules souches a été mis en évidence en 2006 par le travail pionnier de Yamanaka et Takahashi ([Figure 11](#)) ([Takahashi & Yamanaka 2006](#)). Lors des premières étapes de reprogrammation, KLF4 réprime des gènes de différenciation. Dans les dernières étapes, il facilite l'expression des gènes de pluripotence ([Polo et al 2012](#)). L'ajout des 4 facteurs de reprogrammation provoque des changements de conformation et des modifications épigénétiques de la chromatine, pour aboutir à une structure chromatinienne mimant celle des cellules souches embryonnaires ([Takahashi & Yamanaka 2006](#)).

Afin de décrypter plus précisément le rôle des 'facteurs Yamanaka' dans le contrôle de l'autorenouvellement et du maintien de la pluripotence des CS, les chercheurs se sont penchés sur leurs fonctions dans les CSE. Le facteur LIF est requis pour assurer les fonctions citées précédemment. LIF (leukemia inhibitory factor) est utilisé en culture pour maintenir les CSE dans un état indifférencié, par l'activation de la voie STAT3. KLF4 agit comme un médiateur entre l'activation de STAT 3 et les autres facteurs de reprogrammation Oct3/4 et Sox2. KLF4 se lie au promoteur de Nanog, un régulateur majeur de la pluripotence ([Allouba et al 2015](#), [Chan et al 2009](#)), pour permettre à Sox2 et Oct3/4 de réguler son expression. Ainsi, l'expression de KLF4 inhibe la différenciation dans les CSE par l'expression de Nanog, tandis que sa répression contribue à la différenciation prématurée des CSE ([Zhang et al 2010](#)). Plus en aval dans le développement embryonnaire, KLF4 inhibe également l'orientation des CSE vers le mésoderme, et contribue à conserver le statut indifférencié des CSE ([Aksoy et al 2014](#)). Ces études confirment donc l'importance de *KLF4* dans le maintien de la pluripotence et de l'autorenouvellement des CSP.

- Etat de l'art – VII. Le facteur de transcription KLF4 -

KLF4 a été décrit comme un oncogène dans certains cas de cancer. Afin de générer de manière plus sécurisée des iPSC, des stratégies ont été mises en œuvre pour se passer de *KLF4* lors des étapes de reprogrammation. Une étude a notamment montré que la kenpaullone, dont la cible principale est la kinase GSK3-B (voie Wnt) ([Lange et al 2011](#)), pouvait remplacer l'addition de *KLF4* dans le cocktail de reprogrammation en iPSC ([Lyssiotis et al 2009](#)). Dans une autre étude, la kenpaullone a été utilisée pour réprimer l'expression de *KLF4* dans un modèle de tumeurs canines exprimant fortement *KLF4*. Il a été constaté une diminution de l'autorenouvellement et de la prolifération des cellules tumorales en présence de kenpaullone, i.e. quand *KLF4* est réprimé ([Tien et al 2015](#)).

VII.4.B Cellules souches adultes.

Une étude a montré que *KLF4* est plus fortement exprimé dans les CS du *bulge* du FP murin. Dans un modèle de souris génétiquement modifiées, le knock-out (KO) de *KLF4* induit une baisse du nombre de cellules souches épidermales, qui présentent une capacité clonogénique réduite, suggérant que *KLF4* est requis pour une homéostasie normale des CS de l'épiderme. De plus, une déficience en *KLF4* retarde la cicatrisation épidermique. En poussant plus loin leurs observations, les chercheurs ont mis en évidence qu'une fraction des cellules LRC du *bulge* était positive pour *KLF4* (environ 4%), révélant une hétérogénéité dans ce réservoir de CS ([Li et al 2012a](#)). Cette étude est toutefois à prendre avec du recul, car elle a été réalisée dans un modèle murin centré sur le FP. De plus, l'expression de *KLF4* est totalement supprimée (KO), ce qui pourrait avoir un effet différent d'une modulation plus fine, où *KLF4* serait fortement réprimé mais encore exprimé et actif.

Une autre étude a mis en évidence le rôle majeur de *KLF4* dans les cellules souches adultes de prostate ([Xiong et al 2018](#)). Les auteurs ont montré que *KLF4* était largement surexprimé dans les CS de prostate (CSPr), un organe composé de tissu épithélial. Après avoir extrait ces cellules, les chercheurs les ont transfectées avec un shARN-anti*KLF4* et cultivées. Après une semaine de culture dans un gel de collagène, la répression de *KLF4* conduit à une augmentation de la prolifération et de la taille des canaux produits. Il a aussi été constaté une augmentation de la proportion de cellules exprimant Ki67, et plus de cellules exprimant la cytokératine 5 (CK5), un marqueur des cellules épithéliales basales. Dans l'épithélium de prostate, la couche basale abrite les cellules souches les plus immatures, tout comme dans l'épiderme. Dans ce système, *KLF4* semble donc jouer un rôle majeur à la fois sur la prolifération, mais également la maintenance d'un état souche des CSPr.

KLF4 semble avoir un rôle très différent selon le contexte et le système cellulaire étudié. En effet, dans les cellules matures, et plus particulièrement dans les tissus épithéliaux, une forte expression de *KLF4* est majoritairement associée à la différenciation terminale. Au contraire, dans les CS, *KLF4* est maintenant bien connu pour jouer un rôle majeur dans le maintien des fonctionnalités

- Etat de l'art – VII. Le facteur de transcription KLF4 -

essentielles de ces cellules, l'autorenouvellement et la pluripotence. Le double rôle de KLF4 et les fonctions impactées (prolifération, autorenouvellement, pluripotence) sont des paramètres importants à prendre en compte pour comprendre quel pourrait être l'impact d'une dérégulation de l'expression de KLF4 sur des processus pathogéniques.

VII.5 Dualité fonctionnelle de KLF4 dans la carcinogénèse.

L'action inhibitrice de KLF4 sur la prolifération a vite amené les chercheurs à décrypter les fonctions de KLF4 dans la carcinogénèse. Au même titre que sa dualité fonctionnelle en condition d'homéostasie, KLF4 présente également une dualité dans les processus de carcinogénèse, où son rôle semble être encore plus flou. Deux cas de figures se présentent : certaines études démontrent un rôle suppresseur de tumeurs, tandis que d'autres indiquent un rôle pro-oncogène.

Ainsi, l'action antiproliférative de KLF4 est plutôt associée à son rôle de suppresseur de tumeurs. Par exemple, de nombreuses tumeurs présentent une expression inexistante de KLF4, telles que dans les cancers colorectaux, intestinaux, prostatique ou de la vessie ([Ton-That et al 1997](#), [Wei et al 2005](#), [Zhao et al 2004](#)). Des études fonctionnelles ont permis par la suite de démontrer que, en accord avec son rôle suppresseur de tumeur, la surexpression de KLF4 réduit la tumorigénicité des cellules cancéreuses gastriques *in vivo* ([Zhang et al 2012](#)). Ce profil d'expression et son penchant fonctionnel ont aussi été documentés de la même manière dans les cancers du poumon ([Hu et al 2009](#)). A l'inverse, une surexpression de KLF4 a été observée dans des cancers mammaires ([Foster et al 2000](#)), et également dans des carcinomes épidermoïdes ([Tai et al 2011](#)), où il semble être un facteur pronostique de faible survie des patients.

Dans les carcinomes épidermoïdes (SCC) et les carcinomes basocellulaire (BCC), le rôle de KLF4 est controversé. Certaines études le décrivent comme oncogène, notamment dans les SCC où il est fortement exprimé ([Chen et al 2008](#)), et où sa surexpression dans du tissu épidermique murin sain induirait l'apparition de SCC ([Foster et al 2005](#)). Une autre étude utilisant des modèles murins d'inactivation de KLF4 indique que la perte de KLF4 conduirait à l'apparition de SCC, et que KLF4 n'est pas exprimé dans des cellules issues de patients atteints de SCC et BCC ([Li et al 2012b](#)). Il est toutefois important de noter que ces études se basent sur des modèles murins KO pour KLF4, ce qui peut conduire à des phénotypes différents d'une simple répression, à un niveau certes faible mais toutefois physiologique.

La littérature propose plusieurs possibilités pour expliquer ces observations contraires : le rôle de KLF4 serait dépendant du contexte cellulaire, de l'accessibilité de la chromatine, mais également des stades de tumorigénèse différents. Il est aussi possible que le fond génétique des souris/patients

- Etat de l'art – VII. Le facteur de transcription KLF4 -

puisse orienter le rôle de KLF4, notamment si des gènes en interaction avec KLF4 sont mutés, comme p53 par exemple. Ainsi, il est fondamental de lier KLF4 avec les réseaux moléculaires contrôlant également les fonctions cellulaires comme la prolifération.

VII.6 Réseaux de signalisation régulant KLF4 et la biologie des cellules souches

Les cellules souches résident généralement dans leur niche, un microenvironnement riche en molécules de signalisation, qui permettent de maintenir l'identité et la fonctionnalité des CS. Au cœur de ces interactions se trouve par exemple les réseaux TGF- β et Wnt, dont on pense que KLF4 y joue un rôle important.

VII.6.A KLF4 et TGF- β

Le lien entre TGF- β et KLF4 a été documenté dans plusieurs types cellulaires : les macrophages, les kératinocytes, et, principalement, dans les cellules du muscle lisse vasculaire. Cependant, une fois de plus, la complexité des réseaux de signalisation rend difficile de définir de manière absolue l'interaction exacte entre KLF4 et le TGF- β .

Dans les cellules du muscle lisse vasculaire (CMLV), des études démontrent que le TGF- β 1 a un effet pro-différenciation, mais dont le mécanisme reste peu clair. Ces études se sont donc intéressées à l'interaction entre KLF4, TGF- β et ses effecteurs (Smad) dans le contrôle de la différenciation des CMLV. Les résultats de ces études sont assez contradictoires quant à l'interaction entre KLF4 et le TGF- β . La première étude montre une boucle de phosphorylation et d'activation de Smad2 et KLF4, qui interagissent ensemble pour réguler la transcription du TGF- β R1 et des gènes de différenciation vasculaire. Dans cette étude, les chercheurs montrent donc une activation de KLF4 en réponse au TGF- β conduisant à une augmentation de l'expression du récepteur et promouvant la différenciation ([Li et al 2010](#)). Au contraire, une autre étude a montré que KLF4 interagissait avec Smad3. Ce faisant, KLF4 séquestre Smad3 et l'empêche ainsi de se fixer sur ses séquences cibles pour réguler l'expression génique ([Hu et al 2007](#)).

- Etat de l'art – VII. Le facteur de transcription KLF4 -

Dans les kératinocytes, l'interaction entre KLF4 et TGF- β est également reconnue, mais les mécanismes sont moins documentés. Des fortes doses de TGF- β favorisent l'arrêt de la prolifération et la différenciation des kératinocytes (Figure 33) (Fortunel et al 2003a), et notre laboratoire a découvert que des kératinocytes [KLF4^{KD}] étaient moins sensibles à l'effet pro-différenciateur du TGF- β (données non publiées) comparés à des kératinocytes [KLF4^{WT}]. De plus, une autre étude a démontré dans des cellules HaCaT que l'inhibition des Smad 2, 3 et 4 ou la surexpression de l'I-Smad7 conduisait à une répression importante de l'expression de KLF4 (Buschke et al 2011). Enfin, KLF4 et TGF- β partagent des cibles communes, comme p21^{Cip1} et CBP/p300. L'ensemble de ces données suggèrent donc que KLF4 pourrait être un effecteur aval de la voie du TGF- β . Cependant, il reste encore beaucoup à découvrir au niveau mécanistique quant à l'interaction entre KLF4 et cette voie.

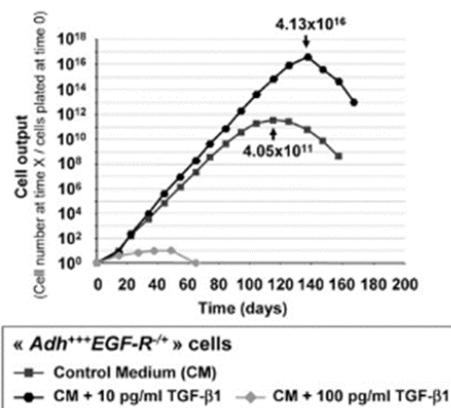


Figure 33 : Effets du TGF- β sur la prolifération de kératinocytes basaux.

Des kératinocytes primaires humains ont été sélectionnés pour leur propriété d'adhésion au collagène I (Adh⁺⁺⁺), puis triés par cytométrie en flux selon l'expression de l'EGF-R, pour isoler une population Adh⁺⁺⁺ EGF-R^{+/+}. Le traitement avec une très faible dose de TGF- β 1 (10 pg/mL) favorise la croissance des kératinocytes, tandis qu'une forte dose (100 pg/mL) inhibe la prolifération. Source : Fortunel et al, 2003.

VII.6.B KLF4 et Wnt.

La voie Wnt et son effecteur principal la β -caténine, jouent un rôle majeur dans les processus de cancérisation. En effet, dans de nombreux cas de cancer, la stabilisation excessive et/ou des mutations dans le gène de la β -caténine ont été observées (revue (Shang et al 2017)). Cette observation a mené les chercheurs à s'intéresser au rôle de la voie Wnt et à ses interactions avec des partenaires dans un contexte de prolifération incontrôlée. Les recherches se sont tournées vers le facteur de transcription KLF4. La plupart des données concernant les interactions entre Wnt et KLF4 ont donc été obtenues dans des lignées de cellules cancéreuses, ou dans des tissus cancéreux. Une équipe a par exemple démontré que KLF4 se liait au domaine activateur de la β -caténine dans des cellules de cancer colorectal, conduisant à l'inhibition de l'action activatrice de la transcription de la β -caténine (Evans et al 2010). Une autre étude a également mis en lumière que le gène TERT, un régulateur majeur du contrôle de la longueur des télomères (régulièrement muté dans des cancers), est directement régulé par la β -caténine, et que KLF4 est nécessaire pour que la β -caténine se localise sur le promoteur de TERT (Hoffmeyer et al 2012). Enfin, des études ont montré que KLF4 interagissait

- Etat de l'art – VII. Le facteur de transcription KLF4 -

avec l'extrémité carboxy-terminale de la β -caténine, empêchant ainsi le recrutement de p300/CBP ([Evans et al 2010](#)), et que KLF4 antagonisait la liaison du complexe TCF/LEF/ β -caténine sur ses cibles génomiques, de manière proportionnelle à l'expression de KLF4 ([Sellak et al 2012](#)).

KLF4 semble être un facteur majeur dans le contrôle de la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales, et également dans le contrôle fonctionnel des cellules souches pluripotentes (autorenouvellement). De plus, il est visiblement au cœur de plusieurs réseaux de signalisation moléculaire complexe impliquant les voies TGF- β et Wnt/ β -caténine.

VIII Le réseau MYC/MAX/MAD et le facteur de transcription de MAD4.

Cette partie a pour but de décrire le réseau de facteurs de transcription MYC/MAX/MAD, et plus particulièrement le facteur de transcription MAD4, qui fait l'objet de ce travail de thèse. Elle comprend 6 parties : une description générale du réseau, la protéine centrale MAX, la famille MYC, la famille MAD, un focus sur MAD4, et enfin une partie sur les interactions entre ce réseau et les grandes voies de régulation du caractère souche.

VIII.1 Description générale du réseau et des partenaires.

Le réseau de facteurs de transcription MYC/MAX/MAD est impliqué dans la régulation de nombreux processus cellulaires comme la prolifération, la différenciation et l'apoptose. Ce réseau se compose de la famille des protéines nucléaires proto-oncogènes MYC (N-MYC, L-MYC et c-MYC), de la protéine centrale du réseau MAX, et de la famille de protéines MAD (MAD1, MXI1, MAD3, MAD4 et Mnt) (Figure 34). La protéine centrale MAX est une protéine très stable, et semble être exprimée de manière ubiquitaire (Blackwood et al 1992) . Au contraire, la famille MYC se compose de protéines dont la demi-vie est de l'ordre de la dizaine de minutes (Blackwood et al 1992), et dont l'expression et la dégradation sont très finement régulées par l'intermédiaire de la voie du protéasome (Farrell & Sears 2014).

- Etat de l'art – VIII. Le réseau MYC/MAX/MAD et le facteur de transcription de MAD4 -

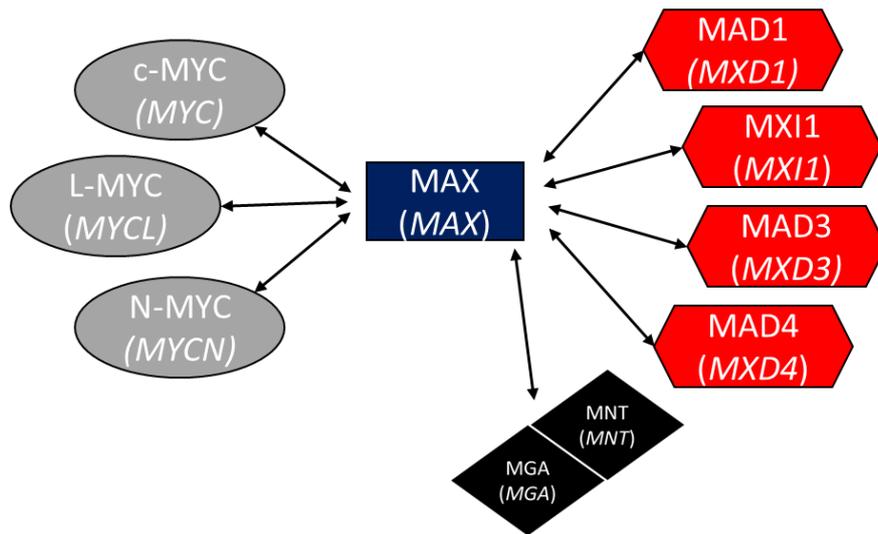


Figure 34 : Représentation schématique des acteurs du réseau MYC/MAX/MAD.

Le réseau MYC/MAX/MAD est organisé autour du facteur de transcription central MAX, acteur principal et nécessaire aux fonctions modulatrices de ses partenaires. Deux familles de FdT peuvent interagir avec MAX : la famille MYC (comprenant de c-MYC, N-MYC et L-MYC) et la famille MAD (comprenant MAD1, MXI1, MAD3 et MAD4). Les noms des gènes associés sont écrits en italique. Une famille apparentée à la famille MAD, qui peut également se lier à MAX, comprend MNT et MGA.

VIII.1.A Structure des acteurs du réseau.

Tous les acteurs de ce réseau partagent une structure commune. Ils font partie d'un sous-groupe de la famille des facteurs de transcription dits « bHLZIP ». Cet acronyme signifie en anglais « basic Helix-Loop-Helix Leucine Zipper », et se rapporte à la structure des protéines. Ces facteurs de transcription possèdent une boucle encadrée par deux hélices, suivie d'une fermeture éclair à leucines. Ils possèdent tous cette structure commune, qui leur confèrent des propriétés de dimérisation et de liaison à l'ADN (Figure 35A). Quand les acteurs de ce réseau ont été découverts, de nombreuses études se sont concentrées à décrire la structure des protéines. Le squelette commun a donc pu être dressé.

A l'extrémité amino-terminale se situe une zone jouant une action modulatrice de la transcription des gènes cibles. Bien que cette zone soit commune à tous les FdT de ce réseau, elle diffère en structure et confère sa fonction spécifique de modulation transcriptionnelle à la protéine. Les FdT MYC possèdent un domaine transactivateur (TAD), et ont donc plutôt une fonction activatrice (Kretzner et al 1992). Les FdT MAD possèdent un domaine appelé SID (« Sin Interacting Domain »), nécessaire à leur activité biologique (Ayer et al 1995a) en permettant le recrutement et l'interaction avec les corépresseurs Sin3a et Sin3b, et a donc plutôt une fonction de répression de la transcription (D.E. et al 1993), tandis que MAX semble être transcriptionnellement inerte (Kato et al 1992).

- Etat de l'art – VIII. Le réseau MYC/MAX/MAD et le facteur de transcription de MAD4 -

Du côté C-terminal se trouve la structure bHLHZ. Celle-ci permet aux protéines de former des dimères. De manière générale, les acteurs de ce réseau forment des dimères avec la protéine centrale MAX. Ainsi, il peut y avoir formation d'homodimères quand deux protéines MAX se dimérisent, ou d'hétérodimère quand une autre protéine du réseau forme un complexe avec MAX ([Blackwood et al 1992](#), [Luscher & Larsson 1999](#)). Il peut s'agir par exemple de facteurs de la famille MYC et MAD. La structure bHLHZ confère également aux dimères la capacité de se lier à l'ADN sur les sites de liaisons spécifiques composées de la séquence nucléotidique CACGTG, appelée « E-Box » ([Blackwell et al 1990](#), [Ferre-D'Amare et al 1993](#)). Une séquence d'adressage au noyau (NLC, Nuclear Localisation Signal) est retrouvée dans c-MYC et MAX, mais pas dans MAD4 ([Figure 35B-D](#)).

Les protéines des familles MYC et MAD ne sont pas capables de former des homodimères. Afin de pouvoir se lier à l'ADN et jouer leur rôle de régulateurs de la transcription des gènes cibles, il leur est nécessaire de former des hétérodimères avec MAX. En effet, une étude mécanistique basée sur le modèle *S. Cerevisiae* a montré que la liaison entre MYC et MAX par la structure bHLHZ était nécessaire pour la fonction transactivatrice, mais également la partie N-terminale de MYC ([Amati et al 1992](#)).

Figure 35 : Structures des acteurs du réseau MYC/MAX/MAD.

A. Les FdT du réseau MYC/MAX/MAD possèdent une structure en « bHLHZ ». MAX est schématisé en rouge, c-MYC en bleu. Ils possèdent tous deux une hélice basique et une hélice contenant la fermeture éclair à leucine, séparées par une boucle. Cette structure permet la dimérisation des partenaires, et également l'interaction avec l'ADN. **B-D.** Structure représentative des différents acteurs du réseau. **B.** Structure de c-MYC : une séquence TAD (Trans Activation Domain) est placée en N-ter, suivie par une séquence d'adressage au noyau (NLS). La protéine se termine par la structure bHLHZ. **C.** La protéine MAX ne possède pas de séquence TAD contrairement à c-MYC. **D.** La protéine MAD4 contient une séquence SID (Sin Interacting Domain) en N-ter. Cependant, elle ne présente pas de NLS, et sa localisation subcellulaire est dépendante des interactions avec d'autres partenaires.

- Etat de l'art – VIII. Le réseau MYC/MAX/MAD et le facteur de transcription de MAD4 -

VIII.1.B Régulations entre les partenaires et compétition pour MAX.

Les hétérodimères MYC/MAX et MAD/MAX reconnaissent les mêmes zones dans le génome, les E-Box. Des études ont donc été menées dans le but de dresser une cartographie des zones cibles de ces facteurs, mais également pour documenter leur fonction. Ainsi, il a été démontré des fonctions antagonistes pour MYC et MAD. MYC est globalement associé à la prolifération et à la transformation cellulaire, tandis que MAD est généralement induit pendant la différenciation, est lié à l'inhibition du cycle cellulaire, et peut contrecarrer la transformation induite par MYC ([Ayer & Eisenman 1993b](#)). De plus, l'expression de MAD permet de s'opposer à la fonction transactivatrice de MYC ([Ayer et al 1993](#), [D.E. et al 1993](#)). Le fait de cibler les mêmes zones génomiques et de montrer des fonctions cellulaires et moléculaires opposées ont orienté les pistes de réflexion vers un mécanisme d'équilibre et de compétition entre ces différents complexes. Dans ce contexte de compétition, une étude a eu pour but de déterminer les affinités de formation des complexes, et également comment la relative abondance des partenaires influence la formation des complexes MYC/MAX et MAD/MAX. Afin de visualiser la formation des différents complexes dans des cellules vivantes, les chercheurs ont utilisé une technique appelée BiFC (Complémentation Biomoléculaire de Fluorescence). Cette technique repose sur la formation d'un complexe fluorescent *in situ* quand deux fragments de protéines fluorescentes sont amenés en contact par l'interaction des deux protéines d'intérêt fusionnées aux dits-fragments ([Hu et al 2002](#)). Ainsi, ils ont développé les protéines de fusion suivantes : les fragments complémentaires de la Yellow Fluorescent Protein (YFP), appelé YN et YC, couplés dans toutes les combinaisons possibles à MAX, c-MYC, MXI1, MAD3 et MAD4. A l'aide de ce système, ils démontrèrent que la liaison à l'ADN n'était pas nécessaire à la formation et à la localisation subcellulaires des complexes. De plus, les différentes protéines peuvent affecter la localisation des autres, indépendamment de leur dimérisation, par l'action des différentes séquences d'adressages. Enfin, à l'aide d'expériences de compétition, ils aboutirent à la proposition d'un modèle d'affinités de liaisons entre les différents partenaires de MAX ([Grinberg et al 2004](#)).

Quelques études ont eu pour but de déterminer les interactions de régulation entre c-MYC et MAD4. La première a démontré que MAD4 était capable d'inhiber la fonction transactivatrice de c-MYC en testant l'activité enzymatique d'une construction basée sur un rapporteur enzymatique CAT (chloramphenicol acetyl transferase) ([Marcotte et al 2003](#)). Néanmoins, leur hypothèse pour cette médiation est plutôt dirigée vers la compétition entre MAD4 et c-MYC pour les E-Box que par une éventuelle interaction directe de régulation. La même équipe a cependant démontré, 2 ans plus tard, qu'il se trouvait dans le promoteur du gène *MXD4*, un élément initiateur (Inr), permettant la fixation de MIZ-1, et une E-Box. Dans des expériences avec un gène rapporteur GFP, MIZ-1 augmente la

- Etat de l'art – VIII. Le réseau MYC/MAX/MAD et le facteur de transcription de MAD4 -

transcription de la GFP, et cette activation est inhibée en présence de c-MYC. Ainsi, comme le promoteur de *MXD4* contient un élément de liaison pour MIZ-1, ils suggèrent que MIZ-1 active l'expression de MAD4, et que c-MYC inhibe cette activation, agissant ainsi comme un répresseur de l'expression de MAD4. De plus, la présence d'une E-Box dans le promoteur désigne également une potentielle fonctionnalité régulatrice des FdT MYC et MAD sur le gène *MXD4*. Cependant, cette hypothèse n'a pas été explorée dans ces travaux ([Kime & Wright 2003](#), [Marcotte et al 2005](#)).

VIII.1.C Modulation de la transcription et accessibilité de la chromatine.

La modulation de la transcription, de manière générale, est liée à l'accessibilité de la chromatine. En effet, l'état d'ouverture ou de fermeture de la chromatine, déterminé par le niveau d'acétylation/méthylation des histones, conditionne l'accès à l'ARN polymérase, et donc la transcription des gènes. Or, l'une des grandes fonctions des complexes MYC/MAX et MAD/MAX est une modulation de la transcription génique. Ainsi, en parallèle de la détermination des fonctions biologiques, les chercheurs se sont intéressés aux mécanismes de régulation de la transcription exercée par les complexes.

Il a été rapporté que l'hétérodimère c-MYC/MAX, une fois sur le promoteur de gènes cibles, par exemple, la cycline D2, recrute un complexe supplémentaire composé de la protéine TRRAP (Transformation/transcription domain-associated protein) et de protéines HAT (histone-acétyltransferase). Ce complexe induit une acétylation des histones au niveau du promoteur, de manière TRRAP-dépendante, et conduit ainsi à l'augmentation de la transcription du gène cible. De plus, les auteurs ont également observé que la diminution de l'ARNm de la cycline D2 était précédée par une diminution de l'occupation du promoteur par c-MYC/MAX au profit de MAD/MAX, accompagné d'une perte de l'activité TRRAP ([Bouchard et al 2001](#)). Le complexe TRRAP-HAT interagit avec c-MYC au niveau du domaine TAD, et l'activité HAT est observée *in vitro* et *in vivo* après avoir coimmunoprecipité MYC ([Figure 36](#)) ([McMahon et al 2000](#)).

Les complexes MAD/MAX quant à eux interagissent avec les corépresseurs Sin3A et Sin3B ([Hurlin et al 1995a](#)). Sin3A et Sin3B présentent dans leur structure 4 paires d'hélices amphiphiles (PAH), et le domaine PAH2 permet l'interaction avec le domaine SID des protéines MAD ([Ayer et al 1995b](#)). Des mutations dans la séquence conservée SID induisent un déficit dans la fonctionnalité de modulation de la transcription de MAD1, indiquant que l'interaction avec Sin3 est nécessaire aux fonctions biologiques de MAD1 ([Ayer et al 1996](#)). La démonstration du mécanisme par lequel Sin3 permet la répression des gènes cibles a été publiée rapidement par la suite. Des expériences de

- Etat de l'art – VIII. Le réseau MYC/MAX/MAD et le facteur de transcription de MAD4 -

coimmunoprécipitation de Sin3 ont montré qu'il interagit physiquement avec HDAC1 et HDAC2, pour former un complexe protéique ternaire. La fonction de répression du complexe Sin3 est inhibée par un traitement à la trapoxine et la trichostatine A, des inhibiteurs des HDAC, suggérant ainsi que la désacétylation des histones pourrait être à l'origine de la modulation de la transcription par les hétérodimères MAD/MAX (Figure 36) ([Hassig et al 1997](#), [Laherty et al 1997](#)).

Figure 36 : Formations de complexes protéiques modulant l'accès à la chromatine.

MAX peut former des homodimères (au milieu, transcriptionnellement inerte), ou des hétérodimères avec les FdT MAD (à gauche) ou MYC (à droite). Tous les dimères reconnaissent la séquence nucléique CACGTG appelée E-box. Par l'intermédiaire du SID, le dimère MAX/MAD recrute les corépresseurs Sin3A/B et les histones désacétylases HDAC 1 et 2, qui vont diminuer l'accès à la chromatine et conduire à une répression de la transcription. Les dimères MAX/MYC vont recruter la protéine TRRAP et des histones acétyl transférases telles que GCN5, acétyler la chromatine et conduire à une activation de la transcription des gènes cibles.

VIII.2 La protéine centrale MAX.

MAX est l'acteur central du réseau. Le gène codant la protéine MAX, *MAX*, se situe sur le chromosome 14 du génome humain, et code une protéine de 18 kDa. La protéine comporte une structure bHLHZ, qui lui permet de former des hétérodimères MYC/MAX ou MAD/MAX, ou des homodimères MAX/MAX. Cependant, elle ne possède pas de domaine transactivateur. La formation des dimères est nécessaire à l'activation des fonctions biologiques des différents partenaires de MAX. Les homodimères MAX-MAX ne semblent pas avoir de fonctions modulatrices de la transcription de manière directe. Cependant, il a été démontré que les homodimères MAX/MAX étaient capables de se lier aux E-box, de la même manière que les hétérodimères MYC/MAX ([Nair & Burley 2003](#)). Dans ces circonstances, l'occupation des promoteurs par les dimères inactifs MAX/MAX contribue à moduler la transcription des gènes cibles par une manière alternative. Cependant, les FdT des familles MYC et MAD présentent une plus grande affinité pour MAX, que MAX pour lui-même, comme démontré par des expériences de compétition *in vitro* où la quantité de MAX disponible est le facteur limitant ([Ayer et al 1993](#)).

- Etat de l'art – VIII. Le réseau MYC/MAX/MAD et le facteur de transcription de MAD4 -

Comme MAX possède un rôle central essentiel dans le réseau et gouverne les fonctions opposées de MYC et MAD, les chercheurs émirent l'hypothèse que MAX pourrait jouer un rôle important dans le développement. Un modèle murin [$MAX^{-/-}$] fut généré en croisant des souris mutées hétérozygotes $MAX^{+/-}$. Le phénotype [$MAX^{+/-}$] n'avait aucun effet visible sur les animaux en termes de poids, taille ou encore durée de vie. Cependant, le phénotype [$MAX^{-/-}$] est létal à une période du développement embryonnaire E5.5-6.5. De plus, les embryons dont le développement est arrêté sont 50-70% plus petit que les souris sauvages, et présentent de nombreux retards de croissance ([Shen-Li et al 2000](#)). MAX, et donc ses partenaires, notamment MYC, sont donc essentiels au bon déroulement de l'embryogenèse.

VIII.3 La famille des facteurs de transcriptions MYC.

VIII.3.A Membres de la famille MYC.

Le gène *MYC*, identifié pour la première fois en 1982 ([Dalla-Favera et al 1982a](#)) est l'archétype du gène codant pour la famille de protéines MYC. Dans les cellules de mammifères, cette famille se compose de 3 protéines différentes, chacune codée par un gène spécifique : L-MYC (*MYCL*), N-MYC (*MYCN*) et le plus connu et le plus étudié, c-MYC (*MYC*). Ces 3 protéines partagent des fonctions globalement similaires, et sont plutôt différenciables par leur localisation dans des tissus ou types cellulaires spécifiques ([Strieder & Lutz 2002](#), [Zimmerman et al 1990](#)). La présence de ces différentes protéines et leurs profils d'expression dans presque tous types cellulaires suggèrent que celles-ci sont requises dans le temps et l'espace au cours du développement, mais également dans la biologie des cellules adultes (revue ([Grandori et al 2000](#))). Confortant ces observations, les protéines MYC sont également souvent dérégulées dans de nombreux cancers. Ainsi, c-MYC est associé aux tumeurs solides et d'origine hématopoïétique, N-MYC plutôt associé aux tumeurs d'origine neuronale et enfin L-MYC est souvent surexprimé dans les cancers pulmonaires à petites cellules.

Ces 3 protéines partagent une structure similaire. Coté N-terminus se situe le domaine transactivateur (TAD domaine), qui confère à MYC leurs propriétés biologiques de modulation de la transcription, et leur capacité de transformation cellulaire ([Kato et al 1990](#)). Du côté C-terminus se trouve la structure en bHLHZ, qui permet à MYC de se lier avec l'ADN et également de se dimériser avec ses partenaires, comme MAX. Des études de cristallographie des protéines par rayons X ont notamment pu montrer que cette structure bHLHZ permettait la formation d'une super hélice entre les deux partenaires. Après une rotation au niveau de la boucle de la structure, cette superhélice présente 2 hélices basiques permettant l'interaction avec le grand sillon de l'ADN ([Nair & Burley 2003](#)). Une fois dimérisé avec son partenaire MAX, le complexe reconnaît les séquences CACGTG dans le

- Etat de l'art – VIII. Le réseau MYC/MAX/MAD et le facteur de transcription de MAD4 -

génomique, appelées E-Box, et peuvent recruter des complexes secondaires, comme les HAT. N-MYC et L-MYC étant peu ou pas exprimés dans l'épiderme sain, au contraire de c-MYC, le paragraphe suivant permettra de présenter les fonctions connues jusqu'à ce jour de c-MYC.

VIII.3.B Fonctions de c-MYC.

VIII.3.B.a Fonctions générales et gènes cibles.

i. Dérégulation de *MYC* dans les cancers.

Les premières études menées à propos du rôle de *MYC* furent faites dans un contexte pathologique de cancer provoqué par contaminations par des rétrovirus dans un système aviaire. Cependant, dans ces cas de cancers, l'activation de *MYC* n'était pas causée par des mutations dans la séquence. Les recherches s'orientèrent donc vers l'identification et la compréhension de nouveaux modes d'activation oncogénique, qui menèrent à la découverte de 3 nouveaux mécanismes qui pouvaient conduire à la dérégulation de *MYC* et promouvoir la transformation : la mutagenèse insertionnelle, la translocation chromosomique et l'amplification génique. Ces nouveaux concepts permirent notamment de montrer que les rétrovirus activaient l'expression d'oncogène par insertion rétroviral ([Neel et al 1981](#)). Plus spécifiquement, certains rétrovirus (comme ALV, acute leukemia virus) possèdent des sites d'intégration préférentiels, et contribuent ainsi à l'activation de proto-oncogènes, sous l'influence du nouveau promoteur viral. *MYC* fut notamment le premier oncogène identifié à être activé de cette manière dans de nombreux cas de Lymphome de Burkitt ([Peters 1990](#)). Les premiers modèles murins transgéniques apparurent peu après, au cours des années 1980, où une équipe activa l'expression de c-MYC à l'aide des séquences activatrices des immunoglobulines μ et κ afin de modéliser le lymphome de Burkitt. Ils démontrent que cette construction, signature de ce type de cancer, induisait l'apparition de celui-ci dans leur modèle murin ([Adams et al 1985](#)). Dans des lignées cellulaires issues de cancer du côlon (COLO-320) ([Alitalo et al 1983](#)) ou de leucémie aigüe (HL-60), il fut démontré une augmentation du nombre de copies de *MYC*, également retrouvée dans les cellules primaires du patient, suggérant que l'activation de *MYC* pourrait être à l'origine de la maladie ([Dalla-Favera et al 1982b](#)). Cependant, la transformation des cellules par l'activation de *MYC* est généralement combinée avec l'activité d'autres oncogènes. Ainsi, une étude a montré, dans des fibroblastes embryonnaires de rat, que l'expression ectopique de RAS, un autre oncogène connu, est insuffisante pour transformer les cellules. Cependant, la cotransfection avec *MYC* a conduit à la transformation cellulaire ([Land et al 1983](#)). Les très nombreuses études sur le potentiel oncogénique de *MYC* et les modes d'activation de celui-ci ont conduit les chercheurs à comprendre la régulation de *MYC* dans des cellules normales.

- Etat de l'art – VIII. Le réseau MYC/MAX/MAD et le facteur de transcription de MAD4 -

ii. Fonctions générales de MYC dans les cellules normales : implications dans les balances « prolifération/quiescence » et « immaturité/différenciation ».

Le rôle principal de *MYC* dans des cellules normales, non transformées, est de favoriser la prolifération. La stimulation de la prolifération par l'ajout de sérum dans des cultures de cellules quiescentes (fibroblastes et lymphocytes) s'accompagne d'une forte augmentation (entre 10 et 40 fois) de la production de l'ARNm de c-MYC dans les heures suivant la reprise du cycle cellulaire ([Kelly et al 1983](#)). Inversement, une privation en sérum de fibroblastes murin 3T3 conduit à une chute de l'ARNm de c-MYC (environ 10 fois) dans les 90 minutes, et les cellules deviennent quiescentes après 40 heures. Dans cet état quiescent, seul un niveau très bas d'ARNm de c-MYC a pu être détecté ([Dean et al 1986](#)). Le rôle pro-prolifératif de c-MYC a ensuite été démontré dans un modèle de génomique fonctionnelle : l'expression ectopique de c-MYC (humain et murin) dans des fibroblastes 3T3 murins active la prolifération et augmente la clonogénicité ([Armelin et al 1984](#)). Une équipe a développé un modèle murin où MYC est fusionné avec le domaine de liaison du récepteur à l'œstrogène (MYC-ER), permettant l'expression conditionnel de *MYC* par l'addition d'œstrogène ([Eilers et al 1989](#)). A l'aide de ce modèle, l'équipe a démontré que l'expression conditionnelle de c-MYC dans des fibroblastes quiescents de rat et de souris les dirigeaient vers une entrée et une progression dans le cycle cellulaire ([Eilers et al 1991](#)).

Reliée à sa fonction de stimulation de la prolifération, l'expression de *MYC* a également été associée à une inhibition et un blocage de la différenciation dans de multiples systèmes. En effet, il fut démontré par de multiples équipes qu'une répression de l'expression de MYC était requise pour permettre aux cellules de quitter le cycle cellulaire et amorcer un processus de différenciation. C'est le cas par exemple dans un modèle de préadipocytes murins, où l'expression forcée de MYC conduit à une inhibition de la différenciation, réversible par l'ajout d'ARN *MYC* antisens ([Freytag 1988](#)). Ce phénomène est également documenté dans des lignées cellulaires de tétatocarcinome F9 ([Griep & Westphal 1988](#)), ou encore dans des progéniteurs neuronaux, où N-MYC est indispensable pour maintenir une expansion rapide pendant la neurogénèse et inhiber la différenciation précoce ([Knoepfler et al 2002](#)).

Toutefois, le rôle de MYC dans l'inhibition de la différenciation semble maintenant de plus en plus remis en question. Selon les systèmes cellulaires et les contextes étudiés, *MYC* semble en effet plutôt favoriser la différenciation. Par exemple, une équipe a démontré dans un modèle de neurogénèse aviaire qu'une suppression de MYC dans les progéniteurs gliaux radiaux conduisait à des altérations dans la différenciation de ceux-ci. Mécanistiquement, dans ce travail, *MYC* dirige la différenciation en inhibant la voie Notch, ce qui cause une augmentation du taux de divisions

- Etat de l'art – VIII. Le réseau MYC/MAX/MAD et le facteur de transcription de MAD4 -

cellulaires, pouvant avoir pour conséquence une diminution précoce de la taille de la population de cellules progénitrices ([Zinin et al 2014](#)). Des observations similaires ont également été mises en évidence dans la peau : elles seront développées dans un paragraphe suivant.

iii. Genès cibles de MYC.

La recherche et l'étude des gènes cibles de MYC se sont d'abord faites de manière très empirique, à l'aide d'études fonctionnelles, et à très petite échelle. Par exemple, une approche proposée initialement fut de stimuler la prolifération par des signaux mitogènes dans des fibroblastes de rat n'exprimant pas MYC (MYC-null), afin de déterminer si les gènes induits ou réprimés par la prolifération sont régulés par MYC. CAD et GADD45 ont par exemple été validés comme gènes cibles de MYC par cette méthode ([Bush et al 1998](#)).

Cependant, les progrès technologiques récemment effectués ont permis de produire une recherche à un niveau plus global avec l'avènement de la génomique (étude du génome) et les technologies de séquençage à haut débit. L'immunoprécipitation de la chromatine couplée au séquençage (ChIP-seq) et l'étude de la méthylation du génome (épigénétique) ont notamment permis d'identifier de nombreuses cibles génomiques de MYC. Ainsi, MYC pourrait réguler jusqu'à 15% des gènes humains. L'ensemble des études ont ainsi permis de dresser une cartographie du réseau des gènes régulés par MYC. Il apparaît que MYC est globalement un activateur de la transcription des gènes, et que parmi les gènes régulés, beaucoup sont impliqués dans la régulation du cycle cellulaire (par exemple, MYC active les cyclines D1, D2, E1 et A1 et répriment p21^{Cip1}, p27, p15^{INK4b} et GADD45), de la synthèse protéique et de l'apoptose ([Dang et al 2006](#)). Néanmoins, la compréhension des fonctions de MYC a besoin d'atteindre un niveau encore plus global, car celui-ci régule également des ARN long non codants (lncRNA) ([Iaccarino 2017](#)) et des micro ARN ([Polioudakis et al 2013](#)) et de manière générale, influence l'accessibilité de la chromatine.

VIII.3.B.b Fonctions dans les cellules souches.

Initialement, c-MYC a été utilisé dans le cocktail de reprogrammation en iPSC de Yamanaka, notamment pour faciliter l'accès à la chromatine aux autres facteurs de reprogrammation, mais aussi pour son rôle d'inhibition de la différenciation, facilitant le maintien des cellules à un stade indifférenciée ([Takahashi & Yamanaka 2006](#)). Cependant, l'activation de c-MYC augmentait la tumorigénicité des cellules quand elles étaient injectées dans des souris, empêchant toutes utilisations éventuelles en clinique. C-MYC fut donc rapidement retiré du cocktail de reprogrammation ([Nakagawa et al 2008](#)), mais permis de mettre en lumière un éventuel rôle de c-MYC dans la biologie des cellules souches.

- Etat de l'art – VIII. Le réseau MYC/MAX/MAD et le facteur de transcription de MAD4 -

La génération de souris présentant une mutation homozygote pour c-MYC a permis d'en apprendre plus sur sa fonction au cours de l'embryogenèse. Une létalité des embryons est observée à E 9.5-10.5, indiquant un rôle majeur de c-MYC pendant l'embryogenèse. De plus, de grosses anomalies de développement du système nerveux et hématopoïétique sont observées. ([Davis et al 1993](#)). Une élimination conditionnelle de c-MYC dans la moelle osseuse résulte en une sévère cytopénie et une accumulation des cellules souches hématopoïétiques dans leur niche. Les CSH mutées sont toujours capables de s'autorenouveler, mais ne peuvent plus initier un processus de différenciation normal, qui commence par une migration des cellules depuis la niche. Cette étude montre que la délétion de c-MYC s'accompagne d'une surexpression de plusieurs protéines liées à l'adhésion, comme la N-cadhérine. Inversement, une expression forcée de c-MYC conduit à une diminution de la N-cadhérine et des intégrines et une migration forcée des CSH, ce qui à long-terme, cause une diminution de la taille de la population et une différenciation accélérée en poussant les CSH vers le compartiment précurseurs ([Wilson et al 2004](#)).

Une équipe a également documenté le rôle de la famille MYC dans l'autorenouvellement d'un autre type de CS, les progéniteurs neuronaux. Ils ont transfecté des progéniteurs neuronaux avec des rétrovirus encodant *MYC* et des formes mutées de *MYC* ne pouvant interagir avec l'un de ses partenaires, MIZ-1. Dans leur modèle de neurosphères, la surexpression de *MYC* conduit à une augmentation (5 fois) de l'autorenouvellement des progéniteurs, même dans un contexte d'induction de la différenciation. Les cellules transfectées avec la forme mutée de *MYC* (MYCV394D) prolifèrent plus, mais ne présentent pas un autorenouvellement accru. Ils ont ainsi mis en évidence que, au moins dans le système neuronal, la prolifération et l'autorenouvellement sont régulés par des mécanismes au moins partiellement différents, dans lesquels c-MYC est impliqué ([Kerosuo et al 2008](#)). Ces mécanismes peuvent notamment être médiés par MIZ-1, qui complexé à c-MYC, agit comme un répresseur transcriptionnel.

VIII.3.B.c Fonctions dans l'épiderme.

Le rôle de c-MYC dans l'épiderme a été principalement étudié par deux équipes : l'équipe de Denis Roop et celle de Fiona Watt. Les deux équipes ont notamment exploré le rôle de c-MYC à l'aide de modèles murins transgéniques dans lesquels l'expression de *MYC* était forcée, dans tout l'épiderme ou spécifiquement dans les kératinocytes de la couche basale. Ces approches *in vivo* ont également été complétées par des approches *in vitro* en culture.

Afin d'étudier le rôle de c-MYC dans la différenciation de l'épiderme, les chercheurs ont sous-cloné le gène humain *MYC* sous le contrôle du promoteur de la loritrine dans un modèle murin, afin de faire exprimer *MYC* dans les kératinocytes prolifératifs mais aussi ceux en différenciation ([Waikel et](#)

- Etat de l'art – VIII. Le réseau MYC/MAX/MAD et le facteur de transcription de MAD4 -

[al 1999](#)). Dans les jours suivant la naissance, les souriceaux développèrent un phénotype d'hyperkératose et d'hyperplasie cutanée. Le marquage des cellules prolifératives au BrdU révéla environ 3 fois plus de cellules positives dans l'épiderme des souris ML.myc2 *versus* les souris contrôles. De plus, ces cellules prolifératives, normalement confinées dans la couche basale de l'épiderme, purent également être localisées dans les couches suprabasales. Enfin, l'expression de certains marqueurs de différenciation comme la loricrine, la filaggrine et la kératine 1 est atténuée. Cette étude a montré un rôle de c-MYC dans la différenciation de l'épiderme, mais les chercheurs ont par la suite développé un autre modèle murin transgénique permettant d'étudier le rôle de c-MYC spécifiquement dans les PK. Dans ces souris, l'expression de c-MYC est forcée dans les kératinocytes de la couche basale uniquement, grâce au promoteur de la kératine 14 (*K14.MYC2*) ([Waikel et al 2001](#)). Cette approche a d'ailleurs été mise en place également par l'équipe de Fiona Watt, à la différence que l'expression de c-MYC est ici inductible par l'injection d'OHT (4-hydroxy-tamoxifen) aux souris (*K14.MYCER*) ([Arnold & Watt 2001](#)). Globalement, ces études ont permis de démontrer que l'expression forcée de c-MYC spécifiquement dans les CSK les poussent d'une part, à proliférer, et d'autre part, à se différencier. Dans les souris transgéniques, aucune différence majeure n'a été observée au niveau de l'EIF. Cependant, l'expression de c-MYC dans les CSK oriente leur différenciation en sébocytes (augmentation de marquage au Red Oil E, spécifiques des lipides), au dépend de la différenciation en FP, démontré par l'absence de marquages des kératines spécifiques du FP et également un impact sur la qualité de la fourrure des animaux ([Arnold & Watt 2001](#)). Une diminution du nombre de cellules LRC a également été observée (réduction du nombre de 75%) dans des souris âgées de 3 mois, associée à une perte de l'expression de l'intégrine- β 1 ([Figure 37](#)) ([Waikel et al 2001](#)). Dans la continuité de ces travaux, une étude a montré par microarray sur des ARN extraits à partir de kératinocytes issus de souris *K14.MYCER* que l'activation de c-MYC conduisait à la répression d'un groupe de gènes impliqués dans l'adhésion des kératinocytes (plus de 40% des gènes réprimés rentre dans cette catégorie). Parmi les gènes réprimés se trouve notamment des intégrines (β 1, α 6 β 4 ...) ([Frye et al 2003](#)). Un mécanisme proposé pour expliquer l'action de c-MYC sur les compartiments CSK/TA fait intervenir la β -caténine. Au cours de la différenciation des CSK vers les TA, c-MYC est une cible de β -caténine, et régule l'expression des marqueurs de kératinocytes basaux (intégrine- α 6 et β 1 ; kératines 15 et 19) ([Shen et al 2017](#))

Ces études *in vivo* ont également été complétées par des études *in vitro* sur des kératinocytes humains. Durant la différenciation terminale des kératinocytes, l'ARN et la protéine c-MYC sont diminués, de manière concomitante avec une augmentation de l'expression des membres de la famille MAD ([Gandarillas & Watt 1995](#), [Hurlin et al 1995a](#)). Quand c-MYC est surexprimé dans des cultures de kératinocytes primaires, il en résulte une diminution de l'expression de l'intégrine- β 1, et quand les

- Etat de l'art – VIII. Le réseau MYC/MAX/MAD et le facteur de transcription de MAD4 -

kératinocytes sont utilisés pour reconstruire un épiderme, des anomalies de différenciation sont observées (involucrine exprimée dans la couche basale), suggérant une différenciation précoce. En culture, le potentiel clonogénique est également impacté : une augmentation de la proportion de colonies abortives est détectée. Ces résultats *in vitro* suggèrent que l'expression de c-MYC induirait ainsi une différenciation accrue, ce qui diffère légèrement des résultats obtenus *in vivo*.

Au vu de l'ensemble de ces résultats, les chercheurs ont donc proposé que l'activation de c-MYC mobilisait les CSK, et que l'augmentation de la prolifération associée à la perte d'adhésion avec la membrane basale les pousserait vers le compartiment de cellules progéniteurs, induisant une différenciation précoce des CSK. Cette théorie semble en effet en adéquation avec les observations *in vivo* et *in vitro*.

Figure 37 : Impact d'une expression forcée de c-MYC sur les cellules souches de l'épiderme.

Coupes de peaux issues d'un modèle murin exprimant c-MYC sous le contrôle du promoteur KRT14 (spécifique de la couche basale de l'épiderme). L'expression forcée de c-MYC dans les kératinocytes de la couche basale induit une hyperplasie et un développement accru des glandes sébacées **B** comparé aux souris sauvages **A**. Une injection unique de BrdU 1h30 avant récupération des tissus (marquage des cellules en prolifération active) indique une augmentation du nombre de cellules prolifératives dans les souris mutées **D** comparées aux souris sauvages **C**. Marquage rouge : kératine 14. **E-G**. Marquage des cellules LRC dans l'épiderme murin. Les souriceaux ont été injectés 4 fois au BrdU, puis les échantillons ont été collectés après une période de 'chase' de 30 et 75 jours. La présence de cellules LRC (flèche blanche) est visible uniquement dans l'épiderme des souris sauvages **E** et non détectées dans les souris mutées **F**. **G**. Quantification du pourcentage de cellules LRC dans les échantillons **E-F**.

VIII.4 La famille des facteurs de transcription MAD.

VIII.4.A Membres de la famille MAD.

La détection de la protéine centrale MAX sans la présence de son partenaire c-MYC, par exemple dans des cellules en quiescence, a suggéré que c-MYC n'était pas le seul partenaire de MAX.

- Etat de l'art – VIII. Le réseau MYC/MAX/MAD et le facteur de transcription de MAD4 -

Ainsi, des expériences de double hybride, une technique de biologie moléculaire permettant de détecter des interactions protéines-protéines et protéines-ADN, identifia des nouveaux partenaires de MAX : la famille des FdT MAD ([Ayer et al 1993](#), [Hurlin et al 1995c](#)).

La famille des FdT MAD comporte 4 membres (les MAD), plus un membre apparenté (MNT). Les protéines ne sont pas des isoformes mais sont codées par des gènes indépendants : *MXD1* pour MAD1, *MXI1* pour MXI1 (aussi connu comme MAD2), *MXD3* pour MAD3, et *MXD4* pour MAD4. Ces facteurs de transcription possèdent également la structure typique bHLHZ, et, du côté N-terminale, une séquence SID (Sin-Interacting Domain), leur conférant leur fonctions biologiques de répresseurs de la transcription par le recrutement des corépresseurs Sin3A et Sin3B ([Ayer et al 1995a](#)). La liaison et la formation d'hétérodimère avec MAX est également nécessaire aux fonctions biologiques des MAD, qui ne peuvent pas former d'homodimères. Une fois dimérisé avec MAX, les hétérodimères MAD/MAX se fixent sur les séquences consensus E-Box, et rentrent en compétition avec les hétérodimères MYC/MAX pour ces sites.

VIII.4.B Fonctions générales des MAD.

Il existe deux fonctions principales rapportées dans la littérature pour les FdT de la famille des MAD. Tout d'abord, ils ont une fonction de répression de la transcription de manière antagoniste aux FdT de la famille MYC.

La deuxième grande fonction partagée par la plupart des membres de la famille MAD est associée à l'arrêt du cycle cellulaire et à la promotion de la différenciation. Les modèles murins KO pour les différents MAD ont permis d'apporter des données importantes concernant ces deux points, et seront développés dans le paragraphe suivant. Cependant, ces données *in vivo* ont été complétées par des données *in vitro*. Dans de multiples systèmes cellulaires, le processus de différenciation est souvent précédé d'une sortie du cycle cellulaire, et de nombreuses données indiquent que le contrôle de cette balance « prolifération/différenciation » est médié par la proportion de complexes MYC/MAX/MAD. C'est par exemple le cas dans les monocytes/macrophages, où les complexes MYC/MAX sont détectés dans les monocytes en prolifération, au contraire des complexes MAD1/MAX, indétectables. Lors de l'induction de la différenciation en macrophages par l'ajout de TPA, la formation de complexes MAD1/MAX est favorisée au dépend des complexes MYC/MAX ([Figure 38](#)) ([Ayer & Eisenman 1993a](#)). Les changements dans la proportion des complexes MYC/MAX/MAD ont également été validés dans des cellules d'érythroleucémie murines (complexe MAD1/MAX) ([Cultrato et al 1997](#)), dans différentes lignées de cellules épithéliales murines et humaines (complexes MAD2/MAX et MAD4/MAX) ([Siegel et al 2003](#)), et dans des kératinocytes primaires humains (complexe MAD1/MAX) ([Hurlin et al 1995a](#)). Dans toutes ces études, le changement de proportions des complexes est associé

- Etat de l'art – VIII. Le réseau MYC/MAX/MAD et le facteur de transcription de MAD4 -

à une inhibition de la prolifération, une répression de l'expression de c-MYC, et parfois, à une induction de la différenciation des cellules.

Figure 38 : Induction de MAD1 au cours de la différenciation des monocytes.

Des monocytes ont été cultivés en présence de TPA pour induire leur différenciation en macrophages, ou sans TPA (condition contrôle). La production de protéine a été suivie par intégration de méthionine [³⁵S]. Les lysats protéiques ont été récupérés et les protéines purifiées avec des anticorps spécifiques. Le lysat est analysé sur gel de polyacrylamide. **A.** Une augmentation de la quantité de MAD est détectée au cours de l'induction de la différenciation. **B.** La protéine centrale MAX est immunoprécipitée et les quantités coimmunoprécipitées de MAD et MYC sont analysées. Au cours de la différenciation monocyttaire, un changement dans la proportion des protéines MAD et MYC complexées à MAX est observé.

VIII.4.C Modèles murins [MXD^{KO}].

Plusieurs modèles murins KO pour les différents facteurs de transcriptions ont été générés au cours des années. Actuellement, les gènes qui ont été la cible des KO sont *MXD1* (Foley et al 1998), *MXI1* (Schreiber-Agus et al 1998) et *MXD3* (Queva et al 2001). Aucun rongeur [*MXD4^{KO}*] n'a été généré à l'heure actuelle. De manière générale, l'impact sur le développement des souris est assez restreint dans le cas des KO simples : toutes les souris sont viables, fertiles et macroscopiquement normales. Néanmoins, les cellules et organes des souris [*MXD1^{KO}*] présentent une prolifération accrue et des anomalies de différenciation. Des modèles de surexpression de MAD1, de manière systémique (Queva et al 1999) ou organe-spécifique (Iritani et al 2002), confirment son rôle dans le contrôle de la sortie du cycle cellulaire. Les souris [*MXI1^{KO}*] présentent également une prolifération cellulaire accrue, résultant en une hyperplasie dans les tissus prostatiques. Enfin, contrairement aux souris [*MXD1^{KO}*] et [*MXI1^{KO}*], les souris [*MXD3^{KO}*] ne présentent pas de phénotype évident en relation avec une hyperprolifération ou une anomalie de différenciation. L'unique phénotype rapporté est une sensibilité

- Etat de l'art – VIII. Le réseau MYC/MAX/MAD et le facteur de transcription de MAD4 -

accrue des progéniteurs neuronaux à l'apoptose induite par une irradiation gamma. Une redondance dans la fonctionnalité des différents MAD est donc une hypothèse possible pour les faibles phénotypes observés, où les autres MAD compensent la perte du MAD délété. Pour tenter de répondre à cette question, un triple KO pour *MXD1*, *MXI1* et *MXD3* a été généré. Les souris sont fertiles et viables, mais de taille supérieure aux souris sauvages, et certains types cellulaires présentent une hyperprolifération. Cependant, il est important de noter qu'un gène de la famille MAD n'est pas impacté : il s'agit de *MXD4*. Il pourrait donc jouer à lui seul un rôle de compensation et suggère un rôle important de celui-ci dans le développement.

VIII.5 Focus sur le facteur de transcription MAD4.

L'un de ces facteurs de transcription fait l'objet de recherche au cours de ce travail de thèse : il s'agit du gène *MXD4*. Il est situé sur le chromosome 4 du génome humain. Il code la protéine MAD4, qui pèse 23 kDa. Comme tous les membres de cette famille de FdT, il possède une structure en bHLHZ, permettant la dimérisation avec MAX et l'interaction avec l'ADN, et une séquence SID, permettant l'interaction avec le complexe corépresseur de la transcription composé de Sin3 et HDAC1/2. Le rôle de MAD4 est relativement peu documenté. A l'heure où ces lignes sont écrites, une recherche du mot-clé « *MXD4* » sur PubMed renvoie seulement 21 publications. De plus, aucun modèle murin [*MXD4*^{KO}] n'a été généré à ce jour, contrairement aux autres membres de la famille. Cependant, une analyse de la littérature désigne MAD4 comme jouant un rôle important dans la biologie des cellules précurseurs, mais également dans la biologie des kératinocytes, en plus de ses fonctionnalités communes avec les autres MAD dans le contrôle de la prolifération et la différenciation.

VIII.5.A Rôle dans le contrôle du cycle cellulaire et la différenciation.

La plupart des études ne se sont pas intéressées au rôle de MAD4 directement, mais plutôt en tant qu'antagoniste de c-MYC, beaucoup plus étudié. Ainsi, une équipe s'est intéressée aux variations d'expression de c-MYC et MAD4 dans des fibroblastes humains primaires, à l'état quiescent (privation en sérum) et lors de l'induction de la prolifération (stimulation par ajout de sérum). Dans les cellules quiescentes, MAD4 est fortement exprimé, et c-MYC n'est pas détectable. Dans les heures suivant l'addition de sérum, l'expression de MAD4 est rapidement réprimée, tandis que c-MYC devient vite détectable. Cependant, dans des cellules sénescents, cette inversion des expressions n'est pas observée, et la forte expression de MAD4 persiste. Il a également été démontré que l'expression de MAD4 était stimulée par MIZ-1, qui peut se lier à son promoteur, et que l'interaction de MIZ-1 avec le promoteur était réprimée en présence de c-MYC, conduisant ainsi à une boucle d'activation de la prolifération ([Marcotte et al 2005](#)). Une deuxième étude a utilisé la même approche d'induction de la

- Etat de l'art – VIII. Le réseau MYC/MAX/MAD et le facteur de transcription de MAD4 -

prolifération, et a identifié un réseau de micro ARN (miR) interagissant avec c-MYC et MAD4 lors de l'entrée en cycle de cellules quiescentes ([Polioudakis et al 2013](#)). Le miR-22 active *MYC* et inhibe *MXD4*, contribuant à l'entretien d'une boucle d'activation de la prolifération lors de la sortie de quiescence des cellules. Enfin, l'expression forcée de MAD4 dans des fibroblastes humains primaires induit un phénotype sénescence, et a un impact fonctionnel au niveau de la prolifération cellulaire : les cellules [*MXD4^{OE}*] ont une capacité clonogénique et une prolifération en culture de masse réduites ([Figure 39](#)) ([Marcotte et al 2003](#)). Ces études suggèrent que MAD4 pourrait donc avoir pour rôle de maintenir les cellules hors du cycle cellulaire, que ce soit à l'état quiescent (comme la plupart des cellules souches) ou sénescence. Une autre étude a montré que l'expression de c-MYC était augmentée, et celle de ses antagonistes MAD1, MXI1 et MAD4 était diminuée dans un contexte de leucémie myéloïde aigüe. Ces modifications ont pour conséquence une diminution du nombre de cellules souches hématopoïétiques long-terme au profit d'une augmentation de la fraction de progéniteurs multipotents ([Basit et al 2018](#)), suggérant un rôle important du réseau MYC/MAX/MAD dans les CSH, du moins en contexte pathologique.

Figure 39 : Impact du niveau d'expression de MAD4 sur la prolifération cellulaire.

Des cellules HeLa ou HEK293 ont été transfectées avec un vecteur vide (AP2) ou un vecteur induisant l'expression de MAD4 (hMad4). **A.** Détection de la protéine MAD4 par WB dans les cellules transfectées. **B-C.** Quantification de la prolifération cellulaire. Le nombre de cellules totales obtenues après 3 jours de culture de masse (B) et le nombre de colonies générées à partir des cellules transfectées (C) est réduit avec les cellules hMad4.

Cependant, MAD4 semble également être lié au processus de différenciation terminale dans plusieurs types cellulaires. Un niveau élevé d'ARNm et de protéine MAD4 est induit et maintenu lors de la différenciation des cellules murines d'érythroleucémie ([Kime & Wright 2003](#)), lors de la différenciation de cellules neurales et épidermiques ([Hurlin et al 1995a](#), [Hurlin et al 1995b](#)), ou encore des adipoblastes ([Pulverer et al 2000](#)). Cependant, la question demeure si l'activation de MAD4 se situe en amont ou en aval des processus de différenciation. Une étude s'est intéressée à la répartition

- Etat de l'art – VIII. Le réseau MYC/MAX/MAD et le facteur de transcription de MAD4 -

spatiale et tissulaire/cellulaire des différents acteurs MAD/MYC au cours du développement embryonnaire murin ([Queva et al 1998](#)). Il apparaît que MAD4 est très peu exprimé dans le développement précoce de l'embryon. A partir de E8.5, des transcrits *MXD4* peuvent être détectés dans la notocorde et la plaque du plancher, des zones où les cellules ne prolifèrent plus du tout et se sont différenciées. Au cours de l'organogenèse, MAD4 est surtout détecté dans les cellules les plus avancées dans la différenciation, notamment les chondrocytes. Il semblerait donc que MAD4 soit également important dans les processus de régulation de la différenciation, en plus de son rôle assez bien documenté dans le contrôle de la prolifération.

VIII.5.B Fonctions dans les cellules précurseurs.

MAD4 semble jouer un rôle important au sein des balances « prolifération/quiescence » et « immaturité/différenciation », des notions directement liées à la fonction d'autorenouvellement des cellules souches et précurseurs. Cependant, une unique étude s'est intéressée directement au rôle de *MXD4* dans des cellules précurseurs ([Boros et al 2011](#)). *MXD4* fut identifié par une étude génomique, montrant une expression extrêmement régulée au cours du développement du système hématopoïétique embryonnaire. Afin d'étudier le rôle de *MXD4* durant ce processus, les auteurs utilisèrent un modèle *in vitro* de différenciation de cellules souches embryonnaires murines en cellules hématopoïétiques, par ajout d'activine-A (voie du TGF- β) et de FGF (fibroblast growth factor) ([Pearson et al 2008](#)). Dans les 6 heures suivant l'induction de la différenciation, les auteurs ([Boros et al 2011](#)) détectèrent une chute brutale de l'expression de MAD4. Afin de confirmer leur observation, ils suivirent le niveau d'expression de MAD4 dans des corps embryoïdes (embryoid bodies, EB) en cours de différenciation. MAD4 n'est pas détecté dans les cellules souches embryonnaires, mais son niveau augmente avec la différenciation jusqu'à être au maximum 5 jours après l'induction de la différenciation. Cependant, entre le jour 3.3 et 4, ils observèrent une chute drastique de MAD4. Afin de déterminer la raison de cette brusque répression, les auteurs forcèrent l'expression de MAD4 dans les progéniteurs hématopoïétique CD41⁺ à l'aide d'un système inductible à la doxycycline, permettant de forcer l'expression de MAD4 au moment souhaité. Les progéniteurs CD41⁺ obtenus à partir des EB furentensemencés en culture, en présence ou absence de doxycycline. Quand l'expression de MAD4 est forcée dans ces cellules au moment où elle devrait être normalement réprimée, une réduction du potentiel clonogénique est observée. Cette réduction dans le potentiel clonogénique est accompagnée d'une augmentation de la proportion de cellules en phase G0/G1 du cycle cellulaire, et une diminution des cellules en phase S. Les auteurs proposèrent donc un modèle où la répression brutale mais transitoire de l'expression de MAD4 est requise en amont de la différenciation hématopoïétique, afin d'induire un pic de prolifération pour permettre l'établissement correcte des différents lignages

- Etat de l'art – VIII. Le réseau MYC/MAX/MAD et le facteur de transcription de MAD4 -

hématopoïétiques. De manière intéressante, ce pattern d'expression est exactement similaire à celui de MAD1 lors du processus de différenciation des adipoblastes ([Pulverer et al 2000](#)).

VIII.5.C MAD4 dans l'épiderme et les kératinocytes.

Une fois de plus, peu d'études ont porté sur la détermination du rôle de MAD4 dans l'épiderme et les kératinocytes. Dans des coupes de tissus, l'expression de MAD a été détectée dans les cellules post-mitotiques au sommet des cryptes intestinales, et également dans les couches suprabasales de l'épiderme. ([Chin et al 1995](#), [Lymboussaki et al 1996](#)). Cependant, les auteurs ne précisent pas quel MAD est détecté dans leur étude. Au vu des dates de publication des études, il s'agit très probablement de MAD1, car la découverte de MAD3 et MAD4 chez l'humain fut quasiment concomitante ([Hurlin et al 1995b](#)). Dans cette étude, les auteurs rapportent une expression de MAD4 dans certaines cellules différenciées des couches suprabasales de l'épiderme embryonnaire.

In vitro, une augmentation de l'expression de MAD4 dans les kératinocytes a été associée à une inhibition de la prolifération et de la capacité clonogénique des kératinocytes primaires humains suite à l'ajout de TGF- β . L'un des intermédiaires dans ce processus est le gène *Id2*, normalement exprimé dans les kératinocytes en prolifération et réprimé lors de la différenciation. Les auteurs n'ont cependant pas creusé le lien entre niveaux respectifs de MAD4, *Id2*, prolifération et différenciation. Aucun marqueur de différenciation des kératinocytes n'a été observé en relation avec l'arrêt de la prolifération ([Siegel et al 2003](#)). Les fonctions de MAD4 dans l'épiderme, et particulièrement dans les kératinocytes précurseurs, sont très peu décrites. MAD4 constitue donc un candidat original à étudier dans ce contexte.

VIII.6 Interactions entre le réseau MYC/MAX/MAD et les voies TGF- β et Wnt.

Une étude s'est intéressée aux mécanismes derrière l'effet antiprolifératif du TGF- β . Les auteurs ont trouvé que cet effet est dû à une répression de c-MYC et une augmentation concomitante de MAD2 et MAD4 après addition de TGF- β sur des cellules Balb/MK ([Satterwhite et al 2001](#)). D'autres études rapportent des observations similaires dans des kératinocytes, où le traitement au TGF- β résulte en une augmentation de MAD1, MAD2 et/ou MAD4. Cependant, la répression de c-MYC n'est pas constamment observée ([Siegel et al 2003](#), [Werner et al 2001](#)). La répression de c-MYC par le TGF- β est effectuée au niveau transcriptionnel, puisqu'une séquence appelée TCE (TGF- β Control Element), qui permet au TGF- β de se fixer dans le génome, a été découverte dans la région promotrice du gène *MYC* ([Pietenpol et al 1991](#)). Un autre élément de régulation dans la séquence promotrice est aussi disponible pour la fixation des Smads, éléments aval de voie TGF- β ([Yagi et al 2002](#)). Des interactions avec la voie Wnt ont également été documentées. Par exemple, le gène *MYC* est un gène cible des

- Etat de l'art – VIII. Le réseau MYC/MAX/MAD et le facteur de transcription de MAD4 -

facteurs de transcriptions aval de la voie Wnt, les facteurs β -caténine/TCF4. Quand TCF4 est déplété, les auteurs observent une diminution de la prolifération causée par une inhibition de MYC, qui en conditions normales empêche l'expression de la CDKI p21^{Cip1} ([van de Wetering et al 2002](#)).

Le réseau MYC/MAX/MAD est composé de nombreux facteurs de transcriptions qui partagent une structure « bHLHZ » commune. Elle leur permet de se dimériser et est nécessaire à leurs fonctions biologiques de modulations de la transcription. La famille MYC présente des caractéristiques d'oncogènes, est généralement associée à la prolifération cellulaire. Au contraire, la famille MAD est antagoniste des fonctions de MYC et agit sur le retrait du cycle cellulaire et la différenciation. Au cœur des grandes fonctions cellulaires, le réseau MYC/MAX/MAD est en interaction avec de nombreuses voies de régulation des fonctions des cellules souches.

OBJECTIFS DE LA THESE

- Objectifs de la thèse -

I. Contexte du travail et objectifs.

Une propriété biologique partagée par différents types de cellules souches est la capacité d'autorenouvellement. Cette capacité d'autorenouvellement permet aux cellules souches de maintenir leur nombre à un niveau constant au cours des divisions cellulaires successives. Cette propriété constitue le socle des approches développées en recherche pour amplifier *ex vivo* des cellules souches en culture, et envisager leur utilisation pour reconstruire des tissus. Promouvoir l'autorenouvellement implique de parvenir à induire une mise en cycle des cellules souches, tout en préservant leur caractère immature. Le décryptage des déterminants moléculaires du caractère souche a notamment permis d'identifier la voie de signalisation du TGF- β comme un élément de cette régulation.

Les cellules souches et progéniteurs de l'épiderme humain (regroupés sous le terme de précurseurs) sont concernés par cette problématique. Ces cellules sont en effet dotées d'une forte capacité d'expansion, qui est exploitée en clinique pour des approches de régénération cutanée. Le bagage du laboratoire permet de positionner le réseau du TGF- β 1 comme central dans la peau. Il a été étudié pour son rôle dans des physiopathologies comme la fibrose ou les cancers ([Reisdorf et al 2001](#)) mais aussi dans la régulation de la prolifération et de l'immaturité des kératinocytes épidermiques en contexte non-pathologique ([Fortunel et al 2003a](#)).

Dans le cadre de ma thèse, je me suis intéressé à la fonction de facteurs de transcription (FdT) du réseau de signalisation TGF- β dans le contexte de l'expansion *ex vivo* de kératinocytes humains. Ma thèse a porté sur 2 candidats. L'axe central a été d'explorer la fonction du facteur de transcription MAD4 (gène *MXD4*). J'ai également apporté une contribution à l'étude d'un second candidat, qui est KLF4 (gène *KLF4*).

II. Démarche.

Avant mon arrivée au laboratoire, les transcriptomes de populations de kératinocytes enrichies en CSK *versus* enrichies en progéniteurs kératinocytaires ont été comparés afin de dresser la liste des gènes différentiellement exprimés dans chaque population : cette étude a permis d'identifier *KLF4* et *MXD4*, comme candidats qui pourraient réguler les balances « quiescence/prolifération » et « immaturité/différenciation » des PK (**Résultats : CHAPITRE 1**).

Afin d'étudier la fonction de ces deux facteurs de transcription, la démarche a consisté en la mise en place d'une approche de génomique fonctionnelle où l'expression de *KLF4* (**Résultats : CHAPITRE 2, PUBLICATION #3 : *KLF4 inhibition promotes the expansion of keratinocyte precursors from adult human skin and of embryonic-stem-cell-derived keratinocytes*, Nature Biomed. Eng., 2019**) ou de *MXD4*

- Objectifs de la thèse -

(**Résultats : CHAPITRE 3**) a été modulée par interférence à l'ARN (shARN, siARN) ou par traitement chimique (kenpaullone). Les contextes cellulaires [FdT^{WT}] et [FdT^{KD}] ont été générés à partir de différents modèles cellulaires de kératinocytes : des kératinocytes primaires humains enrichis en kératinocytes basaux, le modèle plus perfectionné des holoclones de kératinocytes, et des kératinocytes dérivés de cellules souches embryonnaires. Les études visant à déterminer les impacts de la répression de chacun des FdT sur les fonctionnalités des PK comportent trois volets.

Le volet moléculaire consiste à explorer les réseaux de signalisation impliqués dans le contrôle de l'immaturation des kératinocytes. Il inclut des analyses des transcriptomes, des exomes et le développement d'une méthode de quantification absolue de transcrits (**Méthodologie : SECTION 2, PUBLICATION #1 : *Quantitative Detection of Low-Abundance Transcripts at Single-Cell Level in Human Epidermal Keratinocytes by Digital Droplet Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*, Methods Mol. Biol., 2018**).

Le volet cellulaire explore l'impact de la répression des FdT sur les capacités d'expansion des PK. Il comprend des études fonctionnelles focalisées autour de l'aptitude de prolifération bidimensionnelle des PK.

Le volet tissulaire examine les conséquences de la modulation des fonctionnalités des kératinocytes sur leur capacité à reconstruire un épiderme. Ce volet se base sur la quantification de l'aptitude de reconstruction épidermique dans des modèles *in vitro* et *in vivo* (**Méthodologie : SECTION 3, PUBLICATION #2 : *Iterative Three-Dimensional Epidermis Bioengineering and Xenografting to Assess Long-Term Regenerative Potential in Human Keratinocyte Precursor Cells*, Methods Mol. Biol., 2019**).

METHODOLOGIE

- Méthodologie -

- Méthodologie – Section 1 -

Les Matériels et Méthodes (MM) traitant des données non publiées seront présentés dans la Section 1. Au cours de ce travail de thèse, j'ai contribué au développement de méthodes de qualification phénotypique et fonctionnelle des PK, concrétisé par deux publications.

- Une méthode permettant la quantification absolue de transcrit à l'échelon de la cellule unique est développée dans la Section 2 (Article 1, en Annexes).

- Une méthode de xénogreffes itératives de peaux reconstruites humaines dans un modèle murin est développée dans la Section 3 (Article 2, en Annexes).

Enfin, la grande majorité des MM peut être retrouvée dans la section correspondante de l'article 3 (Annexes).

SECTION 1

I. Modèles cellulaires.

Les modèles cellulaires utilisés ont été mis en place au cours de travaux précédents. J'ai utilisé trois modèles différents : le modèle des kératinocytes épidermiques basaux ([Fortunel et al 2011](#)), le modèle des holoclones ([Fortunel et al 2010](#), [Rheinwald & Green 1975b](#)), et des kératinocytes dérivés de cellules souches embryonnaires ([Guenou et al 2009](#)).

L'obtention d'holoclonnes et de kératinocytes basaux a été réalisée au laboratoire. Pour cela, des déchets opératoires ont été récupérés afin d'en extraire les kératinocytes épidermiques. Il s'agit de plastie mammaire provenant de femmes saines âgées en moyenne de 40 ans, et de prépuces d'enfants âgés entre 2 et 5 ans. Les tissus ont été récupérés après consentement éclairé des patients. L'épiderme a été séparé du derme par digestion enzymatique suivi d'actions mécaniques, et les morceaux d'épiderme ont été incubés 20 minutes dans de la trypsine au bain-marie à 37°C. Les kératinocytes en suspension ont ensuite été récupérés et filtrés. Une fois les kératinocytes totaux obtenus, des étapes de sélection de populations cellulaires sont réalisés afin d'obtenir les deux modèles cellulaires de kératinocytes primaires.

- Modèle « kératinocytes basaux » ([Figure 40A](#)) : L'obtention de ce modèle comprend une étape de sélection par la propriété d'adhésion des kératinocytes au collagène I afin de sélectionner les kératinocytes épidermiques basaux. Ici, les kératinocytes

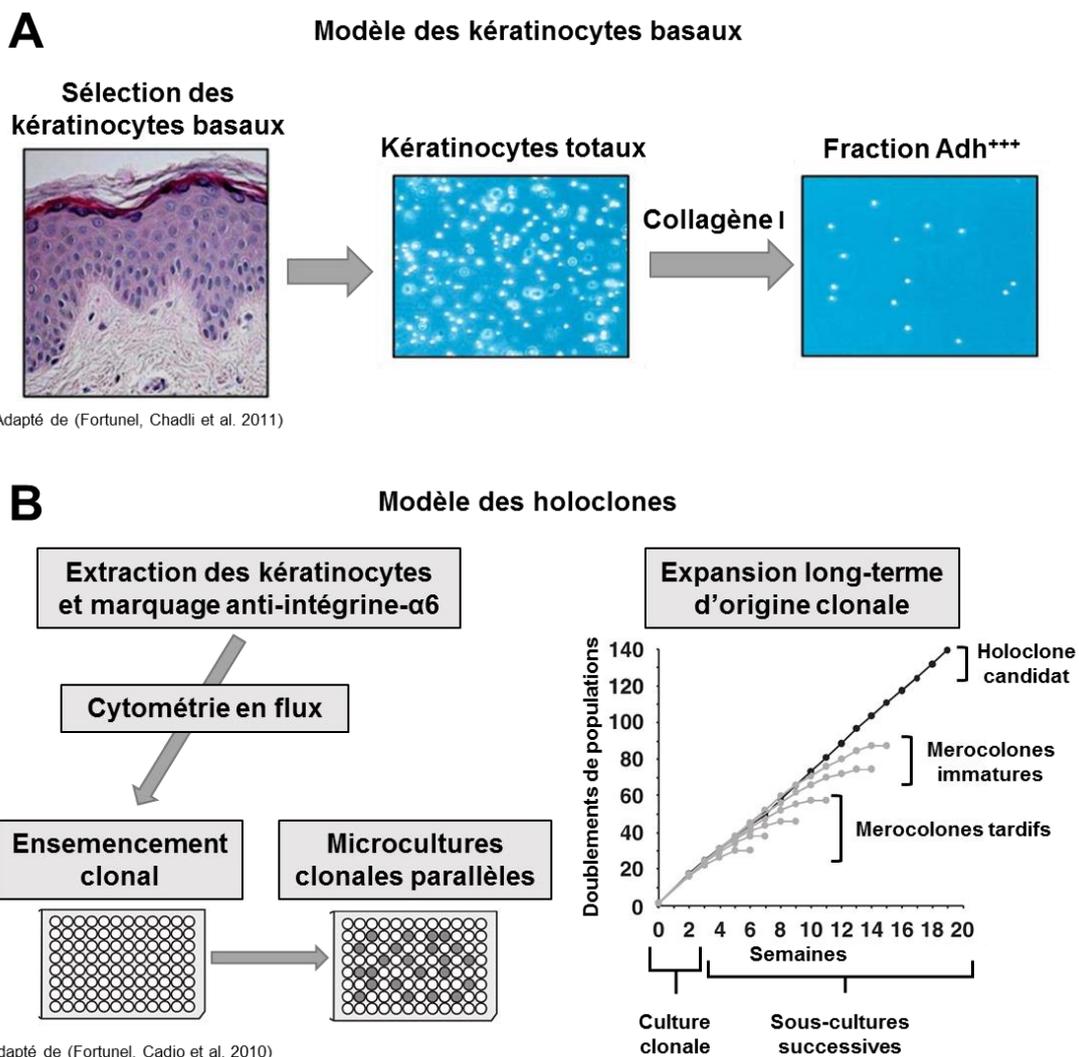
- Méthodologie – Section 1 -

totaux sont ensemencés dans des flacons « coatés » au collagène I à très forte densité (200 000 cellules/cm²), et incubés 10 minutes à 37°C 5% CO₂. Le faible temps d'adhésion permet de sélectionner uniquement les cellules ayant adhérees le plus vite, et de se débarrasser de tous les kératinocytes à des stades de différenciation plus tardifs, n'ayant pas adhéré. Les cellules non-adhérees sont aspirées, et les cellules adhérees (notées ADH⁺⁺⁺) sont trypsinées, comptées et peuvent être ensuite ensemencées ou congelées et stockées. Cette étape de sélection a permis d'enrichir les préparations en kératinocytes de la couche basale, et correspond au premier modèle utilisé au cours de ce travail ([Fortunel et al 2011](#)). Ce modèle est représentatif du matériel cellulaire utilisé en thérapie cellulaire cutanée.

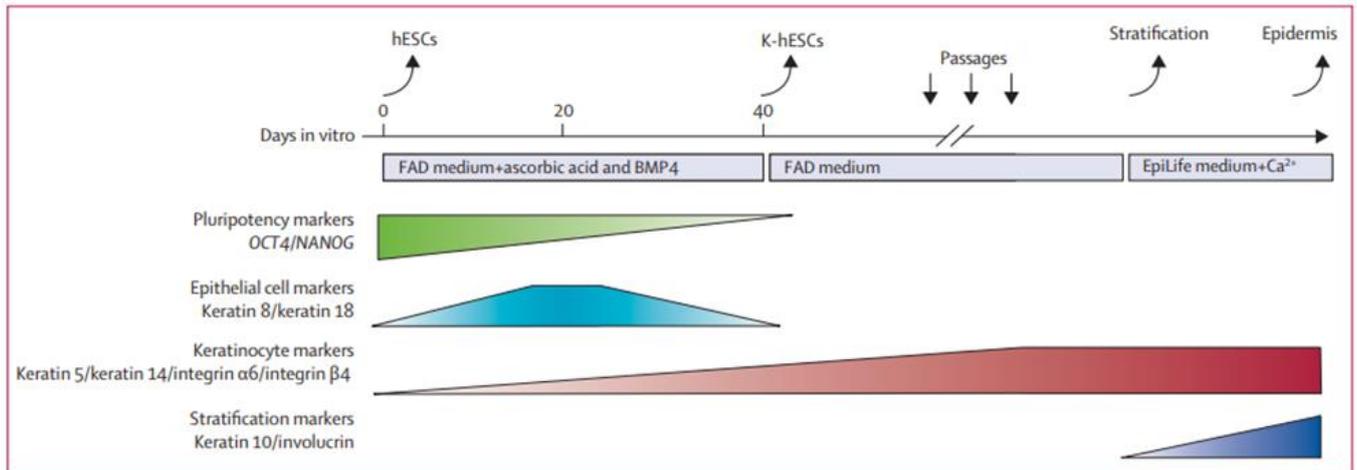
- Modèle « holoclone » ([Figure 40B](#)) : l'obtention de ce modèle comprend une étape de sélection par l'intégrine- $\alpha 6$, puis une étape de sélection par le potentiel prolifératif des cellules (croissance clonogénique puis croissance en culture de masse). Les kératinocytes totaux ont été marqués avec un anticorps dirigé contre l'intégrine- $\alpha 6$, puis clonés à l'échelon de la cellule unique dans des plaques 96 puits. Après 2 semaines de cultures, les clones qui ont rempli les puits sont sous-cultivés dans des flacons de culture. Les sous-cultures sont repiquées chaque semaine pendant plusieurs mois. Au fur et à mesure, les clones avec des potentiels prolifératifs moindre sont éliminés par arrêt de la prolifération. Les cultures sont maintenues jusqu'à obtention de quelques holoclones, qui ont le potentiel prolifératif le plus élevé. Ces deux étapes de sélection permettent, de manière rétroactive, d'identifier un ou plusieurs holoclones, qui contiennent des cellules souches kératinocytaires. En effet, ils maintiennent une intégrité génomique à long-terme en culture, et sont capables de reconstruire un épiderme *in vitro* même après plus de 50 doublements de population.
- Kératinocytes dérivés de cellules souches embryonnaires ([Figure 40C](#)) : En thérapie cellulaire cutanée, l'un des problèmes est l'accès et la disponibilité d'un nombre suffisant de matériel cellulaire pour traiter tous les patients qui pourraient en bénéficier. Une méthode alternative aux kératinocytes primaires proposée par l'institut i-Stem est de dériver des kératinocytes à partir de cellules souches embryonnaires, dont le nombre est virtuellement illimité du fait de la capacité d'autorenouvellement des CSE. Ils ont démontré que ces dérivés kératinocytaires étaient capables de reconstruire un épiderme *in vitro* ([Guenou et al 2009](#)). Dans le cadre d'une collaboration avec le Dr. Gilles Lemaitre, nous avons eu accès à ce type de

- Méthodologie – Section 1 -

cellules. Pour la différenciation, les CSE ont été cultivées sur couches nourricières de fibroblastes, dans un milieu FAD (3/1 DMEM/F12) et 10% de SVF (FCII, Hyclone), supplémenté avec 5 µg/mL d'insuline, 0,5 µg/mL d'hydrocortisone, 10⁻¹⁰ M de toxine cholérique, 1,37 ng/mL de triiodothyronine, 24 µg/mL d'adénine et 10 ng/mL d'EGF. La différenciation de cellules souches embryonnaires vers un phénotype ectodermique a ensuite été induite par l'ajout de 0,5 nM de bone morphogenetic protein 4 (BMP4; R&D System) et 0,3 mM d'acide ascorbique (Sigma). Les cellules ont été cultivées dans ce milieu jusqu'à l'apparition de clones présentant un phénotype épithélial, qui ont été isolées, après quoi l'induction de la différenciation a été stoppée.



C Méthode de différenciation des CSE en kératinocytes



Tiré de (Guenou et al. 2009)

Figure 40 : Présentation des différents modèles cellulaires.

Trois modèles ont été utilisés au cours de ce travail : deux modèles de kératinocytes humains primaires (A-B) et un modèle de dérivés kératinocytaires à partir de cellules souches embryonnaires (C). **A.** Les kératinocytes épidermiques totaux ont été extraits par digestion enzymatique à partir d'une biopsie cutanée de tissu sain. Ils ont été ensemencés dans des flacons de culture dont la surface est traitée au collagène I. Seul les kératinocytes de la couche basale, exprimant fortement des molécules impliquées dans l'adhésion, comme l'intégrine- $\alpha 6$, adhèrent rapidement au support de culture. Les cellules non adhérentes ont été éliminées. La fraction récupérée contient uniquement des kératinocytes adhérant fortement au support, enrichie en kératinocytes précurseurs. C'est la fraction Adh^{+++} . **B.** Les kératinocytes totaux sont marqués avec un anticorps dirigé contre l'intégrine- $\alpha 6$, et clonés par cytométrie en flux dans des plaques 96 puits. Pendant 2 semaines, les clones sont cultivés dans les puits. Ils sont ensuite sous-cultivés successivement pendant plusieurs semaines jusqu'à épuisement du potentiel prolifératif. Les clones proliférant le plus longtemps sont des holoclones, enrichi en cellules souches kératinocytaires. **C.** La différenciation de CSE en kératinocytes est induite par l'addition de BMP4 et d'acide ascorbique au milieu de culture. L'avancement du processus de différenciation est suivi par la disparition des marqueurs de pluripotence Oct4 et Nanog, et l'apparition consécutive des marqueurs épithéliaux kératine 8 et kératine 18, puis apparition des marqueurs kératinocytaires kératines 5 et 14 et des intégrines $\alpha 4$ et $\beta 4$.

II. Conditions de cultures des kératinocytes.

Deux systèmes de culture ont été utilisés lors de ce travail : un milieu non-défini contenant du sérum et nécessitant des couches nourricières de fibroblastes dont la prolifération a été arrêtée par irradiation (milieu Green), et un milieu semi-défini, sans sérum et ne nécessitant pas l'usage de couches nourricières (milieu KFSM : Keratinocyte Serum Free Medium).

III. Transductions des kératinocytes à l'aide de vecteurs lentiviraux.

1. Design et production des vecteurs lentiviraux.

Toutes les transductions lentivirales ont été réalisées à l'aide de vecteurs lentiviraux non réplicatifs produits par la société Vectalis[®]. Les séquences d'intérêt ont été intégrées dans des plasmides dérivés du virus HIV-1 par clonage PCR et ligation. Cinq vecteurs ont été utilisés au cours de ces travaux : ils permettent l'expression de la GFP seule, de la GFP et d'une séquence codant le gène *KLF4*, ou de la GFP et d'un shARN anti-*MXD4*, anti-*MYC*, ou anti-*KLF4* (Figure 41). Ils possèdent tous le même « backbone » (squelette), et leur spécificité provient de l'introduction d'une séquence spécifique permettant la modulation des gènes étudiés. Tous les transgènes sont placés sous le contrôle du promoteur EF1 α , et la présence d'une séquence WPRE (Woodchuck hepatitis virus post transcriptional regulatory element) permet la stabilisation de l'ARNm transcrit en facilitant son exportation du noyau. Les séquences cibles des différentes constructions peuvent être trouvées en annexes (Figure S1).

2. Protocole de transduction des kératinocytes.

Les transductions sont réalisées sur des kératinocytes à environ 20% de confluence. La transduction a lieu dans du milieu dont le sérum a été décomplémenté (inactivation par chauffage à 56°C). Les cellules sont incubées sur la nuit avec les particules virales (multiplicité d'infection [M.O.I.] à 20) en présence d'hexadiméthrine bromide (polybrène) à 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Sigma-Aldrich). Le lendemain, les cellules sont lavées 3 fois au PBS, puis du milieu frais est ajouté. Après 3 jours, les kératinocytes à environ 80% de confluence sont collectés et triés par cytométrie en flux (MoFlo, Beckman-Coulter) grâce à l'expression de la protéine recombinante GFP exprimée par le gène rapporteur. Ils sont ensuite ensemencés en cultures de masse à la densité de 1000/cm² ou clonés par cytométrie en flux dans des plaques 96 puits.

- Méthodologie – Section 1 -

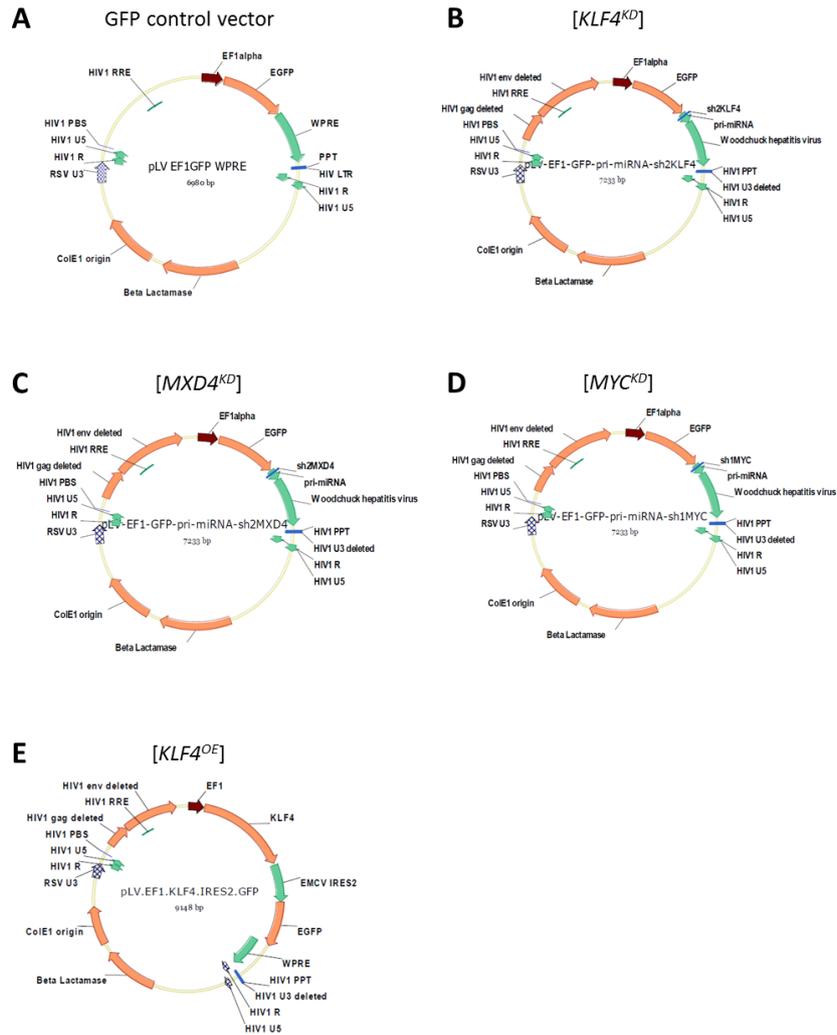


Figure 41 : Cartes des plasmides utilisés pour générer les particules virales.

Les ADN doubles brins ont été générés par hybridation de deux oligonucléotides fournis par Eurogentec, contenant un site de digestion XbaI sur chacun des deux brins. L'ADN double brin a été introduit par ligation cohésive entre le squelette du pri-miARN et le plasmide lentivirus (basé sur HIV1) précédemment digéré par XbaI. Le pri-miARN est localisé après la séquence codante pour la EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein), insérée dans une cassette d'expression sous le contrôle du promoteur EF1. La séquence WPRE (Woodchuck Hepatitis Virus (WHP) Posttranscriptional Regulatory Element (WPRE)), une fois transcrite, crée une structure tertiaire favorisant l'expression du gène associé **A**. Carte du plasmide contrôle. Il ne contient que la EGFP, sans séquence codant des shARN. **B-D** : Cartes des plasmides utilisés pour générer les contextes cellulaires $[KLF4^{KD}]$, $[MXD4^{KD}]$ et $[MYC^{KD}]$. **E**. Carte du plasmide utilisé pour générer le contexte cellulaire $[KLF4^{OE}]$.

IV. Analyse de l'expression des gènes et de la stabilité génomique.

Deux méthodes ciblées (quantification de l'expression de transcrits d'intérêt) et une méthode globale (transcriptomique) ont été utilisées pour quantifier le niveau d'expression de transcrits. La stabilité génomique a été évaluée par séquençage de l'exome, réalisé auprès de la société Integragen.

1. Méthodes ciblées.

a. Rétrotranscription des ARN et RT-q-PCR.

Les ARN totaux ont été extraits avec le kit RNeasy Mini Kit (Qiagen) selon le protocole du fournisseur, et leur pureté a été quantifiée par le ratio des absorbances 260/280 (nm). Ils ont ensuite été rétro-transcrits en ADNc avec le kit Superscript II Reverse Transcriptase (Life Technologies) selon le protocole du fournisseur. Lors des réactions de RT-q-PCR, l'amplification et la détection des séquences spécifiques ont été faites avec des sondes TaqMan (ThermoFischer) dirigées contre *MXD4* (Hs01557630_m1), *MAX* (Hs00231142_m1), *MYC* (Hs00153408_m1), *KRT1* (Hs00196158_m1), *KRT10* (Hs00166289_m1), *MXD1* (Hs00965581_m1), *MKI67* (Hs04260396_g1), *18S* (Hs03003631_g1). Les réactions sont menées sur l'instrument CFX96 (BioRad), et le logiciel CFX Manager (BioRad) est utilisé pour déterminer les niveaux d'expression des différents gènes d'intérêt (méthode du $\Delta\Delta Ct$).

b. PCR digitales en gouttelettes.

Les kératinocytes en suspension ont été filtrés (tamis cellulaire 40 μm), puis un nombre discret de cellules a été isolé par cytométrie en flux sur la base de la morphologie cellulaire (SSC-FSC) ou de l'expression de la GFP. Le protocole complet des étapes de clonage, de lyse cellulaire, de rétrotranscription et de PCR en gouttelettes est décrit dans l'article correspondant (Article 1).

2. Méthodes globales.

a. Séquençage des ARN et analyse des transcrits différentiellement exprimés.

Les ARN totaux d'holoclone de kératinocytes [*MXD4^{WT}*] et [*MXD4^{KD}*] (environ 70 PD) ont été extraits avec le kit RNeasy Mini Kit (Qiagen) selon le protocole du fournisseur, et leur pureté a été quantifiée par le ratio des absorbances 260/280 (nm). Les ARN ont été qualifiés par la banque ADN/ARN du Centre National de Recherche en Génomique Humaine (CNRGH, CEA). Les libraires de RNA-seq ont été préparées en accord avec le protocole Illumina TruSeq, en triplicat biologiques. Les 6 échantillons ont été séquencés sur un séquenceur Illumina HiSeq 4000, en pair-end. Les fichiers contenant les informations de séquençage (fichiers .fastq) ont été ensuite traités par Altrabio. Ils ont d'abord été nettoyés des séquences adaptatrices et des séquences possédant un faible score de qualité (Score de qualité < 15), de chaque côté des fragments lus. Les fragments de moins de 45 paires

- Méthodologie – Section 1 -

de bases ont été éliminés des analyses. Les séquences nettoyées ont été alignées sur les séquences du génome Homo Sapiens (version GRCh38), et associées aux annotations transcriptomiques (Ensembl version 81), téléchargée sur le site GENCODE. La normalisation et le comptage des séquences lues ont été faits avec le package de R (version 3.2.2) DESeq 2. Les ARN dont l'occurrence est inférieure à 1/1 000 000 dans au moins 2 échantillons ont été éliminés de l'analyse. La classification hiérarchique a été faite en utilisant la méthode de Ward et/ou la méthode d'agglomération complète (approche « bottom-up », où la hiérarchie est construite par le bas de l'arbre). L'expression différentielle des gènes a été réalisée avec le package limma de R.

b. Séquençage de l'exome.

La préparation des bibliothèques, la capture de l'exome, le séquençage et l'analyse des résultats ont été réalisés par IntegraGen SA (Evry, France). Le détail complet du séquençage de l'exome est disponible dans la section « Supplemental Informations » de l'article 3. Cette méthode est valide à la fois pour l'exome des cellules traitées à la kenpaullone (article 3) et également pour les kératinocytes basaux [*MXD4^{WT}*] et [*MXD4^{KD}*].

V. Détection des protéines et quantification des interactions protéines-protéines.

1. Détection et quantification des protéines par Western-blot

Les anticorps utilisés lors des recherches concernant le réseau de transcription MYC/MAX/MAD sont les suivants : MAX (Abcam, clone EPR19352), MAD4 (Novus Biological, H00010608-B02P), c-MYC (Abcam, clone Y69), ΔNp63 (Abcam, clone 4A4). Le protocole de détection des protéines par Western-blot, commun à tous les résultats, peut être trouvé dans la section « Materials and Methods » de l'article 3.

2. Détection des protéines par immunofluorescence

a. Dans des coupes de tissus sains/épidermes reconstruits.

Les tissus et les épidermes reconstruits (3 semaines post-ensemencement) ont été récupérés et inclus en paraffine (société Novaxia) et/ou en OCT (Optimal Cutting Temperature compound). Le marquage des structures est réalisé avec de l'hématoxyline, éosine et safran (coloration HES). Des coupes de 8 μm d'épaisseur. Les anticorps primaires utilisés pour les immunomarquages sur des coupes de tissus sont les suivants : involucrine (Abcam, ab53112), β-caténine (Abcam, clone 15B8 et clone E247), MAD4 (Abcam, ab111062), laminine-5 (Abcam, clone P3H9-2), intégrine-α6 (BD Pharmingen, 555736). Ils ont été incubés 1 heure à température ambiante (TA), puis les coupes ont

- Méthodologie – Section 1 -

été lavées 3 fois au PBS-Tween 0.2%, puis incubés 1 heure à TA avec les anticorps secondaires adaptés à l'espèce de l'anticorps primaire (anti-souris ou anti-lapin couplé à l'Alexa488 ou l'Alexa594, Invitrogen). Les coupes ont ensuite été lavées 3 fois au PBS-T 0.2% de nouveau, une goutte de liquide de montage FluoroShield (Sigma-Aldrich) contenant du DAPI a ensuite été déposée sur la coupe et celle-ci a été scellée par une lamelle. Les contrôles négatifs correspondent à l'incubation de l'anticorps secondaire uniquement.

L'acquisition des images a été faite avec un microscope confocal SP8 (Leica) ou un Axio-observer Z1 (Zeiss) à la plateforme d'imagerie-cytométrie de Genethon. L'analyse de l'expression spatiale de MAD4 a été réalisée avec ImageJ (version 1.52a).

b. Dans des cellules en culture.

Les cultures de kératinocytes à environ 50% de confluence ont été fixées 10 minutes à 4°C au paraformaldéhyde (PFA) 4% (Sigma), puis perméabilisées 5 minutes avec du Triton 0.1% dans du PBS (Sigma). Les cellules ont été lavées 5 fois avec de la BSA 5% (Bovine Serum Albumin) (blocage des sites non spécifiques), puis incubées avec les anticorps primaires 1 heure à température ambiante avec l'anticorps primaire anti-Ki67 (Abcam, ab15580). Après lavages, incubation avec l'anticorps secondaire et lavages de nouveau, les cellules ont été incubées 10 minutes avec du DAPI à 1 µg/mL.

L'acquisition des images et l'analyse de la proportion de cellules positives pour le marqueur de prolifération Ki67 ont été réalisées avec l'imageur à haut-contenu CellInsight CX7 (ThermoFischer Scientific) et le logiciel dédié, Studio.

3. Quantification des interactions protéines-protéines avec un imageur haut-contenu : le CellInsight CX7.

Les interactions entre MAX et ses partenaires MAD4 et c-MYC ont été quantifiées par la technique de PLA (Proximity Ligation Assay). Les kératinocytes d'holoclones [*MXD4^{WT}*] et [*MXD4^{KD}*] ont été ensemencés dans des plaques 96 puits TPP (Dutscher) à la densité de 3000 cellules/cm² en milieu Green avec couches nourricières. Une fois la confluence de 50% atteinte, les cellules ont été fixées au (PFA) 4% (Sigma), puis perméabilisées 5 minutes avec du Triton 0.1% dans du PBS (Sigma) et lavées. La détection des interactions MAX/MAD4 et MAX/c-MYC a été réalisée avec le kit DuoLink Starter Kit Red Mouse/Rabbit (Sigma) selon le protocole du fournisseur. Les anticorps primaires utilisés sont les suivants : MAX (NovusBio, clone 4E10-1A9), c-MYC (Abcam, clone Y69), MAD4 (Abcam, ab66367). Les noyaux ont été marqués au DAPI, puis les cellules sont conservées dans du PBS. Le contrôle négatif correspond aux étapes normales de marquages mais sans l'incubation des anticorps primaires.

- Méthodologie – Section 1 -

L'acquisition des images et le comptage du nombre de signaux PLA par cellule ont été réalisés avec l'imageur à haut-contenu CellInsight CX7 (ThermoFischer Scientific) et le logiciel de pilotage et d'analyses dédié, Studio. Pour chacune des conditions [*MXD4^{WT}*] et [*MXD4^{KD}*], 2000 cellules par puits et 20 puits (soit 40 000 cellules) ont été analysées. Le pipeline d'analyse est le suivant (Figure 42) :

- BioApplication utilisée : SpotDetector
- Détection des noyaux sur la base du marquage DAPI, segmentation, élimination des débris et des cellules en bords de champs.
- Détection des points de PLA dans le canal 2, à la longueur d'onde 550 nm, en utilisant la fonction « Local Maxima ».
- Extraction des données brutes et traitement dans Excel afin de soustraire le bruit de fond des contrôles négatifs aux diverses conditions expérimentales.

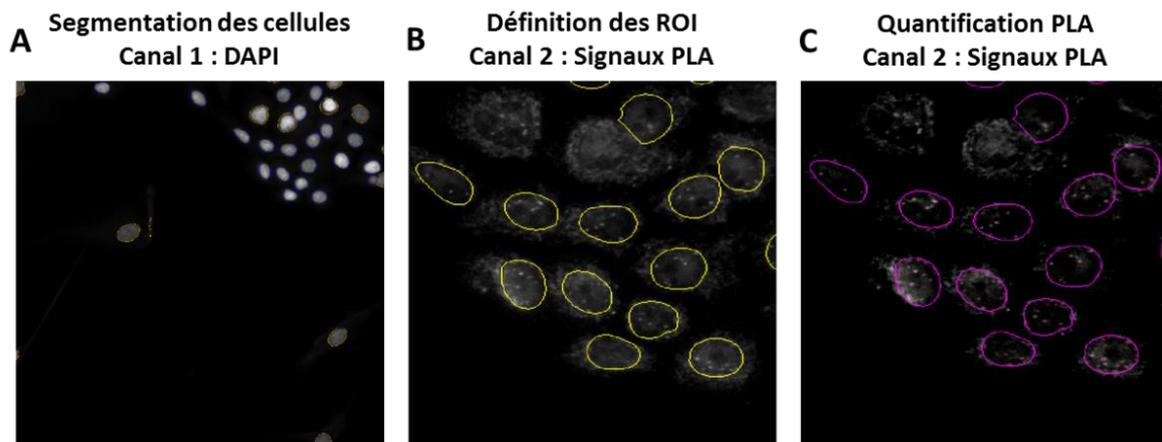


Figure 42 : Pipeline de quantification des signaux PLA par la technologie de microscopie haut-contenu CX7.

Des holoclones de kératinocytes [*MXD4^{WT}*] et [*MXD4^{KD}*] ont été cultivés en plaques 96 puits en présence de couches nourricières et sérum. Après 4 jours de prolifération, les cellules ont été fixées et les marquages PLA ont été effectués, puis les noyaux ont été colorés au DAPI. La quantification du nombre de signaux PLA par cellule a été réalisée avec un microscope haut-contenu CX7. **A.** Etape de segmentation : les cellules sont segmentées sur la base du marquage des noyaux avec le DAPI. Les cellules touchant les bords, et les cellules de tailles extrêmes sont éliminées des analyses (orange). Les cellules valides (bleues) sont ensuite conservées pour les étapes suivantes. **B.** Etape de détermination des ROI (Region Of Interest) : Basé sur les masques du canal 1 (cellules valides), les ROI sont déterminées, correspondant aux zones dans lesquelles seront analysées les signaux PLA. **C.** Etape de quantification du nombre de signaux PLA : En utilisant la fonction de détection « Local Maxima », le nombre de signaux PLA par cellule est déterminé pour chaque contexte cellulaire et les contrôles négatifs, où l'étape d'incubation avec les anticorps primaires n'est pas effectuée.

VI. Production et qualification d'épidermes reconstruits sur gel de fibrine.

1. Production des épidermes reconstruits : modèle gel de fibrine.

Le modèle de greffon utilisé en thérapie cellulaire cutanée chez les grands brûlés est basé sur l'utilisation de gels de fibrine, obtenue à partir de plasma sanguin. Ce protocole a été adapté au travail de laboratoire pour produire un modèle de recherche permettant de générer un épiderme complet entièrement stratifié *in vitro* ([Alexaline et al 2015](#)). Il se compose de plusieurs étapes : la préparation du gel de fibrine, l'ensemencement et la prolifération en 2 dimensions des kératinocytes (étape en immersion) et le processus de différenciation des kératinocytes (étape en émergence) qui permet la stratification de l'épiderme en 3 dimensions.

Le protocole de production des épidermes reconstitués est décrit dans la section correspondante de l'article 3 (en Annexes).

2. Qualification des épidermes reconstruits : tests in vitro.

La qualité des épidermes reconstruits reflète directement la présence et la fonctionnalité des PK présents dans la préparation cellulaire. Au cours de ma thèse, j'ai développé une batterie de tests fonctionnels et de critères histomorphologiques qui permettent de déterminer la qualité d'un épiderme reconstruit en culture.

a. Quantification de la polarisation des cellules de la couche basale (**Figure 43A**).

Dans le tissu épidermique sain, les kératinocytes de la couche basale sont polarisés et possèdent un pôle basal, en contact avec la lame basale, et un pôle apical. La polarisation des cellules basales représente donc un des paramètres permettant d'estimer la qualité de l'épiderme généré.

Au cours de ma thèse, j'ai développé une méthode d'analyse de la polarisation des noyaux d'un épithélium (collaboration avec le Dr. Daniel Stockholm, plateforme imagerie-cytométrie, Genethon, Evry, France). Cette méthode se base sur la détection des noyaux dans un tissu et leur orientation spatiale sur l'image. A partir d'une image d'une coupe d'épiderme reconstruit dont les noyaux ont été marqués au DAPI, l'image est traitée dans le logiciel ImageJ. Tout d'abord, un seuil de signal positif est déterminé afin de détourner les noyaux. Une fois le seuil déterminé, des mesures quantitatives de chacun des objets détournés ont été extraites. Il s'agit de la surface et de descripteurs de forme, notamment le centre de gravité de l'objet, qui est assimilé à une ellipse. Cette assimilation permet de déterminer son orientation dans l'espace en considérant la longueur de l'ellipse et son

- Méthodologie – Section 1 -

centre de gravité. Ces données brutes ont été traitées dans Excel pour les ramener à une mesure d'angle situé entre 0° et 90°. Pour la visualisation des données, un court script RStudio a été développé.

b. Tests fonctionnels en relation avec la fonction barrière de l'épiderme.

La fonction majeure de l'épiderme est d'empêcher les flux de l'extérieur vers l'intérieur du corps humain et inversement. Plusieurs tests fonctionnels en relation avec la fonction barrière de l'épiderme ont été mis en place au laboratoire pour évaluer sa qualité.

i. Quantification de la barrière « inside-out » : test TEWL (Trans Epidermal Water Loss).

Ce test repose sur une mesure de la quantité d'eau diffusée et évaporée sur une surface donnée de tissu. Un déficit dans la fonction barrière de l'épiderme peut être détecté grâce à ces mesures, par exemple suite à une brûlure, une coupure ou une manipulation appelée le « tape stripping » qui consiste à ôter la couche cornée de l'épiderme.

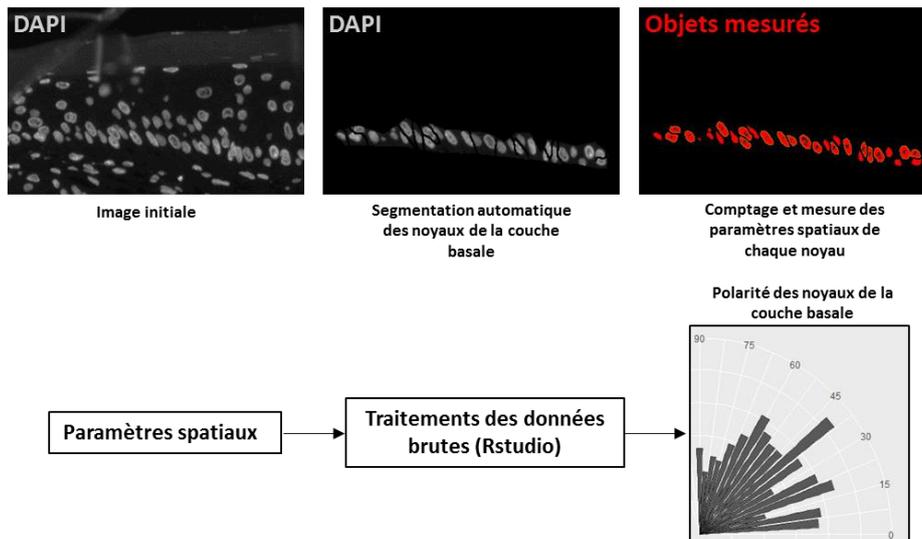
Après 2 semaines de culture en émersion, les épidermes reconstruits ont été séchés à l'air libre pendant 1 heure, et 4 mL de PBS ont été déposés dans chacun des puits. Après avoir calibré la sonde TEWL (modèle AF200, Biox AquaFlux) selon le protocole du fournisseur, une mesure de la masse d'eau perdue ($\text{g}/\text{m}^2\text{h}$) est prise dans chacun des puits.

ii. Quantification de la barrière « outside-in » : test du Lucifer Yellow (Figure 43B).

Le principe de ce test consiste à mesurer la capacité d'un épiderme à empêcher un produit liquide extérieur de diffuser à travers celui-ci. Il repose sur la détection et la quantification par spectrophotométrie d'une molécule colorée à travers l'épiderme.

Dans chacun des puits, 4 mL de PBS ont été déposés. Dans chacun des inserts, 200 μL de Lucifer Yellow 1 mM (Sigma) ont été déposés. Toutes les heures pendant 8 heures, 2*100 μL du milieu dans le puits ont été prélevés, et leur absorbance à 450 nm a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (All Sheng AMR-100). Une gamme étalon a été utilisée pour calculer la quantité de matière qui a diffusé.

A Traitement des images : quantification de la polarité des noyaux



B Schéma du Lucifer Yellow Assay

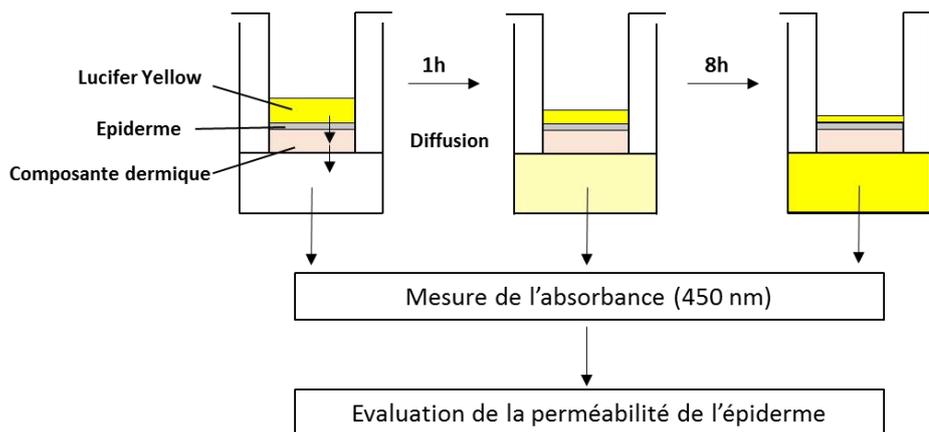


Figure 43 : Représentation schématique des tests *in vitro* mis en place pour évaluer la qualité des épidermes reconstruits.

Des holoclones de kératinocytes [$MXD4^{WT}$] et [$MXD4^{KD}$] ont été utilisés pour reconstruire des épidermes *in vitro*. Des tests fonctionnels ont été développés au laboratoire afin d'évaluer la qualité des épidermes reconstitués. **A.** Quantification de la polarité des noyaux : Des coupes d'épidermes sont marquées au DAPI afin de détecter les noyaux en microscopie. A l'aide du logiciel ImageJ, les noyaux de la couche basale de l'épiderme sont segmentés, puis des paramètres spatiaux, tels que l'angle entre la longueur du noyau et l'horizontal, sont mesurés et extraits dans Excel. Les données brutes sont ensuite traitées par un script R permettant de générer les graphiques polaires. **B.** Evaluation de la fonction barrière de l'épiderme : le colorant Lucifer Yellow est déposé sur les épidermes, et la diffusion du colorant dans le liquide sous-jacent est mesurée toutes les heures par spectrophotométrie à 450 nm. A partir d'une courbe étalon, il est ensuite possible de calculer la quantité de matière diffusée à travers le tissu au cours du temps.

SECTION 2

Détection et quantification absolue de séquences nucléiques à l'échelon de la cellule unique.

Publication numéro 1

Methods in Molecular Biology
DOI 10.1007/7651_2018_149
© Springer Science+Business Media New York 2018



Quantitative Detection of Low-Abundance Transcripts at Single-Cell Level in Human Epidermal Keratinocytes by Digital Droplet Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

Frédéric Auvré, Julien Coutier, Michèle T. Martin, and Nicolas O. Fortunel

Objectif: Détecter et quantifier des transcrits, y compris faiblement exprimés, dans des microéchantillons cellulaires jusqu'à la cellule unique.

Pour cela, des microéchantillons ont été générés par cytométrie en flux (quantité décroissante de 40, 20, 5 et 1 cellule) afin d'analyser un nombre défini de cellules et de déterminer la limite inférieure du système. Des sondes anti-*KLF4* et anti-*MXD4* ont été utilisées afin de détecter par PCR digitale en gouttelettes (RT-ddPCR) les transcrits associés. La méthode, combinée à une chaîne de haut niveau technologique, permet de quantifier des transcrits de l'ordre de 10 copies d'ARNm par cellule, jusqu'à l'échelon de la cellule unique. De plus, une corrélation linéaire entre le nombre de transcrits détectés et le nombre de cellules contenues dans le microéchantillon a été établie, indiquant que la méthode est fiable et robuste sur une gamme allant de 40 à 1 cellule.

- Méthodologie – Section 2 -

Une problématique scientifique importante est de disséquer et comprendre ces réseaux qui assurent l'homéostasie et la régénération, mais également les processus pathologiques. Pour cela, il est essentiel de les caractériser au niveau génétique et épigénétique. Cette caractérisation doit également prendre en compte l'hétérogénéité cellulaire des tissus, et nécessite donc une approche à l'échelon de la cellule unique.

Ici, l'objectif de l'étude est de proposer une méthode qui permette de caractériser, au niveau génétique, des micro-populations de CSK normales ou pathologiques. La méthode se base sur la quantification absolue de transcrits et doit être suffisamment sensible pour détecter de très faibles expressions (environ 10 copies d'ARNm d'intérêt par cellule). Dans cette publication, nous proposons un protocole de détection et de quantification de transcrits dans des microéchantillons cellulaires, jusqu'à la cellule unique, en combinant l'isolation de sous-populations kératinocytaires par cytométrie en flux à la PCR digitale en gouttelettes (RT-ddPCR).

La RT-ddPCR est basée sur la technologie de la PCR, mais permet une quantification absolue des transcrits, au contraire de la PCR-q classique qui indique un ratio d'expression entre deux conditions. Le principe de la ddPCR repose sur le fractionnement du volume réactionnel en plusieurs milliers de microéchantillons contenant les cibles nucléiques d'intérêt. Le fractionnement repose sur une émulsion eau-huile, ou le mélange réactionnel aqueux est encapsulé dans des microgouttelettes d'huile. L'amplification des cibles nucléiques est ensuite réalisée d'une manière similaire aux tests TaqMan, indépendamment dans chacune des gouttelettes générées. La détection du signal de fluorescence est binaire : les gouttelettes positives (présence de la cible) et négatives (absence de la cible) sont comptées, puis le nombre absolu de transcrits de l'échantillon est calculé selon la loi de Poisson.

Après exclusion des débris cellulaires et des doublets de cellules, des préparations cellulaires enrichies en kératinocytes basaux ([Fortunel et al 2011](#)) ont été triées par cytométrie en flux selon leur morphologie. Afin de générer les microéchantillons cellulaires, les kératinocytes ont été triés dans des plaques 96-puits préalablement remplis avec du tampon de lyse, selon une gamme décroissante de 40, 20, 5 et 1 cellule par puits afin de réduire l'échantillon à la cellule unique et de déterminer les limites du système. Les cellules ont été lysées, puis les ARN ont été retrotranscrits en ADNc. Les lysats contenant les ADNc ont été mélangés avec les sondes TaqMan dirigées contre les ADNc *KLF4* et *MXD4*, les gouttelettes générées, et le nombre de transcrits par cellule quantifié. Les résultats ont été générés à partir de 3 expériences indépendantes, et chaque condition est réalisée en 8 réplicats techniques. Les 4 microéchantillons ont donné des signaux interprétables pour les deux transcrits testés ([Figure 44](#)). Pour chacun des deux transcrits étudiés, une régression linéaire peut être établie entre le nombre

- Méthodologie – Section 2 -

de cellules analysées et le nombre de transcrits détectés. Le coefficient de corrélation R^2 est de 0.9778 pour *KLF4*, et 0.9781 pour *MXD4*. La linéarité est conservée jusqu'à la cellule unique, indiquant que la méthode est fonctionnelle dans la gamme de nombre de cellules choisie. A l'échelon de la cellule unique, la quantification des transcrits indique une valeur moyenne de $9,5 \pm 10,1$ transcrits *KLF4* par cellule, et $10,2 \pm 6,1$ transcrits *MXD4* par cellule.

Cette étude démontre qu'il est techniquement possible de détecter et quantifier, de manière robuste et reproductible, des transcrits faiblement exprimés dans des microéchantillons de kératinocytes allant jusqu'à la cellule unique. Cette méthode de caractérisation pourrait permettre de distinguer des sous populations de PK sur la base d'une expression hétérogène de déterminants moléculaires contrôlant le caractère souche. De plus, elle présente l'intérêt de s'affranchir de la normalisation par un gène de ménage, parfois difficile à trouver, en se basant sur le dépôt d'un nombre discret de cellules par cytométrie en flux.

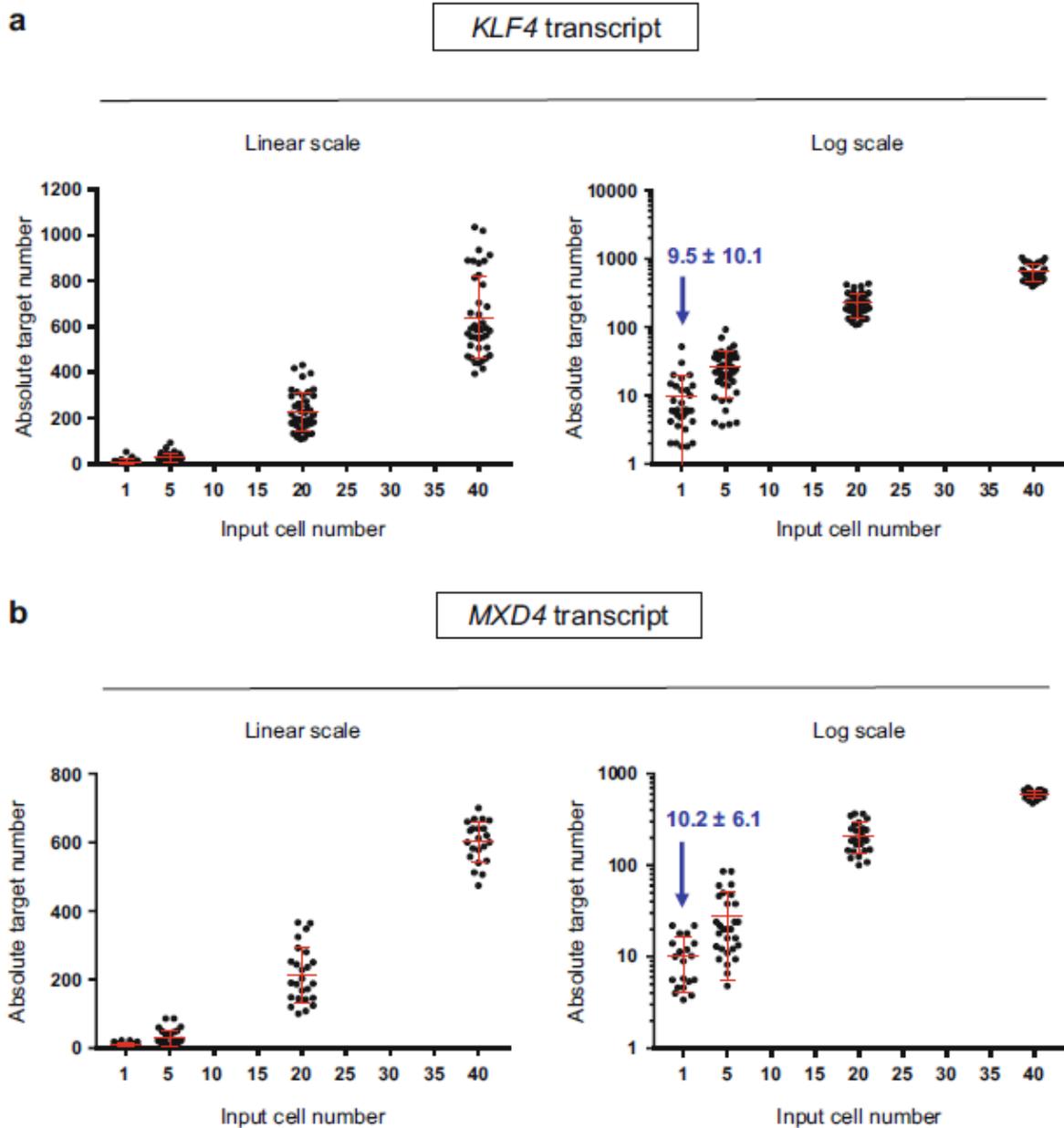


Figure 44 : Détection et quantification des transcrits *KLF4* et *MXD4* dans des microéchantillons de kératinocytes humains par RT-ddPCR.

La gamme de kératinocytes analysés est de 40, 20, 5 et 1 cellule par puits. Trois expériences indépendantes ont été réalisées. Chaque dépôt cellulaire par cytométrie en flux et la procédure qui s'ensuit a été réalisé au moins 8 fois par population, résultant dans l'analyse de 20-47 répliquats pour chaque condition. **(a,b)** Une corrélation linéaire est obtenue entre le nombre absolu de transcrits et le nombre de cellules analysées. Le coefficient de corrélation R^2 est de 0.9778 pour *KLF4*, et de 0.9781 pour *MXD4*. Le nombre de transcrit par cellule à l'échelon de la cellule unique est obtenu de manière reproductible : $9,5 \pm 10,1$ transcrits *KLF4* par cellule, et $10,2 \pm 6,1$ transcrits *MXD4* par cellule (moyenne + SD).

SECTION 3

Caractérisation de la capacité régénérative et de la présence de PK à l'aide d'un modèle *in vivo* de xénogreffes épidermiques itératives.

Publication numéro 2

Methods in Molecular Biology
DOI 10.1007/7651_2019_250
© Springer Science+Business Media New York 2019



Iterative Three-Dimensional Epidermis Bioengineering and Xenografting to Assess Long-Term Regenerative Potential in Human Keratinocyte Precursor Cells

Nicolas O. Fortunel, Emmanuelle Bouissou-Cadio, Julien Coutier, and Michèle T. Martin

Objectif : Mettre au point un test fonctionnel permettant la caractérisation des cellules souches kératinocytaires, fondé sur leur capacité de régénération de l'épiderme à long terme.

Pour cela, des greffons primaires d'épidermes ont été générés à partir d'holoclones de kératinocytes, et greffés sur des blessures cutanées dans la zone dorsale de souris, afin de quantifier le taux de prise de greffe et la qualité de reconstruction. Quatre semaines post-greffes, les épidermes ont été trypsinés et les kératinocytes récupérés afin de débiter un cycle de xénogreffe secondaire, de manière similaire au premier. La présence et l'aptitude de régénération épidermique à long terme des kératinocytes ont été caractérisés par la seconde greffe, itérative. La greffe itérative est le Gold-Standard pour la démonstration fonctionnelle de l'aptitude des CS de tous systèmes, en particulier le système hématopoïétique. Cependant, à notre connaissance, il s'agit de la première publication démontrant l'intérêt et la faisabilité d'une greffe itérative appliquée à la peau (murine ou humaine).

- Méthodologie – Section 3 -

Un modèle de xéno greffe d'épiderme reconstitué humain chez la souris *nude* a été mis au point précédemment ([Alexaline et al 2015](#)). Il permet d'évaluer le potentiel régénératif de kératinocytes à court terme, en évaluant le pourcentage de prise de greffe et en qualifiant la régénération par des mesures histomorphométriques et des marquages immunohistologiques des greffons. Cependant, il ne permet pas d'évaluer le potentiel régénératif des cellules souches à long terme dans les tissus reconstitués.

Notre hypothèse est que, bien que les progéniteurs soient capables d'assurer la prise de greffe rapide et le développement épidermique à court terme, le succès à long terme de la greffe d'épiderme repose sur la présence et les fonctionnalités des cellules souches au sein des cultures et des greffons.

Pour tester cette hypothèse, nous proposons un raffinement du principe de xéno greffe d'épiderme humain chez la souris. Le principe repose sur la génération et la greffe d'un second greffon produit à partir des kératinocytes issus du premier greffon (greffe itérative). Ainsi, la xéno greffe secondaire permet de caractériser à long terme la présence et la fonctionnalité des kératinocytes.

Dans cette étude, la descendance d'holoclone de kératinocytes a été utilisée pour générer les greffons, car ils présentent un très fort potentiel prolifératif et régénératif à long terme. Les kératinocytes ont été transfectés avec un vecteur exprimant le gène rapporteur GFP afin d'être détectable plus facilement lors des étapes de suivi et de tri cellulaire. Ils ont été cultivés pendant une semaine en présence de couches nourricières de fibroblastes irradiés. Ils ont ensuite été récupérés, et ensemencés sur des gels de fibrine, préalablement coulés dans des boîtes de Pétri, dans lesquels sont enchâssés des fibroblastes. Les kératinocytes ont été cultivés ainsi pendant 2 semaines afin de permettre leur propagation en deux dimensions et la génération d'une monocouche dense de kératinocytes. Ce tissu tridimensionnel constitue le greffon primaire. Il peut ensuite être greffé sur une blessure cutanée induite sur le dos d'une souris *nude*. Le greffon est maintenu sur la souris pendant 3 à 5 semaines. Le tissu est ensuite récupéré et analysé. Des paramètres comme la densité en kératinocytes, l'organisation de la couche basale, et l'expression de marqueurs de différenciation kératinocytaire permettent de déterminer la qualité de la reconstruction. Le taux de prise de greffe primaire est également calculé. Le greffon primaire humain est visible au centre de la coupe, encadré par la peau murine, facilement reconnaissable car présentant beaucoup de follicules pileux et un épiderme plus fin ([Figure 47A](#)). Ensuite, les kératinocytes sont extraits du greffon, triés par cytométrie en flux selon l'expression positive de la GFP, et utilisés de nouveau au cours du même processus pour générer un deuxième greffon successif.

Quatre semaines après la greffe secondaire, les souris sont sacrifiées et les greffons récupérés. Les tissus sont inclus en paraffine ou en OCT selon les besoins, et des coupes de tissus de 8 µm

- Méthodologie – Section 3 -

d'épaisseur sont réalisées. Les échantillons en paraffine sont colorés avec de l'hématoxyline, de l'éosine et du safran (HES) afin de colorer les différentes structures cellulaires et révéler l'organisation du tissu. L'épiderme humain du greffon secondaire présente une morphologie normale : on distingue toutes les couches de l'épiderme, y compris une couche basale dense et bien organisée, et une couche cornée (Figure 47B). Les échantillons en OCT sont utilisés pour réaliser des marquages immunohistochimiques à l'aide d'anticorps dirigés contre l'involucrine (marqueur de différenciation terminale), la kératine 10 (marqueur de différenciation des couches suprabasales) et la kératine 5 (marqueur de la couche basale). Les noyaux sont marqués au DAPI. L'expression des 3 marqueurs de structure est localisée dans les zones attendues (Figure 47C).

L'ajout de la greffe secondaire constitue un apport important par rapport au premier modèle développé : il permet d'évaluer le maintien d'un potentiel régénératif à long terme de PK. Les xéngreffes itératives ont été utilisées afin de montrer que *KLF4* est acteur clé dans le contrôle de l'aptitude de reconstruction épidermiques des PK : la capacité de régénération épidermiques des kératinocytes [*KLF4^{KD}*] est augmentée comparée aux cellules [*KLF4^{WT}*].

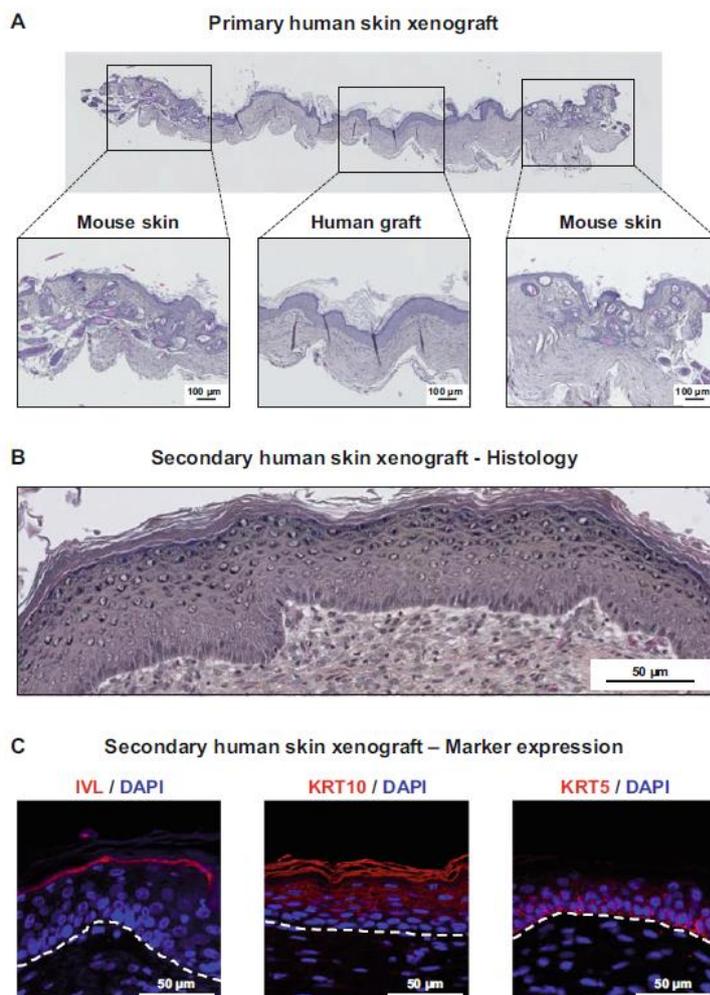


Figure 47 : Morphologie et marqueurs de différenciation de peaux reconstituées humaines issues de xéngreffes primaires et secondaires.

Après une xéngreffe primaire, les kératinocytes ont été récupérés et utilisés pour générer un second greffon. Après 4 semaines *in vivo*, le second greffon est récupéré et analysé. **A.** Coupe de xéngreffe primaire de peau humaine (centre) encadrée par la peau murine réceptrice (gauche et droite). Coloration HES. **B.** Coupe de xéngreffe secondaire de peau humaine colorée au HES. La morphologie de l'épiderme est normale : toutes les couches peuvent être observées, y compris une couche basale et une couche cornée. **C.** Coupes de xéngreffe secondaire de peau humaine marquées avec les anticorps anti-involucrine, kératine 10 et kératine 5. La localisation de ces marqueurs est normale. La ligne pointillée représente la limite derme-épiderme.

- Résultats -

RESULTATS

- Résultats -

Chapitre 1

Identification des gènes *KLF4* et *MXD4* en tant que candidats à la régulation du caractère souche des PK.

Objectif : Identifier des gènes candidats qui pourraient réguler le caractère immature des cellules souches kératinocytaires.

Résultats : 14 gènes présentent des régulations d'expression spécifiques dans la population la plus enrichie en cellules souches, dont les gènes *KLF4* et *MXD4*, qui ont été décrits comme interagissant avec la voie du TGF- β 1.

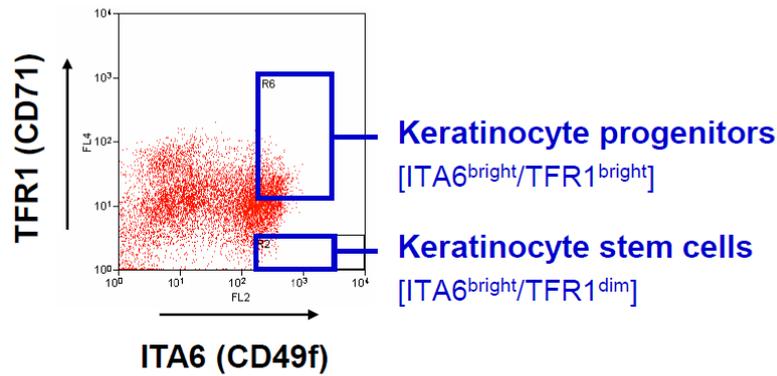
- Résultats - Chapitre 1 -

La stratégie d'identification de gènes candidats développée avant mon arrivée au laboratoire repose sur une approche comparative globale de l'expression des gènes dans les cellules souches *versus* progéniteurs kératinocytaires. Les kératinocytes totaux ont été extraits de biopsies cutanées, puis ils ont été marqués avec des anticorps dirigés contre l'intégrine- $\alpha 6$ (CD49f ou ITA6) et le récepteur à la transferrine (CD71 ou TFR1). L'intégrine- $\alpha 6$ permet de séparer les kératinocytes selon leur degré d'immaturation, des kératinocytes basaux les plus immatures [ITA6^{fort}] aux kératinocytes en cours de différenciation [ITA6^{faible/négatif}]. CD71 permet de séparer les kératinocytes en cycle [CD71^{fort}] des kératinocytes quiescents [CD71^{faible/négatif}]. Deux populations de kératinocytes ont été isolées par cytométrie en flux : une population [ITA6^{fort}/CD71^{faible}], enrichie en cellules souches quiescentes, et une population [ITA6^{fort}/CD71^{fort}], enrichie en progéniteurs en cycle (Figure 48). Les ARN totaux de chacune des deux sous-populations ont ensuite été extraits, rétrotranscrits en ADNc, et hybridés sur des puces à ADN pour procéder à une expérience de microarray. Les transcriptomes (expression des transcrits) des deux sous-populations ont ensuite été comparés afin de déterminer les gènes différentiellement exprimés entre les deux populations. Les ratios d'expression des transcrits exprimés dans les CSK *versus* les progéniteurs sont établis (appelés « fold-change »). Un seuil de « fold-change » de 1,5 est choisi pour définir les gènes différentiellement exprimés. La liste complète des gènes dérégulés a été déposée dans la base de données GEO (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo), sous le numéro d'accèsion No GSE68583. Une sélection de certains gènes identifiés par l'étude transcriptomique comparative est représentée Table 1.

Plusieurs gènes de la voie TGF- β ont été identifiés, mais également deux facteurs de transcription dont la fonction est reliée au contrôle de la prolifération cellulaire : il s'agit de *KLF4* (fold-change x1,8) et *MXD4* (fold-change x6,6), tous les deux surexprimés dans la population enrichie en cellules souches quiescentes. Ces gènes ont retenu l'attention du laboratoire car ils codent tous deux des facteurs de transcription, et parce que des interactions avec la voie du TGF- $\beta 1$ ont été décrites. Les données de la littérature ainsi que l'expertise du laboratoire dans la voie du TGF- $\beta 1$ ont conduit au choix de ces deux candidats.

Notre hypothèse de travail était que les gènes *KLF4* et *MXD4*, surexprimés dans une fraction enrichie en cellules souches *versus* progéniteurs, pourraient jouer un rôle important dans la biologie des CSK.

- Résultats - Chapitre 1 -



ITA6: integrin- α 6

TFR1: transferrin receptor-1

Figure 48 : Isolement de sous-populations kératinocytaires enrichie en cellules souches *versus* enrichie en progéniteurs.

Des kératinocytes fraîchement isolés de prépuces ont été marqués par des anticorps dirigés contre l'intégrine- α 6 et le récepteur à la transferrine CD71. Ils ont été triés par cytométrie en flux selon les profils d'expression de ces marqueurs. Deux sous-population ont été isolées : une population [ITA6^{fort}/CD71^{faible}], enrichie en cellules souches quiescentes, et une population [ITA6^{fort}/CD71^{fort}], enrichie en progéniteurs en cycle. Un profil de cytométrie représentatif est présenté ici (n=10 réplicats biologiques).

Table 1 : Sélection de gènes d'intérêt différentiellement exprimés identifiés par microarray.

+ : gènes surexprimés dans la fraction enrichie en CSK *versus* enrichie en progéniteurs.
 - : gènes sous exprimés dans la fraction enrichie en CSK *versus* enrichie en progéniteurs

Official gene symbol	Transcriptome array fold-change	Function
<i>KLF4</i>	+1.8	Proliferation regulation, cellular reprogramming
<i>KRT5</i>	+3.0	Keratinocyte stem cell phenotype (high)
<i>TFRC</i>	-2.9	Keratinocyte stem cell phenotype (low/neg)
<i>ALDH 3B1</i>	+8.1	Stem cell phenotype (high)
<i>HOXB1</i>	+1.8	Stem/progenitor cell fate regulation / morphogenesis
<i>HOXB2</i>	-1.6	Stem/progenitor cell fate regulation / morphogenesis
<i>HOXC6</i>	+4.2	Stem/progenitor cell fate regulation / morphogenesis
<i>GATA2</i>	+1.6	Stem/progenitor cell fate regulation
<i>MXD4</i>	+6.6	Proliferation regulation
<i>PITX1</i>	+1.8	Morphogenesis
<i>SMAD1</i>	+8.0	TGF- β /BMP signaling, proliferation, morphogenesis
<i>SMAD2</i>	-1.6	TGF- β /BMP signaling, proliferation, morphogenesis
<i>FOXH1</i>	+1.7	TGF- β /BMP signaling, proliferation, morphogenesis
<i>CTGF</i>	-1.9	TGF- β /BMP signaling, cell fate, tissue repair

Chapitre 2

Rôle du facteur de transcription KLF4 dans le contrôle des fonctionnalités des PK.

Publication numéro 3

nature
biomedical engineering

ARTICLES

<https://doi.org/10.1038/s41551-019-0464-6>

KLF4 inhibition promotes the expansion of keratinocyte precursors from adult human skin and of embryonic-stem-cell-derived keratinocytes

Nicolas O. Fortunel^{1,2,3*}, Loubna Chadli^{1,2,3,8}, Julien Coutier^{1,2,3,8}, Gilles Lemaître⁴, Frédéric Auvré^{1,2,3}, Sophie Domingues⁵, Emmanuelle Bouissou-Cadio^{1,2,3}, Pierre Vaigot^{1,2,3}, Sophie Cavallero^{1,2,3}, Jean-François Deleuze⁶, Paul-Henri Roméo^{2,3,7} and Michèle T. Martin^{1,2,3*}

⁸These authors contributed equally: Loubna Chadli, Julien Coutier.

Objectif : Caractériser le rôle de KLF4 dans le contrôle de l'expansion de PK adultes ou de kératinocytes dérivés de cellules souches embryonnaires.

Résultats : La répression de *KLF4* inhibe la différenciation kératinocytaire, permettant la préservation du caractère immature des PK. Elle augmente la prolifération et le potentiel clonogénique. En conséquence, la répression de KLF4 accroît le potentiel régénératif des PK. Ces résultats ont été obtenus à l'aide d'un milieu de culture avec sérum et couches nourricières, puis reproduits dans un milieu sans sérum ni couches nourricières. La modulation de ces fonctionnalités passe notamment par les voies TGF- β et Wnt/ β -caténine. Enfin, ce concept a été étendu aux kératinocytes dérivés de cellules souches embryonnaires, où la répression transitoire de *KLF4* par la kenpaullone (molécule chimique) accentue l'orientation vers un phénotype épithélial et améliore la régénération épidermique. Cette étude désigne *KLF4* comme un garant de l'immaturité des précurseurs, pouvant être utilisé comme cible moléculaire pour promouvoir l'expansion *ex vivo* de PK.

- Résultats - Chapitre 2 -

En thérapie cellulaire cutanée, la génération des greffons nécessite des phases d'amplification *ex vivo* durant lesquelles la préservation des fonctionnalités des PK au sein des cultures est primordiale afin de permettre une bonne prise de greffe et une bonne régénération. La recherche des déterminants moléculaires permettant de contrôler le caractère souche des kératinocytes est donc majeure, pour mieux comprendre l'homéostasie épidermique, mais également pour développer de nouvelles méthodes de thérapie cellulaire cutanée. La surexpression de *KLF4* dans les cellules souches kératinocytaires (Chapitre 1) suggère son importance dans la biologie de ces cellules. Le rôle de *KLF4* dans les cellules souches de kératinocytes a donc été exploré dans plusieurs modèles représentant différents stades d'immaturation du kératinocyte.

- Le premier modèle est celui des holoclones. Les holoclones possèdent un très fort potentiel prolifératif et régénératif, et correspondent à la définition fonctionnelle des CSK. Il a été utilisé principalement pour documenter la fonction du gène *KLF4* d'un point de vue fondamental.

- Le deuxième modèle cellulaire utilisé correspond à l'ensemble des kératinocytes de la couche basale de l'épiderme, sélectionnés par leur adhésion rapide au collagène I.

- Le troisième modèle utilisé est constitué de dérivés kératinocytaires obtenus à partir de cellules souches embryonnaires (collaboration avec l'institut i-Stem). Ce modèle permet un accès rapide à des banques cellulaires préalablement amplifiées. Cependant, il ne reproduit pas un phénotype de cellules souches kératinocytaires, et les cellules possèdent un potentiel de prolifération limité.

I. Stratégie mise en place pour étudier le rôle de *KLF4* dans les PK.

La stratégie mise en place pour étudier le rôle de *KLF4* est une approche de génomique fonctionnelle. L'expression de *KLF4* est modulée de manière stable par l'insertion de vecteurs lentiviraux codant la GFP seule (gène rapporteur) (*[KLF4^{WT}]*), ou la GFP plus un shARN dirigé contre l'ARNm de *KLF4* (*[KLF4^{KD}]*). La GFP permet de s'assurer de la transfection des cellules, et constitue également un outil utile pour la détection de celles-ci par cytométrie en flux et dans les greffons épidermiques. L'expression de *KLF4* a également été modulée de manière transitoire, par des siARN anti-*KLF4* ou une molécule de la famille des paullones : la kenpaullone. La répression par des shARN ou la modulation transitoire permettent une expression partielle des gènes, plus représentative d'un effet physiologique que la délétion totale de l'expression génique (« knock-out »). L'impact de la répression de *KLF4* sur les fonctionnalités des PK, à savoir la prolifération, le statut d'immaturation et la capacité régénérative, a été caractérisé (Figure 49).

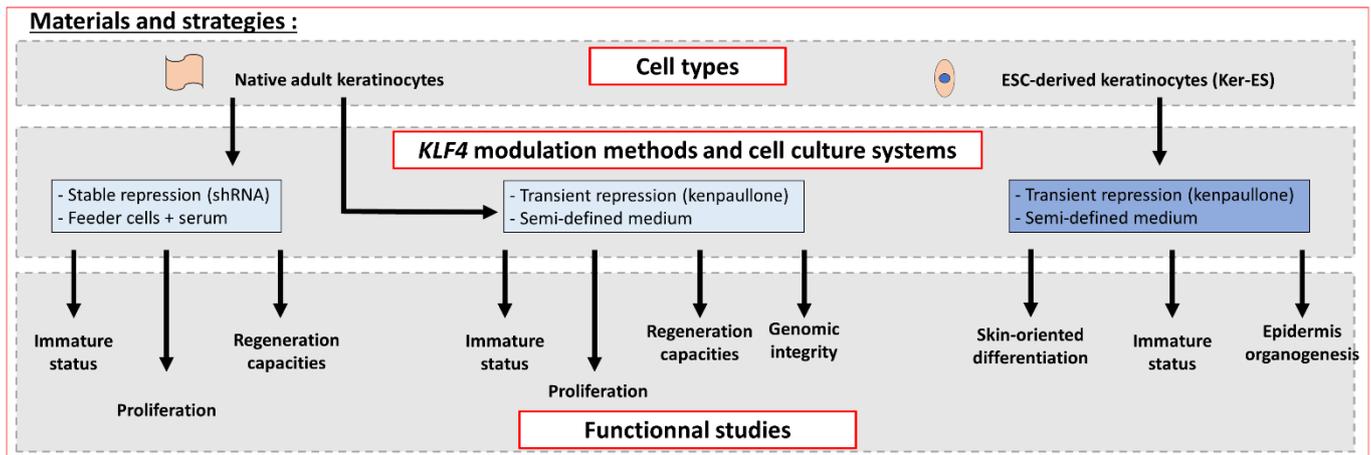


Figure 49 : Représentation schématique des modèles et stratégies utilisés pour étudier le rôle de *KLF4* dans les précurseurs épidermiques.

Trois modèles cellulaires ont été utilisés : le modèle des holoclones, correspondant à la descendance d'une CSK, le modèle des kératinocytes basaux, matériel de thérapie cellulaire cutanée, et le modèle des kératinocytes dérivés depuis des CSE. Une approche de génomique fonctionnelle est mise en place en réprimant *KLF4* de manière stable (shARN) ou transitoire (siARN, kenpaullone), dans deux milieux différents (avec ou sans sérum et couches nourricières). Ensuite, des études fonctionnelles caractérisant la prolifération, le statut immature et la capacité régénérative des cellules ont été menées.

II. Etude du rôle de *KLF4* dans les précurseurs de kératinocytes adultes au moyen d'une répression stable.

*A. La prolifération et le potentiel clonogénique des PK adultes dépendent de *KLF4*.*

Les kératinocytes [*KLF4*^{WT}] et [*KLF4*^{KD}] ont été cultivés en présence de couches nourricières de fibroblastes irradiés, dans du milieu contenant du sérum. Les ARN totaux et les protéines ont été extraits des cellules afin de vérifier que la modulation de *KLF4* est effective. Les cellules [*KLF4*^{KD}] présentent une répression de *KLF4* d'environ 50% au niveau des ARNm et 66% au niveau protéique (Figure 50), validant l'efficacité des shARN anti-*KLF4*.

- Résultats - Chapitre 2 -

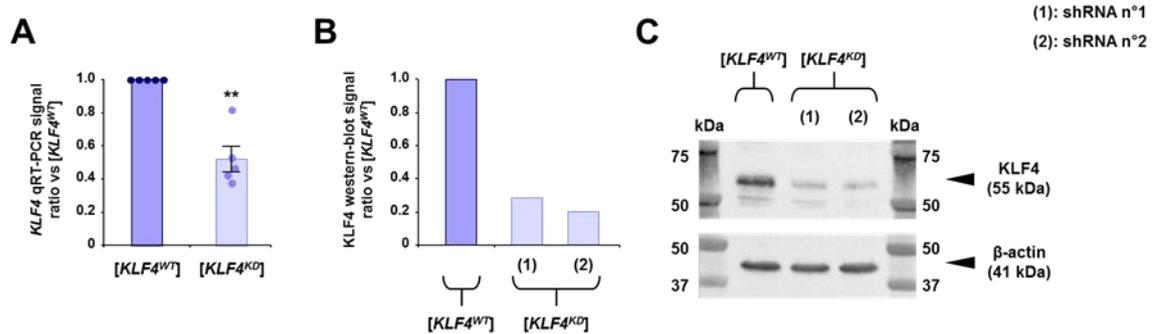


Figure 50 : Quantification de la répression de *KLF4* dans les holoclonés.

Les ARN totaux et les protéines ont été extraits de cellules [*KLF4*^{WT}] et [*KLF4*^{KD}], et l'expression de *KLF4* a été quantifiée par RT-q-PCR et western-blot. **A.** Quantification de l'expression des ARNm *KLF4* par RT-q-PCR. Une diminution d'environ 50% est détectée dans les cellules [*KLF4*^{KD}] comparé au contrôle (moyenne ± SEM, $p = 0,0079$, $n = 5$). **B-C.** Quantification de l'expression de la protéine *KLF4* par western blot. La répression de *KLF4* a été obtenue par deux séquences shARN différentes ($n = 3$).

Après une semaine de culture, les cellules ont été récupérées et le ratio d'expansion calculé (nombre de cellules récupérées / nombre de cellules ensemencées). Les ratios d'expansion pour les cellules [*KLF4*^{WT}] et [*KLF4*^{KD}] sont $39,4 \pm 2,9$ et $80,2 \pm 4,6$, respectivement (Figure 51A). Après une 2ème semaine de culture, les ratios d'expansion cumulés sont de $1,8 \times 10^3 \pm 0,3$ pour les cellules [*KLF4*^{WT}] et $5,9 \times 10^3 \pm 0,8$ pour les cellules [*KLF4*^{KD}] (Figure 51B). Quand *KLF4* est surexprimé, l'impact sur la prolifération est inversé : on observe une réduction de la prolifération (Figure 51C). La prolifération a ensuite été étudiée au niveau de la cellule unique. Les cellules [*KLF4*^{WT}] et [*KLF4*^{KD}] ont été clonées dans des plaques de cultures 96 puits à deux temps : 4 jours après transduction, et après 4 semaines d'expansion en culture de masse, afin de déterminer si l'accroissement de prolifération observée était stable au cours du temps et des amplifications successives. Quatre jours après transduction, les cellules ont été clonées et cultivées pendant deux semaines dans des microcultures clonales. La population [*KLF4*^{WT}] a donné naissance à 62 clones contre 153 clones pour la population [*KLF4*^{KD}] (seuil de taille de clone considéré : 10^4 cellules par clone) (Figure 51D). Après 4 semaines d'expansion en culture de masse, la procédure de culture clonale a été appliquée aux populations [*KLF4*^{WT}] et [*KLF4*^{KD}], comme précédemment. 43 et 95 clones (seuil : 10^4 cellules par clone) ont été produits par les cellules [*KLF4*^{WT}] et [*KLF4*^{KD}], respectivement (Figure 51E), indiquant que l'augmentation du potentiel clonogénique causée par la répression de *KLF4* était stable au cours du temps. Ces résultats indiquent que *KLF4* joue un rôle important dans le contrôle de la prolifération des PK.

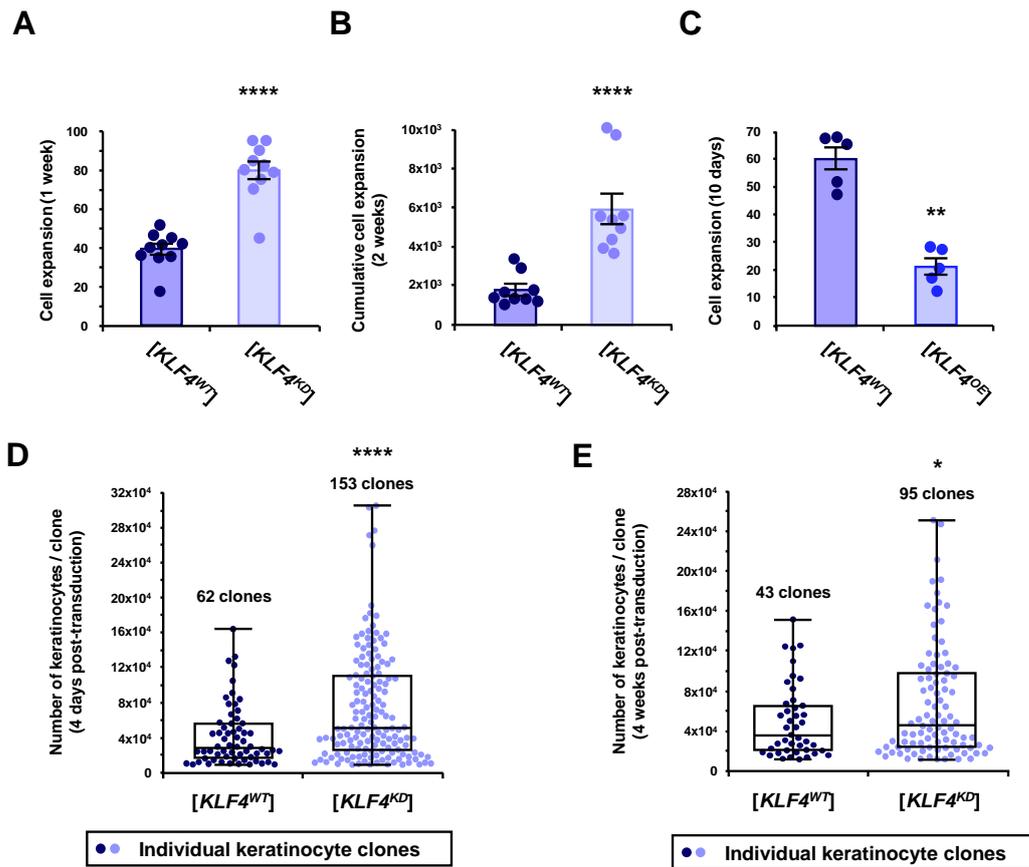


Figure 51 : Impact d'une répression stable de *KLF4* sur la prolifération.

Les cellules [*KLF4*^{WT}], [*KLF4*^{KD}] et [*KLF4*^{OE}] fraîchement transduites ont été cultivées en milieu contenant du sérum et des couches nourricières de fibroblastes. L'impact de la modulation de *KLF4* sur la croissance de masse et le potentiel clonogénique a été quantifié. En culture de masse, les ratios d'expansions ont été calculés (nombre de cellules récupérées / nombre de cellules ensemencées) après un temps de culture défini. Le potentiel clonogénique a été caractérisé par des microcultures clonales parallèles initiées juste après le tri de la transduction, ou 4 semaines après. **A.** Quantification de la prolifération après 1 semaine de culture (moyenne ± SEM, $p = 0,0001$, $n = 10$). **B.** Quantification de la prolifération après 2 semaines consécutives de culture (moyenne ± SEM, $p = 0,0001$, $n = 9$). **C.** Effet de la surexpression de *KLF4* sur la prolifération après 10 jours de culture (moyenne ± SEM, $p = 0,0079$, $n = 5$). **D.** Profils de croissance clonale obtenues avec les cellules [*KLF4*^{WT}] et [*KLF4*^{KD}] ensemencées juste après le tri suivant la transduction ($p = 0,0001$, calculé sur les clones dont la taille est supérieure à 10^4 cellules, $n = 60$ plaques par condition). **E.** Profils de croissances clonales obtenus avec des cellules [*KLF4*^{WT}] et [*KLF4*^{KD}] cultivées en culture de masse pendant 4 semaines avant les microcultures clonales ($p = 0,0344$, calculée sur les clones dont la taille est supérieure à 5×10^4 cellules, $n = 60$ plaques par condition).

B. La répression de *KLF4* promeut le caractère immature des PK adultes.

Les kératinocytes [*KLF4*^{KD}] présentent une morphologie différente des cellules contrôles : les cellules poussent en colonies plus régulières et plus denses, et présentent un ratio nucléocytoplasmique élevé, témoin d'un état plus immature (Figure 52). Dans la biologie des kératinocytes, la prolifération et la différenciation sont intrinsèquement liées. Par conséquent, nous avons ensuite

- Résultats - Chapitre 2 -

exploré l'impact de la répression de *KLF4* sur la différenciation. Pour cela, l'expression du facteur de transcription Δ np63, un des régulateurs essentiels de la fonction des kératinocytes, a été quantifiée par western blot dans des extraits protéiques de cellules [*KLF4*^{WT}] et [*KLF4*^{KD}]. L'expression de Δ np63 est plus élevée dans les kératinocytes [*KLF4*^{KD}] comparée aux kératinocytes contrôles (Figure 53A-B), suggérant un caractère plus immature. Afin de documenter l'impact de la répression de *KLF4* sur l'immaturité, une étude comparative du transcriptome des cellules [*KLF4*^{WT}] et [*KLF4*^{KD}] a été réalisée. Les kératinocytes [*KLF4*^{KD}] montrent une augmentation de l'expression de transcrits associés au caractère souche (par exemple *ZFP42*, *MYB*, *VANGL2*, *TET1*) et une répression de transcrits communément associés à la différenciation des kératinocytes (par exemple *IVL*, *TGM3*, *FLG*) (Figure 53C). Les études transcriptomiques présentent une vision globale, offrant la possibilité d'explorer l'ensemble des réseaux moléculaires impactés. Ainsi, certains réseaux de signalisation semblent être particulièrement modulés en réponse à la répression de *KLF4*, tels que les réseaux Wnt (Figure 54A) et TGF- β (Figure 54B), essentiels dans la biologie des kératinocytes.

Ces résultats suggèrent que *KLF4* contrôle la balance « immaturité/différenciation », notamment en faisant intervenir des réseaux majeurs dans ces processus tels que Wnt et TGF- β .

- Résultats - Chapitre 2 -

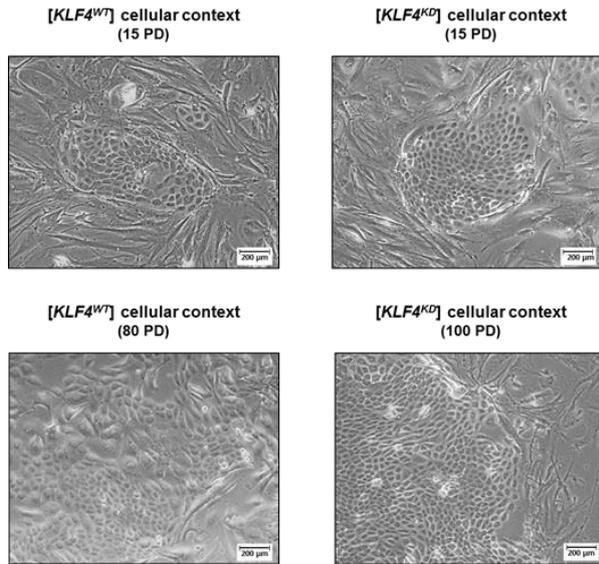


Figure 52 : Morphologie de kératinocytes [KLF4^{WT}] et [KLF4^{KD}] en culture bidimensionnelle.

Les kératinocytes ont été cultivés dans du milieu contenant du sérum et en présence de couches nourricières de fibroblastes. Des photos représentatives de la morphologie des colonies sont montrées ici. En haut, kératinocytes [KLF4^{WT}] et [KLF4^{KD}] à un stade de culture précoce (15 DP). En bas, les mêmes cellules à un stade tardif (80 DP pour les contrôles, 100 DP pour les [KLF4^{KD}]).

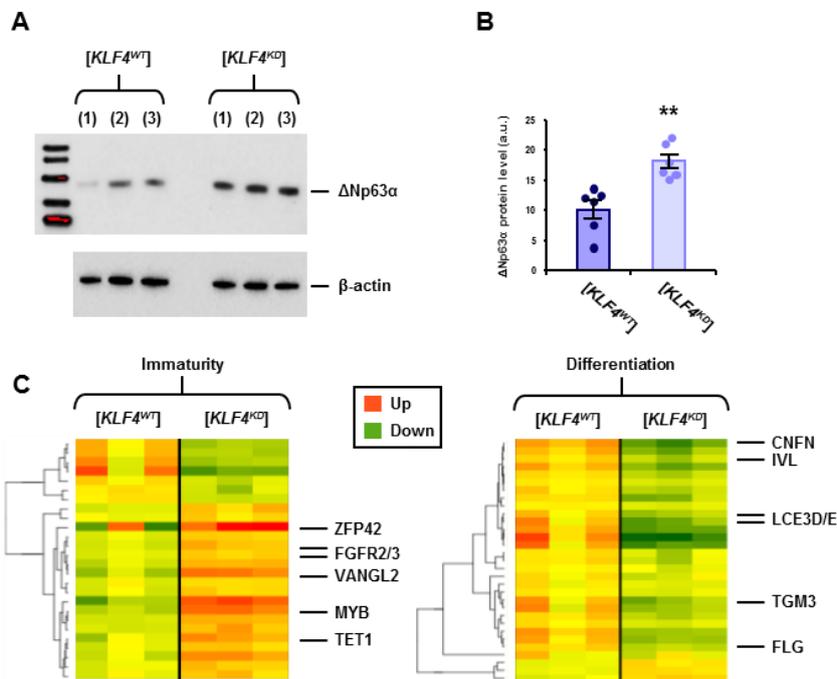
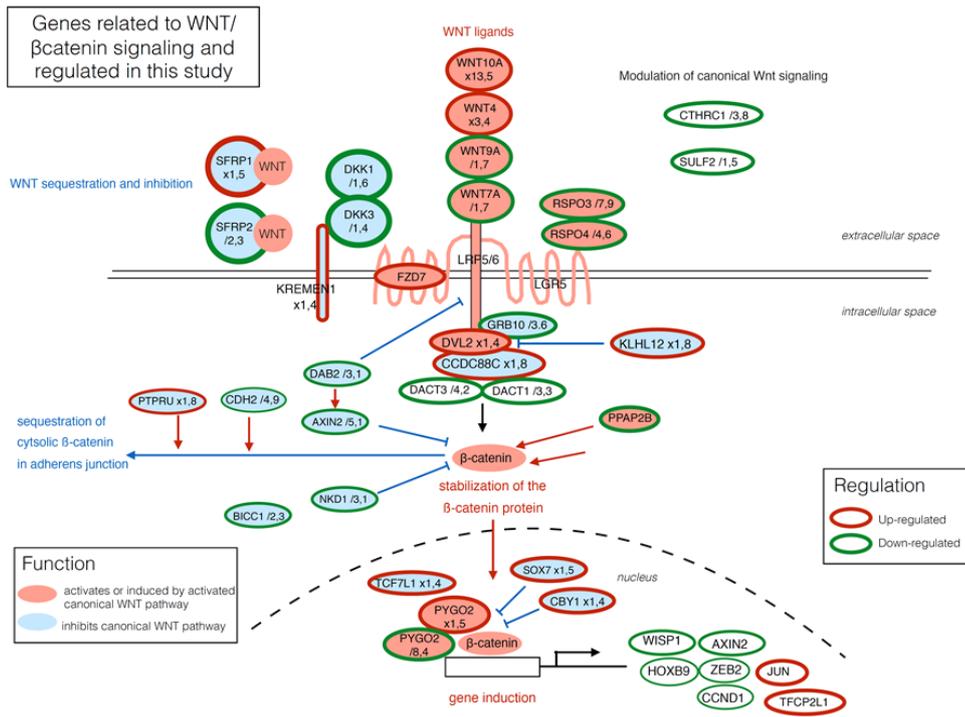


Figure 53 : Impact d'une répression stable de *KLF4* sur le caractère immature des précurseurs kératinocytaires.

A. L'expression de la protéine ΔNp63 a été détectée par western blot. Images représentatives de membranes, correspondant à 3 cultures indépendantes, la β-actine étant utilisée comme marqueur de charge. L'expression de ΔNp63 est augmentée dans les kératinocytes [KLF4^{KD}] comparé aux kératinocytes contrôles. **B.** Quantification des signaux de WB (moyenne ± SEM, p=0.0022, n=6). **C.** Analyse comparative des profils transcriptomiques des cellules [KLF4^{WT}] et [KLF4^{KD}] 5 semaines après transduction. Le panel de gauche indique l'expression relative de transcrits en lien avec l'immaturité des cellules [KLF4^{KD}] par rapport aux cellules contrôles. Le panel de droite indique l'expression relative de transcrits en lien avec la différenciation des kératinocytes [KLF4^{KD}] par rapport à [KLF4^{WT}].

- Résultats - Chapitre 2 -

A



B

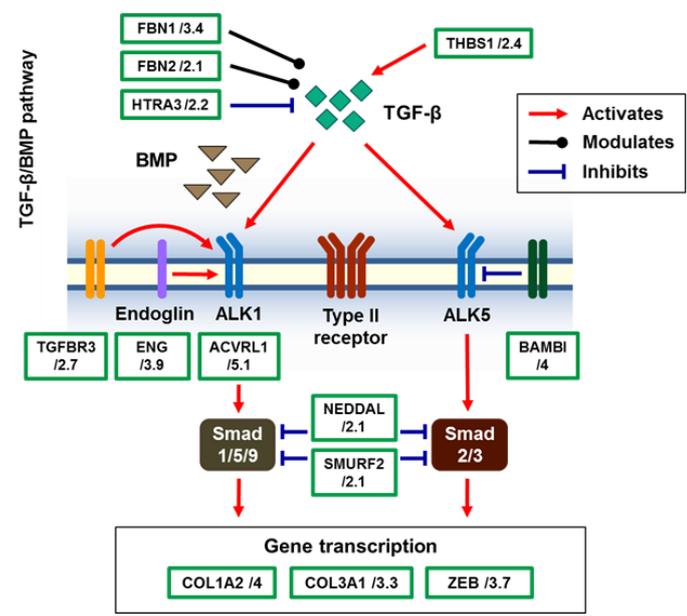


Figure 54 : Impact d'une répression stable de *KLF4* sur les réseaux de signalisation Wnt et TGF- β .

L'analyse comparative des profils transcriptomiques des cellules [*KLF4^{WT}*] et [*KLF4^{KD}*] 5 semaines après transduction révèle l'implication de réseaux de signalisation importants dans le contrôle de la balance « immaturité/différenciation ». **A.** Une signature transcriptomique correspondant à la voie Wnt a été identifiée. Le schéma représente un diagramme des transcrits impliqués dans la voie canonique Wnt et leurs modulations respectives dans les cellules [*KLF4^{KD}*] comparées aux cellules [*KLF4^{WT}*]. **B.** Une signature transcriptomique correspondant à la voie TGF- β a également été identifiée. Le schéma représente un diagramme des transcrits impliqués dans la voie TGF- β /BMP et leurs modulations respectives dans les cellules [*KLF4^{KD}*] comparées aux cellules [*KLF4^{WT}*].

C. La répression de KLF4 promeut la capacité régénérative des PK adultes.

Afin de déterminer si la répression stable de *KLF4* impacte la capacité régénérative des kératinocytes, des épidermes ont été générés *in vitro* avec les contextes cellulaires [*KLF4^{WT}*] et [*KLF4^{KD}*], et greffés sur des souris *nude*. Les épidermes reconstruits [*KLF4^{KD}*] sont plus épais que les épidermes [*KLF4^{WT}*] (Figure 55A). Ils ont été digérés pour récupérer les kératinocytes et ainsi évaluer la cellularité des greffons épidermiques, qui représente simplement le nombre de kératinocytes dans des greffons de même taille. La cellularité des épidermes [*KLF4^{KD}*] est 1,8 fois plus élevée que celle des épidermes [*KLF4^{WT}*] (Figure 55B). Les épidermes greffés sont récupérés 4 semaines plus tard et analysés. Les coupes d'échantillons cutanés révèlent la peau humaine au centre de la coupe, encadrée par la peau murine. La peau humaine présente une morphologie normale, avec les quatre couches de l'épiderme, quel que soit le contexte cellulaire (Figure 55C-D). Afin de caractériser l'aptitude de régénération long terme des kératinocytes [*KLF4^{WT}*] et [*KLF4^{KD}*], les greffons primaires ont été digérés et les kératinocytes utilisés pour une deuxième amplification suivie d'une étape de greffe, comme détaillé dans le chapitre 3 de ce manuscrit. La réussite d'une greffe est déterminée par la présence de cellules souches au sein des greffons. Après la deuxième greffe, le taux de succès de prise de greffe secondaire est de 13,3 % pour les greffons [*KLF4^{WT}*], contre 43,8% pour les greffons [*KLF4^{KD}*] (Figure 55E), indiquant que les cellules [*KLF4^{KD}*] possèdent une capacité de reconstruction accrue et préservée malgré les amplifications *in vitro* supplémentaires. Les épidermes secondaires ne présentent pas d'anomalies de différenciation, comme indiqué par la localisation correcte des marqueurs involucrine, kératine 10 et kératine 5 et les coupes HES (Figure 55F-G).

Ces résultats indiquent que *KLF4* joue un rôle majeur dans le contrôle du potentiel régénératif des holoclones. La répression de *KLF4* augmente le potentiel de reconstruction à long terme, donc probablement l'autorenouvellement des CSK, sans être délétère en terme de qualité de reconstruction épidermique.

- Résultats - Chapitre 2 -

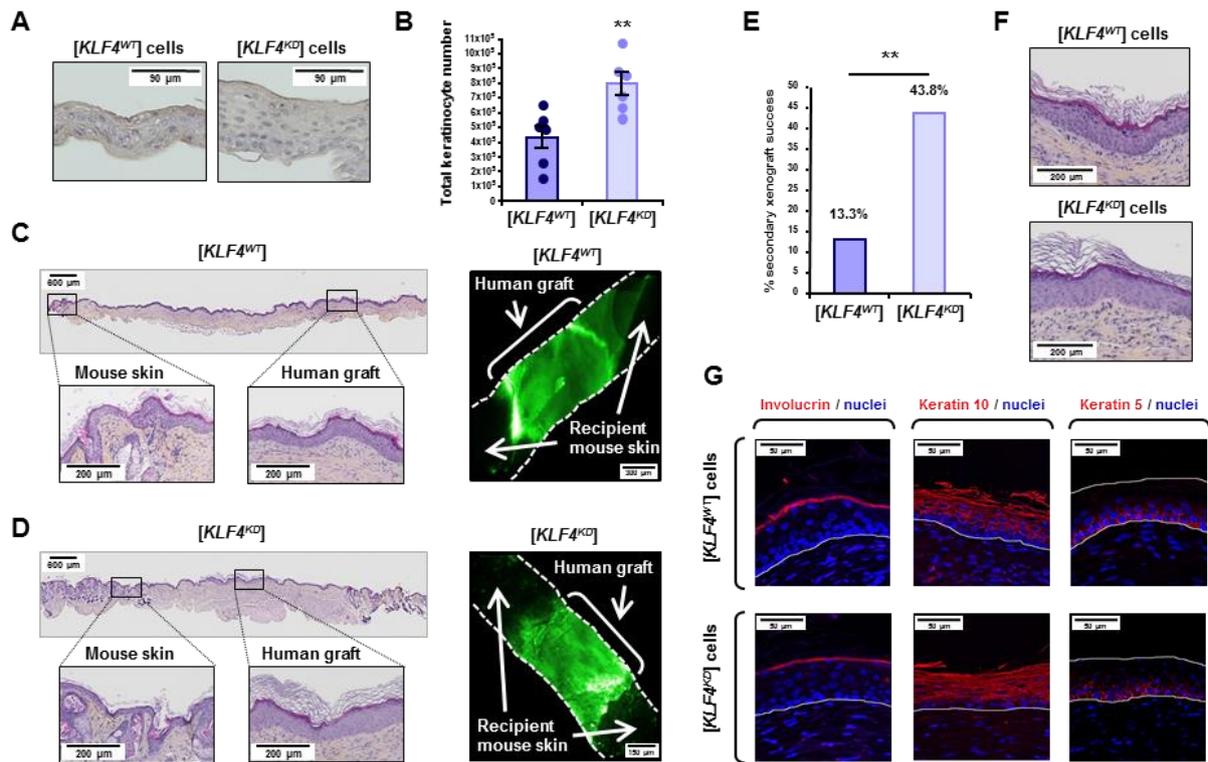


Figure 55 : Impact d'une répression stable de *KLF4* sur la capacité régénérative de kératinocytes adultes.

Evaluation des capacités régénératives d'holoclone de kératinocytes. Des greffons épidermiques ont été générés *in vitro* avec des kératinocytes [*KLF4*^{WT}] et [*KLF4*^{KD}] à 60 DP. **A.** Images représentatives de coupes d'épidermes reconstruits *in vitro*. **B.** Quantification du nombre total de kératinocytes dans les épidermes reconstruits. **C-D.** Les épidermes ont été greffés sur des souris *nude*. 4 semaines post-greffe, les échantillons ont été récupérés. Images représentatives de coupes d'épidermes greffés dans la souris. La peau humaine est visible au centre, encadrée de part et d'autre par la peau murine, reconnaissable à la présence de nombreux follicules pileux et un épiderme plus fin. Le panel de droite indique la présence de la peau humaine constitué de kératinocytes [*GFP*⁺], détectés par microscopie *in vivo*. **E.** Les kératinocytes du greffon primaire ont été récupérés et utilisés pour faire un second cycle de greffe. Le taux de succès de prise de greffe secondaire a été évalué. **F.** Images représentatives de coupes de greffons secondaire colorés au HES, montrant une morphologie normale des épidermes. **G.** Images représentatives de coupes de greffons secondaires marqués avec des anticorps anti-involucrine, kératine 10 et kératine 5. La répression de *KLF4* n'altère pas la différenciation épidermique *in vivo*.

III. Etude du rôle de *KLF4* dans les précurseurs de kératinocytes adultes au moyen d'une répression transitoire.

*A. Impacts d'une répression transitoire de *KLF4* en milieu contenant du sérum et des cellules nourricières.*

Des kératinocytes basaux ont été cultivés en présence de couches nourricières et de milieu contenant du sérum. Ils ont été transfectés par 3 siARN différents dirigés contre *KLF4* ou un siARN scramble (condition contrôle). La répression de *KLF4* est d'environ 55% en moyenne dans les kératinocytes traités aux siARN anti-*KLF4* comparés au contrôle (Figure 56A). Cinq jours après transfection, le niveau du marqueur d'immaturité intégrine- $\alpha 6$ est augmenté dans les kératinocytes traités aux siARN anti-*KLF4* comparé aux cellules contrôles (siARN scramble) (Figure 56B), suggérant qu'une répression transitoire de *KLF4* conduit à un phénotype plus immature.

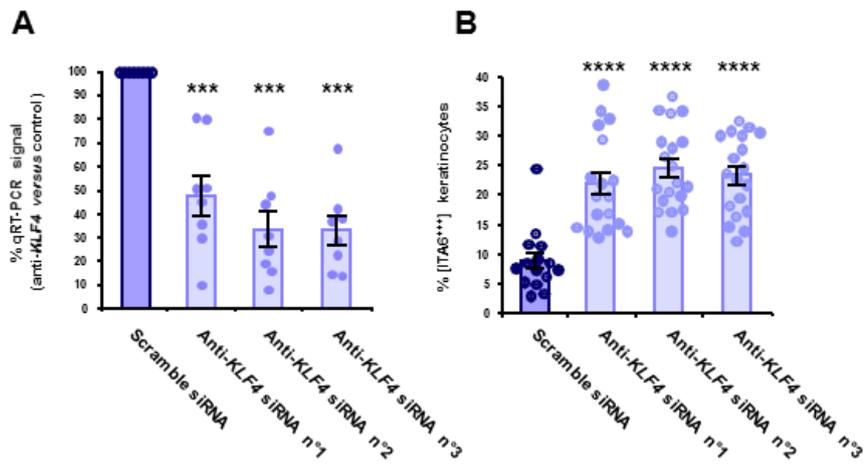


Figure 56 : Impact d'un traitement siARN-anti-*KLF4* sur l'expression de l'intégrine- $\alpha 6$.

Des kératinocytes basaux ont été cultivés sur couches nourricières dans un milieu contenant du sérum. Ils ont été traités avec 3 siARN différents dirigés contre *KLF4* et un siARN scramble (contrôle). **A.** Le niveau d'expression des ARNm *KLF4* a été quantifié par RT-q-PCR. ($p = 0,0002$, $n = 8$) **B.** Le niveau d'expression de l'intégrine- $\alpha 6$ a été quantifié par cytométrie en flux (moyenne \pm SEM, ($p = 0,0001$ [siARN n°1], $n = 18$; $p = 0,0001$ [siARN n°2], $n = 19$; $p = 0,0001$ [siARN n°3], $n = 19$). L'expression de l'intégrine- $\alpha 6$ est augmentée en réponse à la répression transitoire de *KLF4*.

Nous avons ensuite utilisé la kenpaullone pour réprimer *KLF4* (Tien et al 2015). Les cellules traitées à la kenpaullone ont une expression de l'ARNm de *KLF4* réduite d'environ 50% par rapport aux cellules traitées au véhicule contrôle (DMSO) (Figure 57A). Des kératinocytes ont été traités tous les deux jours pendant une semaine avec 5 μ M de kenpaullone (ou de DMSO) et ensemencés par la méthode des microcultures clonales parallèles afin de quantifier l'impact de la répression transitoire

- Résultats - Chapitre 2 -

de *KLF4* sur le potentiel clonogénique. Après deux semaines de culture, le profil de croissance clonale a été établi. Les cellules traitées à la kenpaullone ont donné naissance à plus de clones (Figure 57B). Ils sont plus gros en terme de nombre de cellules par clone comparés aux cellules contrôles (Figure 57C). De plus, les cellules traitées à la kenpaullone présentent également un phénotype plus immature, reflété par une expression plus élevée de l'intégrine- $\alpha 6$ (Figure 57D).

Ces résultats indiquent que la répression transitoire de *KLF4* permet également de moduler les fonctionnalités de prolifération et d'immaturité des PK adultes.

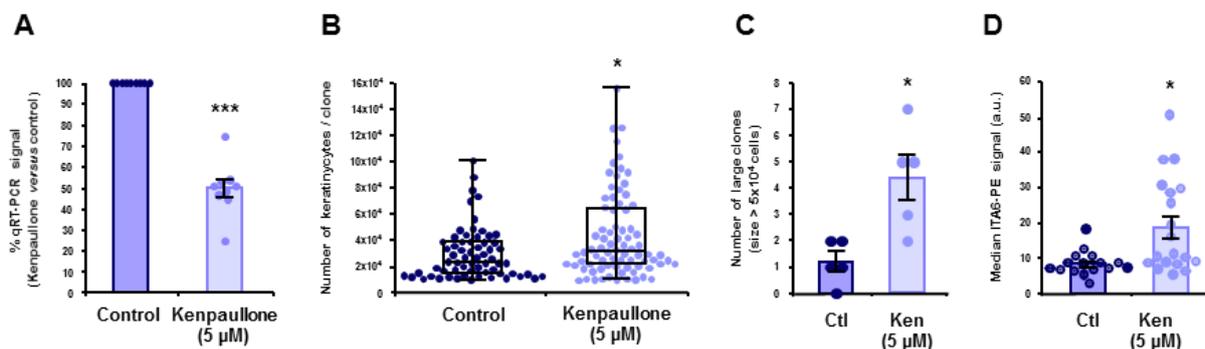


Figure 57 : Impact d'un traitement à la kenpaullone sur les fonctionnalités des précurseurs kératinocytaires.

Des kératinocytes basaux ont été cultivés sur couches nourricières dans un milieu contenant du sérum. Ils ont été traités avec 5 μM de kenpaullone ou de DMSO (contrôle), tous les deux jours pendant une semaine. **A.** 6 heures après le premier traitement, le niveau d'expression de *KLF4* a été quantifié par RT-q-PCR. **B.** Après 3 traitements consécutifs durant la phase d'amplification bidimensionnelle d'une durée d'une semaine, les kératinocytes ont été clonés selon la méthode des microcultures parallèles. Les cellules traitées à la kenpaullone ont donné naissance à plus de clones ($p=0.018$, calculée sur une taille de clone supérieure à 10^4 cellules, $n = 55$ plaques par conditions). **C.** Le nombre de clones dont la taille est supérieure à 5×10^4 cellules est augmenté avec les cellules traitées à la kenpaullone. **D.** L'expression de l'intégrine- $\alpha 6$ a été quantifiée par cytométrie en flux (médiane de fluorescence, $p=0,0167$, 19 clones kenpaullone et 16 clones contrôles analysés.)

B. L'effet biologique de la répression de KLF4 est préservé dans un milieu sans sérum et sans couches nourricières.

L'utilisation de milieux ne contenant pas de composants d'origine xénogénique est envisagé pour l'avenir des applications en thérapie cellulaire cutanée, afin de limiter au maximum les contaminations pour le patient. Cependant, ces milieux présentent l'inconvénient de ne pas favoriser le maintien des fonctionnalités cellulaires à long terme, ni la présence de cellules souches kératinocytaires dans les cultures qui seront utilisées pour les procédés de bioingénierie tissulaire. Il est donc nécessaire de développer des méthodes permettant de contrôler le caractère souche des PK

- Résultats - Chapitre 2 -

dans des milieux plus contrôlés, afin de sauvegarder leur capacité fonctionnelle et ainsi optimiser les résultats de greffe cutanée.

Nous avons donc cultivé des kératinocytes basaux dans un milieu sans sérum et sans couches nourricières (KFSM) et exposé les cellules à la kenpaullone afin de déterminer si les effets positifs de la répression de *KLF4* pouvaient être maintenus dans un tel milieu. La répression de *KLF4* par le traitement à la kenpaullone a été obtenue aussi en milieu KFSM (Figure 58A), et a eu pour conséquence au bout d'une semaine de traitement, une augmentation de l'expression de l'intégrine- $\alpha 6$ (Figure 58B). Afin de déterminer si la répression transitoire de *KLF4* par la kenpaullone induit un gain au niveau de la prolifération, les cellules ont été cultivées en KFSM et traitées tous les deux jours par 0,25 μM de kenpaullone pendant 4 passages successifs. Les cellules traitées à la kenpaullone présentent un ratio d'expansion cumulé supérieur aux cellules contrôles à chacun des passages successifs (Figure 58C). A la fin de la première et la 3^{ème} semaine de traitement, les kératinocytes ont également étéensemencés à très faible densité (5 cellules par puits de plaque 96 puits) afin d'étudier un éventuel impact du traitement à la kenpaullone sur leur capacité à initier une culture. Après deux semaines de culture à faible densité, le nombre de puits positifs par plaque est compté. Un puits est défini comme positif si au moins 10 cellules ont été détectées. Le pourcentage de puits positifs, défini par le nombre de puits positifs divisé par le nombre de puits total pour chaque plaque, est déterminé pour chaque condition. Les cellules traitées une semaine à la kenpaullone ont généré plus de puits positifs (22,9%) que les cellules contrôles (14,8%) (Figure 58D). L'augmentation de la capacité à initier une culture est également observée après 3 semaines de traitement à la kenpaullone (7,1%) comparé aux cellules contrôles (3,9%) (Figure 58E).

La répression de *KLF4* par la kenpaullone en milieu KFSM s'accompagne également d'une augmentation du marqueur Δnp63 (Figure 58F), suggérant la maintenance d'un état immature. La morphologie des cellules traitées est également différente : elles poussent de manière plus dense (Figure 58G). Enfin, des kératinocytes traités une semaine à la kenpaullone ont été utilisés dans notre modèle de reconstruction épidermique *in vitro*. Les cellules traitées génèrent des épidermes morphologiquement normaux, de la même manière que les cellules contrôles (Figure 58H), suggérant que l'addition de kenpaullone dans les cultures n'est pas délétère pour la reconstruction épidermique.

Ces résultats indiquent que, dans un milieu sans sérum et sans couches nourricières, l'effet positif de la répression de *KLF4* obtenu par addition de kenpaullone conduit à une augmentation des capacités prolifératives et du caractère immature des PK, sans être délétère pour la reconstruction épidermique.

- Résultats - Chapitre 2 -

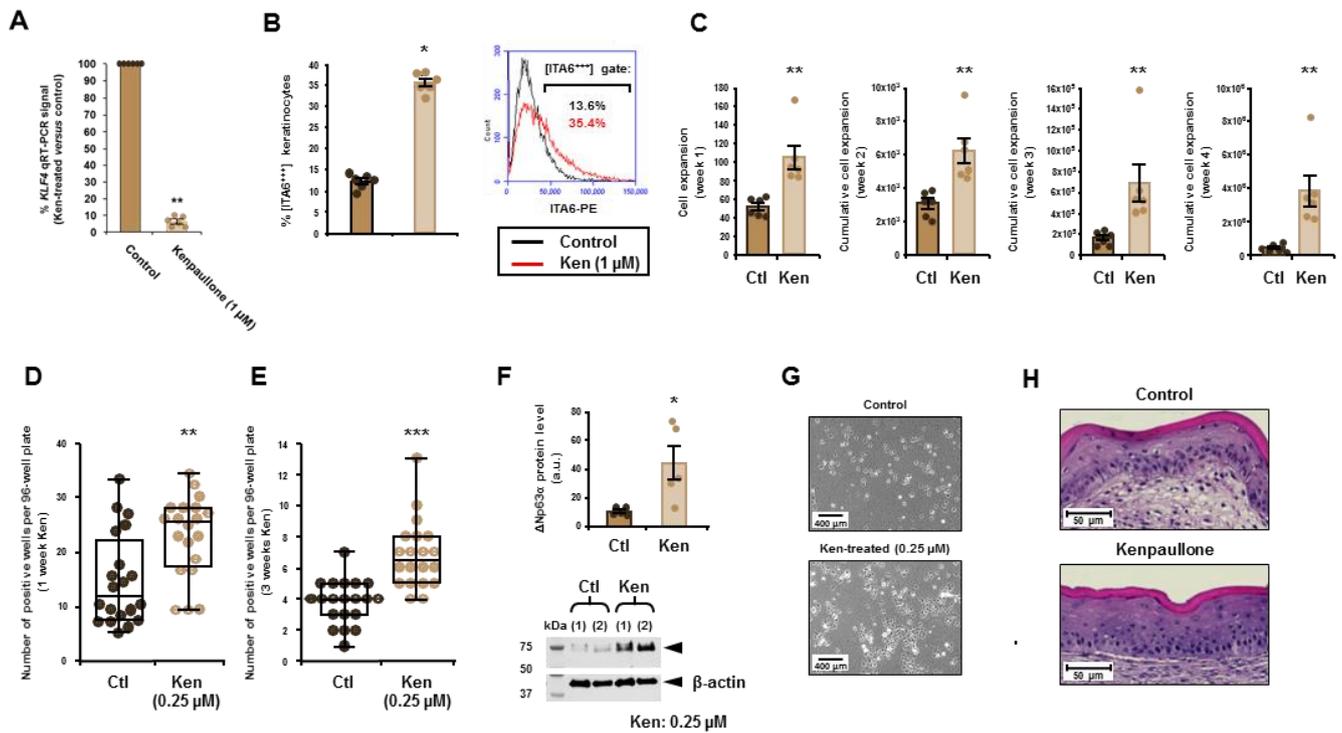


Figure 58 : Augmentation de l'expansion bidimensionnelle en réponse à la répression transitoire de *KLF4* par la kenpaullone en milieu sans sérum et sans couches nourricières.

Des kératinocytes basaux adultes ont été cultivés sans couches nourricières et dans un milieu sans sérum. Ils ont été traités ou non (DMSO : contrôle) à la kenpaullone (0,25 ou 1 μM) pendant 1 à 4 semaines consécutives, tous les deux jours. **A.** Le niveau d'expression des ARNm *KLF4* a été quantifié par RT-q-PCR, normalisé par rapport au niveau de *KLF4* dans les cellules contrôles (moyenne \pm SEM, $p=0,0022$, $n=6$). **B.** Après une semaine de traitement, l'expression de l'intégrine- $\alpha 6$ est augmentée dans les cellules traitées *versus* les cellules contrôles ($p=0,0022$, $n=6$). **C.** Les cellules ont été traitées pendant 4 semaines avec 0,25 μM de kenpaullone, et les ratios d'expansion cumulés calculés à chaque passage ($p=0,0022$, $n=6$). **D.** Après une semaine de traitement, 5 cellules par puits (plaques 96 puits) sont ensemencées par condition, et le pourcentage de puits positifs (> 10 cellules / puits) est déterminé après deux semaines de culture ($p=0,0029$, $n=20$ plaques par condition). **E.** L'expérience similaire a été réalisée avec des kératinocytes traités pendant 3 semaines ($p=0,0001$, $n=20$). **F.** Le niveau d'expression de *Anp63* a été quantifié par western blot. Le signal est normalisé par rapport au signal de l'actine. **G.** Photos représentatives de la morphologie des kératinocytes basaux après une semaine de traitement à la kenpaullone ou au DMSO. **H.** Des kératinocytes traités pendant une semaine avec 0,25 μM de kenpaullone ont été utilisés pour générer des épidermes reconstruits. Images représentatives de coupes marquées HES, montrant une morphologie normale des épidermes reconstruits.

*C. La répression transitoire de *KLF4* améliore le potentiel épidermique de kératinocytes dérivés de cellules souches embryonnaires.*

Les effets de la répression transitoire de *KLF4* par la kenpaullone ont aussi été explorés dans le modèle des kératinocytes dérivés de cellules souches embryonnaires. Les kératinocytes sont cultivés sans couche nourricière et dans un milieu sans sérum. Ils ont été traités avec 1 μM de kenpaullone (ou DMSO) qui réduit efficacement le niveau d'expression de *KLF4* (Figure 59A). Conséquemment, une augmentation de l'intégrine- $\alpha 6$ a pu être détectée par cytométrie en flux (Figure 59B), associée à un

- Résultats - Chapitre 2 -

changement morphologique en culture. Les kératinocytes traités poussent en colonies et sont plus petits, un phénotype associé à un statut immature (Figure 59C). Après avoir été traités pendant une semaine avec 1 μM de kenpaullone, les kératinocytes sontensemencés à la densité de 30 cellules/cm² dans des plaques 96 puits, et cultivés pendant 5 semaines sans kenpaullone afin d'évaluer leur potentiel de croissance. Les cellules traitées à la kenpaullone ont généré 314 initiations de cultures (13,1%) contre seulement 211 (8,8%) avec les cellules contrôles (Figure 59D). En accord avec l'augmentation de la fréquence d'initiation de croissance, une augmentation du ratio d'expansion après 1 et 2 semaines de culture de masse est observée avec les cellules traitées à la kenpaullone en comparaison aux cellules contrôles (Figure 59E).

Le potentiel de régénération épidermique a ensuite été évalué dans un modèle de reconstruction épidermique *in vitro*. Les kératinocytes dérivés d'ES ont été traités ou non pendant 1 semaine avec 1 μM de kenpaullone. Dans les conditions classiques d'ensemencement (500 000 cellules/cm²), les épidermes présentent une morphologie normale quel que soit les conditions de cultures des kératinocytes (traités ou non) (Figure 60A). Afin d'étendre les limites du système, les kératinocytes ont été ensemencés à une densité inférieure (125 000 cellules/cm²) sur les membranes pour reconstruire les épidermes. L'utilisation de condition limitante permet de révéler parfois des différences qui n'auraient pas été observées en condition normale. Dans ces conditions, seuls les kératinocytes traités à la kenpaullone sont capables de générer un épiderme stratifié (Figure 60B).

- Résultats - Chapitre 2 -

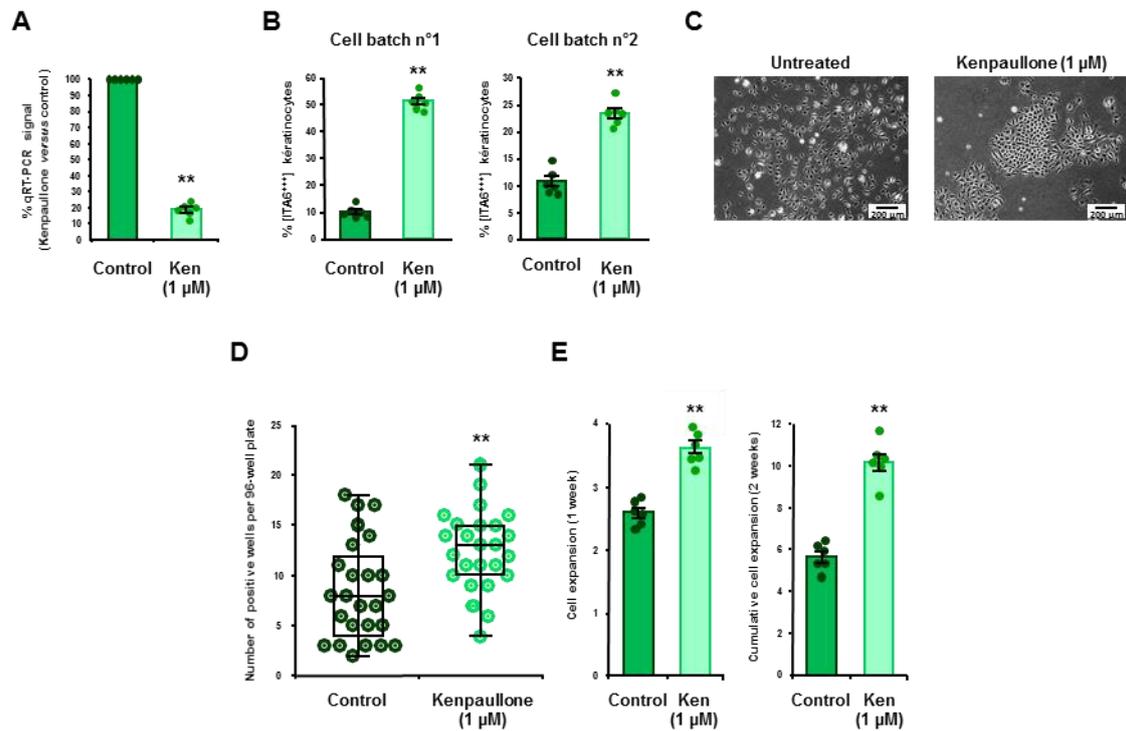


Figure 59 : Impacts d'un traitement à la kenpaullone sur des kératinocytes dérivés de cellules souches embryonnaires.

Des kératinocytes dérivés de cellules souches embryonnaires ont été traités avec 1 μM de kenpaullone ou non (contrôle : DMSO). **A.** Le niveau d'expression des ARNm *KLF4* a été quantifié par RT-q-PCR ($p=0,0022$, $n=6$). **B.** Le niveau d'intégrine après une semaine de traitement a été quantifié par cytométrie en flux, sur deux préparations de kératinocytes indépendantes ($p=0,0022$, $n=6$). **C.** Images représentatives des cultures de kératinocytes traités ou non avec 1 μM de kenpaullone. Les cellules traitées poussent en colonies très denses et sont plus petites que les cellules contrôles. **D.** Après 1 semaine de traitement avec 1 μM de kenpaullone, les kératinocytes osant ensemencés à la densité de 30 cellules par cm^2 (10 cellules par puits) dans des plaques 96 puits. Après 5 semaines de culture, le pourcentage de puits ayant initié des cultures est déterminé (défini par > 10 cellules/puits) ($p=0,0028$, $n=25$ plaques par condition). **E.** Les cellules, traitées ou non, ont été cultivées en masse pendant 2 semaines consécutives. Les ratios d'expansion cumulés ont été calculés (moyenne \pm SEM, $p=0,0022$, $n=6$).

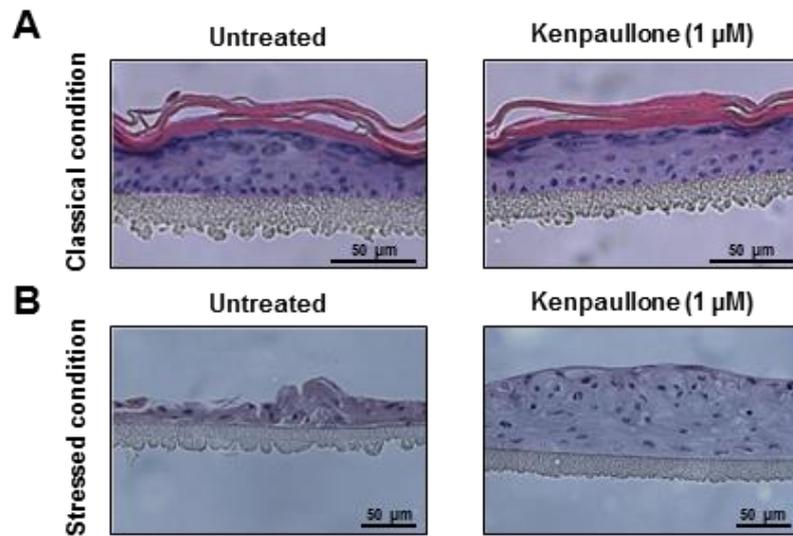


Figure 60 : Impact du traitement à la kenpaullone sur la reconstruction épidermique de kératinocytes dérivés de cellules souches embryonnaires.

Des kératinocytes dérivés de cellules souches embryonnaires ont été traités avec 1 μM de kenpaullone ou non (contrôle : DMSO) tous les deux jours pendant 1 semaine et utilisés pour reconstruire des épidermes *in vitro*. **A-B**. Images représentatives de coupes d'épidermes colorées HES, permettant de voir les structures des tissus (n=3 pour chacune des conditions). **A**. Condition standard d'ensemencement des kératinocytes à la densité de 500 000 cellules/cm². **B**. Condition d'ensemencement limite à la densité de 125 000 cellules/cm².

Chapitre 3

Rôle du facteur de transcription MAD4 dans le contrôle des fonctionnalités des PK.

Objectif : Caractériser le rôle de MAD4 dans le contrôle des balances « immaturité/différenciation » et « quiescence/prolifération » des PK humains adultes.

Résultats : La répression stable de *MXD4* inhibe la différenciation du kératinocyte, contribuant à la préservation du caractère immature des PK. La prolifération et le potentiel clonogénique sont augmentés par la répression de *MXD4*. Conséquemment, une préservation de la capacité de reconstruction épidermique à long terme est observée. Au niveau des mécanismes impliqués, nous montrons que la répression de *MXD4* conduit à l'augmentation de l'expression de son antagoniste, c-MYC. Cette modification dans l'expression des partenaires de MAX, MAD4 et c-MYC, conduit à une augmentation de la formation d'hétérodimère c-MYC/MAX aux dépens de MAD4/MAX. De plus, la répression stable de MYC aboutit à une répression de la prolifération des PK, suggérant que la proportion de complexes c-MYC/MAX/MAD4 est un acteur clé des fonctions des PK. Le séquençage complet de l'exome indique que l'insertion de vecteurs lentiviraux et la répression stable de *MXD4* ne sont pas délétères pour l'intégrité génomique. Enfin, la hausse du niveau d'intégrine- $\alpha 6$ après inhibition transitoire de *MXD4* (siARN, kenpaullone) suggère que *MXD4* pourrait être une cible moléculaire pour promouvoir l'expansion *ex vivo* de PK.

I. Modèles et stratégies mises en place pour l'étude.

Afin d'étudier le rôle de MAD4 dans la biologie des cellules souches kératinocytaires, nous avons choisi d'utiliser comme précédemment le modèle des holoclones. Un holoclone est la descendance d'une CSK. Il présente un très fort potentiel prolifératif et régénératif sur le long terme. Il correspond à la définition fonctionnelle d'une cellule souche de kératinocyte. Ce modèle est donc le plus pertinent pour étudier le rôle de MAD4 dans les CSK.

Afin de disséquer le rôle de MAD4 dans le contrôle des fonctionnalités des kératinocytes, nous avons mis en place une approche de génomique fonctionnelle. L'utilisation de vecteurs lentiviraux codant la GFP seule (gène rapporteur, contexte cellulaire [*MXD4^{WT}*]) ou la GFP plus un shARN anti-*MXD4* (contexte cellulaire [*MXD4^{KD}*]) ont permis d'étudier l'impact d'une répression stable de *MXD4* sur les fonctionnalités cellulaires des holoclones (Figure 61). Dans un second temps, une répression transitoire a été réalisée à l'aide de siARN anti-*MXD4*, et d'une molécule chimique : la kenpaullone. L'impact de la répression de *MXD4* a ensuite été explorée au niveau moléculaire, cellulaire et tissulaire.

La validation de la répression de *MXD4* par la caractérisation moléculaire des contextes cellulaires [*MXD4^{WT}*] et [*MXD4^{KD}*] a été réalisée. Par RT-q-PCR, une répression d'environ 80% est détectée dans les cellules [*MXD4^{KD}*] comparée aux cellules contrôles [*MXD4^{WT}*] ($p=0,0003$, $n=8$) (Figure 62A). En parallèle, les cellules [*MXD4^{WT}*] et [*MXD4^{KD}*] ont également été triées par cytométrie en flux dans des plaques 96 puits pour quantifier de manière absolue le nombre de transcrits *MXD4* exprimés dans les cellules selon la méthode de RT-dd-PCR présenté dans ce manuscrit (Méthodologie, Section 2, publication numéro 1). Dans le contexte contrôle [*MXD4^{WT}*], $17,3 \pm 2,4$ transcrits par cellule ont été quantifiés, contre $8,6 \pm 0,9$ dans le contexte [*MXD4^{KD}*] (moyenne \pm SEM, $p=0,0074$, $n=12$) (Figure 62B). La quantification absolue, précise et robuste, indique la rareté de ce type de transcrits (en comparaison, on détecte dans un kératinocyte unique environ 15 000 copies d'ARN *18s* par la même méthode). Enfin, le niveau d'expression de la protéine MAD4 est analysée par western blot (Figure 62C). On constate une diminution d'environ 60% de l'expression de la protéine MAD4 (moyenne \pm SEM, $p=0,0317$, $n=5$) (Figure 62D).

Ces résultats indiquent que la répression de *MXD4* par le shARN anti-*MXD4* est fonctionnelle (répression des ARNm) et a un impact au niveau traductionnel (répression de la protéine MAD4).

- Résultats - Chapitre 3 -

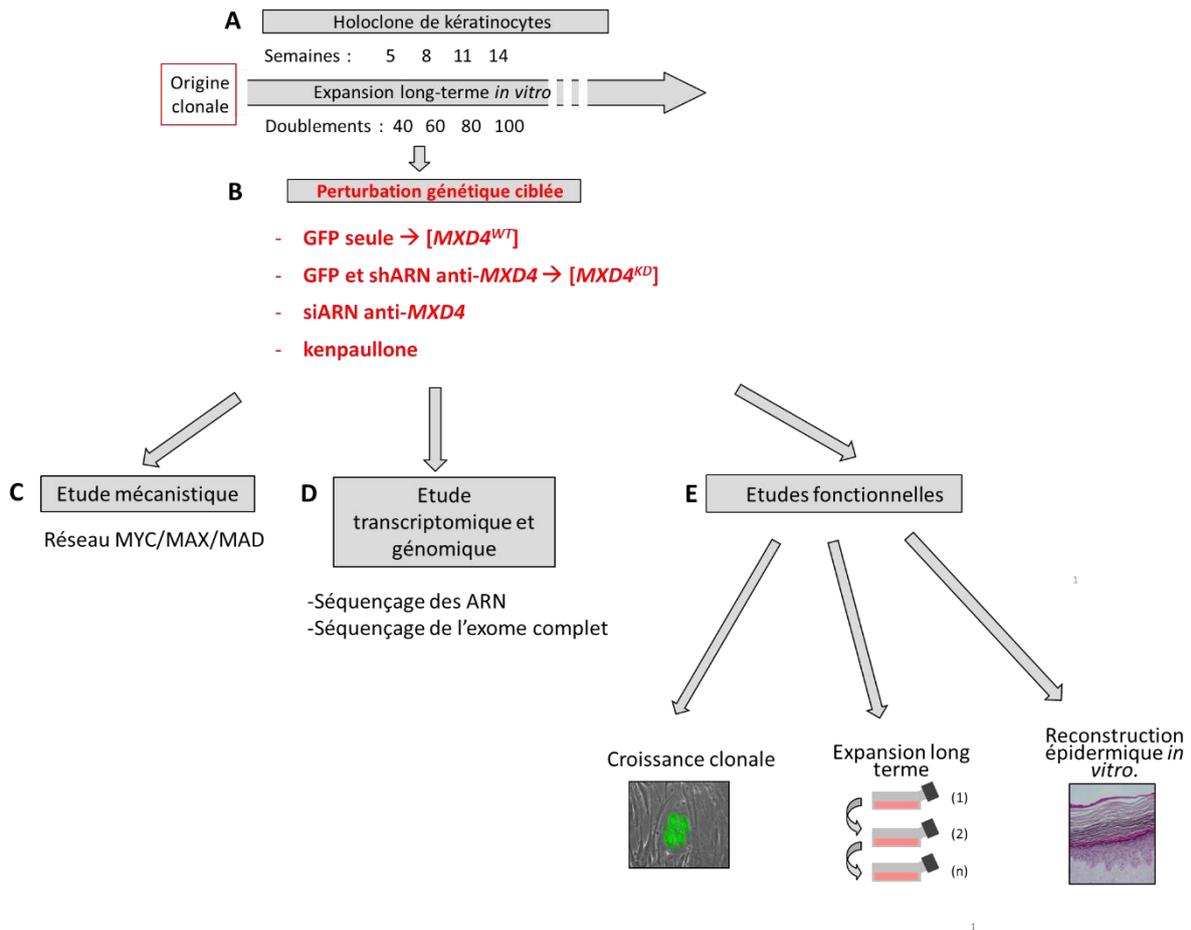


Figure 61 : Stratégie mise en place pour l'étude du rôle de MAD4 dans la fonctionnalité des holoclones.

Une approche de génomique fonctionnelle a été développée. **A.** Des holoclones de kératinocytes ont été cultivés en milieu contenant du sérum et des couches nourricières afin de disposer de matériel cellulaire à des stades précoces (DP < 30) ou tardifs (DP > 60). **B.** Une perturbation génétique ciblée du gène *MXD4* a été introduite dans les cellules à un stade très précoce (DP ~ 10) par transduction avec des vecteurs lentivirus encodant la GFP seule ([*MXD4*^{WT}]) ou la GFP et un shARN anti-*MXD4* ([*MXD4*^{KD}]). **C-E.** L'impact de la répression de *MXD4* a ensuite été exploré au niveau moléculaire, cellulaire et tissulaire. **C.** Etude mécanistique du réseau MYC/MAX/MAD. **D.** Etude à grande échelle par séquençage des transcriptomes et des exomes des contextes [*MXD4*^{WT}] et [*MXD4*^{KD}]. **E.** Etudes fonctionnelles de l'impact de la répression de *MXD4* sur la prolifération, le caractère immature et le potentiel de régénération des kératinocytes.

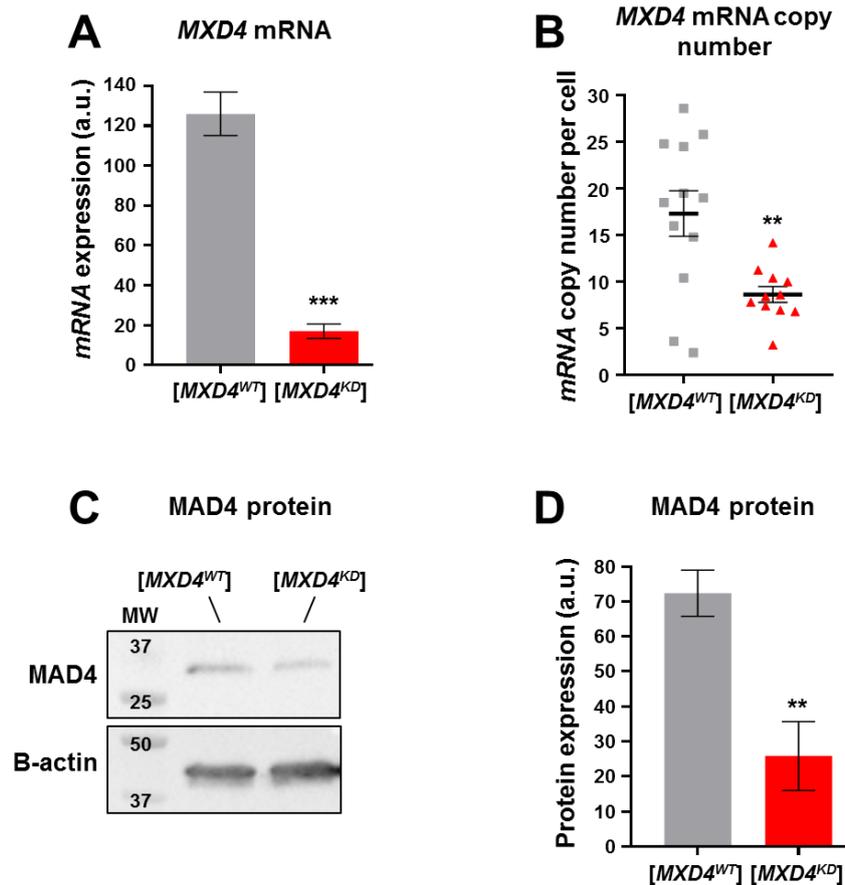


Figure 62 : Quantification de l'expression de *MXD4* dans les contextes cellulaires [MXD4^{WT}] et [MXD4^{KD}].

Des holoclones de kératinocytes ont été transduits par des vecteurs lentiviraux codant la GFP seule (génération du contexte cellulaire [MXD4^{WT}]) ou la GFP et un shARN anti-*MXD4* (génération du contexte cellulaire [MXD4^{KD}]). 3 jours post-transduction, les kératinocytes ont été purifiés par cytométrie en flux selon l'expression de la GFP. Le niveau de répression de *MXD4* a été quantifié. **A.** Les ARN totaux ont été extraits et le niveau d'expression de *MXD4* a été quantifié par RT-q-PCR. L'expression de *MXD4* est normalisée par rapport à l'expression de *18s* (moyenne \pm SEM, $p=0,0003$, $n=8$). **B.** Quantification absolue du nombre de transcrits *MXD4* par cellule par RT-dd-PCR (moyenne \pm SEM, $p=0,0074$, $n=12$). **C.** Image représentative d'une membrane de western blot montrant la détection de la protéine MAD4 et de l'actine. **D.** Quantification du signal de western blot. Le signal MAD4 est normalisé par rapport à l'actine (moyenne \pm SEM, $p=0,0317$, $n=5$).

II. La protéine MAD4 est présente dans les kératinocytes de la couche basale de l'épiderme humain.

Le crible transcriptomique initial a identifié le gène *MXD4* comme étant surexprimé dans les cellules souches de kératinocytes. Cependant, cette technique ne fournit aucune information sur l'expression et la localisation spatiale des protéines. J'ai donc effectué des marquages immunohistochimiques sur des coupes d'épiderme avec un anticorps anti-MAD4 afin de localiser la

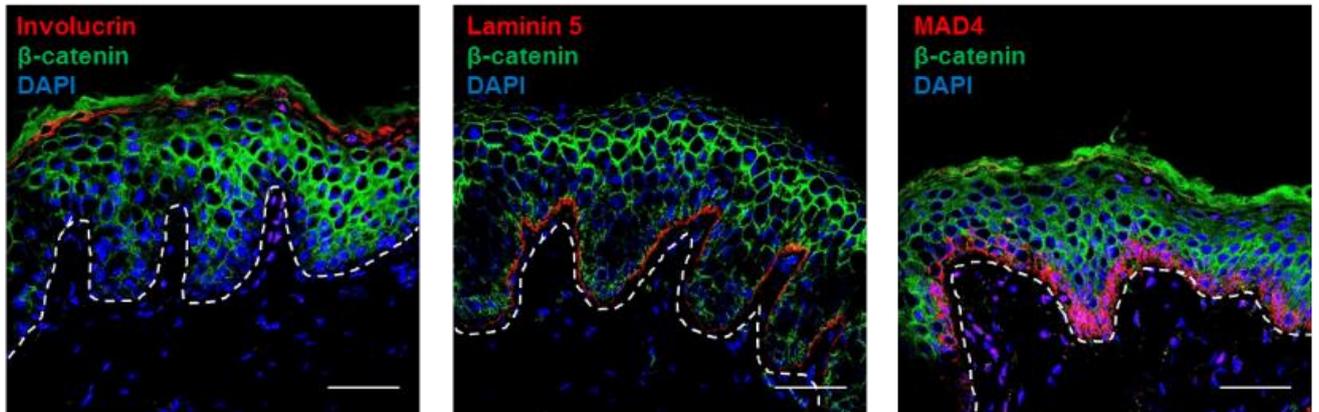
- Résultats - Chapitre 3 -

protéine MAD4 dans l'épiderme. Des échantillons de peau saine issus de deux zones anatomiques et de deux tranches d'âge différentes ont été analysés : des prépuces (sexe masculin, âge moyen 3 ± 1 ans) et des plasties mammaires (sexe féminin, âge moyen de 40 ± 10 ans). L'intérêt de disposer de zones anatomiques et d'âges différents est de s'assurer que ces paramètres n'influencent pas l'expression de MAD4. Des coupes ont été marquées avec des anticorps primaires dirigés contre l'involucrine, la laminine 5 et la β -caténine en plus de MAD4, puis incubées avec les anticorps secondaires adaptés couplés à des fluorochromes. L'involucrine est un marqueur de différenciation terminale (couche cornée) et la laminine 5 une protéine de la matrice extracellulaire formant la lame basale. Elles ont été utilisées afin de déterminer les limites de l'épiderme et également pour s'assurer que celui-ci présentait une morphologie normale. La β -caténine est séquestrée au niveau des membranes et permet de détecter les limites cellulaires.

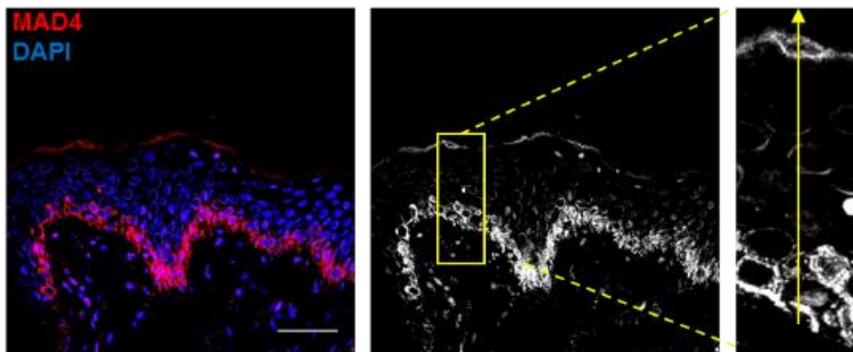
La protéine involucrine est exprimée au niveau de la couche cornée, et la laminine 5 au niveau de la lame basale, indiquant que l'épiderme présente une morphologie normale. MAD4 est détecté majoritairement dans la couche basale de l'épiderme. Un faible signal est également détecté au niveau de la couche cornée (Figure 63A). Le logiciel ImageJ a ensuite été utilisé pour quantifier l'expression de MAD4 à travers les différentes couches épidermiques. Le signal fluorescent a été transformé en niveaux de gris pour permettre la quantification, et celle-ci a été réalisée le long de l'épiderme (ligne verticale jaune) (Figure 63B). La quantification indique que MAD4 est fortement exprimé dans les kératinocytes situés dans les 20 μm les plus proches de la lame basale, correspondant à la couche basale (Figure 63C). Au niveau subcellulaire, MAD4 semble être exprimé majoritairement dans le cytoplasme. Une fraction est tout de même détectable dans les noyaux. Le profil d'expression de MAD4 est similaire entre les coupes provenant de prépuces ou de plastie mammaires (Annexes : Figure S2).

Ce résultat montre que la protéine MAD4 est localisée dans la couche basale de l'épiderme, qui est la couche régénérative contenant les cellules souches et les progéniteurs kératinocytaires. Il confirme une association avec les kératinocytes immatures, peu différenciés. Avec cette technique, il n'est pas possible de caractériser plus précisément l'expression de cette protéine.

A



B



C

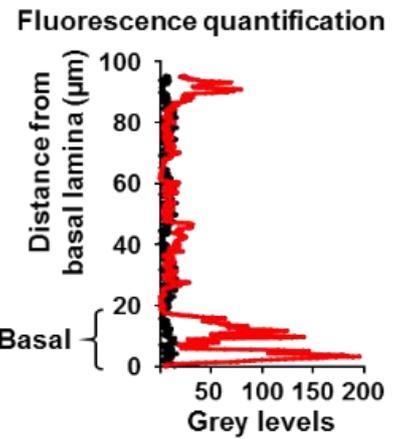


Figure 63 : La protéine MAD4 est localisée dans la couche basale de l'épiderme interfolliculaire humain.

Des échantillons de peaux humaines (prépuce) ont été congelés en OCT et des coupes de 8 microns réalisées au cryostat. Les coupes ont été incubées avec des anticorps primaires dirigés contre l'involucrine, la laminine 5, la β -caténine et le FdT MAD4. **A.** Images représentatives de coupes de peaux humaines montrant l'expression conjointe de l'involucrine, la laminine 5, la β -caténine et MAD4. La barre d'échelle mesure 50 microns. La ligne pointillée représente la jonction derme-épiderme. **B-C.** Quantification du signal de fluorescence correspondant à la détection de MAD4, le long de la ligne jaune, avec le logiciel ImageJ. **C.** Graphique représentant l'intensité du signal (niveau de gris) par rapport à la distance à la lame basale. La ligne noire représente le signal contrôle (incubation sans l'anticorps primaire), la ligne rouge le signal spécifique de MAD4.

III. Etude de l'impact des modifications de l'expression de *MXD4* sur l'immaturité et la prolifération des holoclones.

La présence de la protéine MAD4 dans la couche basale de l'épiderme renforce la pertinence du choix d'étudier ce FdT dans les cellules précurseurs de l'épiderme. Nous avons donc utilisé les contextes [*MXD4^{WT}*] et [*MXD4^{KD}*] pour étudier l'impact de la répression stable de *MXD4* sur les fonctions des PK.

*A. La répression de *MXD4* préserve le statut immature des holoclones de kératinocytes en inhibant la différenciation.*

Une étude transcriptomique comparative a été menée afin d'explorer l'impact de la répression de *MXD4* sur le caractère immature des holoclones de kératinocytes et sur les voies de signalisation impliquées. Les ARN totaux ont été extraits de kératinocytes [*MXD4^{WT}*] et [*MXD4^{KD}*] à environ 60 DP. Ils ont ensuite été préparés pour le séquençage, notamment en sélectionnant les ARN dotés d'une queue polyadénylée (ARN polyA), qui correspondent principalement aux ARNm stables, qui seront traduits en protéines. Cette méthode permet aussi de récupérer une partie des ARN long non-codants (lncRNA).

La comparaison des transcriptomes a permis de dresser une liste des transcrits différentiellement exprimés entre les contextes cellulaires [*MXD4^{WT}*] et [*MXD4^{KD}*]. Une signature transcriptomique correspondant à un statut immature a été détectée dans les kératinocytes [*MXD4^{KD}*]. Parmi les transcrits surexprimés dans les cellules [*MXD4^{KD}*], la plupart sont associés à la couche basale de l'épiderme ou à la régulation des CSK, comme l'intégrine- $\alpha 6$ (*ITGA6*), les kératines 5 et 14 (*KRT5*, *KRT14*) ou encore p63 (*TP63*) (Figure 65A). Le niveau d'expression de la protéine intégrine- $\alpha 6$, un marqueur d'immaturité des kératinocytes bien connu, a été quantifié par cytométrie en flux. 40,6% \pm 7,9 des cellules analysées expriment fortement l'intégrine- $\alpha 6$ dans les cellules contrôles, contre 70,3% \pm 6,3 dans les cellules [*MXD4^{KD}*] (moyenne \pm SEM, $p=0.0159$, $n=5$) (Figure 65B). L'expression protéique de $\Delta np63$, un régulateur majeur de la fonctionnalité des holoclones, a été quantifiée par western-blot. L'expression de $\Delta np63$ est de 36,9 \pm 12,8 (u.a.) dans les cellules [*MXD4^{WT}*] et 96,6 \pm 6,1 (u.a.) dans les cellules [*MXD4^{KD}*] (moyenne \pm SEM, $p=0,0087$, $n=6$) (Figure 65C).

En accord avec ces résultats, une signature transcriptomique associée avec une inhibition de la différenciation kératinocytaire est obtenue. Plusieurs marqueurs de différenciation terminale du kératinocyte sont réprimés, pour la plupart impliqués directement ou indirectement dans la mise en place de la couche cornée, comme l'involucrine (*IVL*), la transglutaminase 5 (*TGM5*), la lorcrine (*LOR*) ou la desmogléine 3 (*DSG3*) (Figure 65D). Les marqueurs de différenciation kératinocytaire précoce

- Résultats - Chapitre 3 -

kératine 1 (*KRT1*) et kératine 10 (*KRT10*) sont également réprimés, tout comme un autre FdT de la famille MAD, le premier découvert et bien connu pour son rôle dans la différenciation, MAD1 (*MXD1*) (moyenne \pm SEM, $p=0,0001$, $n=9$) (Figure 65E).

Enfin, une signature transcriptomique associée à un état souche global, appelée Consensus Stemness Ranking (CSR), est détectée dans les cellules [*MXD4^{KD}*] (Figure 65F). Le Consensus Stemness Ranking est un ensemble de transcrits communs à plusieurs types de cellules souches ([Shats et al 2011](#)). Il a été établi en croisant l'expression des transcrits d'iPSC obtenues à partir de fibroblastes humains, de cellules souches embryonnaires humaines et murines, et de cellules souches de tumeurs épithéliales mammaires. La surexpression du CSR dans les kératinocytes [*MXD4^{KD}*] suggère une augmentation du caractère souche de ces cellules.

L'ensemble de ces résultats indique que la répression de *MXD4* conduit à une inhibition partielle des programmes de différenciation cellulaire, ce qui est favorable au maintien des caractéristiques spécifiques des PK.

- Résultats - Chapitre 3 -

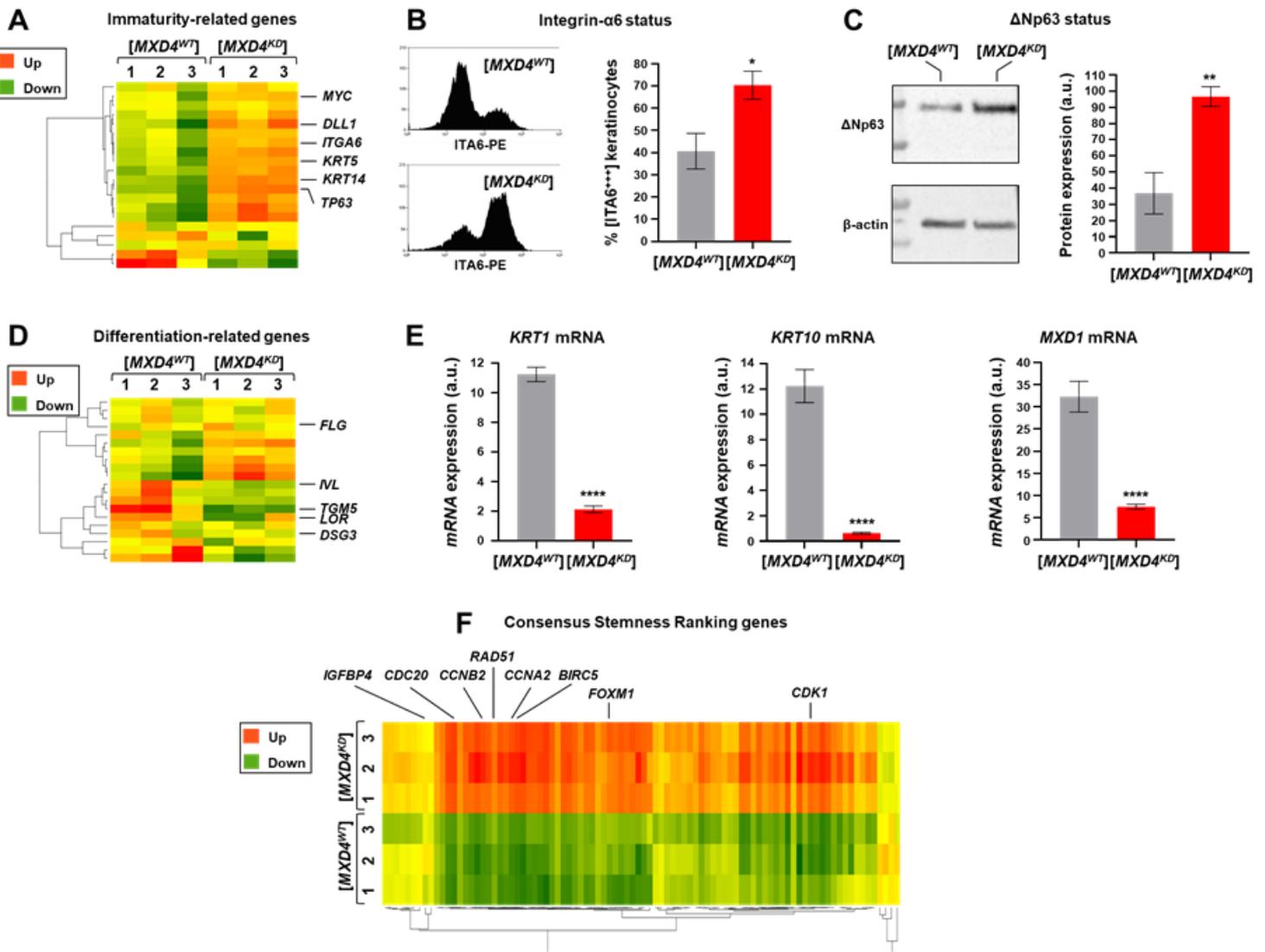


Figure 65 : La répression de *MXD4* préserve le caractère immature des holoclones de kératinocytes en inhibant la différenciation.

Une étude transcriptomique différentielle a été mise en place afin de comparer les transcrits exprimés dans les populations $[MXD4^{WT}]$ et $[MXD4^{KO}]$. **A**. Analyse comparative des profils transcriptomiques des cellules $[MXD4^{WT}]$ et $[MXD4^{KO}]$ à 60 DP. La heatmap indique l'expression relative de transcrits en lien avec l'immaturité des cellules $[MXD4^{KO}]$ par rapport aux cellules contrôles. **B**. Quantification de l'expression de l'intégrine- $\alpha 6$ par cytométrie en flux. Le seuil de positivité du signal a été déterminé par le contrôle isotypique (moyenne \pm SEM, $p=0.0159$, $n=5$). **C**. Quantification de l'expression de Δ n63 par western blot. La quantification du signal spécifique a été normalisée par la quantification du signal de l'actine (moyenne \pm SEM, $p=0,0087$, $n=6$). **D**. La heatmap indique l'expression relative de transcrits en lien avec la différenciation des cellules $[MXD4^{KO}]$ par rapport aux cellules contrôles. **E**. Quantification par RT-q-PCR de l'expression de transcrits relatifs à la différenciation précoce du kératinocyte (moyenne \pm SEM, $p=0,0001$, $n=9$). **F**. La heatmap indique l'expression relative des transcrits inclus dans le « Consensus Stemness Ranking » des cellules $[MXD4^{KO}]$ par rapport aux cellules contrôles. Le CSR est composé des transcrits communs à plusieurs types de cellules souches (CSE humaines et murines, iPSC humains et CS de tumeurs mammaires épithéliales).

B. La répression de MXD4 a un effet positif sur la prolifération des holoclones de kératinocytes.

Dans la biologie du kératinocyte, la différenciation et l'immaturation sont des notions directement liées à la prolifération cellulaire. Ainsi, la prolifération des holoclones de kératinocytes [*MXD4^{WT}*] et [*MXD4^{KD}*] a été étudiée. Pour cela, des holoclones de kératinocytes [*MXD4^{WT}*] et [*MXD4^{KD}*] ont mis en culture et la prolifération précoce a été quantifiée en comptant le nombre de cellules uniques qui ont effectué de 0 à 1 division, ou plus de 2 divisions après les premières 48 heures de culture. On constate une augmentation du nombre de cellules [*MXD4^{KD}*] ayant effectué deux divisions ou plus dans les premières 48h de culture comparé aux cellules contrôles (Figure 66A). Au bout de 72h de culture, les cellules [*MXD4^{KD}*] présentent des colonies denses comprenant en général plus de cellules que les colonies issues de cellules [*MXD4^{WT}*] (Figure 66B). Les cellules ont ensuite été sous-cultivées en culture de masse pendant 3 semaines, et le nombre de doublements de population calculé à chaque passage ($DP = \log(N/N_0) / 0,3$, où N est le nombre de cellules récupérées et N₀ le nombre de cellules ensemencées). Après 3 semaines en culture de masse, les kératinocytes [*MXD4^{KD}*] ont effectué environ 6 DP de plus que les cellules contrôles (moyenne ± SEM, p=0,0001, n=24) (Figure 66C). Afin d'évaluer le potentiel clonogénique de ces cellules, elles ont été ensemencées en microcultures clonales parallèles dans des plaques 96 puits, et maintenues en culture pendant deux semaines. Ensuite, les clones ont été trypsinés et le nombre de cellules dans chaque clone a été compté. Les cellules [*MXD4^{WT}*] ont généré 24 clones, contre 100 pour les cellules [*MXD4^{KD}*]. De plus, les clones [*MXD4^{KD}*] comptent également plus de cellules (p=0,0172, calculée sur les gros clones comportant plus de 3x10⁴ cellules) (Figure 66D).

L'analyse transcriptomique précédente a été mise à profit pour explorer l'expression des gènes associés à la progression dans le cycle cellulaire, dont certains sont des gènes cibles de c-MYC (comme les cyclines D et E ou les inhibiteurs du cycle cellulaire p15^{INK4b} et p21^{Cip1}). La plupart des activateurs du cycle sont surexprimés dans les cellules [*MXD4^{KD}*] comparés aux cellules contrôles (comme *CDK1*, *CDC20* et *CDC25*) tandis que l'expression de la plupart des inhibiteurs du cycle est réprimée (*CDKN2B* (p15^{INK4b}), *CDKN1A* (p21^{Cip1}), *CDKN1C* (p57)) (Figure 66E). L'expression de l'ARNm de Ki67 (*MKI67*), un marqueur de prolifération reconnu, est également massivement induite (Figure 66F). Pour confirmer l'induction de l'expression de Ki67 au niveau protéique, des kératinocytes [*MXD4^{WT}*] et [*MXD4^{KD}*] en culture bidimensionnelle ont été fixés, perméabilisés et marqués avec un anticorps primaire anti-Ki67. Le pourcentage de cellules positives pour Ki67 a été quantifié. 15,2% ± 2,1 des cellules contrôles sont positives, contre 24,8% ± 2,9 pour les cellules [*MXD4^{KD}*] (moyenne ± SEM, p=0,0211, n=20 puits par conditions, 2000 cellules par puits) (Figure 66G).

- Résultats - Chapitre 3 -

L'ensemble de ces résultats indique que, conséquemment à l'accroissement du caractère immature conféré par la répression de *MXD4*, la prolifération cellulaire est stimulée. Certains des gènes cibles de c-MYC, comme les cyclines, sont fortement modulés, et pourraient contribuer à l'augmentation du potentiel clonogénique des holoclones [*MXD4^{KD}*].

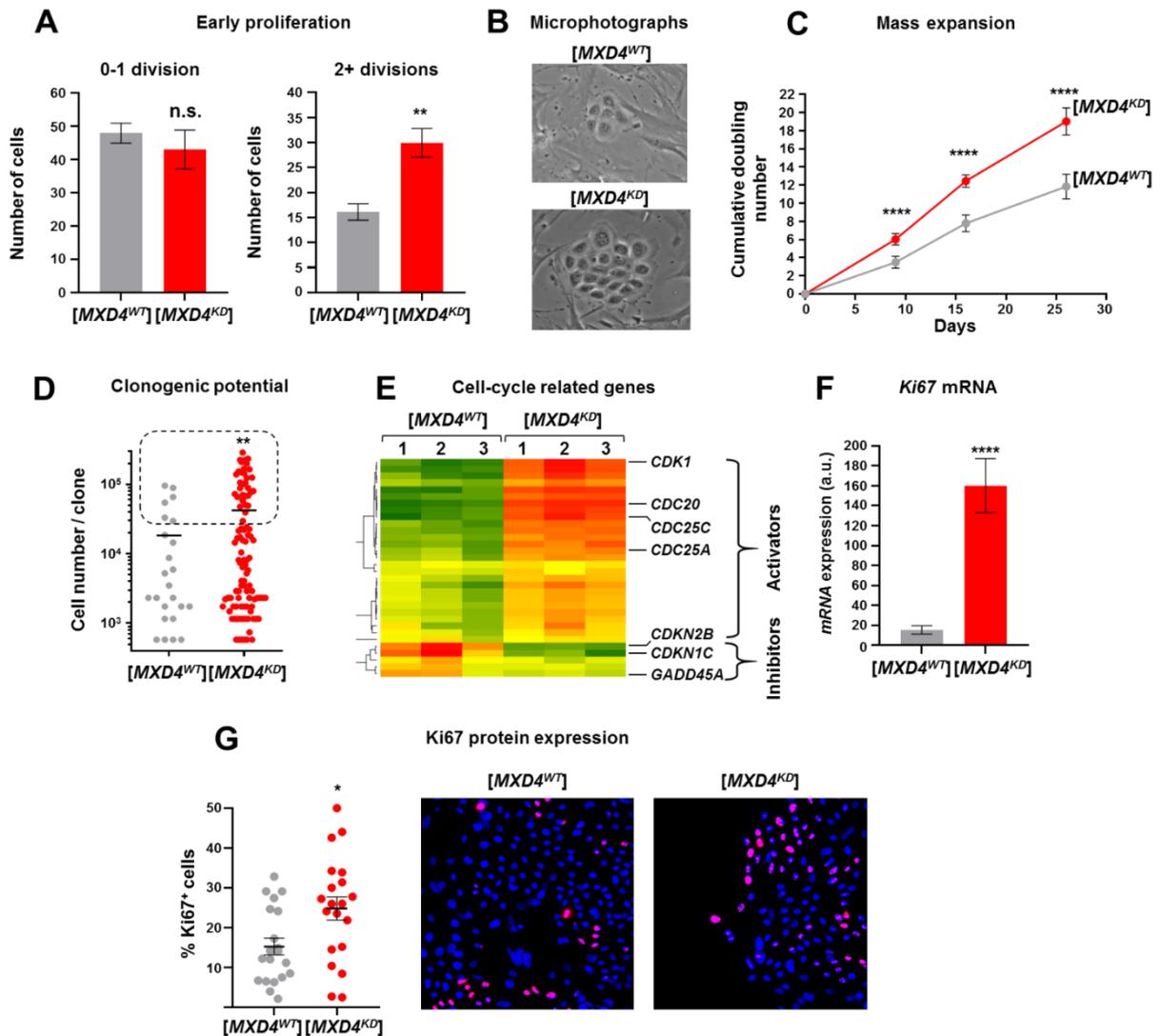


Figure 66 : La répression de *MXD4* augmente la prolifération des holoclones de kératinocytes.

Des holoclones de kératinocytes [*MXD4^{WT}*] et [*MXD4^{KD}*] ont été cultivés en milieu contenant du sérum et des couches nourricières afin de quantifier leur capacité de prolifération. **A.** La prolifération précoce a été estimée en comptant le nombre de cellules qui ont effectué 0-1 division (moyenne \pm SEM, $p=0,66$, $n=6$ cultures), ou 2+ divisions après 48h de culture (moyenne \pm SEM, $p=0,043$, $n=6$). **B.** Images représentatives de colonies de kératinocytes après 48h de culture. **C.** Profil d'expansion en culture de masse pendant 3 sous-cultures successives (moyenne \pm SEM, $p=0,0001$, $n=24$ pour les 3 passages). **D.** Profil de croissance clonale obtenu après ensemencement et culture par la méthode des microcultures clonales parallèles (moyenne \pm SEM, $p=0,0172$, $n=30$ plaques par condition). **E.** Heatmap montrant l'expression relative des transcrits liés au cycle cellulaire dans le contexte [*MXD4^{KD}*] versus [*MXD4^{WT}*]. **F.** Quantification de l'expression des ARNm *MKI67* par RT-q-PCR (moyenne \pm SEM, $p=0,0001$, $n=18$). **G.** Quantification du pourcentage de kératinocytes positifs pour le marqueur de prolifération Ki67 par analyse immunocytochimique (moyenne \pm SEM, $p=0,0211$, $n=20$ puits par conditions, 2000 cellules par puits).

IV. La répression de *MXD4* préserve la capacité de régénération épidermique des précurseurs de kératinocytes.

Des holoclones de kératinocytes et des kératinocytes basaux [*MXD4*^{WT}] et [*MXD4*^{KD}] ont été utilisés pour reconstruire des épidermes *in vitro*. Des kératinocytes à deux stades d'amplification *in vitro* ont été utilisés : un stade 'précoce', où ils ont subi peu d'amplification en culture, et un stade 'tardif', où ils ont subi des étapes d'amplifications massives. Le 1^{er} contexte ainsi généré correspond à des kératinocytes ayant subi une expansion relativement faible (environ 30 DP). A ce stade, les kératinocytes sont capables de reconstruire un épiderme. Ce contexte d'expansion modérée permettra de s'assurer que la répression stable de *MXD4* n'est pas délétère pour la reconstruction épidermique. Le 2nd contexte correspond à des kératinocytes ayant subi des phases d'amplification massive en culture (environ 70-80 DP). A ce stade, la plupart des cellules a atteint un stade de senescence réplivative, et a perdu son potentiel prolifératif et régénératif. Ce contexte d'expansion intensive permettra de déterminer si la répression de *MXD4* permet d'empêcher la perte de potentiel régénératif à long terme des PK.

Des épidermes reconstruits ont été générés selon le protocole décrit dans la section Matériel et Méthodes ([Alexaline et al 2015](#)), puis la qualité de la reconstruction a été évaluée.

Les épidermes reconstruits avec des kératinocytes [*MXD4*^{WT}] et [*MXD4*^{KD}] au stade 'précoce' (30 DP) sont macroscopiquement similaires (**Figure 67A**) et présentent toutes les couches de l'épiderme, y compris une couche basale et une couche cornée. Les épaisseurs des tissus générés sont également comparables ([*MXD4*^{WT}] : 62,3 $\mu\text{m} \pm 1,1$, [*MXD4*^{KD}] : 61,1 $\mu\text{m} \pm 1,1$, $p=0,19$, $n=150$ mesures sur 6 épidermes par condition) (**Figure 67C**). Dans l'épiderme humain sain, la couche basale, qui abrite les cellules souches, possède un haut niveau d'organisation, avec des cellules très denses et polarisées de manière apico-basale. Au cours de ce travail, nous avons développé un algorithme permettant de quantifier l'orientation d'un noyau cellulaire (collaboration avec le Dr. Daniel Stockholm, Genethon, voir partie Méthodologie). L'analyse de l'orientation des noyaux des kératinocytes de la couche basale dans les épidermes reconstruits avec des kératinocytes [*MXD4*^{WT}] et [*MXD4*^{KD}] à 30 DP a révélé un profil similaire. La majorité des kératinocytes présente une orientation comprise entre 60 et 90 degrés par rapport à la lame basale (position verticale), indiquant une polarisation correcte (**Figure 67B**). La fonction principale de l'épiderme est de lutter contre l'entrée de pathogènes extérieurs au corps, et contre une perte hydrique excessive. C'est la fonction barrière, assurée par la couche cornée de l'épiderme. Cette fonction peut être évaluée *in vitro* par deux tests fonctionnels, que j'ai mis en place au laboratoire au cours de ma thèse (test TEWL et Lucifer Yellow, voir partie Méthodologie). La perte hydrique à la surface des épidermes (TEWL), mesurée en $\text{g/m}^2\text{h}$

- Résultats - Chapitre 3 -

d'eau, est similaire à la surface des épidermes [*MXD4^{WT}*] ($49,8 \text{ g/m}^2\text{h} \pm 0,2$) et [*MXD4^{KD}*] ($49,9 \text{ g/m}^2\text{h} \pm 0,2$) à 30 PD (moyenne \pm SEM, $p=0,91$, $n=18$) (Figure 67D). La diffusion de la Lucifer Yellow à travers les épidermes [*MXD4^{WT}*] et [*MXD4^{KD}*] a été quantifiée par spectrophotométrie. Quand des kératinocytes à 30 PD sont utilisés pour reconstruire les épidermes, aucune différence dans la cinétique de diffusion de la Lucifer Yellow n'est observée (Figure 67E), suggérant une fonction barrière similaire entre les deux contextes cellulaires.

Aucun des paramètres mesurés permettant de qualifier la reconstruction épidermique ne varie entre les épidermes [*MXD4^{WT}*] et [*MXD4^{KD}*] quand des kératinocytes à environ 30 DP sont utilisés. Ainsi, ces résultats indiquent que la répression stable de *MXD4* n'est pas délétère pour la reconstruction épidermique.

Early expansion context (30 PD)

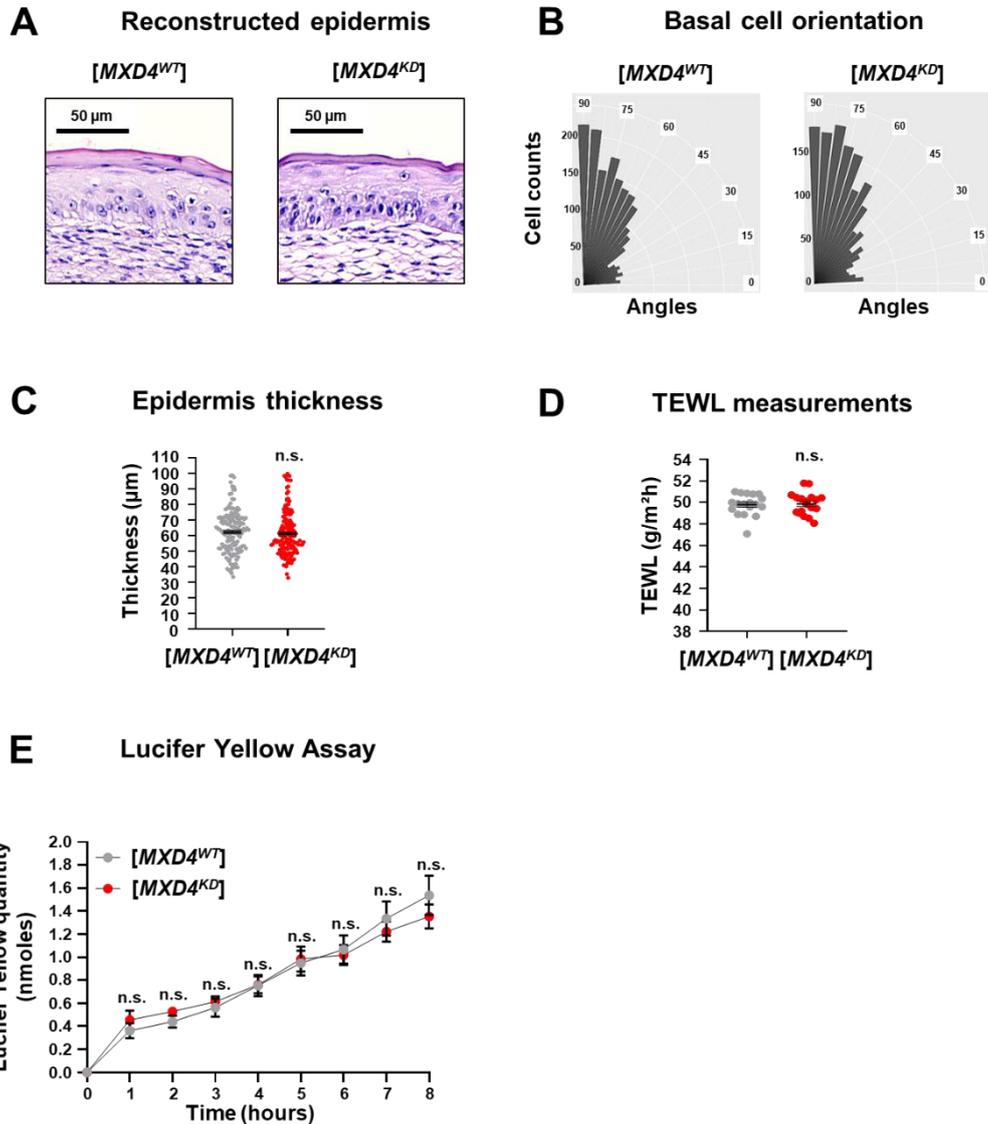


Figure 67 : La répression de *MXD4* n'est pas délétère pour la reconstruction épidermique.

Des holoclones de kératinocytes et des kératinocytes basaux ADG⁺⁺⁺ [*MXD4^{WT}*] et [*MXD4^{KD}*] ayant subi une expansion modérée en culture (30 DP) ont été cultivés en milieu contenant du sérum et des couches nourricières pendant une semaine, puis ont été utilisés pour reconstruire des épidermes sur gel de fibrine. **A.** Images représentatives de coupes d'épidermes reconstruits colorées au HES pour marquer les structures (n=9 épidermes par conditions). **B.** Des coupes d'épidermes reconstruits marqués au DAPI ont été scannées, et la polarité des noyaux analysée par ImageJ. Les noyaux peuvent être horizontaux (0-30 degrés par rapport à la lame basale), obliques (30-60 degrés) ou verticaux (60-90 degrés). **C.** Quantification de l'épaisseur des épidermes reconstitués ([*MXD4^{WT}*] : 62,3 $\mu\text{m} \pm 1,1$, [*MXD4^{KD}*] : 61,1 $\mu\text{m} \pm 1,1$, p=0,19, n=150 mesures sur 6 épidermes par conditions). **D-E.** Tests fonctionnels de qualification de la fonction barrière. **D.** Mesure de la diffusion et de l'évaporation à la surface des épidermes reconstitués par une sonde de mesure TEWL ([*MXD4^{WT}*] : 49,8 $\text{g}/\text{m}^2\text{h} \pm 0,2$ [*MXD4^{KD}*] : 49,9 $\text{g}/\text{m}^2\text{h} \pm 0,2$ (moyenne \pm SEM, p=0,91, n=18). **E.** Quantification de la cinétique de diffusion de la Lucifer Yellow à travers l'épiderme. Une mesure d'absorbance à 450 nm est prise toutes les heures.

- Résultats - Chapitre 3 -

Nous avons ensuite reconstruit des épidermes à partir de kératinocytes [*MXD4^{WT}*] et [*MXD4^{KD}*] ayant subi une amplification massive en culture (70-80 DP). Les kératinocytes [*MXD4^{WT}*] ne sont plus capables de reconstruire un épiderme pluristratifié, contrairement aux cellules [*MXD4^{KD}*], qui génèrent des épidermes pluristratifiés comprenant encore une couche basale, une couche cornée et les couches intermédiaires (Figure 68A). Les cellules [*MXD4^{WT}*] génèrent seulement une ou deux couches cellularisées, sans aucune organisation, et l'épaisseur des tissus ($24,9 \mu\text{m} \pm 1,3$) est bien inférieure aux épidermes reconstruits [*MXD4^{KD}*] ($76,9 \mu\text{m} \pm 1,9$) (moyenne \pm SEM, $p=0,0001$, $n=80$ mesures) (Figure 68C). La polarisation des kératinocytes basaux est également plutôt bonne dans les épidermes reconstruits avec des cellules [*MXD4^{KD}*] à 70 DP. Cependant, dans les épidermes [*MXD4^{WT}*], la plupart des noyaux des kératinocytes basaux sont orientés parallèlement à la lame basale (0-30 degrés), témoignant d'une désorganisation massive du tissu (Figure 68B). La fonction barrière a été qualifiée par les tests TEWL et Lucifer Yellow. A la surface des épidermes [*MXD4^{KD}*], des valeurs de TEWL plus basses ont été mesurées ($42,7 \text{ g/m}^2\text{h} \pm 0,6$) qu'à la surface des épidermes contrôles ($47,0 \text{ g/m}^2\text{h} \pm 1,1$) (moyenne \pm SEM, $p=0,0014$, $n=12$), qui ne présentent pas de couche cornée (Figure 68D). A contrario, les épidermes reconstruits avec des kératinocytes [*MXD4^{WT}*] à 70 DP laissent diffuser plus de Lucifer Yellow que les épidermes [*MXD4^{KD}*] au cours du temps, suggérant une fonction barrière accrue des épidermes [*MXD4^{KD}*] (Figure 68E).

Nous avons montré précédemment que la répression de *MXD4* semble inhiber la différenciation des kératinocytes *in vitro*. Cependant, les épidermes [*MXD4^{KD}*] possèdent une couche cornée, qui est normalement formée par des kératinocytes matures, différenciés. Afin de vérifier que la répression de *MXD4* n'empêche pas de générer des épidermes normaux, des coupes OCT d'épidermes reconstruits à partir de kératinocytes [*MXD4^{KD}*] à 70 DP ont été marquées par des anticorps primaires dirigés contre l'involucrine, la laminine 5 et l'intégrine- $\alpha 6$. L'expression et la localisation de ces protéines de structures sont normales dans les épidermes reconstruits à partir de kératinocytes [*MXD4^{KD}*] à 70 DP (Figure 68F).

Ces résultats indiquent que la répression stable de *MXD4* permet d'empêcher la perte de potentiel régénératif associée aux phases d'amplification massive des PK en culture. De plus, ils suggèrent également une fonction barrière accrue dans un contexte où *MXD4* est réprimé. Bien qu'associée à une inhibition de la différenciation en culture 2D, la répression de *MXD4* n'empêche pas la différenciation en 3D dans des modèles organotypiques d'épiderme.

Late expansion context (70 PD)

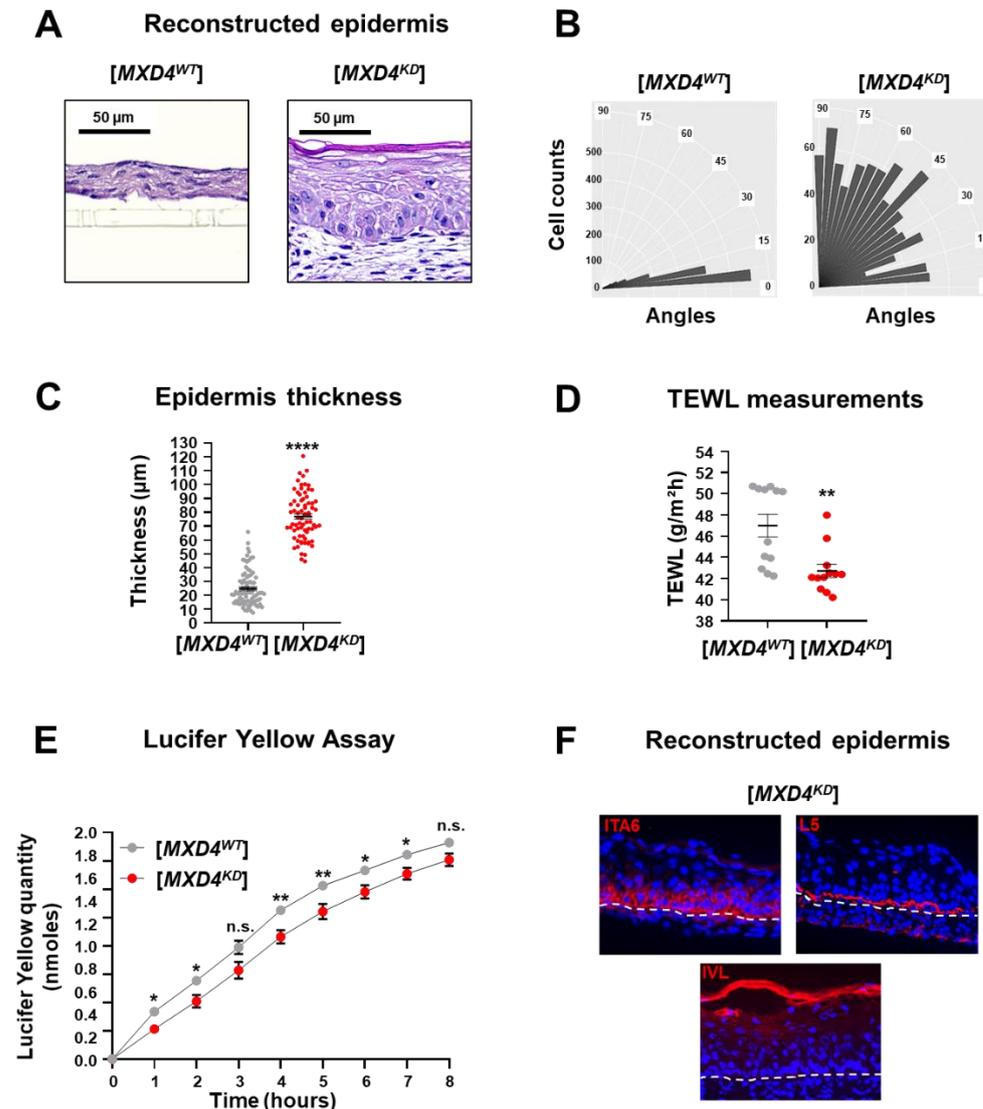


Figure 68 : La répression de *MXD4* préserve le potentiel régénératif à long terme des précurseurs kératinocytaires.

Des holoclones de kératinocytes et des kératinocytes basaux Adh⁺⁺⁺ [*MXD4*^{WT}] et [*MXD4*^{KD}] ayant subi une expansion massive en culture (70 DP) ont été cultivés en milieu contenant du sérum et des couches nourricières pendant une semaine, puis ont été utilisés pour reconstruire des épidermes sur gel de fibrine. **A.** Images représentatives de coupes d'épidermes reconstruits colorées au HES pour marquer les structures (n=9 épidermes par conditions). **B.** Des coupes d'épidermes reconstruits marqués au DAPI ont été scannées, et la polarité des noyaux analysée par ImageJ. Les noyaux peuvent être horizontaux (0-30 degrés par rapport à la lame basale), obliques (30-60 degrés) ou verticaux (60-90 degrés). **C.** Quantification de l'épaisseur des épidermes reconstitués ([*MXD4*^{WT}] : 24,9 μm ± 1,3, [*MXD4*^{KD}] : 76,9 μm ± 1,9 (moyenne ± SEM, p=0,0001, n=80 mesures). **D-E.** Tests fonctionnels de qualification de la fonction barrière. **D.** Mesure de la diffusion et de l'évaporation à la surface des épidermes reconstitués par une sonde de mesure TEWL ([*MXD4*^{KD}] : 42,7 g/m²h ± 0,6, [*MXD4*^{WT}] : 47,0 g/m²h ± 1,1 (moyenne ± SEM, p=0,0014, n=12). **E.** Quantification de la cinétique de diffusion de la Lucifer Yellow à travers l'épiderme. Une mesure d'absorbance à 450 nm est prise toutes les heures. **F.** Coupes d'épidermes reconstruits marquées avec des anticorps anti-intégrine-α6, anti-laminine 5 et anti-involucrine, montrant une différenciation normale des épidermes [*MXD4*^{KD}] à 70 DP.

V. Mécanismes de régulation : la répression de *MXD4* modifie la proportion des complexes MAD4/MAX et c-MYC/MAX.

Les fonctions biologiques de MAD4 et de son antagoniste c-MYC sont soumises au préalable à la dimérisation de ceux-ci avec MAX, qui permet la liaison à l'ADN. La modulation de la transcription des gènes cibles est dépendante de l'occupation des E-Box par les différents hétérodimères. La proportion de chacun des deux hétérodimères repose sur un équilibre entre la quantité de MAD4, c-MYC et MAX. Je me suis donc intéressé à l'expression de ces 3 partenaires, puis à la proportion des complexes MAD4/MAX et c-MYC/MAX dans les contextes cellulaires [*MXD4^{WT}*] et [*MXD4^{KD}*].

Notre hypothèse de travail était que l'introduction d'une répression partielle de *MXD4* pourrait avoir un impact sur l'expression des autres partenaires du réseau, pouvant contribuer à générer un déséquilibre dans la proportion des complexes (Figure 69A).

Afin de tester cette hypothèse, des holoclones de kératinocytes [*MXD4^{WT}*] et [*MXD4^{KD}*] ont été cultivés sur couches nourricières dans du milieu contenant du sérum. Les ARN totaux et les protéines totales ont ensuite été extraits. Le niveau d'expression des ARNm de *MYC*, *MXD4* et *MAX* ont été quantifiés par RT-q-PCR. Une augmentation d'environ 50% (moyenne \pm SEM, $p=0,0284$, $n=20$) des ARNm *MYC* et une répression d'environ 80% (moyenne \pm SEM, $p=0,0003$, $n=8$) de l'expression des ARNm *MXD4* sont observées dans les kératinocytes [*MXD4^{KD}*] comparé aux kératinocytes contrôles [*MXD4^{WT}*]. Le niveau d'ARNm de *MAX* est similaire dans les contextes cellulaires [*MXD4^{WT}*] et [*MXD4^{KD}*] ($p=0,99$, $n=11$) (Figure 69B). Le niveau d'expression des protéines c-MYC, MAD4 et MAX a été quantifié par western-blot. Les patterns de modulation sont similaires à ceux observés pour les ARNm : le niveau d'expression de la protéine c-MYC est environ 2,5 fois supérieur dans les cellules [*MXD4^{KD}*] comparé au contexte cellulaire contrôle [*MXD4^{WT}*] ($p=0,0104$, $n=8$). L'expression de MAD4 est diminuée d'environ 60% dans les kératinocytes [*MXD4^{KD}*] comparé aux kératinocytes contrôles [*MXD4^{WT}*] ($p=0.0317$, $n=5$). La quantité de protéine MAX n'est pas impactée par la modulation de MAD4 ($p=0,99$, $n=6$) (Figure 69C-D).

- Résultats - Chapitre 3 -

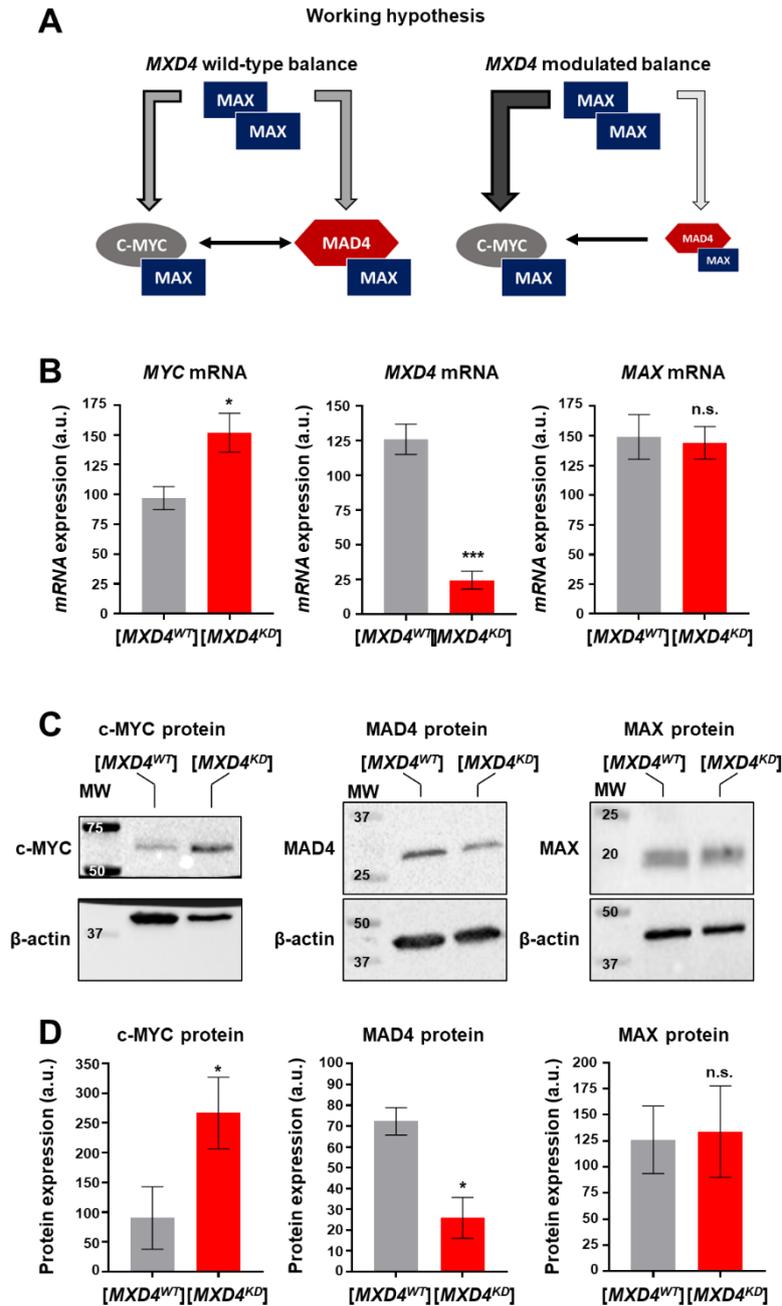


Figure 69 : La répression de *MXD4* modifie l'expression des acteurs du réseau MAD4/MAX/c-MYC.

A. Schéma de l'hypothèse de travail proposé : dans le contexte [MXD4^{WT}], les interactions MAD4/MAX et c-MYC/MAX sont à l'équilibre. Dans le contexte [MXD4^{KD}], la répression de MAD4, antagoniste de c-Myc, pourrait entraîner une modification dans l'équilibre des interactions MAD4/MAX et c-MYC/MAX, pour favoriser les hétérodimères c-MYC/MAX. Afin de vérifier cette hypothèse, les ARN et les protéines totales ont été extraits de kératinocytes [MXD4^{WT}] et [MXD4^{KD}]. **B.** Quantification par RT-q-PCR des niveaux d'expression des ARNm de MYC (moyenne ± SEM, p=0,0284, n=20), MXD4 (moyenne ± SEM, p=0,0003, n=8) et MAX (moyenne ± SEM, p=0,99, n=11) dans les contextes cellulaires [MXD4^{WT}] et [MXD4^{KD}]. **C.** Images représentatives de membranes de WB montrant la détection des protéines c-MYC, MAD4 et MAX. L'actine est utilisée comme marqueur de charge. **D.** Quantification des signaux de WB pour c-MYC (moyenne ± SEM, p=0,0104, n=8), MAD4 (moyenne ± SEM, p=0,0317, n=5) et MAX (moyenne ± SEM, p=0,99, n=6), normalisés par rapport à la quantification de l'actine.

- Résultats - Chapitre 3 -

La proportion des complexes MAD4/MAX et c-MYC/MAX a ensuite été étudiée dans les contextes [*MXD4^{WT}*] et [*MXD4^{KD}*] par la technique de « Proximity Ligation Assay » (PLA). Elle repose sur la détection puis la quantification d'un signal fluorescent produit par l'interaction physique entre deux protéines d'intérêt. Des holoclones de kératinocytes [*MXD4^{WT}*] et [*MXD4^{KD}*] ont été cultivés puis les cultures fixées afin de pouvoir réaliser les étapes de marquage PLA. Des anticorps primaires contre MAX, MAD4 et c-MYC ont été incubés par paire afin de détecter les hétérodimères MAD4/MAX et c-MYC/MAX. Le contrôle négatif correspond au protocole complet de PLA sans l'incubation avec les anticorps primaires. Le nombre de signaux PLA positifs a ensuite été quantifié par des analyses de microscopie à haut contenu à l'aide du système CellInsight CX7. Pour chacune des conditions [*MXD4^{WT}*] et [*MXD4^{KD}*], les signaux PLA ont été comptés dans 350 cellules en moyenne, réparties dans 3 puits correspondant à des transductions et cultures indépendantes, et rapportés au nombre de signaux positifs par cellule. Le bruit de fond du contrôle négatif, quantifié individuellement dans 400 cellules, a été soustrait des signaux spécifiques.

La quantification des interactions MAD4/MAX indique $3,2 \pm 0,3$ signaux PLA positifs / cellule dans les kératinocytes [*MXD4^{WT}*] contre seulement $0,9 \pm 0,1$ signal / cellule dans les [*MXD4^{KD}*] (moyenne \pm SEM, $p=0,0001$, $n=215-225$). La quantification des interactions c-MYC/MAX indique $2,6 \pm 0,1$ signaux PLA positifs / cellule dans les kératinocytes [*MXD4^{WT}*]. Une augmentation du nombre de signaux positifs a $4,3 \pm 0,2$ par cellule est constatée dans le contexte [*MXD4^{KD}*] (moyenne \pm SEM, $p=0,0001$, $n=378-472$) (Figure 70A-B).

L'ensemble de ces résultats indiquent que la répression stable de *MXD4* dans les holoclones de kératinocytes induit un changement dans l'expression des partenaires du réseau MAD4/MAX/c-MYC : l'expression de c-MYC est augmentée conséquemment à la répression de MAD4. MAX n'est pas impacté. Ce changement dans l'expression des partenaires a des conséquences au niveau de l'équilibre entre les hétérodimères. La répression de MAD4 favorise la formation des complexes c-MYC/MAX aux dépens des complexes MAD4/MAX, probablement à cause de la disponibilité relative des partenaires de MAX.

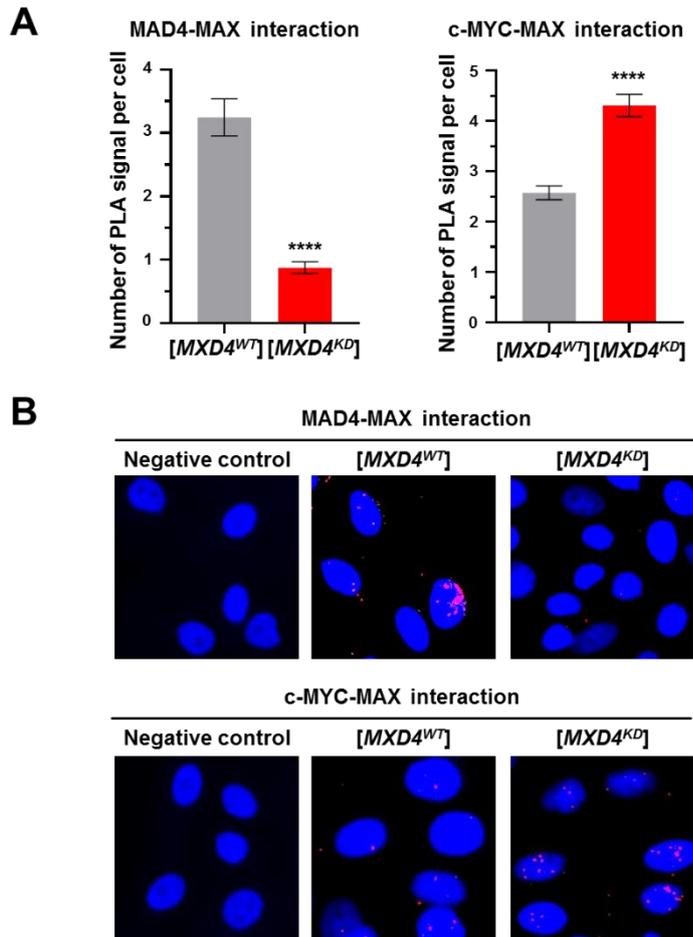


Figure 70 : La répression de *MXD4* modifie la proportion de complexes MAD4/MAX et c-MYC/MAX.

La quantification des hétérodimères MAD4/MAX et c-MYC/MAX dans les contextes cellulaires [*MXD4*^{WT}] et [*MXD4*^{KD}] a été réalisée par la technique de PLA. **A.** Quantification du nombre de signaux PLA positifs par cellule par microscopie haut contenu CellInsight CX7. Le bruit de fond du contrôle négatif (pas d'anticorps primaire), quantifié individuellement dans 400 cellules, a été soustrait des signaux spécifiques (moyenne \pm SEM, interactions MAD4/MAX, $p=0,0001$, $n=215-225$, interactions c-MYC/MAX, $p=0,0001$, $n=378-472$) **B.** Images représentatives acquises au CellInsight CX7 correspondant aux signaux positifs analysés dans les cultures de kératinocytes.

VI. Mécanismes de régulation : étude de l'impact d'une répression de *MYC* sur la prolifération des holoclones.

Le FdT c-MYC est un antagoniste de MAD4, et nous avons montré précédemment que la répression de *MXD4* conduit, d'une part, à une modification dans l'équilibre des complexes c-MYC/MAX/MAD4, et d'autre part à une augmentation de la prolifération. Afin de confirmer ces résultats au niveau fonctionnel, nous avons généré un contexte cellulaire où *MYC* est réprimé de manière stable [*MYC*^{KD}], et un contexte cellulaire contrôle [*MYC*^{WT}], dans des holoclones de kératinocytes.

Les holoclones de kératinocytes [*MYC*^{WT}] et [*MYC*^{KD}] ont été cultivés en culture de masse, et les ratios d'expansion (N/N_0 , où N est le nombre de cellules récupérées et N_0 le nombre de cellules ensemencées) ont été calculés. Après une semaine de culture, on constate une forte diminution de la croissance : les cellules contrôles ont un ratio d'expansion de $69,7 \pm 2,4$ alors que les cellules [*MYC*^{KD}] ont un ratio d'expansion de $19,7 \pm 0,7$ (moyenne \pm SEM, $p=0,0238$, $n=3$ pour [*MYC*^{WT}] et $n=6$ pour [*MYC*^{KD}] (2 shARN différents)) (Figure 71A). Après deux semaines de culture, le ratio cumulé des cellules

- Résultats - Chapitre 3 -

contrôle est de $4307 \pm 178,5$, contre $487,2 \pm 28,1$ pour les cellules [*MYC^{KD}*] (moyenne \pm SEM, $p=0,0238$, $n=3$ pour [*MYC^{WT}*] et $n=6$ pour [*MYC^{KD}*] (2 shARN différents)). Les cellules [*MYC^{KD}*] présentent des colonies plus petites, dont les bords sont irréguliers, avec des cellules réfringentes typiques de cellules en cours de différenciation (Figure 71B). Quand les cellules sont cultivées sur le long terme (environ 2 mois de culture), les cellules [*MYC^{KD}*] ne prolifèrent presque plus après environ 20 DP cumulés, alors que les cellules contrôles continuent leur phase de croissance exponentielle au-delà des 30 DP (Figure 71C). Quand les contextes cellulaires sont ensemencés à très faible densité dans des boîtes de Pétri afin de déterminer leur potentiel à former des colonies, les cellules [*MYC^{KD}*] forment beaucoup moins de colonies que les cellules contrôle (Figure 71D).

Ces résultats indiquent que la répression de *MYC* a un effet délétère sur la prolifération cellulaire, tout à fait en accord avec les observations de l'augmentation de la prolifération causée par la répression de *MXD4*.

L'ensemble de ces résultats suggère donc que les proportions des complexes MAD4/MAX et c-MYC/MAX sont des acteurs clé du contrôle de la prolifération et du cycle cellulaire des holoclones de kératinocytes.

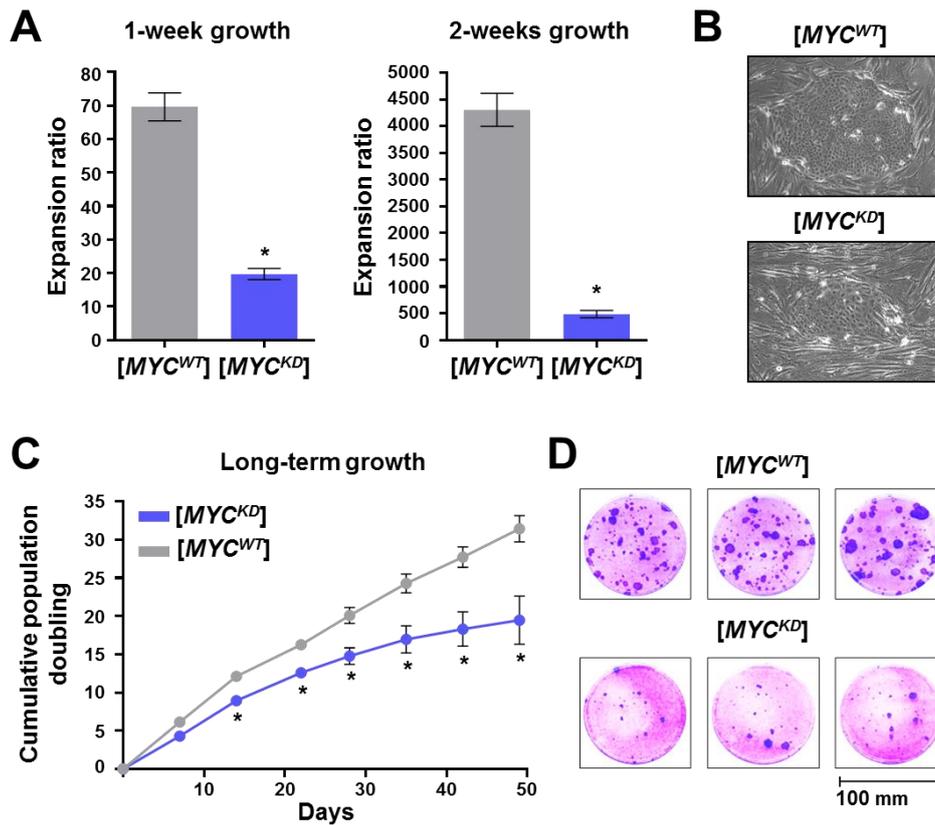


Figure 71 : La répression de *MYC* diminue la prolifération des holoclones de kératinocytes.

Des holoclones de kératinocytes ont été transduits avec des vecteurs lentiviraux codant la GFP seule [MYC^{WT}] ou la GFP et un shARN anti-MYC [MYC^{KD}]. Trois jours post-transduction, ils ont été triés par cytométrie en flux selon l'expression de la GFP, et remis en culture pour caractériser leur prolifération. **A.** Quantification de la prolifération après 1 et 2 semaines de cultures de masse. Les ratios d'expansion sont calculés selon la formule N/N_0 , où N est le nombre de kératinocytes récupérés et N_0 le nombre de kératinocytes ensemencés (moyenne \pm SEM, $p=0,0238$, $n=3$ pour [MYC^{WT}] et $n=6$ pour [MYC^{KD}] (2 shARN différents)) pour les deux temps) **B.** Images représentatives de colonies de kératinocytes après 96h de culture. **C.** Profil d'expansion en culture de masse pendant 7 sous-cultures successives. **D.** Images représentatives de boîtes de Pétri ensemencées à très faible densité afin de déterminer le potentiel à former des colonies.

VII. La répression stable de *MXD4* n'est pas délétère pour l'intégrité génomique des précurseurs de kératinocytes.

MXD4 a été précédemment décrit comme un gène suppresseur de tumeurs à cause de sa fonction inhibitrice de la prolifération et de sa fonction opposée à la transformation tumorale exercée par c-MYC. Dans le système biologique décrit ici, la répression de *MXD4* semble se faire au profit de l'expression de c-MYC. Il est donc important de vérifier que la dérégulation de l'équilibre entre les complexes MAD4/MAX et c-MYC/MAX ne favorise pas un contexte propice à la transformation cellulaire.

- Résultats - Chapitre 3 -

Pour cela, des kératinocytes basaux [*MXD4^{WT}*] et [*MXD4^{KD}*] transduits à 15 PD ont été cultivés jusqu'à 50 PD environ afin de disposer de matériel tardif ayant subi de multiples phases d'expansion cellulaire durant lesquelles les cellules auraient pu accumuler des mutations délétères. L'ADN des cellules [*MXD4^{WT}*] et [*MXD4^{KD}*] a été extrait, purifié et préparé pour le séquençage. Nous avons choisi de séquencer uniquement l'exome (ensemble des exons), afin de concentrer nos recherches sur des altérations génomiques qui pourraient affecter les ARN codants les protéines. L'étude génomique a consisté à comparer 3 transductions et cultures indépendantes de chaque contexte [*MXD4^{WT}*] et [*MXD4^{KD}*] afin de déterminer dans un premier temps les profils des variants entre les échantillons [*MXD4^{WT}*] et [*MXD4^{KD}*]. Les profils de variants retrouvés dans les cultures [*MXD4^{WT}*] et [*MXD4^{KD}*] sont similaires (Figure 72A-B). Dans un deuxième temps, les délétions ou insertions de gènes ou morceaux de gènes à travers le génome, résultant dans l'augmentation ou la diminution du nombre de copies d'un gène, ont été analysées par le Copy Number Aberrations (CNA). Le CNA a été déterminé pour chacun des réplicats [*MXD4^{WT}*] et [*MXD4^{KD}*], puis les CNA détectés dans les échantillons [*MXD4^{WT}*] ont été soustraits des CNA détectés dans les échantillons [*MXD4^{KD}*] afin de déterminer le profil des CNA différemment détectés dans les échantillons [*MXD4^{KD}*]. Aucune zone du génome n'a été amplifiée ou supprimée lors des phases de culture durant lesquelles *MXD4* est réprimé de manière stable (Figure 72C). Enfin, la recherche de mutations dans des gènes liés aux cancers épithéliaux (Basal Cell Carcinoma et Squamous Cell Carcinoma) a été effectuée (Liste des gènes étudiés en Table 2). Aucune mutation n'a été détectée dans les gènes liés à la mise en place et au développement des BCC (Figure 72D) ou des SCC (Figure 72E).

Table 2 : Sélection de gènes liés aux cancers épithéliaux.

Gènes liés aux BCC:

PTCH1 (PATCHED-1); *MYCN* (MYCN proto-oncogene, BHLH transcription factor); *PTPN14* (protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 14); *PPP6C* (protein phosphatase 6 catalytic subunit); *SMO* (smoothed, frizzled class receptor); *STK19* (serine/threonine kinase 19); *RB1* (RB transcriptional corepressor 1); *SUFU* (SUFU negative regulator of hedgehog signaling).

Gènes liés aux SCC:

TP53 (tumor protein P53); *KRAS* (KRAS proto-oncogene, GTPase); *CDKN2A* (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, encoding p16-INK4A and p14-ARF); *RB1* (RB transcriptional corepressor 1); *KNSTRN* (kinetochore localized astrin (SPAG5) binding protein); *CCND1* (cyclin D1); *NOTCH1* (NOTCH1); *SOX2* (SRY-Box 2); *FBXW7* (F-box and WD repeat domain containing 7).

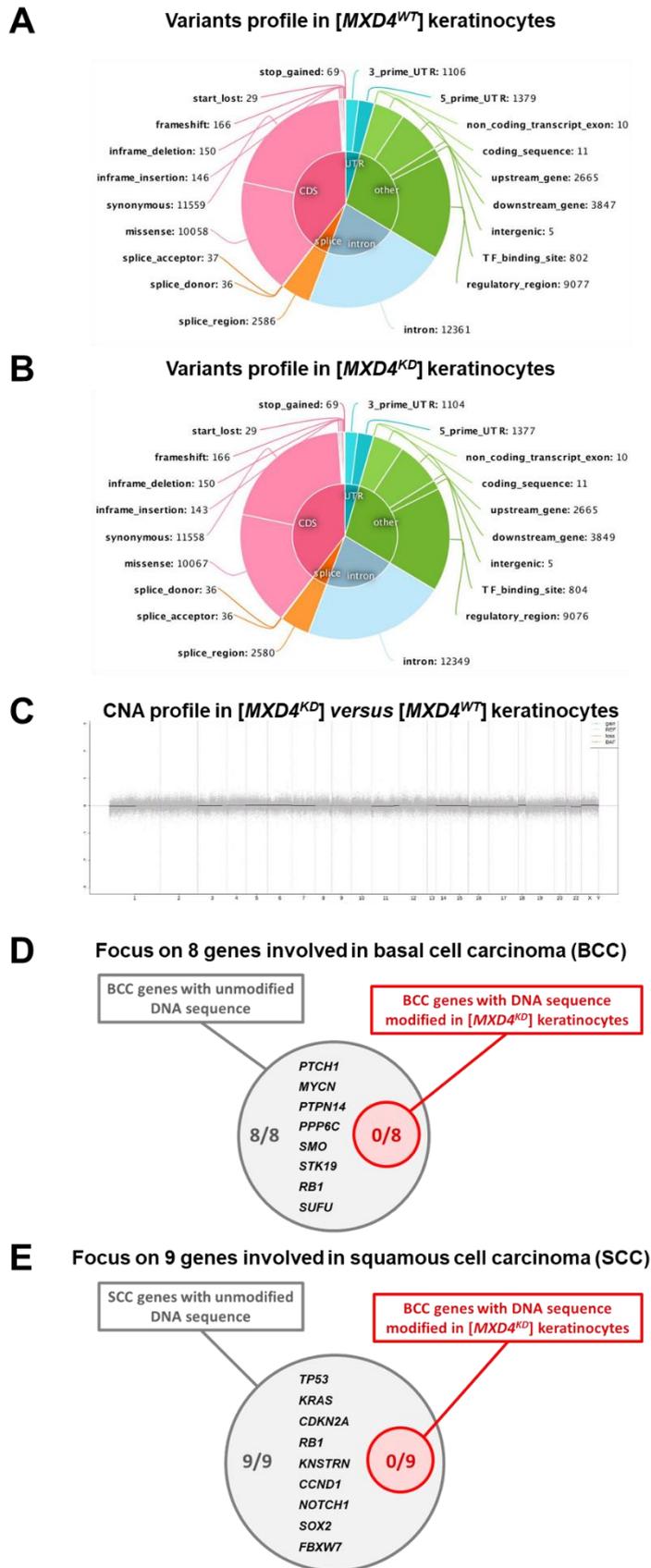


Figure 72 : Absence d'effets délétères de la répression de $MXD4$ sur l'intégrité génomique.

Des kératinocytes basaux ADH⁺⁺⁺ $[MXD4^{WT}]$ et $[MXD4^{KD}]$ à environ 50 DP ont été cultivés en milieu contenant du sérum et des couches nourricières, puis les ADN ont été extraits et l'exome complet a été séquencé (n=3 échantillons indépendants par condition). Les profils de variants ont été dressés pour les deux contextes cellulaires, sur la référence du génome humain Hg38. **A.** Profil des variants dans le contexte $[MXD4^{WT}]$. **B.** Profil des variants dans le contexte $[MXD4^{KD}]$. Les deux contextes présentent des profils similaires. **C.** Le nombre de copies de chaque gène a été déterminé par le CNA (Copy Number Aberration) afin de déterminer si des zones du génome ont été dupliquées, supprimées ou transloquées. Le graphe représente le profil des CNA détectées dans le contexte $[MXD4^{KD}]$ normalisé par rapport au CNA détectées dans le contexte $[MXD4^{WT}]$. **D-E.** Aucune mutation spécifique dans des gènes associés à la mise en place et au développement **D.** des SCC et **E.** des BCC n'a été détecté dans le contexte $[MXD4^{KD}]$, indiquant que la répression stable de $MXD4$ n'a pas d'effet néfaste sur l'intégrité génomique.

VIII. La répression transitoire de *MXD4* augmente l'immaturation des PK.

Nous avons exploré la possibilité de moduler *MXD4* de manière transitoire, non-intégrative, par des siARN ou un traitement moléculaire par la kenpaullone.

Des kératinocytes basaux ADH⁺⁺⁺ sélectionnés par adhésion rapide au collagène I ont été cultivés. 24 heures après ensemencement, ils ont été transfectés avec un siARN scramble, dont la séquence n'est pas spécifique d'ARNm humain, et 2 siARN différents dirigés contre l'ARNm de *MXD4*. Un jour (24h) après la transfection, les ARN ont été extraits et le niveau d'expression de *MXD4* quantifié par RT-q-PCR. Quel que soit le siARN-anti*MXD4* utilisé, l'expression de *MXD4* est réduite d'environ 60% (moyenne \pm SEM, $p=0,0022$, $n=6$) (Figure 73A). Sept jours après la transfection, le pourcentage de kératinocytes exprimant fortement le marqueur d'immaturation intégrine- $\alpha 6$ est quantifié par cytométrie en flux. Une augmentation du pourcentage de cellules [ITA6⁺⁺⁺] est détectée avec les siARN #1 et #2 (moyenne \pm SEM, siARN #1, $p=0,026$, $n=6$, siARN #2, $p=0,0022$, $n=6$) (Figure 73B).

Les kératinocytes ont été traités ou non (condition contrôle, DMSO) par 1 μ M de kenpaullone, et les ARN ont été extraits 6 heures après traitement. L'expression des ARNm *MXD4* a ensuite été quantifiée par RT-q-PCR. L'expression de *MXD4* est diminuée d'environ 43% dans les cellules traitées à la kenpaullone (moyenne \pm SEM, $p=0,0022$, $n=6$) comparé aux cellules contrôle (Figure 73C). Après une semaine de culture et 3 traitements avec 1 μ M de kenpaullone, le niveau d'expression de l'intégrine- $\alpha 6$ est quantifié par cytométrie en flux. Le pourcentage de cellules exprimant fortement l'intégrine- $\alpha 6$ augmente de $11,8 \pm 0,7\%$ pour les contrôles à $35 \pm 1\%$ pour les cellules traitées à la kenpaullone (moyenne \pm SEM, $p=0,0022$, $n=6$) (Figure 73D).

Ces résultats indiquent que la répression transitoire de *MXD4* a un effet positif sur le caractère immature des précurseurs de kératinocytes.

- Résultats - Chapitre 3 -

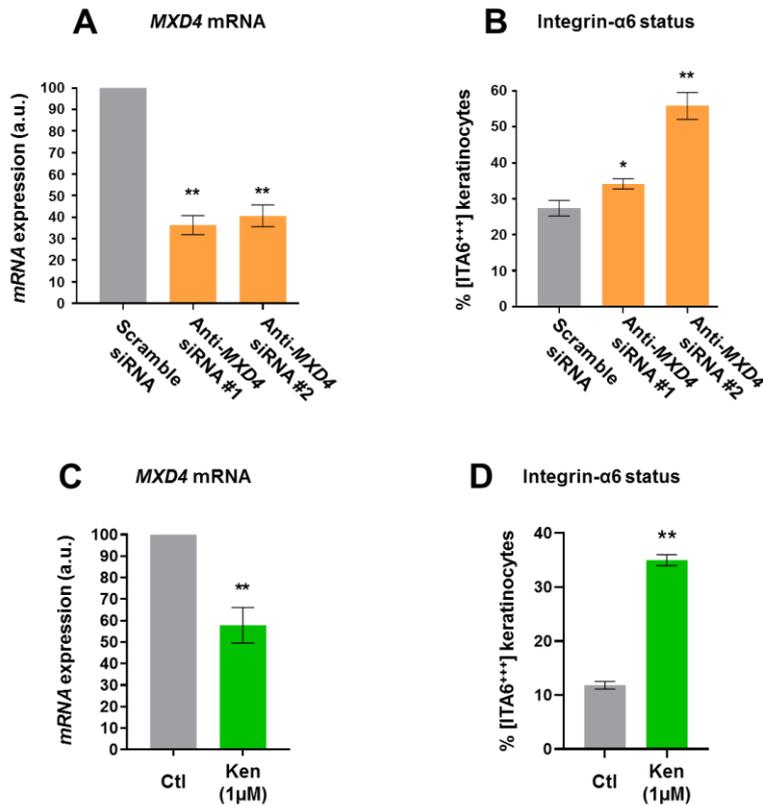


Figure 73 : La répression transitoire de *MXD4* a un effet positif sur le caractère immature des précurseurs kératinocytaires.

Des kératinocytes basaux ADH⁺⁺⁺ ont été cultivés en présence de couches nourricières et de sérum. Deux outils de répression transitoire de *MXD4* ont été utilisés. **A-B** : 24 heures après ensemencement, les cellules ont été transfectées avec un siARN scramble (contrôle) ou des siARNanti-*MXD4*. **A**. 24 heures après transfection, les ARN ont été extraits et l'ARNm *MXD4* quantifié par RT-q-PCR (moyenne \pm SEM, $p=0,0022$, $n=6$). **B**. 7 jours après transfection, le pourcentage de cellules exprimant fortement l'intégrine- α 6 a été quantifié par cytométrie en flux (moyenne \pm SEM, siARN #1, $p=0,026$, $n=6$, siARN #2, $p=0,0022$, $n=6$). **C-D** : 24 heures après ensemencement, les cellules ont été traitées par 1 μ M de kenpaullone (ou DMSO, contrôle), et à chaque changement de milieu (toutes les 48 heures). **C**. 6 heures après traitement, les ARN ont été extraits et l'ARNm *MXD4* quantifié par RT-q-PCR (moyenne \pm SEM, $p=0,0022$, $n=6$). **D**. Après 3 traitements pendant une semaine de culture de masse, le pourcentage de cellules exprimant fortement l'intégrine- α 6 a été quantifié par cytométrie en flux (moyenne \pm SEM, $p=0,0022$, $n=6$).

DISCUSSION / PERSPECTIVES

- Discussion / Perspectives -

I. Contrôles exercés par KLF4 et MAD4.

1. L'interaction KLF4-TGF- β régule l'immaturation des PK.

KLF4 est associé à la mise en place de la barrière épidermique et de la différenciation dans les couches supérieures de l'épiderme. Un modèle murin a mis en lumière une fonction barrière défective dans les souriceaux [*KLF4*^{-/-}], conduisant à la mort rapide par déshydratation dans les heures suivant la naissance ([Segre et al 1999](#)). Il a ensuite été démontré que KLF4 est impliqué dans l'induction de la différenciation des kératinocytes, en particulier par des mécanismes épigénétiques : il interagit avec le FdT ZNF750 pour recruter des régulateurs de la chromatine tels que RCOR1 ou CTBP1/2 au niveau des promoteurs de gènes de différenciation ([Boxer et al 2014](#)). Une étude a également montré l'importance des lncRNA ANCR et TINCR comme régulateurs des FdT MAF:MAFB. Ces FdT régulent en particulier l'expression de ZNF750 et KLF4 lors de l'induction de la différenciation du kératinocyte ([Lopez-Pajares et al 2015](#)). Toutes ces études décrivent un rôle pour KLF4 en relation avec la différenciation terminale.

Nos travaux documentent une fonction de KLF4 dans les kératinocytes de la couche basale de l'épiderme. La répression stable de KLF4 dans des PK empêche leur différenciation précoce, résultant en une hausse de leur capacité de prolifération et de régénération. Le bagage du laboratoire a contribué à décrire la voie TGF- β comme un réseau majeur régulant la prolifération et l'immaturation des kératinocytes ([Fortunel et al 2003a](#)). De plus, l'expression de KLF4 est corrélée à l'activité d'acétylation des histones exercée par p300, contribuant à la modulation de gènes contrôlés par le TGF- β ([He et al 2015](#)). Ainsi, le lien entre KLF4 et TGF- β constitue une piste d'exploration pour tenter d'élucider les mécanismes de régulation exercés par KLF4.

Pour explorer cette interaction, des holoclones de kératinocytes [*KLF4*^{WT}] et [*KLF4*^{KD}] ont été traités avec une forte dose de TGF- β 1 (300 pg/mL), et le pourcentage de kératinocytes exprimant le marqueur d'immaturation intégrine- α 6 a été quantifié. Les cellules [*KLF4*^{WT}] et [*KLF4*^{KD}] non traitées présentent des pourcentages similaires de kératinocytes exprimant l'intégrine- α 6 (89 \pm 5% et 90 \pm 5,5% respectivement, p=0.3942). Après traitement au TGF- β 1, le pourcentage de cellules exprimant l'intégrine- α 6 est plus élevé dans les cellules [*KLF4*^{KD}] (77 \pm 4%), comparé aux cellules [*KLF4*^{WT}] (60 \pm 9%), suggérant un effet anti-différenciateur lié à une faible expression de KLF4 (**Figure 74**). La désensibilisation partielle des kératinocytes [*KLF4*^{KD}] à l'effet pro-différenciateur de fortes doses de TGF- β pourrait être en partie expliquée à l'aide d'un groupe de gènes liés au TGF- β , réprimés dans les analyses de RNA-Seq : les récepteurs au TGF- β . La diminution de l'expression des corécepteurs (*TGFBR3*, réprimé d'environ 60% dans le contexte [*KLF4*^{KD}]) pourrait contribuer à diminuer l'accessibilité des ligands aux récepteurs *TGFBR2*, tandis que la répression de *TGFBR1* (récepteur de

- Discussion / Perspectives -

type 1, impliqué dans la propagation du signal) d'environ 20%, diminuerait l'activation aval de la voie TGF- β .

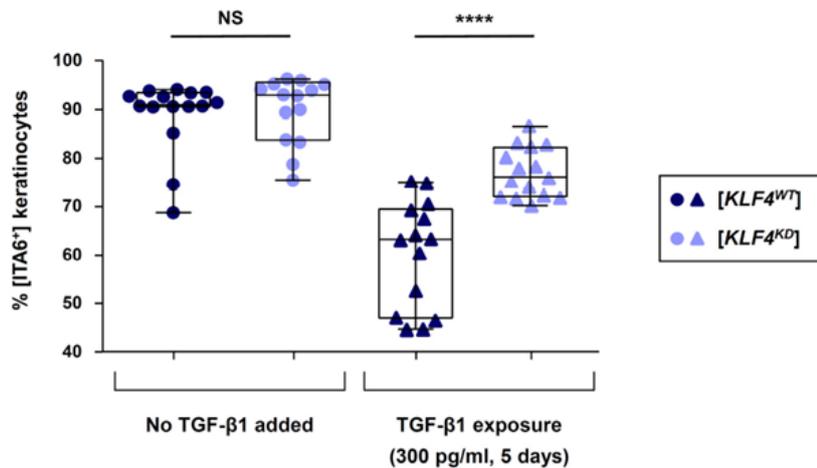


Figure 74 : Atténuation de l'effet pro-différenciateur d'une forte dose de TGF- β 1 sur les kératinocytes [KLF4^{KD}].

Des holoclones de kératinocytes [KLF4^{WT}] et [KLF4^{KD}] ont été traités avec une dose de 300 pg/mL de TGF- β 1 pendant 5 jours, puis le pourcentage de kératinocytes exprimant le marqueur d'immaturité intégrine- α 6 a été déterminé par cytométrie en flux dans chacun des contextes cellulaires.

Les liens moléculaires directs entre KLF4 et TGF- β ne sont pas démontrés dans nos études. Pour cela, la mise en œuvre d'approches conduisant à l'identification de protéines pouvant agir avec KLF4 pourrait être envisagée. Ainsi, des approches de double hybride ciblant KLF4 permettraient de déterminer ses partenaires physiques. La détermination des gènes cibles de KLF4 par des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine avec un anticorps anti-KLF4 couplées au séquençage des séquences cibles (ChIP-seq) permettraient d'explorer cette piste.

Par ailleurs, l'exploration des mécanismes de régulation du caractère immature des PK est une thématique actuellement explorée. Une étude très récente a montré que la protéine HRNRPK est impliquée dans la maintenance du caractère immature. Elle est nécessaire à l'activité de DDX6, une hélicase à ARN, pour dégrader les ARNm de *ZNF750* et *KLF4* (Li et al 2019b). Notre approche de répression des ARNm par un shARN spécifique est donc en accord avec cette étude.

- Discussion / Perspectives -

2. MXD4, verrou moléculaire au cœur des balances « quiescence/prolifération » et « immaturité/différenciation ».

A. MAD4/MAX, c-MYC/MAX et contrôle de la prolifération.

Dans la littérature, il a été montré qu'une forte expression de MAD4 est associée à un état non-prolifératif : la transduction de fibroblastes « jeunes », en prolifération, avec le gène humain MXD4, induit un phénotype de sénescence replicative en culture ([Marcotte et al 2003](#)). La même équipe a ensuite démontré que le haut niveau d'expression de MAD4 observé dans les fibroblastes sénescents empêchait les cellules de basculer d'une majorité de complexes MAD4/MAX vers c-MYC/MAX suite à une stimulation au sérum pour induire la prolifération, empêchant la mise en cycle de ces cellules. Le mécanisme proposé fait intervenir le complexe Miz1/c-MYC, qui peut se lier au promoteur de MAD4 ([Marcotte et al 2005](#)).

Ici, nous montrons que la proportion des complexes MAD4/MAX et c-MYC/MAX influence la prolifération et la clonogénicité des holoclones de kératinocytes. Nous apportons une vision complémentaire de la régulation de la prolifération dans un autre compartiment constituant la peau. Si la PLA permet de quantifier des interactions physiques entre deux protéines, il paraît important de valider ces observations à l'aide d'une technique complémentaire comme la coimmunoprécipitation de MAX, puis la détection par western-blot de ses partenaires c-MYC et MAD4 et leur quantification respective dans les contextes [*MXD4^{WT}*] et [*MXD4^{KD}*]. Une validation fonctionnelle consisterait à réprimer *MYC* (par interférence par ARN par exemple) dans des cellules [*MXD4^{KD}*] et à quantifier leur prolifération.

L'accroissement de la prolifération peut notamment être reliée à l'augmentation de l'expression de l'antagoniste de MAD4, c-MYC. En effet, il a été montré que *MYC* active la plupart des activateurs du cycle cellulaire tels que les cyclines D1, D2, E1 et A1 et réprime p21^{Cip1}, p27, p15^{INK4b} ([Bretones et al 2015](#)). Dans l'étude transcriptomique comparative des contextes [*MXD4^{WT}*] et [*MXD4^{KD}*], la plupart des activateurs du cycle cellulaire (CDK1, CDC20, CDC25 ...) sont surexprimés, tandis que la plupart des inhibiteurs sont réprimés. La stimulation de la prolifération pourrait donc être causée par l'augmentation de l'expression de c-MYC comme conséquence indirecte de la répression de *MXD4*. Une analyse par immunoprécipitation de la chromatine permettrait de déterminer l'occupation des promoteurs des cyclines dans les contextes [*MXD4^{WT}*] et [*MXD4^{KD}*].

B. MAD4/MAX, c-MYC/MAX et contrôle de la différenciation.

Dans l'épiderme, MAD4 est connu pour son rôle dans la différenciation des kératinocytes. Au cours du développement de l'épiderme, la répression de l'expression de c-MYC est concomitante avec

- Discussion / Perspectives -

l'activation de l'expression de MAD4. Une forte expression de MAD4 a été détectée par hybridation *in situ* dans les couches supérieures de l'épiderme, correspondant aux kératinocytes en cours de différenciation ([Hurlin et al 1995b](#)). La même équipe a également montré que durant la différenciation kératinocytaire, c-MYC diminue et MAD augmente, suggérant un changement dans la proportion des complexes ([Hurlin et al 1995a](#)).

Dans cette étude, nous montrons que l'augmentation des complexes c-MYC/MAX aux dépens de MAD4/MAX régule la balance « immaturité/différenciation » dans les PK. La répression stable de *MXD4* s'accompagne de l'augmentation de l'expression de nombreux transcrits associés à la couche basale de l'épiderme (tels que l'intégrine- $\alpha 6$, Δ np63 et les kératines 5 et 14) et à une répression de transcrits associés à la différenciation des kératinocytes (tels que l'involucrine, la transglutaminase 5 ou la desmogléine 3). Empêcher une forte expression de *MXD4* permet donc d'inhiber la différenciation des kératinocytes, en accord avec les études précédentes.

L'exploitation des contextes [*MXD4^{WT}*] et [*MXD4^{KD}*] apporte une vision supplémentaire à propos du rôle de MAD4 dans la différenciation, en prenant en compte l'histoire mitotique. Lors des étapes d'amplification massive en culture, les kératinocytes peuvent être amenés à se différencier et atteindre un état de senescence répllicative. Afin de déterminer s'il existe un lien entre le niveau d'expression de *MXD4* et la perte de fonction, nous avons quantifié par RT-dd-PCR le nombre de transcrits *MXD4* dans les contextes [*MXD4^{WT}*] et [*MXD4^{KD}*] au cours des divisions successives ([Figure 75](#)). A environ 20 DP (culture précoce, peu d'expansion), le nombre de transcrits *MXD4* par cellule est similaire dans les deux contextes ([*MXD4^{WT}*] : $2,3 \pm 0,4$; [*MXD4^{KD}*] : $4,5 \pm 0,6$; moyenne \pm SEM, $p=0,23$, $n=12$). Au cours des expansions de masse, le nombre de transcrits augmente dans les cellules [*MXD4^{WT}*], mais reste bas dans les kératinocytes [*MXD4^{KD}*] (40 DP : [*MXD4^{WT}*] : $7,9 \pm 1,1$; [*MXD4^{KD}*] : $2,3 \pm 0,3$; moyenne \pm SEM, $p=0,0001$, $n=13$, 52 PD : [*MXD4^{WT}*] : $13,5 \pm 1,4$; [*MXD4^{KD}*] : $6,2 \pm 0,6$; moyenne \pm SEM, $p=0,0004$, $n=30$). Ces résultats sont à relier avec les expériences de reconstruction épidermique : nous avons démontré que la répression de *MXD4* au cours des étapes d'amplification empêchait la perte de potentiel régénératif. L'ensemble de ces résultats suggère donc un lien entre le niveau d'expression de *MXD4*, le caractère immature et la capacité de reconstruction épidermique des PK.

- Discussion / Perspectives -

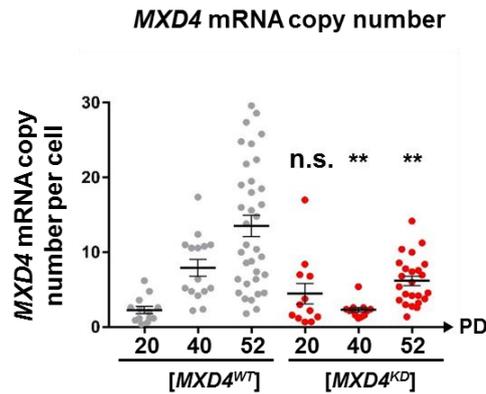


Figure 75 : Variation de l'expression de *MXD4* au cours de l'histoire mitotique des kératinocytes.

Afin de déterminer si l'expression de *MXD4* varie au cours des phases d'expansion successives, des kératinocytes basaux [*MXD4*^{WT}] et [*MXD4*^{KD}] ont été triés par cytométrie en flux par l'expression de la GFP, et déposés dans des plaques 96 puits adaptées à la RT-dd-PCR. Le nombre de copies d'ARNm *MXD4* a ensuite été quantifié par RT-dd-PCR dans chacun des contextes. A 20 DP, le nombre de copies de *MXD4* est similaire dans les deux contextes cellulaires ([*MXD4*^{WT}] : 2,3±0,4 ; [*MXD4*^{KD}] : 4,5±0,6 ; moyenne ± SEM, p=0,23, n=12). Cependant, le nombre de copies *MXD4* augmente avec les passages successifs dans les kératinocytes [*MXD4*^{WT}], alors qu'il reste à un niveau très bas, stable, dans le contexte [*MXD4*^{KD}] (40 DP : [*MXD4*^{WT}] : 7,9±1,1 ; [*MXD4*^{KD}] : 2,3±0,3 ; moyenne ± SEM, p=0,0001, n=13, 52 PD : [*MXD4*^{WT}] : 13,5±1,4 ; [*MXD4*^{KD}] 6,2±0,6 ; moyenne ± SEM, p=0,0004, n=30). Chaque point représente 10 cellules analysées.

c. Modèle des contrôles exercés par le réseau c-MYC/MAX/MAD4 sur les fonctionnalités des PK.

Des études basées sur l'exploitation d'un modèle murin permettant l'induction de l'expression de c-MYC dans le compartiment des kératinocytes basaux a mis en évidence une différenciation précoce des CSK, par le biais d'une prolifération accrue. L'activation de c-MYC contribue à l'épuisement des CSK, en favorisant leur différenciation en sébocytes ou en kératinocytes de l'EIF, présentant une différenciation normale (Arnold & Watt 2001, Gandarillas & Watt 1997b, Waikel et al 2001). Ici, nous documentons une prolifération accrue, en accord avec ces études. Néanmoins, nous n'observons pas de différenciation précoce, au contraire, puisque la répression de *MXD4* s'accompagne d'un maintien à long terme de l'immaturité et de la capacité régénérative des kératinocytes, indiquant la présence de PK immatures fonctionnels au sein des cultures.

Plusieurs pistes de réponses pourraient permettre d'expliquer ces observations : les études citées ont été menées *in vivo* à l'aide de modèles murins de surexpression de *MYC* dans la couche basale de l'épiderme. Dans le travail présenté ici, nous avons choisi de réprimer l'antagoniste de *MYC*, *MXD4*. L'une des conséquences est une augmentation de l'expression de *MYC* (150% pour l'ARNm et 50% pour les protéines environ). Dans notre étude, l'expression de *MYC* est augmentée de manière

- Discussion / Perspectives -

concomitante à la répression de *MXD4* et ne s'accompagne pas d'une signature associée à la différenciation. La répression de *MXD4* semble donc agir comme un verrou moléculaire qui inhibe la différenciation, d'une manière plus puissante que la favorisation de la différenciation exercée par c-MYC.

Ces travaux permettent de proposer un modèle où l'activation conséquentielle de c-MYC dirige les PK vers le compartiment de cellules d'amplification transitoire *via* une activation de la prolifération. Les processus de différenciation sont contrebalancés par la répression stable de *MXD4*, conduisant à une préservation du caractère immature, même à long terme. Contrôler l'expression de *MXD4* permet donc de favoriser l'expansion *ex vivo* d'une population de PK fonctionnels à long terme ([Figure 76](#)). Afin de confirmer et affiner ce modèle, il serait nécessaire de quantifier l'expression de *MYC* au cours des amplifications successives dans les deux contextes cellulaires.

Ce motif d'expression est retrouvé dans d'autres systèmes cellulaires. Dans les cellules souches hématopoïétiques, une répression brève mais intense est requise pour induire un pic de prolifération avant l'initiation de la mise en place des lignages hématopoïétiques. Une expression forcée de *MAD4* au moment où il devrait être réprimé aboutit à des défauts de différenciation et un déficit dans le développement des lignages primitifs et définitifs des cellules sanguines. Dans ce système, la répression de *MXD4* semble donc également favoriser la prolifération, mais aussi, par conséquent, la différenciation. Néanmoins, l'impact d'une répression stable de *MXD4* ou d'une surexpression de *MYC* sur la prolifération des CSH n'a pas été exploré ([Boros et al 2011](#)). Au cours de la différenciation adipocytaire, la quantification de l'expression de *MAD1* et *MAD4* indique une répression brusque juste avant l'activation du processus de différenciation, conduisant à une augmentation massive de la prolifération. Ensuite, *MAD4* est fortement induit, et les cellules quittent le cycle cellulaire et se différencient ([Pulverer et al 2000](#)).

- Discussion / Perspectives -

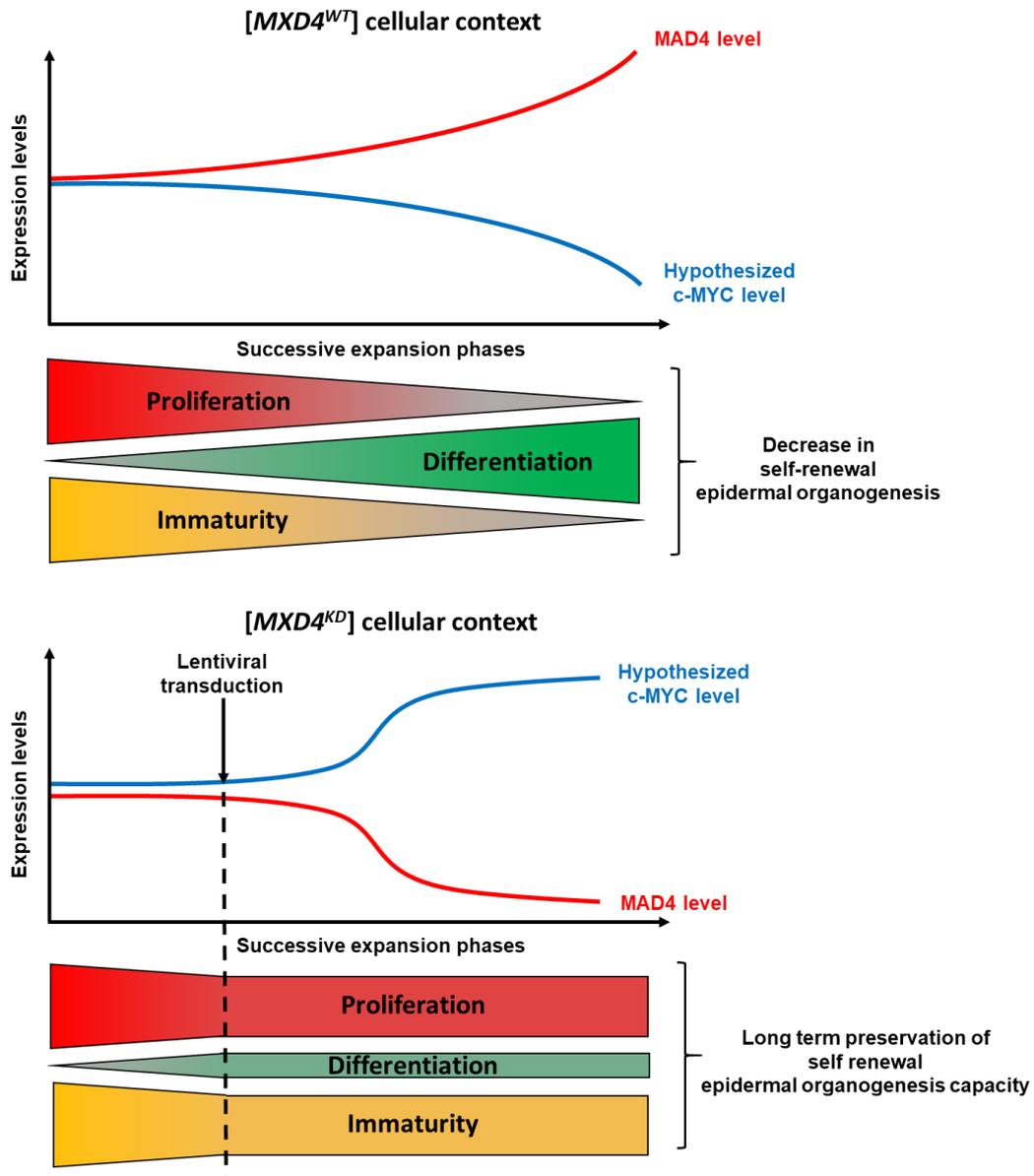


Figure 76 : Contrôle des fonctionnalités du compartiment de précurseurs kératinocytaires par *MXD4*.

Selon ce modèle, le niveau d'expression de *MXD4* contrôlerait les fonctionnalités des précurseurs de kératinocytes. Dans un contexte normal, l'expression de *MXD4* augmente au cours du temps, et celle de son antagoniste *MYC* diminue. Ces changements d'expression ont pour répercussion une diminution de l'immaturité et de la prolifération, associé à une augmentation de la différenciation. C'est le destin cellulaire normal des kératinocytes en culture, qui perdent leur capacité d'autorenouvellement au cours des phases d'amplification successives. Dans un contexte où *MXD4* est réprimé, *MYC* serait augmenté en réponse, conduisant à une prolifération accrue, et mobilisant les CSK les plus immatures vers le compartiment de TA. Cependant, l'inhibition forcée de *MXD4* empêcherait la différenciation associée, conduisant à une préservation du statut immature et, en conséquence, des capacités de reconstruction épidermique.

- Discussion / Perspectives -

D. Interactions entre MAD4 et la voie du TGF- β .

Plusieurs études ont montré que, dans les cellules épithéliales, la suppression de la prolifération cellulaire induite par le TGF- β était médiée, en aval, par le réseau MYC/MAX/MAD. Par exemple, l'expression du gène *Id2*, associé à la prolifération, est diminuée lors de la différenciation. La transcription de ce gène est régulée par la fixation des complexes c-MYC/MAX et MAD4/MAX sur son promoteur, en aval de la voie TGF- β ([Siegel et al 2003](#)). De plus, des modulations dans l'expression de c-MYC et MAD4 ont été rapportées dans des cellules Balb/MK (cellules épithéliales murines) après traitement au TGF- β : l'expression de c-MYC est diminuée ([Coffey et al 1988](#)), tandis que l'expression de MAD4 est augmentée ([Satterwhite et al 2001](#)). Ces mécanismes entre les réseaux TGF- β et MYC/MAX/MAD ont été mis en lumière principalement dans des systèmes épithéliaux murins.

Une piste de réflexion pour décrypter les mécanismes de contrôle exercés par les hétérodimères c-MYC/MAX et MAD4/MAX consisterait à explorer les interactions avec la voie TGF- β dans les PK humains. Nos données de transcriptomique indiquent que la répression de *MXD4* dans des PK humains a un impact sur la voie TGF- β , en particulier sur certains récepteurs (*ACVR1*, *ACVR2*) et sur les TGF- β 1 et TGF- β 2 ([Figure 77](#)).

La poursuite de l'exploration de ce pan du travail nécessiterait ensuite l'établissement d'un lien fonctionnel entre MAD4 et le TGF- β , puis la recherche d'un mécanisme direct. Pour cela, des PK [*MXD4^{KD}*] et [*MXD4^{WT}*] pourraient être traités avec de fortes doses de TGF- β 1, puis le niveau d'expression de marqueurs d'immaturité tels que l'intégrine- α 6 et Δ np63 pourraient être quantifiés, afin de déterminer si la répression de *MXD4* a un effet anti-différenciation contrecarrant l'effet du TGF- β . Par la suite, ce mécanisme pourra être creusé également en déterminant les cibles génomiques de *MXD4*, en relation avec le TGF- β , de la même manière que proposé pour *KLF4* (ChIP-seq).

3. KLF4 et MAD4 : indépendance ou similarité des mécanismes de régulation ?

Nos travaux indiquent que KLF4 et MAD4 sont tous les deux impliqués dans le réseau de signalisation du TGF- β et le contrôle de la fonctionnalité des PK. Néanmoins, plusieurs questions restent en suspens. Il reste à déterminer si KLF4 et MAD4 partagent des mécanismes de régulation communs, différents, ou interdépendants, qui pourraient converger vers la régulation de fonctions communes.

Afin d'explorer cette piste, nous avons exploité les analyses comparatives des transcriptomes des contextes [*KLF4^{WT}*], [*KLF4^{KD}*], [*MXD4^{WT}*] et [*MXD4^{KD}*]. Les listes des gènes différentiellement exprimés dans chacun des contextes [*FdT^{KD}*] ont été croisées afin de générer une nouvelle liste correspondant aux gènes différentiellement exprimés en commun dans les deux contextes « knock-

- Discussion / Perspectives -

down ». 1719 gènes ont été identifiés en commun (Figure 78AB). Un seuil de sélection a été appliqué, avec un « fold-change » de 2 et une p-valeur inférieure à 5%, afin de générer les volcano-plot représentant les gènes modulés en fonction des contextes cellulaires (Figure 78C-D). Nous avons ensuite procédé à la recherche d'enrichissement de « Gene Ontology (GO) », qui permet de classifier des gènes en catégorie associées à des fonctions cellulaires. En utilisant le set de gènes communs surexprimés, des GO principalement associés au cycle cellulaire sont détectés (par exemple, GO:0051726 regulation of cell cycle ou GO:0051301 cell division) (Figure 78E). En utilisant le set de gènes communs réprimés, des GO associés à la différenciation cellulaire sont détectés (par exemple, GO:0045597 positive regulation of cell differentiation ou GO:0030154 cell differentiation) (Figure 78F).

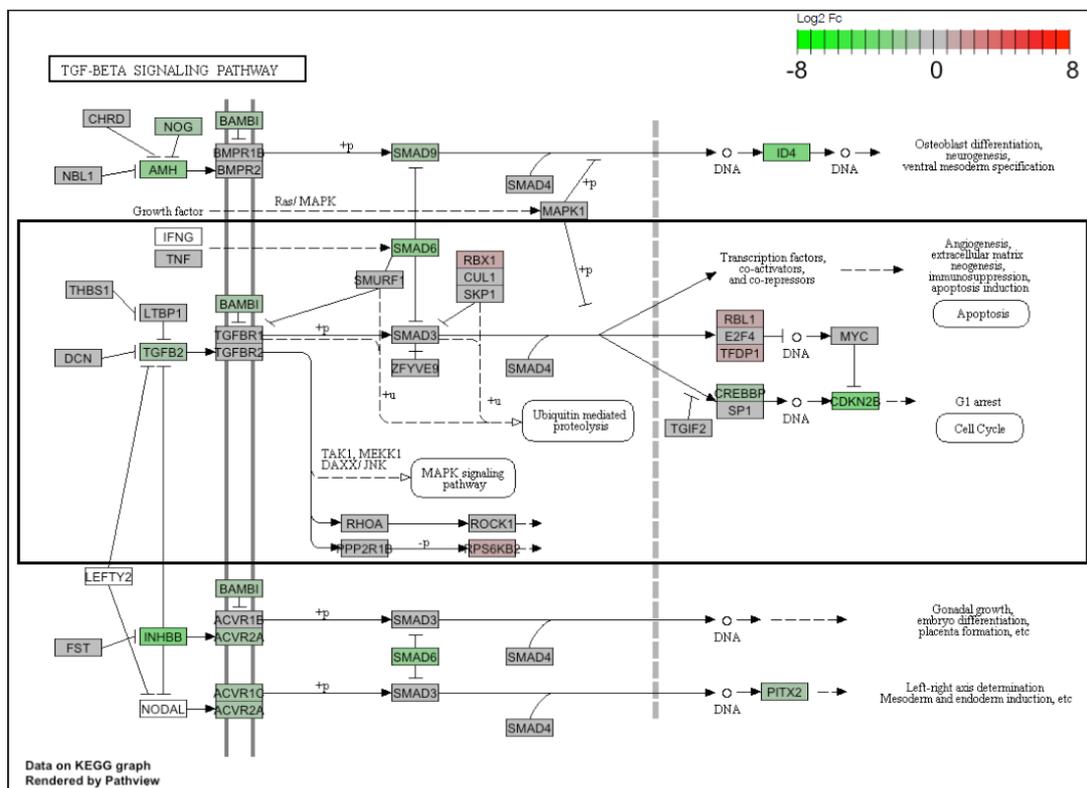
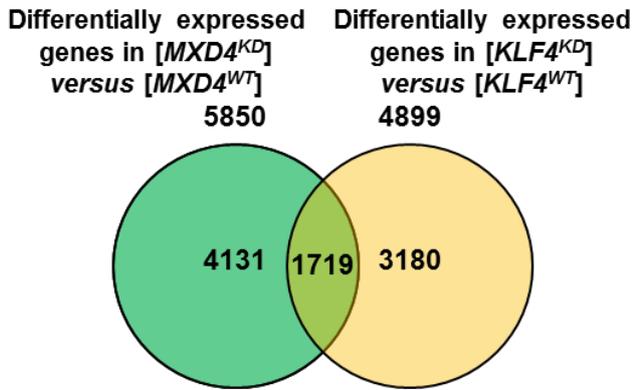


Figure 77 : Modulation des transcrits liés au réseau de signalisation TGF-β dans les cellules [MXD4^{KD}].

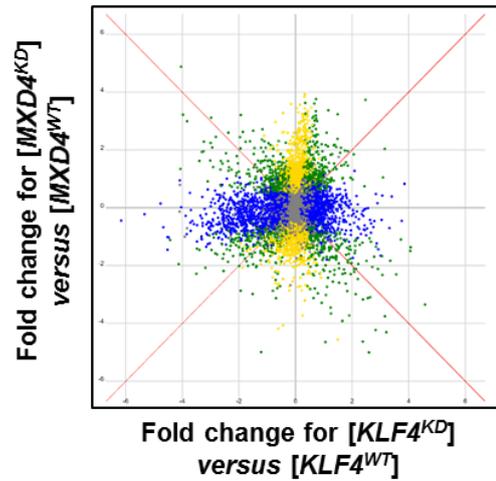
L'étude comparative des transcriptomes des cellules [MXD4^{WT}] et [MXD4^{KD}] par séquençage de l'ARN, à environ 80 DP, révèle des groupes de gènes modulés en relation avec la balance « immaturité/différenciation ». Une signature transcriptomique correspondant à des modulations de la voie TGF-β a été identifiée. Diagramme de KEGG montrant les transcrits en relation avec la voie TGF-β, différenciellement exprimée dans les cellules [MXD4^{KD}] versus [MXD4^{WT}].

A



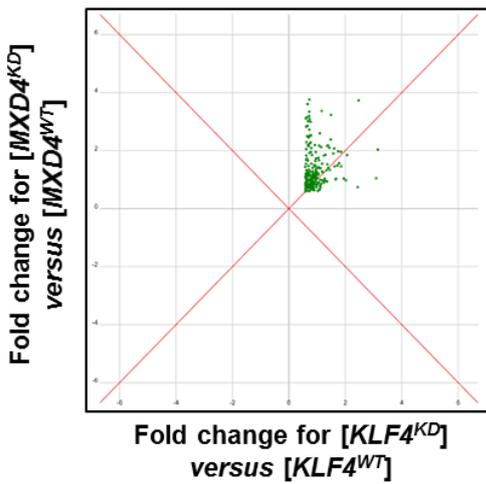
B

Common differentially expressed genes in [MXD4^{KD}] and [KLF4^{KD}] contexts.



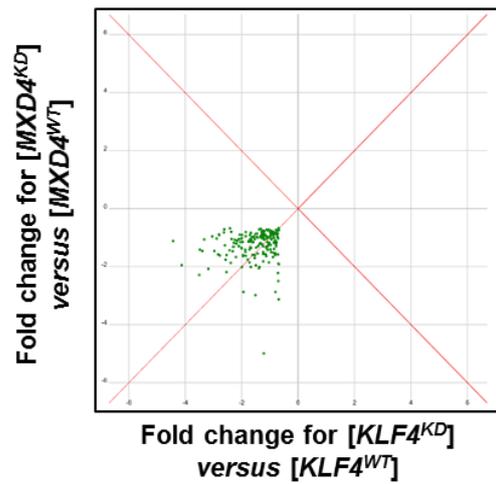
C

Common significant up-regulated genes in [MXD4^{KD}] and [KLF4^{KD}] contexts.



D

Common significant down-regulated genes in [MXD4^{KD}] and [KLF4^{KD}] contexts.



E

GO term enriched in common up-regulated genes

GO:0007049	cell cycle
GO:0022402	cell cycle process
GO:0044770	cell cycle phase transition
GO:0051726	regulation of cell cycle
GO:0051301	cell division

F

GO term enriched in common down-regulated genes

GO:0030154	cell differentiation
GO:0045597	positive regulation of cell differentiation
GO:0045595	regulation of cell differentiation
GO:0048468	cell development

Figure 78 : Identification des gènes communément modulés par les répressions indépendantes de *KLF4* et *MXD4*.

Les résultats des études transcriptomiques indépendantes comparant les contextes [*KLF4^{KD}*] versus [*KLF4^{WT}*] et [*MXD4^{KD}*] versus [*MXD4^{WT}*] ont été intersectés afin de déterminer si *KLF4* et *MXD4* régulent des gènes et des processus communs. **A.** Diagramme de Venn représentant le nombre de transcrits différentiellement dans l'étude "MXD4" (vert) et "KLF4" (jaune). L'intersection correspond au nombre de transcrits différentiellement exprimés communément retrouvés dans les deux études. **B.** Volcano-plot représentant les transcrits différentiellement exprimés dans les deux études. L'axe X représente le fold-change des transcrits dans l'étude "KLF4". L'axe Y représente le fold-change des transcrits dans l'étude "MXD4". La couleur des points représente la significativité de la p-valeur : en vert, les transcrits significativement modulés dans les deux études ($p < 0,05$), en jaune, significativement modulés dans l'étude "MXD4" mais pas "KLF4", en bleu significativement modulés dans l'étude "KLF4" mais pas l'étude "MXD4", en gris, non significatifs ($p > 0,05$). **C.** Volcano-plot présentant les transcrits communs aux deux études dont l'expression est augmentée ($\log_2 Fc > 0,58$, $p < 0,05$). **D.** Volcano-plot présentant les transcrits communs aux deux études dont l'expression est diminuée ($\log_2 Fc < 0,58$, $p < 0,05$). **E.** Recherche des termes de Gene Ontology enrichis dans la liste de transcrits communs dont l'expression est augmentée dans les deux études. La plupart des GO sont reliés au cycle cellulaire. **F.** Recherche des termes de Gene Ontology enrichis dans la liste de transcrits communs dont l'expression est diminuée dans les deux études. La plupart des GO sont reliés à la différenciation cellulaire.

Nous avons observé un gain de fonction au niveau de la prolifération et de l'immaturation des kératinocytes quand *KLF4* est réprimé de manière transitoire par la kenpaullone. Parmi les autres cibles moléculaires réprimées par la kenpaullone se trouve *MXD4* et la kinase GSK3-B. Comme la kenpaullone inhibe à la fois *KLF4* et *MXD4*, son utilisation constitue un outil intéressant pour explorer les mécanismes de régulation communs de *KLF4* et *MXD4*. Il pourrait être nécessaire de séquencer les transcrits de kératinocytes traités ou non à la kenpaullone, puis de comparer ces transcriptomes à ceux des contextes cellulaires [*FdT^{KD}*]. L'inhibition de GSK3-B conjointe à celle de *KLF4* et *MXD4* suggère la voie Wnt/ β -caténine comme piste de réflexion future pour des mécanismes communs à ces deux FdT. Ajoutant un degré de complexification à ces mécanismes, il a été démontré que GSK3-B pouvait également participer à la régulation de la voie TGF- β en phosphorylant Smad3 ([Millet et al 2009](#)) (Figure 79).

Dans le but de poursuivre le décryptage des mécanismes de régulation exercés par *KLF4* et *MAD4*, nous pouvons poser l'hypothèse d'un effet additif ou synergique de leur répression simultanée. Afin de tester cette hypothèse, nous pourrions générer au laboratoire des contextes cellulaires « double KD » [*KLF4^{KD}/MXD^{KD}*]. L'impact de la double répression sur les fonctions des PK pourrait ensuite être évalué, par des études moléculaires et fonctionnelles.

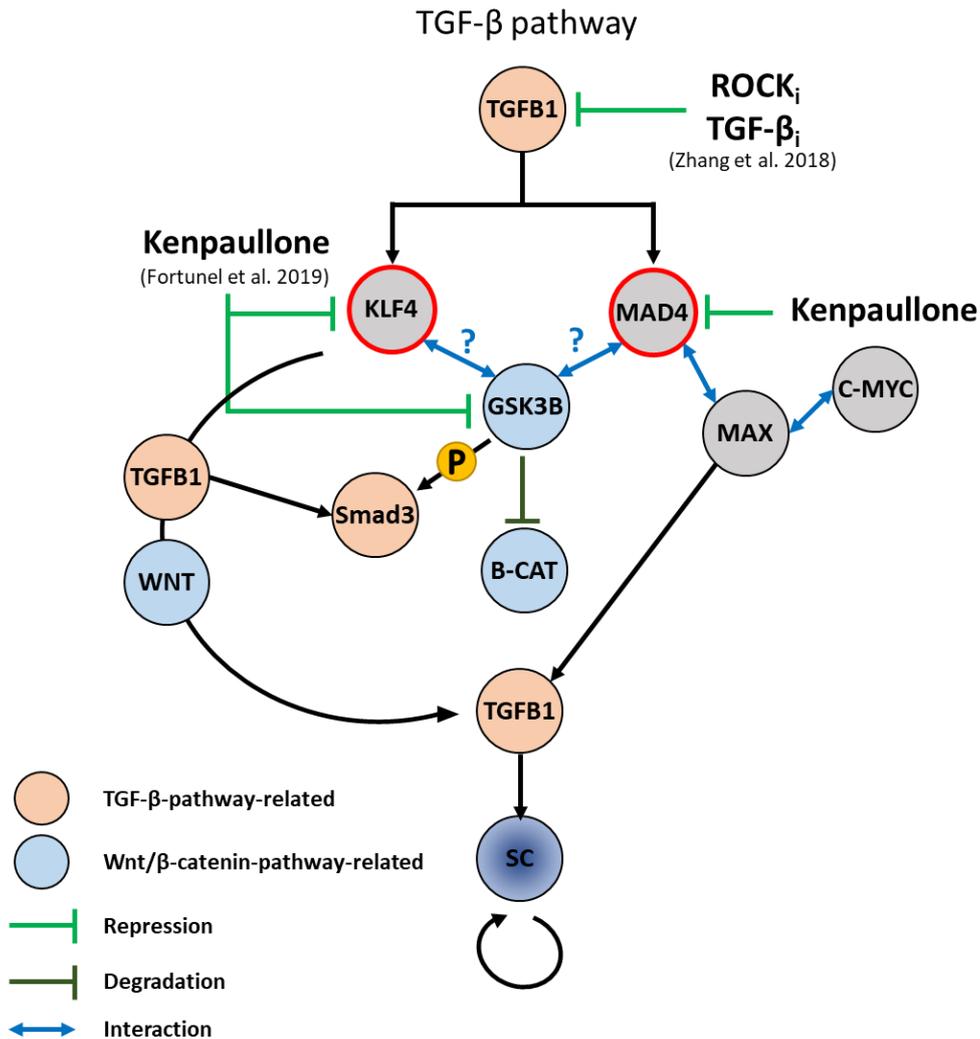


Figure 79 : Intégrations de KLF4, MAD4 dans les réseaux TGF- β et Wnt/ β -caténine.

Les facteurs de transcription KLF4 et MAD4 sont étroitement liés aux réseaux de signalisation TGF- β et Wnt/ β -caténine, qui participent à la régulation des fonctions des CSK. Plusieurs équipes ont proposé des molécules ou des cocktails de molécules pour promouvoir l'expansion de cellules épithéliales : parmi les approches, les inhibiteurs du TGF- β ou de ses interactants sont mis en lumière. La kinase GSK3B, membre d'un complexe dégradant la β -caténine (voie Wnt), est une cible de la kenpaullone. De plus, GSK3B peut également interagir avec la voie TGF- β en phosphorylant Smad3, favorisant l'activation de cette voie.

II. Contrôle de l'expansion *in vitro* des PK : potentielles applications en thérapie cellulaire cutanée.

Plusieurs technologies alternatives pour les phases d'expansion *ex vivo* des kératinocytes utilisés pour la production de greffons ont été approuvées par les autorités réglementaires. La culture de kératinocytes sur une couche de fibroblastes murins 3T3 s'est révélée efficace pour produire un grand nombre de cellules fonctionnelles utilisées ensuite pour générer des greffons et traiter des

- Discussion / Perspectives -

patients ([Gallico et al 1984a](#), [Ronfard et al 2000](#)). Récemment, cette méthode de culture a été combinée avec une approche de thérapie génique pour corriger les kératinocytes d'un patient souffrant d'épidermolyse bulleuse jonctionnelle et produire des greffons à partir des cellules corrigées ([Hirsch et al 2017](#)). Ainsi, cette méthode d'amplification, historique, fonctionne bien pour générer des kératinocytes fonctionnels. Néanmoins, à l'avenir, les autorités réglementaires tendent à orienter les méthodes de production vers des milieux plus contrôlés, qui s'affranchissent de l'utilisation de sérum bovin et de couches nourricières. Le principal désavantage de tels milieux de culture est leur propension défavorable à la préservation de l'immaturation et du potentiel régénératif des cellules lors des phases d'amplification ([Lamb & Ambler 2013](#)). Il est donc nécessaire d'apporter des améliorations à ces milieux afin de favoriser l'amplification de cellules aptes à générer un tissu.

Dans ce contexte, l'utilisation de la kenpaullone pour améliorer les conditions de culture est une piste de réflexion. Réprimant *KLF4*, *MXD4* et *GSK3B*, nous montrons qu'elle permet l'expansion de PK de meilleure qualité dans des milieux sans sérum ni couches nourricières. Cet axe de recherche est par ailleurs très exploré en ce moment par de nombreuses équipes. Il a par exemple été démontré que l'addition d'un inhibiteur de la voie TGF- β (A83-01) combinée à un inhibiteur de l'axe PAK1-ROCK-Myosine II (Y-27632) dans les milieux de culture favorise massivement l'expansion à long terme de différents types de cellules épithéliales, dont les kératinocytes épidermiques ([Zhang et al 2018](#)). Les inhibiteurs de la voie TGF- β sont régulièrement proposés pour stimuler la prolifération et empêcher la différenciation précoce des cellules épithéliales en culture, à tous niveaux de la voie : il peut s'agir de l'inhibition des récepteurs au TGF- β , ALK5, avec RepSox, un inhibiteur sélectif ([Suzuki et al 2017](#)), ou alors une inhibition en aval, avec des inhibiteurs des SMAD, bloquant ainsi la transduction du signal ([Mou et al 2016](#)). Ces stratégies favorisent l'expansion à long terme des kératinocytes p63⁺. D'autres approches ont également ciblé la voie Wnt/ β -caténine, en utilisant un inhibiteur chimique sélectif de la kinase GSK3-B ([Hampton et al 2012](#)), comme nous le proposons avec la kenpaullone. Ainsi, la recherche d'un « super-cocktail » de molécules favorisant l'expansion des kératinocytes, construit en combinaison de la kenpaullone, pourrait être envisagé afin d'exacerber son effet positif. Un criblage de molécules chimiques sélectionnées sur leur aptitude à promouvoir la capacité proliférative et/ou l'expression de l'intégrine- $\alpha 6$ pourrait être mis en place. Nous disposons au laboratoire d'une technologie de microscopie à haut-contenu et haut-débit permettant de mettre en place ce crible. Après avoir traité des PK à l'aide de molécules sélectionnées, cette technologie permettrait le comptage automatique des cellules (estimation de la prolifération) et la quantification de signaux fluorescents (quantification de l'expression de l'intégrine- $\alpha 6$).

III. Ouverture vers l'exploration de facteurs épigénétiques : les lncRNA.

Nous avons montré que les fonctionnalités des PK sont modulées par *KLF4* et *MXD4*, des gènes codants des protéines qui exercent leur fonction biologique. Cependant, les analyses de RNA-Seq issus de ces études ont permis d'identifier également des ARN long non codants (lncRNA) différenciellement exprimés entre les contextes cellulaires [*MXD4^{KD}*] et [*MXD4^{WT}*]. Ces derniers jouent certainement un rôle important dans le contrôle de l'immaturation et la prolifération des PK. A l'heure actuelle, l'essor de ce domaine de recherche est fulgurant, y compris dans le domaine de la biologie des kératinocytes. Par exemple, il a été montré que certains lncRNA contrôlent des processus comme la différenciation des kératinocytes ([Li et al 2017](#)) ou influencent la cicatrisation des blessures en contrôlant la migration des kératinocytes ([Li et al 2019a](#)). Les modèles [*Fd^{KD}*] générés sont de bons modèles pour explorer cette piste, car ils présentent un phénotype de kératinocytes immatures.

La sélection des ARN destinés à être séquencés pour l'étude des transcriptomes comparant les contextes cellulaires [*MXD4^{WT}*] et [*MXD4^{KD}*] a été faite sur les ARN dotés d'une queue polyA. Parmi ceux-ci, plus de 60% sont des lncRNA. Cette étude transcriptomique a permis de générer une liste de lncRNA dont l'expression est significativement impactée par la répression stable de *MXD4*. Les lncRNA identifiés peuvent être rangés dans deux catégories.

Les lncRNA connus, dont la fonction est déjà partiellement documentée : ils ont été sélectionnés sur la base de leur expression différentielle forte ($Fc > 3$) entre les contextes cellulaires [*MXD4^{WT}*] et [*MXD4^{KD}*]. Parmi les lncRNA identifiés, *RMRP* ($Fc \times 6,2$) (RNA component of mitochondrial RNA processing endoribonuclease), *FGF14-AS2* ($Fc \times 6,6$) (FGF14 antisense RNA2) et *TGFB2-OT1* ($Fc / 16,7$) (TGFB2 overlapping transcript1) semblent particulièrement intéressants car ils sont fortement modulés par la répression de *MXD4* et possèdent des sites de fixation pour de nombreux facteurs de transcription dans les régions activatrices de ces lncRNA. Parmi ces facteurs de transcription, on peut notamment citer *KLF4*, *MAX*, *MXD4* ou encore *MYC* ([Figure 80A](#)). Plusieurs études très récentes ont par ailleurs identifié le lncRNA *RMRP* comme favorisant la prolifération et la migration des cellules de cancer de la vessie ([Cao et al 2019](#)) ou de gliome ([Feng et al 2017](#)). Une faible expression de *FGF14-AS2* a été corrélée avec une taille supérieure des tumeurs et plus de métastases dans les cancers du sein ([Yang et al 2016](#)), suggérant une fonction surpresseur de tumeur.

A l'inverse, des lncRNA identifiés au cours de cette étude ont une fonction à ce jour non documentée. Ils constituent donc des candidats plus originaux. Seuls ceux qui sont les plus différenciellement exprimés dans le contexte cellulaire [*MXD4^{KD}*] versus [*MXD4^{WT}*] sont présentés ([Figure 80B](#)).

- Discussion / Perspectives -

Cette catégorisation permet de proposer deux axes pour le futur. D'une part, un axe plus sûr, basé sur la description fonctionnelle d'un ou plusieurs lncRNA déjà connus (moins risqué mais moins original). D'autre part, un axe plus exploratoire pourrait être mené en parallèle, consistant à exploiter les candidats lncRNA nouvellement identifiés et fortement régulés par la répression de *MXD4*.

A Known lncRNA modulated in [MXD4^{KO}] versus [MXD4^{WT}]

Symbol	Description	ID (Ensembl)	Adjusted p-value	Fold change	TF binding sites in the enhancer sequence	Publications
TMPO-AS1	TMPO antisense RNA 1	ENSG00000257167	0,001	x 5,51	SIN3A, MXD4, SMAD4, MNT, MYC, MAX, MXD3, HDAC1, MXI1	Huang et al, 2018
RMRP	RNA component of mitochondrial RNA processing endoribonuclease	ENSG00000269900	0,008	x 6,28	MYC, MAX, MXD4, MLX, HDAC2, MNT	Feng et al, 2017 ; Cao et al, 2019
FGF14-AS2	FGF14 antisense RNA 2	ENSG00000272143	0,010	x 6,67	HDAC1, SIN3A, MGA, MXI1, MAX, MNT	Yang et al, 2016
KRTAP5-AS1	KRTAP5-1/KRTAP5-2 antisense RNA 1	ENSG00000233930	0,002	/ 9,39	SIN3A, KLF7, KLF17, MXI1, KLF1, KLF4, KLF8, MAZ	You et al, 2018
KRT7-AS	KRT7 antisense RNA 1	ENSG00000257671	0,005	/ 4,39	SIN3A, ZEB1, MYC, MAX, BRCA1, MAZ, MXI1, KLF4	Huang et al, 2016
TGFB2-OT1	TGFB2 overlapping transcript 1	ENSG00000281453	0,017	/ 16,79	ZEB2, STAT3, JUN, MAX, KLF4	Huang et al, 2015

B Newly identified lncRNA modulated in [MXD4^{KO}] versus [MXD4^{WT}]

Symbol	Description	ID (Ensembl)	Adjusted p-value	Fold change
LINC02323	long intergenic non-protein coding RNA 2323	ENSG00000259230	0,002	x 4,47
LINC00302	long intergenic non-protein coding RNA 302	ENSG00000176075	0,006	x 5,49
LINC02005	long intergenic non-protein coding RNA 2005	ENSG00000242741	0,001	x 7,85
LINC01669	long intergenic non-protein coding RNA 1669	ENSG00000280191	0,008	/ 16,33
LINC02159	long intergenic non-protein coding RNA 2159	ENSG00000253417	0,002	/ 14,59
LINC02102	long intergenic non-protein coding RNA 2102	ENSG00000248677	0,002	/ 14,07

Figure 80 : Identification de candidats lncRNA modulés par la répression stable de MXD4.

Les ARN dotés d'une queue polyA ont été purifiés et séquencés pour réaliser l'étude comparative des transcriptomes des kératinocytes [MXD4^{KO}] versus [MXD4^{WT}]. La plupart des ARN polyA sont destinés à être traduits en protéines. Néanmoins, parmi ceux-ci, certains ne sont pas traduits et possèdent une fonction biologique. Ces ARN, de plus de 200 nucléotides, sont appelés lncRNA et contribuent à la régulation épigénétique du génome. L'étude transcriptomique a permis d'identifier des lncRNA régulés par la répression de MXD4, suggérant qu'ils pourraient jouer un rôle dans la régulation des fonctionnalités des kératinocytes. **A.** Tableau présentant les lncRNA connus fortement régulés par la répression de MXD4. **B.** Tableau présentant les lncRNA nouvellement identifiés fortement régulés par la répression de MXD4.

CONCLUSION

- Conclusion -

- Conclusion -

Cette étude met en évidence 3 résultats principaux :

- Le facteur de transcription *KLF4* contrôle la prolifération, le caractère immature et la capacité régénérative des PK primaires humain. Maintenir une faible expression de *KLF4* permet de favoriser l'expansion de PK fonctionnels, dans des milieux de culture contenant du sérum et des couches nourricières, et aussi dans des milieux plus définis. Les mécanismes de contrôle antagonise l'effet différenciateur de fortes doses de TGF- β 1. La répression de *KLF4* dans des kératinocytes dérivés de cellules souches embryonnaires permet de favoriser la croissance en colonies denses de petites cellules, représentatives de kératinocytes immatures, et d'augmenter leur prolifération.
- Le facteur de transcription *MXD4* contrôle également la prolifération, le caractère immature et la capacité régénérative des PK primaires humain. Maintenir une faible expression de *MXD4* permet de préserver les fonctionnalités de régénération épidermique des kératinocytes à long-terme, en inhibant leur différenciation précoce. Nous avons montré que l'un des paramètre clé dans les mécanismes de contrôle de ces propriétés est la proportion respective des complexes c-MYC/MAX et MAD4/MAX dans les holoclones de kératinocytes.
- La répression conjointe de *KLF4* et *MXD4* par la kenpaullone augmente le caractère immature et la prolifération des PK, y compris dans des milieux sans sérum ni couches nourricières. Ces résultats positionnent *KLF4* et *MAD4* comme leviers moléculaires de contrôle, et pourraient contribuer à proposer des axes de réflexion pour améliorer les phases d'expansion *ex vivo* en thérapie cellulaire cutanée.

- Conclusion -

ANNEXES

A Human KLF4 shRNA-mir n°2 selection

KLF4 siRNA n°2 was selected on the human KLF4 coding sequence (Accession Number CCDS6770, previously validated by the customer) using our siRNA selection pipeline which takes into account thermodynamic properties and mRNA secondary structure data in addition to classical siRNA selection criteria. The selected siRNA sequence (GGCAAAACCTACACAAAGA) was then adapted to be used as a shRNA-mir (see figure 1 for details): we added the loop of a human miRNA to generate a short hairpin and a mismatch was created on the sense sequence in order to mimic the natural miRNA. The resulting double strand DNA is the following:

```
5' CTAGGGCAAAACATACACAAAGATTTAATGTCTATACAAATCTTTGTGTAGGTTTTGCC 3'
3' CCGTTTTGTATGTGTTTCTAAATTACAGATATGTTAGAAACACATCCAAAACGGGATC 5'
```

miRNA loop
introduced mismatch

B Human MXD4 shRNA-mir n°2 selection

MXD4 siRNA n°2 was selected on the human MXD4 coding sequence (Accession Number CCDS3361, previously validated by the customer) using our siRNA selection pipeline which takes into account thermodynamic properties and mRNA secondary structure data in addition to classical siRNA selection criteria. The selected siRNA sequence (TCGCCAGGGAGAAAACAAA) was then adapted to be used as a shRNA-mir (see figure 1 for details): we added the loop of a human miRNA to generate a short hairpin and a mismatch was created on the sense sequence in order to mimic the natural miRNA. The resulting double strand DNA is the following:

```
5' CTAGTCGCCAGGTAGAAAACAAATTTAATGTCTATACAAATTTGTTTCTCCCTGGCGA 3'
3' AGCGGTCCATCTTTTGTTTAAATTACAGATATGTTAAACAAAAGAGGGACCGCTGATC 5'
```

miRNA loop
introduced mismatch

C Human MYC shRNA-mir n°1 selection

MYC siRNA n°1 was selected on the human MYC coding sequence (Accession Number CCDS6359, previously validated by the customer) using our siRNA selection pipeline which takes into account thermodynamic properties and mRNA secondary structure data in addition to classical siRNA selection criteria. The selected siRNA sequence (AGAGGAGGAACGAGCTAAA) was then adapted to be used as a shRNA-mir (see figure 1 for details): we added the loop of a human miRNA to generate a short hairpin and a mismatch was created on the sense sequence in order to mimic the natural miRNA. The resulting double strand DNA is the following:

```
5' CTAGAGAGGAGGCACGAGCTAAATTTAATGTCTATACAAATTTAGCTCGTTCCTCCTCT 3'
3' TCTCCTCCGTGCTCGATTTAAATTACAGATATGTTAAATCGAGCAAGGAGGAGAATC 5'
```

miRNA loop
introduced mismatch

D KLF4 CODING SEQUENCE CLONING

The KLF4 was generated by PCR using a plasmid of Vectalys as a template and the primers corresponding to the customer's sequence and provided by EUROGENTEC:

- The forward primer was designed including a KOZAK sequence:
5'-GCCACCATGAGGCAGCCACTGGCGAG-3'
- The reverse primer was designed including a MluI site for cloning purpose:
5'-CTAACGCGTTAAAAATGCCTCTTCATGTGTAAGGC-3'

Figure S1 : Séquences nucléiques sélectionnées pour la construction des plasmides insérés dans les vecteurs viraux.

Les séquences nucléiques insérées dans les 'backbone' des vecteurs lentivirus ont été construites par un algorithme de la société Vectalys® en se basant sur les propriétés thermodynamiques d'interactions et la structure secondaire de l'ARNm ciblé, en plus des critères de sélection standards. La séquence générant le siARN a ensuite été adaptée pour produire un shARN (small hairpin ARN) : une boucle a été ajoutée ainsi qu'une mutation ponctuelle d'une paire de bases afin d'imiter le miARN naturel. **A.** Séquences nucléiques insérées dans les plasmides codant le shARN anti-KLF4 ([*KLF4^{KD}*]). **B.** Séquences nucléiques insérées dans les plasmides codant le shARN anti-MXD4 ([*MXD4^{KD}*]). **C.** Séquences nucléiques insérées dans les plasmides codant le shARN anti-MYC ([*MYC^{KD}*]). **D.** Séquences nucléiques insérées pour exprimer de manière ectopique le gène KLF4 ([*KLF4^{OE}*]).

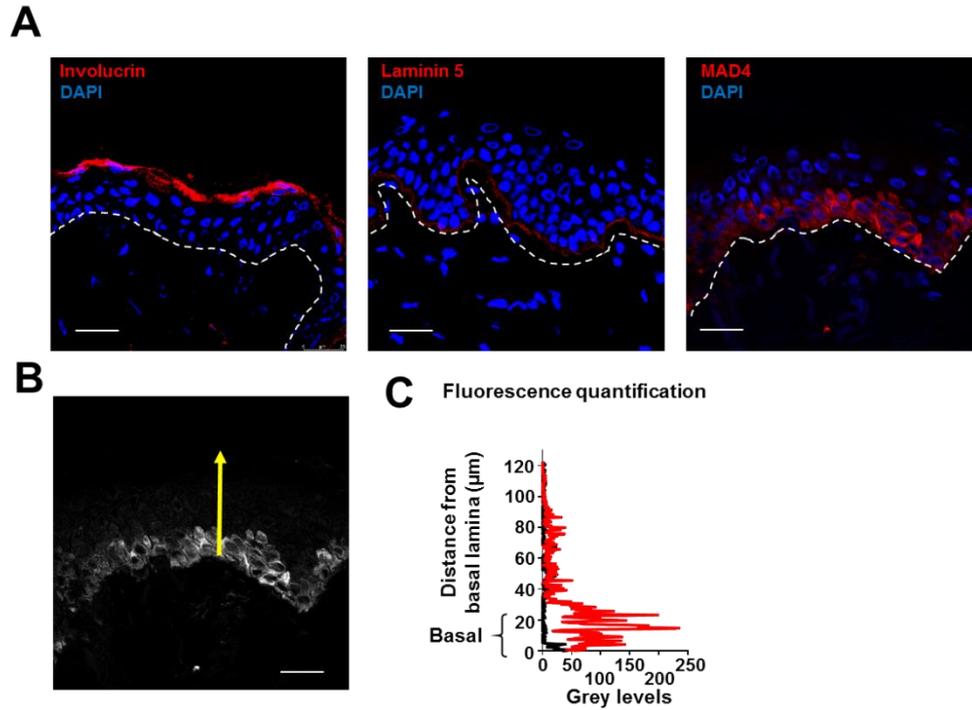


Figure S2 : La protéine MAD4 est localisée dans la couche basale de l'épiderme interfolliculaire humain.

Des échantillons de peaux humaines (plastie mammaire) ont été congelés en OCT et des coupes de 8 microns réalisés au cryostat. Les coupes ont été incubées avec des anticorps primaires dirigés contre l'involucrine, la laminine 5, la beta-caténine et le FdT MAD4. **A.** Images représentatives de coupes de peaux humaines montrant l'expression de l'involucrine, la laminine 5 et MAD4. La barre d'échelle mesure 50 microns. La ligne pointillée représente la jonction derme-épiderme. **B-C.** Quantification du signal de fluorescence correspondant à la détection de MAD4, le long de la ligne jaune, avec le logiciel ImageJ. **C.** La ligne noire représente le signal contrôle (incubation sans l'anticorps primaire), la ligne rouge le signal spécifique de MAD4.



Quantitative Detection of Low-Abundance Transcripts at Single-Cell Level in Human Epidermal Keratinocytes by Digital Droplet Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

Frédéric Auvré, Julien Coutier, Michèle T. Martin, and Nicolas O. Fortunel

Abstract

Genetic and epigenetic characterization of the large cellular diversity observed within tissues is essential to understanding the molecular networks that ensure the regulation of homeostasis, repair, and regeneration, but also pathophysiological processes. Skin is composed of multiple cell lineages and is therefore fully concerned by this complexity. Even within one particular lineage, such as epidermal keratinocytes, different immaturity statuses or differentiation stages are represented, which are still incompletely characterized. Accordingly, there is presently great demand for methods and technologies enabling molecular investigation at single-cell level. Also, most current methods used to analyze gene expression at RNA level, such as RT-qPCR, do not directly provide quantitative data, but rather comparative ratios between two conditions. A second important need in skin biology is thus to determine the number of RNA molecules in a given cell sample. Here, we describe a workflow that we have set up to meet these specific needs, by means of transcript quantification in cellular micro-samples using flow cytometry sorting and reverse transcription-digital droplet polymerase chain reaction. As a proof-of-principle, the workflow was tested for the detection of transcription factor transcripts expressed at low levels in keratinocyte precursor cells. A linear correlation was found between quantification values and keratinocyte input numbers in a low quantity range from 40 cells to 1 cell. Interpretable signals were repeatedly obtained from single-cell samples corresponding to estimated expression levels as low as 10–20 transcript copies per keratinocyte or less. The present workflow may have broad applications for the detection and quantification of low-abundance nucleic acid species in single cells, opening up perspectives for the study of cell-to-cell genetic and molecular heterogeneity. Interestingly, the process described here does not require internal references such as house-keeping gene expression, as it is initiated with defined cell numbers, precisely sorted by flow cytometry.

Keywords ddPCR, Keratinocytes, Low-abundance nucleic acids, Single-cell level, Transcript quantification

1 Introduction

Wide cellular diversity is found within all tissues. It is required to control homeostasis, repair, and regeneration, and can be disturbed by pathological dysregulations. Skin is a perfect illustration of this diversity, being composed of multiple cell lineages, each of which comprises various cell subpopulations with distinct cellular and

molecular properties. Even within a single cell lineage, such as keratinocytes constituting the epithelial part of the epidermis, different immaturity statuses and differentiation stages can be detected and separated, including diverse subpopulations of stem- and progenitor-cells [1–6]. Further cellular and molecular studies remain needed for full characterization. In previous issues of *Methods Mol Biol*, our group presented an experimental model enabling functional investigation of keratinocyte stem- and progenitor-cells at single-cell level, based on multi-parallel clonal micro-cultures [7] and a dye-tracking approach to monitor the cultured keratinocyte cycle [8]. The present study describes a method suitable for detection and quantification of transcripts in samples with low cell numbers, down to single-cell level, using flow cytometry sorting and reverse transcription-digital droplet polymerase chain reaction (RT-ddPCR). The goal was to set up a method suitable for acquisition of quantitative data on transcript expression in normal and pathological samples of human epidermal cells, and sensitive enough to enable the study of transcripts expressed at low levels in single cells.

Briefly, digital PCR is a refinement of classical PCR methods that allows absolute quantification of nucleic acids, including cDNA (RT-dPCR). The principle of digital PCR consists in fractionation of the sample reaction volume into thousands of smaller reactions, so that individual nucleic acid targets are partitioned in separate micro-volumes. In digital droplet PCR (ddPCR) technology, sample fractionation is based on water-oil emulsion. Each PCR reaction volume is fractionated into nanoliter-size samples which are encapsulated into oil droplets. PCR amplification is then performed similarly to classical TaqMan assay, giving rise to a mix of positive fluorescent droplets (presence of the PCR target sequence) together with negative non-fluorescent droplets (absence of the PCR target sequence). The fraction of fluorescent droplets is determined on binary readout of the numbers of positive and negative droplets per sample. Interpretation of ddPCR signals is based on the fact that the distribution of target molecules within the droplet ensemble follows a Poisson distribution. The correspondence between the proportion of fluorescent droplets and absolute quantity of copies of the target sequence in the input sample can therefore be determined according to this probability distribution. Readout of positive droplets thus provides a quantitative estimate of specific expressed sequences (*see* [9, 10]).

We expect RT-ddPCR to provide a useful tool for different areas of fundamental, translational, and clinical research on skin. The wide range of applications may include detection and quantification of low-abundance messenger RNAs (mRNAs) and mRNA variants, and also analysis of diverse epigenetic molecular species such as long noncoding RNAs (LncRNAs) [11] and micro-RNAs (miRNAs) [12], the functions of which in normal skin

morphogenesis, homeostasis, aging, and regenerative capacity are far from being fully understood. In particular, analysis of low-abundance nucleic species is of great importance for further exploration of the stemness concept [13], notably in skin. In the domain of pathophysiology, RT-ddPCR may be applied to characterize mRNA expression dysregulation. It is also being investigated for the detection of pathogens, including viral genomes [14]. - RT-ddPCR applications are exemplified in the present study by detection and quantification of two transcripts from transcription factor genes which are studied by our group for their role in the regulation of the cell-fate decision in human keratinocyte precursor cells, notably in the maintenance of their immature character: *MXD4* and *KLF4* transcripts, which respectively encode MAD4 and KLF4 proteins ([15]; for a review, see [16]). Transcription factors are often characterized by low transcript and protein expression levels in normal cells. Like low-abundance nucleic acid species in general, their study thus depends on the availability of sensitive quantification methods, especially in the perspective of working at single-cell level.

Finally, considering the current demand for validation of wide genomic and epigenomic data based on massive next-generation sequencing, which is in continuous expansion, the workflow described in this chapter may constitute an efficient tool for the qualification of samples and technical processes. In particular, it may contribute to the development and validation of genome-wide analyses applied in cell micro-samples, including at single-cell level. Notably, the biological significance of global profiling approaches such as transcriptome analysis by RNA-sequencing applied on cell micro-samples depends on careful checking to ensure that low-level expressions are correctly detected and not excluded from the analysis pipeline.

2 Materials

2.1 Cellular Material

The cells used in the example of RT-ddPCR analysis shown here were cultured human epidermal keratinocyte precursor cells, defined as the progeny of the basal stem- and progenitor-cell fraction obtained by the previously described selection method based on rapid adhesion on collagen [17]. The cells were used at passage-1 stage after primary culture. The example, presented as a proof-of-principle, is nonrestrictive, and the workflow can be directly applied to the study of the different cell types in any tissue. In skin, suitable cellular material non-exhaustively includes the various immature or differentiated keratinocyte subpopulations and dermal fibroblast subtypes [18].

- 2.2 Equipment**
- 2.2.1 Flow Cytometry**
- Cell sorter: MoFlo Astrios EQ (Beckman-Coulter Life Sciences), allowing 6-way sorting and deposition of defined cell numbers, including single cells.
Excitation sources (lasers). Wavelength/power: 355 nm/100 mW; 405 nm/55 mW; 488 nm/200 Mw; 561 nm/200 mW; and 642 nm/100 mW.
Biological safety cabinet, Class II Type A2, SteriGARD (Baker). Summit™ software system v6.3 (Cytomation, Inc.).
- 2.2.2 Microplate Sealing**
- PX1™ PCR plate sealer (Bio-Rad; cat. no. 1814000).
- 2.2.3 Droplet Generation**
- QX200 droplet generator (Bio-Rad; cat. no. 1864002).
- 2.2.4 Sample Lysis, cDNA Synthesis, and PCR Amplification**
- C1000 Touch thermal cycler (Bio-Rad).
- 2.2.5 Readout**
- QX200™ droplet reader (Bio-Rad; cat. no. 1864003).
QuantaSoft™ software, regulatory edition (Bio-Rad; cat. no. 1864011).
- 2.3 Reagents and Products**
- Flow cytometry tubes, 5 ml polypropylene round-bottom (Falcon; cat. no. 352063).
BSA (Sigma; cat. no. A9418).
DPBS-2% BSA filtered through a 0.22 µm filter and stored as frozen aliquots at -20 °C.
Hard-shell® 96-well PCR plates, clear well, white shell (Bio-Rad; cat. no. HSP9601).
- 2.3.1 Flow Cytometry Cell Sorting**
- 2.3.2 Cell Lysis**
- Tris-EDTA buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 mM EDTA) (Sigma-Aldrich; cat. no. T9285).
SingleShot™ cell lysis buffer (Bio-Rad; cat. no. 172-5080).
Proteinase K solution (Bio-Rad; cat. no. 172-5080).
DNase solution (Bio-Rad; cat. no. 172-5080).
Microseal® 'B' PCR plate sealing film (Bio-Rad; cat. no. MSB1001).
- 2.3.3 Reverse Transcription**
- Distilled water, DNase/RNase-free (Invitrogen; cat. no. 0977035).
SuperScript™ VILO™ cDNA synthesis [reverse-transcriptase 5× RT buffer and 10× VILO SuperScript enzyme] (Invitrogen; cat. no. 11754050).
Microseal® 'B' PCR plate sealing film (Bio-Rad; cat. no. MSB1001).

2.3.4 <i>Polymerase Chain Reaction</i>	ddPCR™ supermix for probes (No dUTP) (Bio-Rad; cat. no. 1863024). ddPCR™ 96-well plates (Bio-Rad; cat. no. 12001925). PCR plate heat seal, foil, pierceable (Bio-Rad; cat. no. 1814040).
2.3.5 <i>Droplet Generation</i>	DG8 cartridges and gasket (Bio-Rad; cat. no. 1864007). Droplet generation oil (Bio-Rad; cat. no. 1863005).
2.3.6 <i>Signal Readout</i>	ddPCR droplet reader oil (Bio-Rad; cat. no. 1863004).

3 Methods

3.1 Description of the Workflow

As described in detail in Subheading 3 below, the workflow that we have set up for transcript quantification in keratinocyte micro-samples includes the following experimental steps, schematized in Fig. 1:

1. Automated deposition of defined numbers of cells in micro-wells using flow cytometry.
2. Cell lysis and RNA reverse transcription.
3. Sample preparation for polymerase chain reaction (PCR mixture).
4. Droplet generation (sample partitioning through water-oil emulsion).
5. Polymerase chain reaction (generation of fluorescent droplets).
6. Readout (quantification of positive and negative droplets).

In the example of a RT-ddPCR experiment presented here, the feasibility of *MXD4* and *KLF4* transcript detection was investigated in samples with decreasing quantities of input cellular material.

- For *KLF4* transcript amplification, primers were selected in exons 2 and 3 of the human *KLF4* gene (Thermo-Fisher Scientific; primers ref. HS00358836_m1; fluorescent probe FAM-MGB), producing a 110 base-length amplicon.
- For *MXD4* transcript amplification, primers were selected in exons 3 and 4 of the human *MXD4* gene (Thermo-Fisher Scientific; primers ref. HS01557630_m1; fluorescent probe FAM-MGB), producing a 60 base-length amplicon.

The tested keratinocyte quantities comprised 40 cells, 20 cells, 5 cells, and 1 single cell. For each cell number, 20–47 replicates were analyzed. The four micro-sample sizes gave rise to interpretable signals for both *KLF4* and *MXD4* transcripts, as shown in Fig. 2. Moreover, a proportionality between transcript quantification values and input keratinocyte numbers was found, indicating that the workflow was functional in this low cell-quantity range,

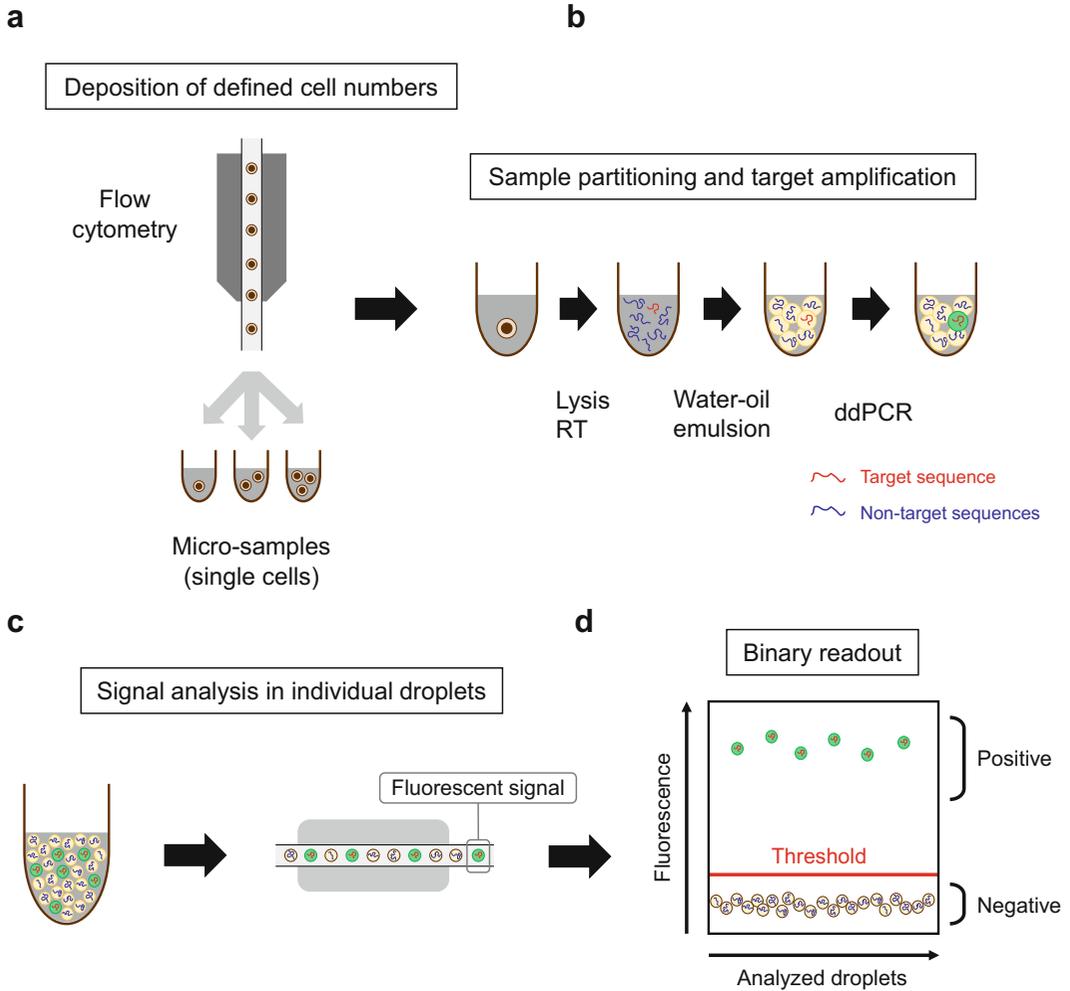


Fig. 1 Schematic representation of the RT-ddPCR workflow. **(a)** Generation of micro-samples by flow cytometry cell-sorting and automated deposition. Defined cell numbers are deposited in multi-well plates containing the lysis solution. This input cellular material can be single cells. **(b)** Cell lysis, reverse transcription, sample partitioning, and ddPCR target amplification. Steps from cell lysis to cDNA synthesis and preparation of the amplification mixture are performed in the same well to avoid material loss. Sample partitioning is then achieved based on the principle of water-oil emulsion. The ddPCR reaction is then performed. **(c)** ddPCR amplification gives rise to two droplet populations: droplets that initially contained the target become fluorescent after PCR amplification, whereas droplets that did not contain the target remain non-fluorescent. Droplets are analyzed individually for fluorescence signal. **(d)** The ddPCR signal is analyzed on binary readout. The absolute number of molecular targets present in initial samples can be determined from the proportion of positive and negative droplets based on Poisson distribution

including single-cell analysis. The method repeatedly enabled detection of *KLF4* and *MXD4* transcripts in single keratinocytes, and estimated their expression levels in the range of 9.5 ± 10.1 and 10.2 ± 6.1 copies per cell, respectively. Characterization of this heterogeneity is critical for further understanding the intrinsic properties that can distinguish different individual cells. In

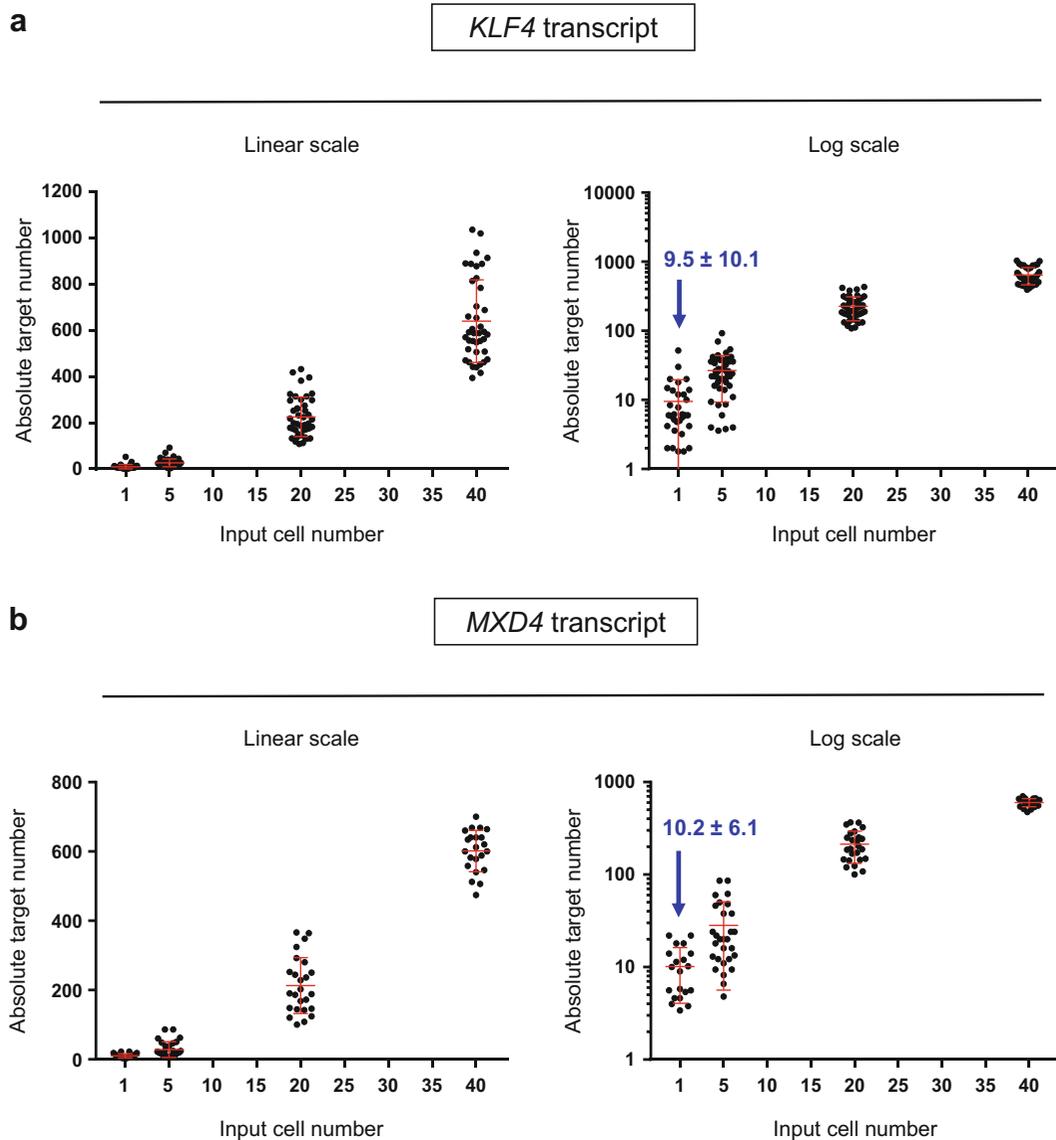


Fig. 2 Detection and quantification of *KLF4* and *MXD4* transcripts in micro-samples of human epidermal keratinocyte precursor cells by RT-ddPCR. Input keratinocyte quantities were 40, 20, and 5 cells, or 1 cell. In the example shown, each input cell quantity was analyzed in 20–47 replicate RT-ddPCR points. Dots represent RT-ddPCR transcript quantification values obtained with equivalent replicate cell samples. (a, b) A linear correlation between quantification values and input keratinocyte numbers was found for the two transcripts (see linear scale representations). Correlation coefficients (R^2) were 0.9778 and 0.9781 for *KLF4* and *MXD4* transcripts, respectively. Moreover, the possibility for transcript quantification in single cells was validated, providing estimates of *KLF4* and *MXD4* transcript numbers in the range of 9.5 ± 10.1 and 10.2 ± 6.1 copies per individual keratinocyte precursor cell, respectively (see log-scale representations). Dots correspond to ddPCR analyses of replicate biological samples from three independent experiments. Means \pm SD are indicated

summary, this methodological set-up validates the feasibility of detection and quantification of low-abundance transcripts in single human keratinocytes. Interestingly, the present process does not require internal references such as house-keeping gene expression, which frequently constitutes a difficult issue in RT-PCR. Indeed, the workflow described here is initiated with defined cell numbers, which is precisely ensured by flow cytometry sorting.

It is important to bear in mind that high-abundance nucleic species can saturate the system, even with single cells as input material, requiring sample dilution. For example, to test RT-ddPCR detection of the strongly expressed *18S rRNA* in single keratinocytes, a 1/400 dilution of cDNA samples was used, allowing detection in the range of 10,000–15,000 copies per cell. Accordingly, when quantification is the objective, we recommend checking that the cellular abundance of the specific targets matches the quantitative detection range of the method, by systematically establishing a curve of cell quantity versus signal.

3.2 Automated Deposition of Defined Numbers of Cells in Micro-Wells Using Flow Cytometry

1. Prepare a volume of lysis solution corresponding to 5 μl /sample: mix 4.2 μl Tris-EDTA buffer, 0.64 μl singleshot cell lysis buffer, 0.08 μl proteinase K solution, and 0.08 μl DNase solution (*see Note 1*).
2. Distribute the lysis solution in a 96-well PCR plate.
3. Suspend cell samples in PBS-2% BSA, in flow cytometry tubes (*see Note 2*).
4. Set the MoFlo at a low sheath pressure (20 psi), use a 100 μm nozzle, and adjust drop drive frequency at 40 kHz, voltage at 55 V.
5. Set sorting gates according to defined morphological and phenotypic characteristics, and for cell doublet exclusion (*see Note 3*).
6. Process for deposition of defined numbers of cells into micro-wells (*see Notes 4 and 5*).
7. Seal the micro-well plate.
8. Centrifuge the plate for 1 min at $500 \times g$.

3.3 Cell Lysis and RNA Reverse Transcription

1. Process for cell lysis using the following thermocycler program: 10 min at 25 $^{\circ}\text{C}$, then 5 min at 75 $^{\circ}\text{C}$, and at 7 $^{\circ}\text{C}$ until sample storage or further processing (*see Note 6*).
2. Prepare a volume of reverse transcription mix corresponding to 6 μl /sample: mix 3 μl DNase/RNase-free H_2O , 2 μl $5 \times$ RT buffer, and 1 μl $10 \times$ VILO SuperScript enzyme (*see Notes 1 and 7*).
3. Remove the sealing film from the plate.
4. Add 6 μl RT mixture to each 5 μl cell lysate, and homogenize by gentle pipetting.

5. Seal the micro-well plate.
6. Process for reverse transcription (cDNA synthesis) using the following thermocycler program: 10 min at 25 °C, followed by 60 min at 42 °C, 5 min at 85 °C, and then 7 °C until next step.

3.4 Sample Preparation for Polymerase Chain Reaction (ddPCR Mixture)

1. Prepare a volume of ddPCR mixture corresponding to 11 µl/sample: mix 10 µl of ddPCR supermix for probes and 1 µl probes (*see* **Notes 1** and **8**).
2. Remove the sealing film from the plate.
3. Add 11 µl ddPCR mixture to each 11 µl cDNA sample, and homogenize by gentle pipetting.

3.5 Droplet Generation (Sample Partitioning Through Water-Oil Emulsion)

1. Carefully transfer the samples (20 µl) to the droplet generation cartridge (*see* **Note 9**).
2. Fill cartridge wells with 70 µl droplet generation oil.
3. Cover the wells with the rubber seal (*see* **Note 10**).
4. Process for water-oil emulsion using the droplet generator.

3.6 Polymerase Chain Reaction (Generation of Fluorescent Droplets)

1. Carefully transfer the samples (40 µl) to a new 96-well plate (*see* **Note 11**).
2. Seal the micro-well plate using a pierceable film.
3. Process polymerase chain reaction (ddPCR) using the following thermocycler program: 10 min at 95 °C, followed by 40 cycles consisting of 30 s at 94 °C and 1 min at 60 °C, and then 10 min at 98 °C, and finally 7 °C until next step (*see* **Note 12**).

3.7 Readout (Quantification of Positive and Negative Droplets)

1. Place the plate in the droplet reader without removing the sealing film.
2. Quantify positive and negative droplets.
3. Process for data analysis and interpretation using the QuantaSoft™ software (*see* **Note 13**).

4 Notes

1. Prepare more volume than strictly needed, due to loss during pipetting, which can be estimated as 20%.
2. Filtering the cell suspension is recommended to strictly avoid aggregates.
3. Use the area-versus-peak ratio on a fluorescence parameter for doublet discrimination.
4. We suggest analyzing samples in at least 4–8 replicates.

5. Check the accuracy of cell deposition by visual microscopic observation, as previously described [6, 7].
6. At this stage, samples can be stored frozen at -80°C .
7. We recommend the use of high fidelity enzymes to ensure high accuracy and sensitivity.
8. cDNA amplification primers are preferentially selected in different exons of the gene. The fluorescent probes that are used to generate the PCR signal are available with different wavelengths (TaqMan principle, the presented example, FAM-MGB, Thermo-Fisher Scientific).
9. Strictly avoid making bubbles.
10. Check that the rubber seal is correctly adjusted.
11. Pipet very gently, as droplets are fragile and can be easily destroyed.
12. Set the thermocycler so that lip temperature is maintained at 105°C , and temperature changes are operated at a low speed of $2^{\circ}\text{C}/\text{s}$ (gradient), to maintain droplet integrity.
13. Molecular target distribution within droplets after sample partitioning follows a Poisson distribution. Accordingly, the absolute number of molecular targets present in initial samples can be determined from the proportion of positive and negative droplets, based on Poisson distribution [9, 10].

Acknowledgments

We thank Genopole[®] (Evry, France), and particularly Julien Picot, who provided support for equipment and infrastructure. This work was supported by grants from: CEA and INSERM (UMR967) and the *Délégation Générale de l'Armement* (DGA) grants; FUI-AAP13 and the *Conseil Général de l'Essonne* within the STEMSAFE grant; and EURATOM (RISK-IR, FP7, grant 323267). Julien Coutier received a CEA-DGA thesis fellowship grant.

References

1. Li A, Simmons PJ, Kaur P (1998) Identification and isolation of candidate human keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3902–3907
2. Fortunel NO, Hatzfeld JA, Rosemary PA, Ferraris C, Monier MN, Haydont V, Longuet J, Brethon B, Lim B, Castiel I, Schmidt R, Hatzfeld A (2003) Long-term expansion of human functional epidermal precursor cells: promotion of extensive amplification by low TGF-beta1 concentrations. *J Cell Sci* 116:4043–4052
3. Larderet G, Fortunel NO, Vaigot P, Cegalerba M, Maltère P, Zobiri O, Gidrol X, Waksman G, Martin MT (2006) Human side population keratinocytes exhibit long-term proliferative potential and a specific gene expression profile and can form a pluristratified epidermis. *Stem Cells* 24:965–974
4. Rachidi W, Harfourche G, Lemaitre G, Amiot F, Vaigot P, Martin MT (2007) Sensing

- radiosensitivity of human epidermal stem cells. *Radiother Oncol* 83:267–276
5. Harfouche G, Vaigot P, Rachidi W, Rigaud O, Moratille S, Marie M, Lemaitre G, Fortunel NO, Martin MT (2010) Fibroblast growth factor type 2 signaling is critical for DNA repair in human keratinocyte stem cells. *Stem Cells* 28:1639–1648
 6. Fortunel NO, Cadio E, Vaigot P, Chadli L, Moratille S, Bouet S, Roméo PH, Martin MT (2010) Exploration of the functional hierarchy of the basal layer of human epidermis at the single-cell level using parallel clonal microcultures of keratinocytes. *Exp Dermatol* 19:387–392
 7. Fortunel NO, Vaigot P, Cadio E, Martin MT (2010) Functional investigations of keratinocyte stem cells and progenitors at a single-cell level using multiparallel clonal microcultures. *Methods Mol Biol* 585:13–23
 8. Chadli L, Cadio E, Vaigot P, Martin MT, Fortunel NO (2013) Monitoring the cycling activity of cultured human keratinocytes using a CFSE-based dye tracking approach. *Methods Mol Biol* 989:83–97
 9. Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, Belgrader P, Heredia NJ, Makarewicz AJ, Bright IJ, Lucero MY, Hiddessen AL, Legler TC, Kitano TK, Hodel MR, Petersen JF, Wyatt PW, Steenblock ER, Shah PH, Bousse LJ, Troup CB, Mellen JC, Wittmann DK, Erndt NG, Cauley TH, Koehler RT, So AP, Dube S, Rose KA, Montesclaros L, Wang S, Stumbo DP, Hodges SP, Romine S, Milanovich FP, White HE, Regan JF, Karlin-Neumann GA, Hindson CM, Saxonov S, Colston BW (2011) High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal Chem* 83:8604–8610
 10. Pinheiro LB, Coleman VA, Hindson CM, Herrmann J, Hindson BJ, Bhat S, Emslie KR (2012) Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification. *Anal Chem* 84:1003–1011
 11. Kretz M, Siprashvili Z, Chu C, Webster DE, Zehnder A, Qu K, Lee CS, Flockhart RJ, Groff AF, Chow J, Johnston D, Kim GE, Spitale RC, Flynn RA, Zheng GX, Aiyer S, Raj A, Rinn JL, Chang HY, Khavari PA (2013) Control of somatic tissue differentiation by the long non-coding RNA TINCR. *Nature* 493:231–235
 12. Nagosa S, Leesch F, Putin D, Bhattacharya S, Altshuler A, Serron L, Amitai-Lange A, Nasser W, Aberdam E, Rouleau M, Tattikota SG, Poy MN, Aberdam D, Shalom-Feuerstein R (2017) microRNA-184 induces a commitment switch to epidermal differentiation. *Stem Cell Reports* 9:1991–2004
 13. Fortunel NO, Otu HH, Ng HH, Chen J, Mu X, Chevassut T, Li X, Joseph M, Bailey C, Hatzfeld JA, Hatzfeld A, Usta F, Vega VB, Long PM, Libermann TA, Lim B (2003) Comment on “‘Stemness’: transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells” and “a stem cell molecular signature”. *Science* 302:393
 14. Arvia R, Sollai M, Pierucci F, Urso C, Massi D, Zakrzewska K (2017) Droplet digital PCR (ddPCR) vs quantitative real-time PCR (qPCR) approach for detection and quantification of Merkel cell polyomavirus (MCPyV) DNA in formalin fixed paraffin embedded (FFPE) cutaneous biopsies. *J Virol Methods* 246:15–20
 15. Hurlin PJ, Quéva C, Koskinen PJ, Steingrímsson E, Ayer DE, Copeland NG, Jenkins NA, Eisenman RN (1995) Mad3 and Mad4: novel Max-interacting transcriptional repressors that suppress c-myc dependent transformation and are expressed during neural and epidermal differentiation. *EMBO J* 14:5646–5659
 16. Sur I (2009) Krüppel-like factors 4 and 5: unity in diversity. *Curr Genomics* 10:594–603
 17. Fortunel NO, Chadli L, Bourreau E, Cadio E, Vaigot P, Marie M, Deshayes N, Rathman-Josserand M, Leclaire J, Martin MT (2011) Cellular adhesion on collagen: a simple method to select human basal keratinocytes which preserves their high growth capacity. *Eur J Dermatol* 21(Suppl 2):12–20
 18. Mine S, Fortunel NO, Pigeon H, Asselineau D (2008) Aging alters functionally human dermal papillary fibroblasts but not reticular fibroblasts: a new view of skin morphogenesis and aging. *PLoS One* 3:e4066



Iterative Three-Dimensional Epidermis Bioengineering and Xenografting to Assess Long-Term Regenerative Potential in Human Keratinocyte Precursor Cells

Nicolas O. Fortunel, Emmanuelle Bouissou-Cadio, Julien Coutier, and Michèle T. Martin

Abstract

The functional definition of somatic adult stem cells is based on their regenerative capacity, which allows tissue regeneration throughout life. Thus, refining methodologies to characterize this capacity is of great importance for progress in the fundamental knowledge of specific keratinocyte subpopulations but also for preclinical and clinical research, considering the high potential of keratinocytes in cell therapy. We present here a methodology which we define as iterative xenografting, which originates in the classical model of human skin substitute xenografts onto immunodeficient recipient mice. The principle of this functional assay is first to perform primary xenografts to assess graft take and the quality of epidermal differentiation. Then, human keratinocytes are extracted from primary graft samples to perform secondary xenografts, to assess the presence and preservation of functional keratinocyte stem cells with long-term regenerative potential. In the example of experiments shown, iterative skin xenografting was used to document the high regenerative potential of epidermal holoclone keratinocytes.

Keywords Epidermis, Epidermis reconstruction, Keratinocyte, Regeneration, Stem cell, Xenograft

1 Introduction

Modeling the capacity of stem and progenitor cells to maintain tissue integrity has a great importance for both fundamental and biomedical research, as clearly exemplified in the skin, particularly in the epidermis. In fundamental research, complementary *in vitro* and *in vivo* functional assays are needed to enhance knowledge of the functional hierarchy of the basal layer of the human interfollicular epidermis. There is a great need to assess short- and long-term potential for two-dimensional growth and three-dimensional tissue reconstitution. In biomedical research, one important field of interest is cell therapy, exemplified by the use of keratinocytes for bioengineering of skin substitutes [1] for grafting in severe burn patients [2]. More generally, the regenerative capacity of keratinocyte precursor cells could lead to applications in the cure of chronic lesions, such as in diabetic and elderly patients. A second

biomedical domain in which assessment of keratinocyte precursor functionalities is of crucial importance is the use of ionizing radiation (IR) for curative (high dose: radiotherapy) or for diagnostic purposes (low dose: imaging). Various dermatological pathologies are induced by high-dose IR exposure, including short-term acute effects (burns) and long-term sequelae (fibrosis, cancer) [3, 4]. Knowledge of IR effects is very incomplete, especially at low doses, whereas the impact may be wide with the increasing development and use of medical imaging.

Various *in vitro* assays are available [5] to analyze keratinocyte growth and epidermis reconstruction capacity and may be suitable for evaluating stress-induced alterations in these properties. Two-dimensional short- and long-term mass culture is used to quantify proliferation, together with low-density or clonal culture to quantify colony- or clone-forming efficiency, respectively. More sophisticated three-dimensional reconstructed skin models can provide information on the quality of epidermis organogenesis and differentiation and reveal histological abnormalities. However, none of these culture techniques and functional assays can fully reproduce the *in vivo* context, and various *in vitro* systems are not sufficient to evaluate the efficacy of particular skin substitutes for grafting or to study stem cell maintenance within grafts. To address these important questions, xenograft models have been developed, with an immunodeficient animal receiving a human reconstructed skin graft. Immunodeficient nude mice have been used for these purposes in preclinical studies of original bioengineered human epidermal substitutes [1].

The present report describes a refined methodology based on the classical model of human skin xenograft onto nude mice. Primary xenografts enable assessment of the quality and efficiency of graft take but are less satisfactory for assessing the long-term preservation and maintenance of immature functional keratinocyte precursors within grafted epidermis substitutes. In the hematopoietic system, the presence of stem cells with long-term hematopoietic reconstitution capability was demonstrated by transplantation experiments in successive recipient mice [6]. Considering the biological similarities between the hematopoietic system and epidermis (i.e., tissues in constant renewal and self-renewing stem cell compartments), we extended this concept to explore the long-term regenerative potential of keratinocytes in epidermis xenografts.

Human holoclone keratinocytes were used as a model of immature precursor cells endowed with long-term growth and three-dimensional epidermis regeneration capacity, to generate a proof of principle for successful iterative epidermis bioengineering and grafting in two successive recipient nude mice. This functional assay opens up perspectives for modeling epidermal stem cell functionalities. Direct applications could include skin regeneration, particularly cell and gene therapies in which the presence and

functionality of long-term stem cells are critical parameters for clinical outcome [7, 8]. In addition, iterative bioengineered epidermis xenografting may shed light on the long-term consequences of skin exposure to environmental stress or genotoxic agents associated with medical practices.

2 Materials

- 2.1 Cellular Material** Frozen banked samples of human epidermal holoclone keratinocytes generated and characterized in the study by Fortunel et al. [9] were used as a model of immature skin keratinocyte precursor cells. These holoclone keratinocyte samples were stably transduced using a lentiviral vector to express the fluorescent protein GFP (supplied by Vectalys SA). Holoclonal cells are not the sole option: keratinocyte banks of total basal keratinocyte precursor cell progeny [10] can also be used, and suitable material non-exhaustively includes stem and progenitor cell-enriched subpopulations that can be sorted according to various cell surface markers or other phenotypic criteria [11–15]. Feeder layers of human dermal fibroblasts growth-arrested by 60 Gy γ -irradiation were prepared as previously described [9] and stored as frozen aliquots. Human dermal fibroblasts included in plasma gels in bioengineered skin substitutes were produced similarly, but not irradiated.
- 2.2 Recipient Mice** Immunodeficient nude mice were used as recipients (Harlan Laboratories) (*see Note 1*).
- 2.3 Equipment** Cell sorter: MoFlo Astrios EQ (Beckman-Coulter Life Sciences), allowing sorting and deposition of predefined cell numbers, including single cells.
- 2.3.1 Flow Cytometry** Biological safety cabinet, Class II Type A2, SteriGARD (Baker). Summit™ software system v6.3 (Cytomation, Inc.).
- 2.3.2 Xenografting** Isoflurane anesthetic unit (Minerve). Heated surface—Multistation temperature control unit (Minerve).
- 2.3.3 Histology** High-resolution slide imaging NanoZoomer 2.0-HT system (Hamamatsu).
- 2.4 Reagents and Products** DMEM and Ham's F12 media (Gibco) (v/v, 3/1 mixture). 10% fetal calf serum (HyClone).
- 2.4.1 Keratinocyte Culture Medium** 10 ng/ml epidermal growth factor (EGF) (Chemicon). 5 μ g/ml transferrin (Sigma). 5 μ g/ml insulin (Sigma).

0.4 µg/ml hydrocortisone (Sigma).
180 µM adenine (Sigma).
2 mM tri iodothyronine (Sigma).
2 mM L glutamine (Gibco).
100 U/ml penicillin/streptomycin (Gibco).

**2.4.2 Skin Substitute
Bioengineering and
Xenografting**

Dissection tools: autoclaved scissors, scalpel, and curved forceps (CML).
Human plasma (in the present work, generous gift from Pr Lataillade, Biomedical Research Institute of the Armies [IRBA], INSERM U1197 Clamart, France).
9 mg/ml NaCl (Fresenius).
10 mg/ml CaCl₂ (Laboratoire Renaudin).
0.1 g/ml Exacyl (tranexamic acid, Sanofi).
9.6 cm² Petri dishes (BD Falcon).
25 cm² culture flasks coated with collagen I (BD Falcon).
Liquid nitrogen.

2.4.3 Graft Dissociation

Dissection tools: autoclaved scissors, scalpel, and curved forceps (CML).
Grade II dispase 2.4 U/ml (Roche).
Trypsin 0.25% (Gibco).

**2.4.4 Flow Cytometry
Cell Sorting**

Flow cytometry tubes, 5 mL polypropylene round-bottom (Falcon; cat. no. 352063).
BSA (Sigma; cat. no. A9418).
DPBS-2% BSA filtered through a 0.22 µm filter and stored as frozen aliquots at -20 °C.

2.4.5 Anesthesia

Ketamine (Centravet).
Xylazine (Centravet).
Isoflurane (Axience).

3 Methods

**3.1 Description
of the Assay Principle**

Functional assessment of keratinocyte capacity for epidermis reconstitution and in vivo grafting capacity comprised the experimental steps Fig. 1:

1. Primary skin substitute bioengineering.
2. Xenografting of primary skin substitutes onto recipient mice.

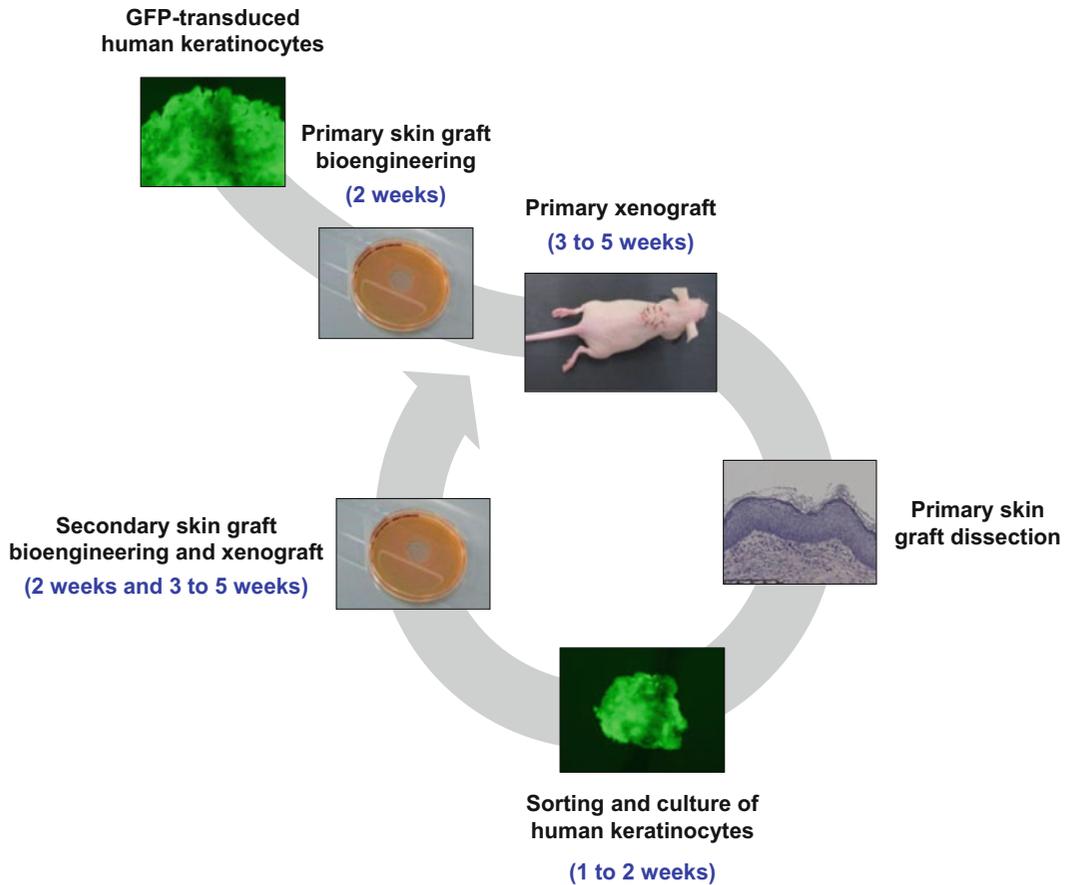


Fig. 1 Diagram of the principle of iterative skin substitute bioengineering and xenografting

3. Dissection of primary skin and isolation of human keratinocytes.
4. Secondary skin substitute bioengineering.
5. Xenografting of secondary skin substitutes onto recipient mice.
6. Dissection of secondary grafts and outcome analysis.

In the experiments presented here, iterative reconstructed skin xenografting was performed using holoclone keratinocytes, which correspond to the clonal progeny of individual keratinocyte stem cells grown in culture. These human keratinocyte precursor cells exhibit extensive long-term growth potential exceeding 100 cumulative population doublings, with genomic stability in culture [9]. In the present methodological setup, holoclone keratinocyte samples stably transduced to express the fluorescent protein GFP were used to facilitate cell visualization and tracking. Notably, the functional importance of holoclone cells for epidermal regeneration was strengthened by the demonstration of a correlation between the presence of these primitive cells in bioengineered

epithelial substitutes and favorable graft outcome for regeneration of large full-thickness skin burns [7]. Moreover, in a more recent clinical report, regeneration and genetic correction of the entire epidermis of a child suffering from junctional epidermolysis bullosa were attributed to long-lived epidermal stem cells, functionally defined as holoclones [8]. Accordingly, human holoclone keratinocytes provide a particularly relevant cellular model for the development of epidermis reconstitution and grafting procedures, as here described.

Reconstructed skin grafts were generated according to a bioengineered procedure that was comparable to the plasma-based model previously described in a preclinical study [1] and were then grafted in the dorsal region of nude mice. The skin substitute bioengineering protocol and the mouse xenografting procedure are schematized in Fig. 2a, b, respectively. In primary xenografts onto immunodeficient nude mice, this skin substitute model enables characterization of graft take and quality of epidermal differentiation. “Iterative skin xenografting” (extraction of human keratinocytes from the primary graft samples, followed by initiation of a second round of skin substitute bioengineering and xenografts) is a significant upgrade of this initial principle. The working hypothesis is that, although short-term potential precursor cells are sufficient to ensure primary xenografts, successful secondary epidermis regeneration and xenografts require the presence and preservation of stem cells, defined as immature cells with long-term regenerative potential. As a proof of principle, this potentiality was here documented in the human epidermal holoclone keratinocyte model (Fig. 3). More generally, iterative skin xenografting might shed new light on the functional hierarchy that characterizes the various stem and progenitor cell-enriched subpopulations of keratinocyte precursors present within the epidermis basal layer [9, 11, 12, 14, 15].

3.2 Primary Skin Substitute Bioengineering

1. Use 9.6 cm² Petri dish for each skin substitute sample.
2. For 1 sample, mix 0.833 ml plasma, 1.083 ml NaCl, 8.3 μl tranexamic acid (Exacyl), and 0.167 ml CaCl₂, for a total ~2 ml per sample (adjust volume according to sample number) (*see Note 2*).
3. Distribute 1.3 ml of the mix between the Petri dishes.
4. Place the Petri dishes at 37 °C in a culture incubator for at least 30 min to let the plasma acquire a semisolid consistency.
5. Prepare a fibroblast suspension at 10⁶ cells/ml in keratinocyte culture medium (*see Note 3*).
6. Add 57.8 μl fibroblast suspension to the remaining 0.7 ml plasma mix, for 57,720 fibroblasts per sample and fibroblast density 6000 cells/cm² (*see Note 4*).

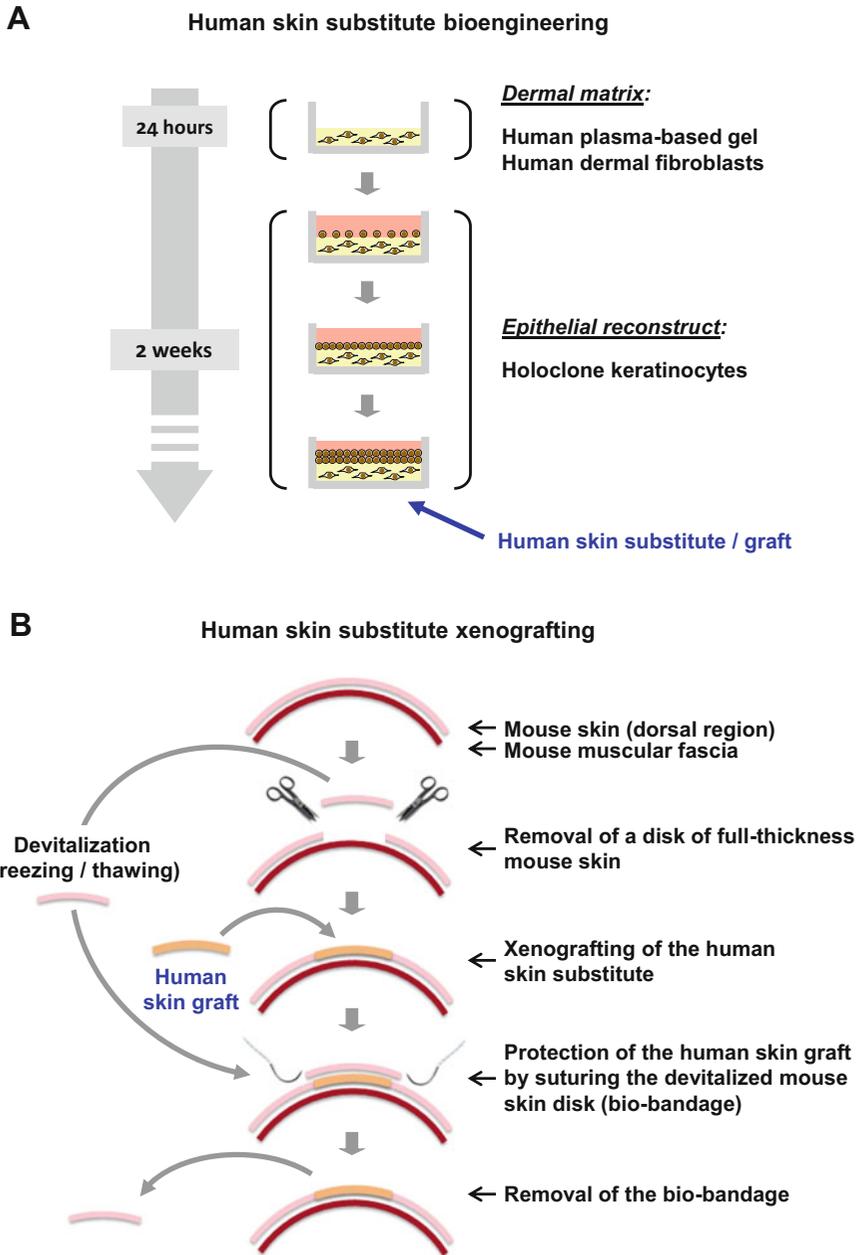


Fig. 2 In vitro human skin substitute bioengineering (a) and in vivo mouse xenografting (b)

7. Distribute 635 μ l plasma/fibroblast mix between the Petri dishes (onto the cell-free plasma layer obtained **step 4**).
8. Maintain for at least 30 min at 37 °C in a culture incubator for cellularized plasma layer gelification.
9. Cover dishes with 2 ml culture medium, and maintain in culture overnight.

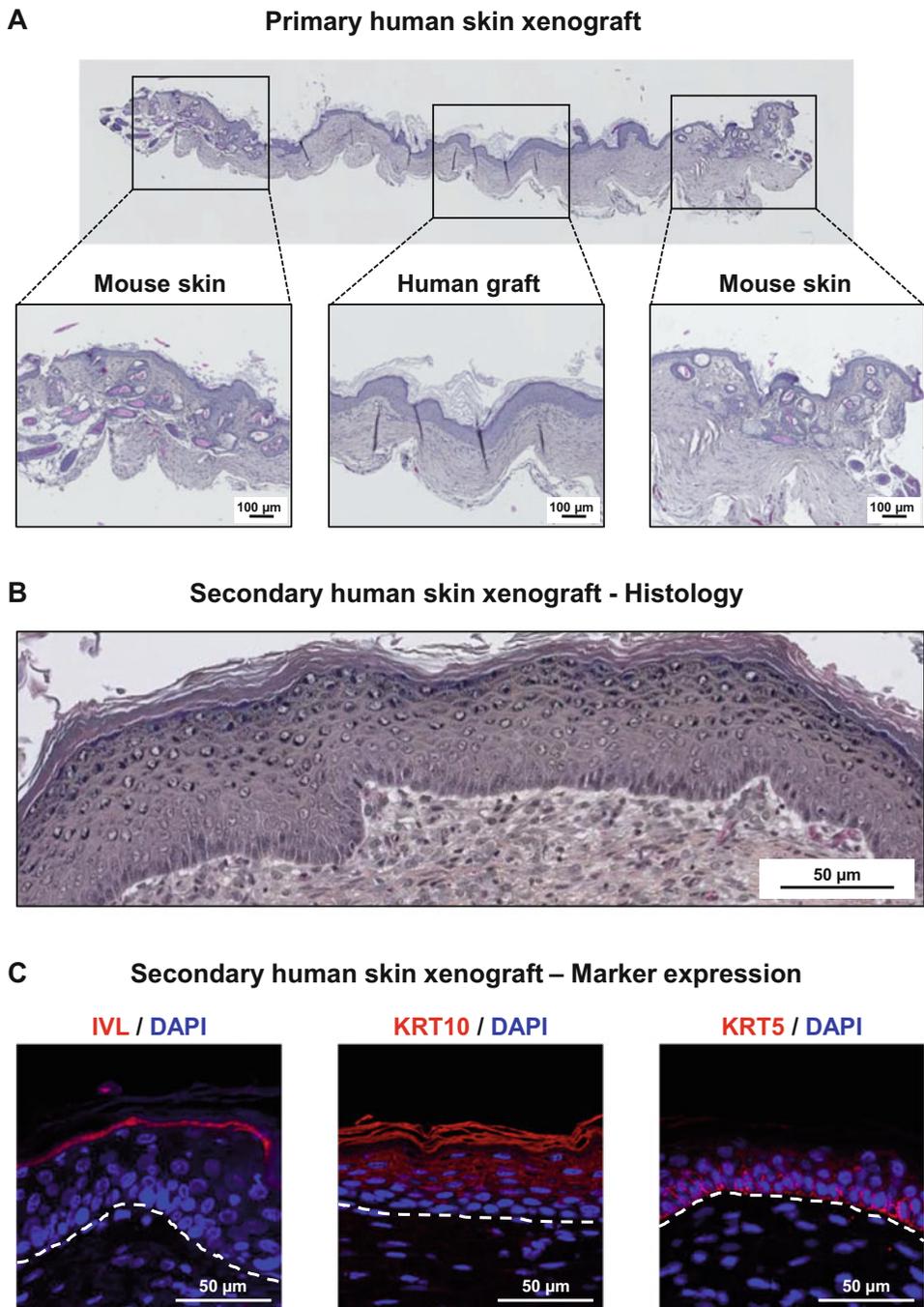


Fig. 3 (a) Tissue sections (hematoxylin-eosin-saffron [HES] staining) of primary human skin xenografts, showing typical histology of human grafted skin surrounded by the recipient mouse skin. (b) Typical section of a human skin sample obtained after secondary xenografting with HES staining, showing normal histological characteristics. (c) Secondary graft sections labeled with antibodies (ab) against IVL (involucrin) (rabbit polyclonal, ab53112, Abcam), KRT10 (keratin 10) (rabbit monoclonal ab, clone EP1607IHCY, Abcam), and KRT5 (keratin 5) (mouse monoclonal ab, clone 3E2F1, Abgent) and then with anti-mouse or anti-rabbit-Alexa594 secondary antibodies (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific), showing well-differentiated epidermis. Dotted line represents the epidermis/dermis boundary

10. The next day, prepare a cell suspension with the human keratinocyte samples to be studied for epidermis regeneration and xenografting capability (here, GFP-transduced holoclone keratinocytes).
11. Plate keratinocytes onto cellularized plasma gels, at 2400 cells/cm^2 (see **Notes 5** and **6**).
12. Culture for 2 weeks with at least three medium renewals per week (2 ml).
13. Two-week-old skin substitutes are ready for xenografting.

3.3 Xenografting of Primary Skin Substitutes onto Recipient Mice

The experimental procedures described below were approved by the ethics committee CEEA-51 of the Center for Exploration and Experimental Functional Research [CERFE] (Genopole[®], Evry, France).

1. General anesthesia uses intraperitoneal injection of ketamine (80 mg/kg) and xylazine (6 mg/kg), inducing full unconsciousness during 30–40 min (see **Notes 7–9**).
2. Cut and remove a full-thickness disk of the dorsal skin ($\sim 1 \text{ cm}^2$).
3. Devitalize the disk by serial freezing (liquid nitrogen) and thawing, and keep for use at **step 5** as bio-bandage (see **Note 10**).
4. Cover the wound bed with an equivalent area of human bioengineered skin substitute (see **Note 11**).
5. Then, suture the devitalized skin disk to the edge of the mouse skin, to cover and temporarily protect the xenograft site (bio-bandage).
6. Follow mouse awakening and replace them in cages (see **Note 12**).
7. Maintain the bio-bandage for 1 week.
8. Perform lighter gas anesthesia (isoflurane) to remove sutures and bio-bandage, exposing the human skin graft to the air (see **Note 13**).
9. Maintain xenografted mice for an additional 2–4 weeks to enable full development and differentiation of the human epidermis.
10. Euthanize mice for graft characterization and processing for secondary skin substitute bioengineering and xenografting (see **Notes 14** and **15**).

3.4 Dissection of Primary Grafts and Isolation of Human Keratinocytes

1. After euthanasia of primary xenografted mice, dissect human skin grafts and cut into $2 \times 2 \text{ mm}$ pieces.
2. Incubate samples in 2 ml of solution containing (v/v) 3/4 grade II dispase 2.4 U/ml (Roche) and 1/4 trypsin 0.25% (Gibco), for 2 h at 4°C and then for 30 min at room temperature.

3. Separate and harvest epidermal sheets using dissection tools (thin forceps).
4. Digest epidermal sheets in 1 ml trypsin 0.05% EDTA for 20 min at 37 °C.
5. Neutralize trypsin with serum.
6. Dissociate epidermis samples by gentle pipetting to obtain single-cell suspensions (*see Note 16*).
7. Wash and resuspend samples in DPBS-2% BSA, and transfer to flow cytometry tubes for sorting of human keratinocytes (*see Note 17*).

3.5 Secondary Skin Substitute Bioengineering

1. Prepare 25 cm² culture flasks for receiving sorted human keratinocytes by plating growth-arrested feeder fibroblasts at 6000 fibroblasts/cm². Fill culture flasks with 4 ml keratinocyte culture medium (*see Notes 18 and 19*).
2. Plate and amplify human keratinocytes sorted from primary grafts (*see Notes 20 and 21*).
3. Renew medium three times a week.
4. Trypsinize keratinocytes and perform a second round of skin substitute bioengineering, by repeating the experimental steps described in Subheading 3.2.

3.6 Xenografting of Secondary Epidermis Substitutes onto Recipient Mice

1. Use the secondary human bioengineered skin substitutes produced as described in Subheading 3.5, and perform a second round of xenografting by repeating the experimental steps described in Subheading 3.3.
2. Euthanize mice and process for secondary xenograft characterization (*see Notes 22 and 23*).

4 Notes

1. The immunodeficient status of nude mice requires experimentation and housing in appropriate aseptic conditions, and notably sterile air-filtered cages. These conditions were here ensured in the Center for Exploration and Experimental Functional Research [CERFE] (Genopole[®], Evry, France).
2. Add mix components successively, respecting the indicated order, and keep on ice to avoid plasma gelification.
3. Fibroblasts can either be thawed from a frozen banked vial or trypsinized from culture flasks.
4. Fibroblast density may be adjusted according to specific experimental requirements.

5. Keratinocyte density may be adjusted according to specific experimental requirements.
6. Homogeneous cell deposition is important for optimal epidermis reconstruction.
7. Respect of animal welfare requires that experiments are conducted at least 1 week after mouse arrival in the facility.
8. We recommend experimentation under a sterile hood, but the air flow can cause mouse eye surface drying, and hydration using isotonic buffer drops contributes to the respect of animal welfare.
9. We also strongly recommend maintaining anesthetized mice on a heated surface to avoid hypothermia (temperature control unit, Minerve).
10. At least five mouse skin disk freezing and thawing cycles ensure that cells are destroyed and will not contribute to regeneration when used as bio-bandage.
11. Using a sterile scalpel, cut the appropriate area from a bioengineered skin substitute cultured in a 9.6 cm² Petri dish, and manipulate carefully considering plasma gel fragility.
12. We recommend maintaining xenografted mice in individual cages to avoid the risk of graft site injury by inter-animal interaction.
13. Exposure of the human graft to the air provides physiological conditions and promotes correct epidermis regeneration.
14. Pieces of the graft samples can be used for histology and analysis of marker expression by immunostaining.
15. The ethically approved method of cervical dislocation can be used, or any alternative method.
16. We recommend filtering cell suspensions (50 µm sterile filters) to eliminate potential cell aggregates that could disturb flow cytometry sorting.
17. Here, human keratinocytes were purified by flow cytometry sorting according to GFP fluorescence. When non-tagged keratinocytes are studied, antibodies specifically detecting human and not mouse cells can be used for sorting.
18. Feeder-layer fibroblasts can be plated either on the same day as keratinocyte culture initiation, or the day before, which renders the feeder-layer more effective in supporting keratinocyte growth initiation.
19. The use of flasks coated with collagen I is optional but more effective than the plastic surface alone in supporting keratinocyte attachment.

20. Recommended cell plating densities range between 500 and 2000 keratinocyte/cm².
21. Keratinocytes can be amplified for 1 or 2 weeks, depending on growth kinetics and quality.
22. Graft characterization can include analysis of histological characteristics and expression of molecular markers revealing normal or pathological characteristics.
23. Tertiary xenografts may be performed to further test the long-term regenerative potential of the keratinocytes.

Acknowledgments

We wish to thank S. Bouet and A. Boukadiri (histology platform, UMR 1313 GABI, INRA/CEA, Jouy en Josas). We thank J.-J. Lataillade and M. Trouillas (IRBA, INSERM U1197, Clamart) for helpful discussions on skin substitute bioengineering. This work was supported by grants from CEA and INSERM (UMR967), the Délégation Générale de l'Armement (DGA), and the "Les Gueules Cassées" foundation.

References

1. Alexaline MM, Trouillas M, Nivet M, Bourreau E, Leclerc T, Duhamel P, Martin MT, Doucet C, Fortunel NO, Lataillade JJ (2015) Bioengineering a human plasma-based epidermal substitute with efficient grafting capacity and high content in clonogenic cells. *Stem Cells Transl Med* 4:643–654
2. Ronfard V, Rives JM, Neveux Y, Carsin H, Barrandon Y (2000) Long-term regeneration of human epidermis on third degree burns transplanted with autologous cultured epithelium grown on a fibrin matrix. *Transplantation* 70:1588–1598
3. Sivan V, Vozenin-Brotons MC, Tricaud Y, Lefaix JL, Cosset JM, Dubray B, Martin MT (2002) Altered proliferation and differentiation of human epidermis in cases of skin fibrosis after radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 53:385–393
4. Martin MT, Vulin A, Hendry JH (2016) Human epidermal stem cells: role in adverse skin reactions and carcinogenesis from radiation. *Mutat Res* 770:349–368
5. Fortunel NO, Vaigot P, Cadio E, Martin MT (2010) Functional investigations of keratinocyte stem cells and progenitors at a single-cell level using multiparallel clonal microcultures. *Methods Mol Biol* 585:13–23
6. McKenzie JL, Takenaka K, Gan OI, Doedens M, Dick JE (2007) Low rhodamine 123 retention identifies long-term human hematopoietic stem cells within the Lin-CD34+CD38- population. *Blood* 109:543–545
7. Pellegrini G, Ranno R, Stracuzzi G, Bondanza S, Guerra L, Zambruno G, Micali G, De Luca M (1999) The control of epidermal stem cells (holoclones) in the treatment of massive full-thickness burns with autologous keratinocytes cultured on fibrin. *Transplantation* 68:868–879
8. Hirsch T, Rothoef T, Teig N, Bauer JW, Pellegrini G, De Rosa L, Scaglione D, Reichelt J, Klausegger A, Kneisz D, Romano O, Secone Seconetti A, Contin R, Enzo E, Jurman I, Carulli S, Jacobsen F, Luecke T, Lehnhardt M, Fischer M, Kueckelhaus M, Quaglini D, Morgante M, Biccato S, Bondanza S, De Luca M (2017) Regeneration of the entire human epidermis using transgenic stem cells. *Nature* 551:327–332
9. Fortunel NO, Cadio E, Vaigot P, Chadli L, Moratille S, Bouet S, Roméo PH, Martin MT (2010) Exploration of the functional hierarchy of the basal layer of human epidermis at the single-cell level using parallel clonal

- microcultures of keratinocytes. *Exp Dermatol* 19:387–392
10. Fortunel NO, Chadli L, Bourreau E, Cadio E, Vaigot P, Marie M, Deshayes N, Rathman-Josserand M, Leclaire J, Martin MT (2011) Cellular adhesion on collagen: a simple method to select human basal keratinocytes which preserves their high growth capacity. *Eur J Dermatol* 21(Suppl 2):12–20
 11. Li A, Simmons PJ, Kaur P (1998) Identification and isolation of candidate human keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3902–3907
 12. Fortunel NO, Hatzfeld JA, Rosemary PA, Ferraris C, Monier MN, Haydont V, Longuet J, Brethon B, Lim B, Castiel I, Schmidt R, Hatzfeld A (2003) Long-term expansion of human functional epidermal precursor cells: promotion of extensive amplification by low TGF-beta1 concentrations. *J Cell Sci* 116:4043–4052
 13. Larderet G, Fortunel NO, Vaigot P, Cegalerba M, Maltère P, Zobiri O, Gidrol X, Waksman G, Martin MT (2006) Human side population keratinocytes exhibit long-term proliferative potential and a specific gene expression profile and can form a pluristratified epidermis. *Stem Cells* 24:965–974
 14. Rachidi W, Harfourche G, Lemaitre G, Amiot F, Vaigot P, Martin MT (2007) Sensing radiosensitivity of human epidermal stem cells. *Radiother Oncol* 83:267–276
 15. Harfourche G, Vaigot P, Rachidi W, Rigaud O, Moratille S, Marie M, Lemaitre G, Fortunel NO, Martin MT (2010) Fibroblast growth factor type 2 signaling is critical for DNA repair in human keratinocyte stem cells. *Stem Cells* 28:1639–1648

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Références bibliographiques -

- Références bibliographiques -

- Adams JC, Watt FM. 1990. Changes in keratinocyte adhesion during terminal differentiation: reduction in fibronectin binding precedes alpha 5 beta 1 integrin loss from the cell surface. *Cell* 63: 425-35
- Adams JM, Harris AW, Pinkert CA, Corcoran LM, Alexander WS, et al. 1985. The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature* 318: 533-8
- Aksoy I, Giudice V, Delahaye E, Wianny F, Aubry M, et al. 2014. Klf4 and Klf5 differentially inhibit mesoderm and endoderm differentiation in embryonic stem cells. *Nat Commun* 5: 3719
- Alam H, Sehgal L, Kundu ST, Dalal SN, Vaidya MM. 2011. Novel function of keratins 5 and 14 in proliferation and differentiation of stratified epithelial cells. *Mol Biol Cell* 22: 4068-78
- Alexaline MM, Trouillas M, Nivet M, Bourreau E, Leclerc T, et al. 2015. Bioengineering a human plasma-based epidermal substitute with efficient grafting capacity and high content in clonogenic cells. *Stem Cells Transl Med* 4: 643-54
- Alitalo K, Schwab M, Lin CC, Varmus HE, Bishop JM. 1983. Homogeneously staining chromosomal regions contain amplified copies of an abundantly expressed cellular oncogene (c-myc) in malignant neuroendocrine cells from a human colon carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80: 1707-11
- Allen TD, Potten CS. 1974. Fine-structural identification and organization of the epidermal proliferative unit. *J Cell Sci* 15: 291-319
- Allouba MH, ElGuindy AM, Krishnamoorthy N, Yacoub MH, Aguib YE. 2015. Nanog: A pluripotency homeobox (master) molecule. *Glob Cardiol Sci Pract* 2015: 36
- Amati B, Dalton S, Brooks MW, Littlewood TD, Evan GI, Land H. 1992. Transcriptional activation by the human c-Myc oncoprotein in yeast requires interaction with Max. *Nature* 359: 423-6
- Andorno R. 2002. Biomedicine and international human rights law: in search of a global consensus. *Bull World Health Organ* 80: 959-63
- Anisimov VN, Ukraintseva SV, Yashin AI. 2005. Cancer in rodents: does it tell us about cancer in humans? *Nat Rev Cancer* 5: 807-19
- Armelin HA, Armelin MC, Kelly K, Stewart T, Leder P, et al. 1984. Functional role for c-myc in mitogenic response to platelet-derived growth factor. *Nature* 310: 655-60
- Arnold I, Watt FM. 2001. c-Myc activation in transgenic mouse epidermis results in mobilization of stem cells and differentiation of their progeny. *Current biology : CB* 11: 558-68
- Atiyeh BS, Costagliola M. 2007. Cultured epithelial autograft (CEA) in burn treatment: three decades later. *Burns* 33: 405-13
- Auxenfans C, Menet V, Catherine Z, Shipkov H, Lacroix P, et al. 2015. Cultured autologous keratinocytes in the treatment of large and deep burns: a retrospective study over 15 years. *Burns* 41: 71-9
- Ayer D, Lawrence Q, Eisenman R. 1995a. Mad-max transcriptional repression is mediated by ternary complex formation with mammalian homologs of yeast repressor Sin3. *Cell* 80: 767-76
- Ayer DE, Eisenman RN. 1993a. A switch from Myc:Max to Mad:Max heterocomplexes accompanies monocyte/macrophage differentiation. *Genes Dev*
- Ayer DE, Eisenman RN. 1993b. A switch from Myc:Max to Mad:Max heterocomplexes accompanies monocyte/macrophage differentiation. *Genes & development* 7: 2110-9
- Ayer DE, Kretzner L, Eisenman RN. 1993. Mad: A Heterodimeric Partner for Max That Antagonizes Myc Transcriptional Activity. *Cell*
- Ayer DE, Laherty CD, Lawrence QA, Armstrong AP, Eisenman RN. 1996. Mad proteins contain a dominant transcription repression domain. *Mol Cell Biol* 16: 5772-81
- Ayer DE, Lawrence QA, Eisenman RN. 1995b. Mad-Max transcriptional repression is mediated by ternary complex formation with mammalian homologs of yeast repressor Sin3. *Cell* 80: 767-76
- Banks-Schlegel S, Green H. 1980. Formation of epidermis by serially cultivated human epidermal cells transplanted as an epithelium to athymic mice. *Transplantation* 29: 308-13

- Références bibliographiques -

- Banziger C, Soldini D, Schutt C, Zipperlen P, Hausmann G, Basler K. 2006. Wntless, a conserved membrane protein dedicated to the secretion of Wnt proteins from signaling cells. *Cell* 125: 509-22
- Baroni A, Buommino E, De Gregorio V, Ruocco E, Ruocco V, Wolf R. 2012. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clin Dermatol* 30: 257-62
- Barrandon Y, Green H. 1985. Cell size as a determinant of the clone-forming ability of human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 5390-4
- Barrandon Y, Green H. 1987a. Cell migration is essential for sustained growth of keratinocyte colonies: the roles of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor. *Cell* 50: 1131-7
- Barrandon Y, Green H. 1987b. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 2302-6
- Basit F, Andersson M, Hultquist A. 2018. The Myc/Max/Mxd Network Is a Target of Mutated Flt3 Signaling in Hematopoietic Stem Cells in Flt3-ITD-Induced Myeloproliferative Disease. *Stem Cells Int* 2018: 3286949
- Betschinger J, Knoblich JA. 2004. Dare to be different: asymmetric cell division in Drosophila, C. elegans and vertebrates. *Curr Biol* 14: R674-85
- Bickenbach JR. 1981. Identification and behavior of label-retaining cells in oral mucosa and skin. *J Dent Res* 60 Spec No C: 1611-20
- Bikle DD, Xie Z, Tu CL. 2012. Calcium regulation of keratinocyte differentiation. *Expert review of endocrinology & metabolism* 7: 461-72
- Bisson F, Rochefort E, Lavoie A, Larouche D, Zaniolo K, et al. 2013. Irradiated human dermal fibroblasts are as efficient as mouse fibroblasts as a feeder layer to improve human epidermal cell culture lifespan. *International journal of molecular sciences* 14: 4684-704
- Black AR, Black JD, Azizkhan-Clifford J. 2001. Sp1 and kruppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer. *Journal of cellular physiology* 188: 143-60
- Blackwell TK, Kretzner L, Blackwood EM, Eisenman RN, Weintraub H. 1990. Sequence-specific DNA binding by the c-Myc protein. *Science* 250: 1149-51
- Blackwood EM, Luscher B, Eisenman RN. 1992. Myc and Max associate in vivo. *Genes & development* 6: 71-80
- Blais M, Parenteau-Bareil R, Cadau S, Berthod F. 2013. Concise review: tissue-engineered skin and nerve regeneration in burn treatment. *Stem Cells Transl Med* 2: 545-51
- Blank U, Karlsson G, Karlsson S. 2008. Signaling pathways governing stem-cell fate. *Blood* 111: 492-503
- Blanpain C, Horsley V, Fuchs E. 2007. Epithelial Stem Cells : Turning over New Leaves. *Cell*
- Blanpain C, Lowry WE, Geoghegan A, Polak L, Fuchs E. 2004. Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. *Cell* 118: 635-48
- Boros K, Lacaud G, Kouskoff V. 2011. The transcription factor Mxd4 controls the proliferation of the first blood precursors at the onset of hematopoietic development in vitro. *Exp Hematol* 39: 1090-100
- Bouchard C, Dittrich O, Kiermaier A, Dohmann K, Menkel A, et al. 2001. Regulation of cyclin D2 gene expression by the Myc/Max/Mad network: Myc-dependent TRRAP recruitment and histone acetylation at the cyclin D2 promoter. *Genes Dev* 15: 2042-7
- Boveri T. 1892. Ueber die Entstehung des Gegensatzes zwischen den Geschlechtszellen und den somatischen Zellen bei Ascaris megaloccephala, nebst Bemerkungen zur Entwicklungsgeschichte der Nematoden. . *Sitzungsberichte der Gesellschaft für Morphologie und Physiologie in München*. 8:114–25.
- Boxer LD, Barajas B, Tao S, Zhang J, Khavari PA. 2014. ZNF750 interacts with KLF4 and RCOR1, KDM1A, and CTBP1/2 chromatin regulators to repress epidermal progenitor genes and induce differentiation genes. *Genes & development* 28: 2013-26
- Braun KM, Niemann C, Jensen UB, Sundberg JP, Silva-Vargas V, Watt FM. 2003. Manipulation of stem cell proliferation and lineage commitment: visualisation of label-retaining cells in whole mounts of mouse epidermis. *Development* 130: 5241-55

- Références bibliographiques -

- Breitkreutz D, Koxholt I, Thiemann K, Nischt R. 2013. Skin basement membrane: the foundation of epidermal integrity--BM functions and diverse roles of bridging molecules nidogen and perlecan. *Biomed Res Int* 2013: 179784
- Bretones G, Delgado MD, Leon J. 2015. Myc and cell cycle control. *Biochim Biophys Acta* 1849: 506-16
- Buschke S, Stark HJ, Cerezo A, Pratzel-Wunder S, Boehnke K, et al. 2011. A decisive function of transforming growth factor-beta/Smad signaling in tissue morphogenesis and differentiation of human HaCaT keratinocytes. *Mol Biol Cell* 22: 782-94
- Bush A, Mateyak M, Dugan K, Obaya A, Adachi S, et al. 1998. c-myc null cells misregulate cad and gadd45 but not other proposed c-Myc targets. *Genes & development* 12: 3797-802
- Byrne C, Tainsky M, Fuchs E. 1994. Programming gene expression in developing epidermis. *Development* 120: 2369-83
- Campbell KH, McWhir J, Ritchie WA, Wilmut I. 1996. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 380: 64-6
- Cao HL, Liu ZJ, Huang PL, Yue YL, Xi JN. 2019. lncRNA-RMRP promotes proliferation, migration and invasion of bladder cancer via miR-206. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 23: 1012-21
- Castro-Munozledo F, Hernandez-Quintero M, Marsch-Moreno M, Kuri-Harcuch W. 1997. Cultivation, serial transfer, and differentiation of epidermal keratinocytes in serum-free medium. *Biochemical and biophysical research communications* 236: 167-72
- Chakraborty C, Agoramorthy G. 2012. Stem cells in the light of evolution. *Indian J Med Res* 135: 813-9
- Chan KK, Zhang J, Chia NY, Chan YS, Sim HS, et al. 2009. KLF4 and PBX1 directly regulate NANOG expression in human embryonic stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 27: 2114-25
- Chen X, Johns DC, Geiman DE, Marban E, Dang DT, et al. 2001. Kruppel-like factor 4 (gut-enriched Kruppel-like factor) inhibits cell proliferation by blocking G1/S progression of the cell cycle. *The Journal of biological chemistry* 276: 30423-8
- Chen X, Whitney, Gao, Yang. 2009. Transcriptional Profiling of Krüppel-like Factor 4 Reveals a Function in Cell Cycle Regulation and Epithelial Differentiation. *J Mol Biol.* 2003 Feb 21; 326(3): 665–677.
- Chen YJ, Wu CY, Chang CC, Ma CJ, Li MC, Chen CM. 2008. Nuclear Kruppel-like factor 4 expression is associated with human skin squamous cell carcinoma progression and metastasis. *Cancer Biol Ther* 7: 777-82
- Cheng T, Rodrigues N, Shen H, Yang Y, Dombkowski D, et al. 2000. Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1. *Science* 287: 1804-8
- Cheshire P, Zhafira AS, Banakh I, Rahman MM, Carmichael I, et al. 2019. Xeno-free expansion of adult keratinocytes for clinical application: the use of human-derived feeder cells and serum. *Cell Tissue Res* 376: 389-400
- Chew YC, Adhikary G, Wilson GM, Reece EA, Eckert RL. 2011. Protein kinase C (PKC) delta suppresses keratinocyte proliferation by increasing p21(Cip1) level by a KLF4 transcription factor-dependent mechanism. *J Biol Chem* 286: 28772-82
- Chew YC, Adhikary G, Xu W, Wilson GM, Eckert RL. 2013. Protein kinase C delta increases Kruppel-like factor 4 protein, which drives involucrin gene transcription in differentiating keratinocytes. *J Biol Chem* 288: 17759-68
- Chin L, Schreiber-Agus N, Pellicer I, Chen K, Lee HW, et al. 1995. Contrasting roles for Myc and Mad proteins in cellular growth and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 8488-92
- Christophers E. 1971. [The columnar structure of the epidermis. Possible mechanism of differentiation]. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 114: 441-50
- Cirrodde A, Leclerc T, Jault P, Duhamel P, Lataillade JJ, Bargues L. 2011. Cultured epithelial autografts in massive burns: a single-center retrospective study with 63 patients. *Burns* 37: 964-72
- Clayton E, Doupe DP, Klein AM, Winton DJ, Simons BD, Jones PH. 2007. A single type of progenitor cell maintains normal epidermis. *Nature* 446: 185-9

- Références bibliographiques -

- Coffey RJ, Jr., Bascom CC, Sipes NJ, Graves-Deal R, Weissman BE, Moses HL. 1988. Selective inhibition of growth-related gene expression in murine keratinocytes by transforming growth factor beta. *Mol Cell Biol* 8: 3088-93
- Coolen NA, Verkerk M, Reijnen L, Vlig M, Van Den Bogaerdt AJ, et al. 2007. Culture of Keratinocytes for Transplantation without the Need of Feeder Layer Cells. *Cell Transplant* 16: 649-61
- Coomes SM, Moore BB. 2010. Pleiotropic effects of transforming growth factor-beta in hematopoietic stem-cell transplantation. *Transplantation* 90: 1139-44
- Cotsarelis G. 2006. Epithelial stem cells: a folliculocentric view. *J Invest Dermatol* 126: 1459-68
- Cotsarelis G, Sun TT, Lavker RM. 1990. Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell* 61: 1329-37
- Cultrato CM, Bino T, Segal S. 1997. Function of the c-Myc Antagonist Mad1 during a Molecular Switch from Proliferation to Differentiation. *Molecular and Cellular Biology*
- D.E. A, Kretzner L, Eisenman RN. 1993. Mad: a heterodimeric partner for Max that antagonizes Myc transcriptional activity. *Cell*
- Dalla-Favera R, Bregni M, Erikson J, Patterson D, Gallo RC, Croce CM. 1982a. Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79: 7824-7
- Dalla-Favera R, Wong-Staal F, Gallo RC. 1982b. Onc gene amplification in promyelocytic leukaemia cell line HL-60 and primary leukaemic cells of the same patient. *Nature* 299: 61-3
- Dang CV, O'Donnell KA, Zeller KI, Nguyen T, Osthus RC, Li F. 2006. The c-Myc target gene network. *Seminars in cancer biology* 16: 253-64
- Dang DT, Chen X, Feng J, Torbenson M, Dang LH, Yang VW. 2003. Overexpression of Kruppel-like factor 4 in the human colon cancer cell line RKO leads to reduced tumorigenicity. *Oncogene* 22: 3424-30
- DasGupta R, Fuchs E. 1999. Multiple roles for activated LEF/TCF transcription complexes during hair follicle development and differentiation. *Development* 126: 4557-68
- Davis AC, Wims M, Spotts GD, Hann SR, Bradley A. 1993. A null c-myc mutation causes lethality before 10.5 days of gestation in homozygotes and reduced fertility in heterozygous female mice. *Genes & development* 7: 671-82
- Dean M, Levine RA, Ran W, Kindy MS, Sonenshein GE, Campisi J. 1986. Regulation of c-myc transcription and mRNA abundance by serum growth factors and cell contact. *The Journal of biological chemistry* 261: 9161-6
- Descargues P, Sil AK, Sano Y, Korchynskiy O, Han G, et al. 2008. IKKalpha is a critical coregulator of a Smad4-independent TGFbeta-Smad2/3 signaling pathway that controls keratinocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 2487-92
- Dinella J, Koster MI, Koch PJ. 2014. Use of induced pluripotent stem cells in dermatological research. *J Invest Dermatol* 134: 1-5
- Djalilian AR, McGaughey D, Patel S, Seo EY, Yang C, et al. 2006. Connexin 26 regulates epidermal barrier and wound remodeling and promotes psoriasiform response. *J Clin Invest* 116: 1243-53
- Eilers M, Picard D, Yamamoto KR, Bishop JM. 1989. Chimaeras of myc oncoprotein and steroid receptors cause hormone-dependent transformation of cells. *Nature* 340: 66-8
- Eilers M, Schirm S, Bishop JM. 1991. The MYC protein activates transcription of the alpha-prothymosin gene. *The EMBO journal* 10: 133-41
- Evans MJ, Kaufman MH. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292: 154-6
- Evans PM, Chen X, Zhang W, Liu C. 2010. KLF4 interacts with beta-catenin/TCF4 and blocks p300/CBP recruitment by beta-catenin. *Mol Cell Biol* 30: 372-81
- Farrell AS, Sears RC. 2014. MYC degradation. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 4

- Références bibliographiques -

- Feng W, Li L, Xu X, Jiao Y, Du W. 2017. Up-regulation of the long non-coding RNA RMRP contributes to glioma progression and promotes glioma cell proliferation and invasion. *Arch Med Sci* 13: 1315-21
- Ferre-D'Amare AR, Prendergast GC, Ziff EB, Burley SK. 1993. Recognition by Max of its cognate DNA through a dimeric b/HLH/Z domain. *Nature* 363: 38-45
- Finch BW, Ephrussi B. 1967. RETENTION OF MULTIPLE DEVELOPMENTAL POTENTIALITIES BY CELLS OF A MOUSE TESTICULAR TERATOCARCINOMA DURING PROLONGED CULTURE in vitro AND THEIR EXTINCTION UPON HYBRIDIZATION WITH CELLS OF PERMANENT LINES. *Proc Natl Acad Sci U S A* 57: 615-21
- Fleming ES, Zajac M, Moschenross DM, Montrose DC, Rosenberg DW, et al. 2007. Planar spindle orientation and asymmetric cytokinesis in the mouse small intestine. *J Histochem Cytochem* 55: 1173-80
- Foitzik K, Paus R, Doetschman T, Dotto GP. 1999. The TGF-beta2 isoform is both a required and sufficient inducer of murine hair follicle morphogenesis. *Developmental biology* 212: 278-89
- Foley KP, McArthur GA, Queva C, Hurlin PJ, Soriano P, Eisenman RN. 1998. Targeted disruption of the MYC antagonist MAD1 inhibits cell cycle exit during granulocyte differentiation. *EMBO J* 17: 774-85
- Fortunel NO, Cadio E, Vaigot P, Chadli L, Moratille S, et al. 2010. Exploration of the functional hierarchy of the basal layer of human epidermis at the single-cell level using parallel clonal microcultures of keratinocytes. *Exp Dermatol* 19: 387-92
- Fortunel NO, Chadli L, Bourreau E, Cadio E, Vaigot P, et al. 2011. Cellular adhesion on collagen: a simple method to select human basal keratinocytes which preserves their high growth capacity. *Eur J Dermatol* 21 Suppl 2: 12-20
- Fortunel NO, Hatzfeld A, Hatzfeld JA. 2000. Transforming growth factor-beta: pleiotropic role in the regulation of hematopoiesis. *Blood* 96: 2022-36
- Fortunel NO, Hatzfeld JA, Rosemary PA, Ferraris C, Monier MN, et al. 2003a. Long-term expansion of human functional epidermal precursor cells: promotion of extensive amplification by low TGF-beta1 concentrations. *J Cell Sci* 116: 4043-52
- Fortunel NO, Otu HH, Ng HH, Chen J, Mu X, et al. 2003b. Comment on " 'Stemness': transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells" and "a stem cell molecular signature". *Science* 302: 393; author reply 93
- Foster KW, Frost AR, McKie-Bell P, Lin CY, Engler JA, et al. 2000. Increase of GSK3 messenger RNA and protein expression during progression of breast cancer. *Cancer Res* 60: 6488-95
- Foster KW, Liu Z, Nail CD, Li X, Fitzgerald TJ, et al. 2005. Induction of KLF4 in basal keratinocytes blocks the proliferation-differentiation switch and initiates squamous epithelial dysplasia. *Oncogene* 24: 1491-500
- Freytag SO. 1988. Enforced expression of the c-myc oncogene inhibits cell differentiation by precluding entry into a distinct predifferentiation state in G0/G1. *Molecular and cellular biology* 8: 1614-24
- Frye M, Gardner C, Li ER, Arnold I, Watt FM. 2003. Evidence that Myc activation depletes the epidermal stem cell compartment by modulating adhesive interactions with the local microenvironment. *Development* 130: 2793-808
- Fuchs E. 2012. The impact of cell culture on stem cell research. *Cell Stem Cell* 10: 640-41
- Fuchs E, Green H. 1980. Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. *Cell* 19: 1033-42
- Gallico GG, 3rd, O'Connor NE, Compton CC, Kehinde O, Green H. 1984a. Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. *The New England journal of medicine* 311: 448-51
- Gallico GG, Oconnor NE, Compton CC, Kehinde O, Green H. 1984b. Permanent Coverage of Large Burn Wounds with Autologous Cultured Human Epithelium. *New Engl J Med* 311: 448-51
- Gandarillas A, Watt FM. 1995. Changes in expression of members of the fos and jun families and myc network during terminal differentiation of human keratinocytes. *Oncogene* 11: 1403-7

- Références bibliographiques -

- Gandarillas A, Watt FM. 1997a. c-Myc promotes differentiation of human epidermal stem cells. *Genes Dev*
- Gandarillas A, Watt FM. 1997b. c-Myc promotes differentiation of human epidermal stem cells. *Genes & development* 11: 2869-82
- Garrett-Sinha LA, Eberspaecher H, Seldin MF, de Crombrughe B. 1996. A gene for a novel zinc-finger protein expressed in differentiated epithelial cells and transiently in certain mesenchymal cells. *The Journal of biological chemistry* 271: 31384-90
- Gat U, DasGupta R, Degenstein L, Fuchs E. 1998. De Novo hair follicle morphogenesis and hair tumors in mice expressing a truncated beta-catenin in skin. *Cell* 95: 605-14
- Gebhardt A, Frye M, Herold S, Benitah SA, Braun K, et al. 2006. Myc regulates keratinocyte adhesion and differentiation via complex formation with Miz1. *J Cell Biol* 172: 139-49
- Ghadially R. 2012. 25 years of epidermal stem cell research. *J Invest Dermatol* 132: 797-810
- Ghaleb AM, McConnell BB, Kaestner KH, Yang VW. 2011. Altered intestinal epithelial homeostasis in mice with intestine-specific deletion of the Kruppel-like factor 4 gene. *Developmental biology* 349: 310-20
- Ghazizadeh S, Taichman LB. 2001. Multiple classes of stem cells in cutaneous epithelium: a lineage analysis of adult mouse skin. *EMBO J* 20: 1215-22
- Ghazizadeh S, Taichman LB. 2005. Organization of stem cells and their progeny in human epidermis. *J Invest Dermatol* 124: 367-72
- Gomis RR, Alarcon C, He W, Wang Q, Seoane J, et al. 2006. A FoxO-Smad synexpression group in human keratinocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 12747-52
- Grandori C, Cowley SM, James LP, Eisenman RN. 2000. The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. *Annual review of cell and developmental biology* 16: 653-99
- Green H. 1978. Cyclic AMP in relation to proliferation of the epidermal cell: a new view. *Cell* 15: 801-11
- Green H, Kehinde O, Thomas J. 1979. Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 5665-8
- Greenwood JE. 2010. Function of the panniculus carnosus--a hypothesis. *Vet Rec* 167: 760
- Griep AE, Westphal H. 1988. Antisense Myc sequences induce differentiation of F9 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85: 6806-10
- Grinberg AV, Hu CD, Kerppola TK. 2004. Visualization of Myc/Max/Mad Family Dimers and the Competition for Dimerization in Living Cells. *Molecular and Cellular Biology* 24: 4294-308
- Guasch G, Schober M, Pasolli HA, Conn EB, Polak L, Fuchs E. 2007. Loss of TGFbeta signaling destabilizes homeostasis and promotes squamous cell carcinomas in stratified epithelia. *Cancer cell* 12: 313-27
- Guenou H, Nissan X, Larcher F, Feteira J, Lemaitre G, et al. 2009. Human embryonic stem-cell derivatives for full reconstruction of the pluristratified epidermis: a preclinical study. *Lancet* 374: 1745-53
- Haase I, Evans R, Pofahl R, Watt FM. 2003. Regulation of keratinocyte shape, migration and wound epithelialization by IGF-1- and EGF-dependent signalling pathways. *J Cell Sci* 116: 3227-38
- Haeckel E. 1868. *Natürliche Schöpfungsgeschichte*.
- Hall PE, Lathia JD, Miller NG, Caldwell MA, French-Constant C. 2006. Integrins are markers of human neural stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 24: 2078-84
- Hampton PJ, Jans R, Flockhart RJ, Parker G, Reynolds NJ. 2012. Lithium regulates keratinocyte proliferation via glycogen synthase kinase 3 and NFAT2 (nuclear factor of activated T cells 2). *Journal of cellular physiology* 227: 1529-37
- Han G, Lu SL, Li AG, He W, Corless CL, et al. 2005. Distinct mechanisms of TGF-beta1-mediated epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis during skin carcinogenesis. *The Journal of clinical investigation* 115: 1714-23

- Références bibliographiques -

- Harfouche G, Vaigot P, Rachidi W, Rigaud O, Moratille S, et al. 2010. Fibroblast growth factor type 2 signaling is critical for DNA repair in human keratinocyte stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 28: 1639-48
- Hartenstein V. 2006. Blood cells and blood cell development in the animal kingdom. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22: 677-712
- Hassig C, Fleischer T, Billin AN, Schreiber S, Ayer DE. 1997. Histone Deacetylase Activity Is Required for Full Transcriptional Repression by mSin3A. *Cell* 89: 341-47
- Haydont V, Neiveyans V, Zucchi H, Fortunel NO, Asselineau D. 2019. Genome-wide profiling of adult human papillary and reticular fibroblasts identifies ACAN, Col XI alpha1, and PSG1 as general biomarkers of dermis ageing, and KANK4 as an exemplary effector of papillary fibroblast ageing, related to contractility. *Mechanisms of ageing and development* 177: 157-81
- He M, Zheng B, Zhang Y, Zhang XH, Wang C, et al. 2015. KLF4 mediates the link between TGF-beta1-induced gene transcription and H3 acetylation in vascular smooth muscle cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 29: 4059-70
- He X, Semenov M, Tamai K, Zeng X. 2004. LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development* 131: 1663-77
- Herr P, Basler K. 2012. Porcupine-mediated lipidation is required for Wnt recognition by Wls. *Developmental biology* 361: 392-402
- Hirsch T, Rothoefl T, Teig N, Bauer JW, Pellegrini G, et al. 2017. Regeneration of the entire human epidermis using transgenic stem cells. *Nature* 551: 327
- Hoffmeyer K, Raggioli A, Rudloff S, Anton R, Hierholzer A, et al. 2012. Wnt/beta-catenin signaling regulates telomerase in stem cells and cancer cells. *Science* 336: 1549-54
- Horvitz HR, Herskowitz I. 1992. Mechanisms of asymmetric cell division: two Bs or not two Bs, that is the question. *Cell* 68: 237-55
- Hsieh JC, Kodjabachian L, Reibert ML, Rattner A, Smallwood PM, et al. 1999. A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities. *Nature* 398: 431-6
- Hu B, Wu Z, Liu T, Ullenbruch MR, Jin H, Phan SH. 2007. Gut-enriched Kruppel-like factor interaction with Smad3 inhibits myofibroblast differentiation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 36: 78-84
- Hu C, Chinenov Y, Kerppola T. 2002. Visualization of Interactions among bZIP and Rel Family Proteins in Living Cells Using Bimolecular Fluorescence Complementation. *Molecular Cell* 9: 189-798
- Hu W, Hofstetter WL, Li H, Zhou Y, He Y, et al. 2009. Putative tumor-suppressive function of Kruppel-like factor 4 in primary lung carcinoma. *Clin Cancer Res* 15: 5688-95
- Huang CC, Liu Z, Li X, Bailey SK, Nail CD, et al. 2005. KLF4 and PCNA identify stages of tumor initiation in a conditional model of cutaneous squamous epithelial neoplasia. *Cancer biology & therapy* 4: 1401-8
- Huangfu D, Osafune K, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, et al. 2008. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol* 26: 1269-75
- Huelsken J, Vogel R, Erdmann B, Cotsarelis G, Birchmeier W. 2001. beta-Catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin. *Cell* 105: 533-45
- HUGHES AFW, DANN. L. 1941. Vascular regeneration in experimental wounds and burns. *Br. J. Exp. Pathol* 22:9-14
- Hurlin PJ, Foley KP, Ayer DE, Eisenman RN, Hanahan D, Arbeit JM. 1995a. Regulation of Myc and Mad during epidermal differentiation and HPV-associated tumorigenesis. *Oncogene* 11: 2487-501
- Hurlin PJ, Queva C, Koskinen PJ, Steingrimsson E, Ayer DE, et al. 1995b. Mad3 and Mad4: novel Max-interacting transcriptional repressors that suppress c-myc dependent transformation and are expressed during neural and epidermal differentiation. *The EMBO journal* 14: 5646-59
- Hurlin PJ, Quéva C, Koskinen PJ, Steingrimsson E, Ayer DE, et al. 1995c. Mad3 and Mad4 : novel Max-interacting transcriptional repressors that suppress c-myc dependant transformation and are expressed during neural and epidermal differentiation. *EMBO J*
- Hussein SM, Batada NN, Vuoristo S, Ching RW, Autio R, et al. 2011. Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency. *Nature* 471: 58-62

- Références bibliographiques -

- Iaccarino I. 2017. IncRNAs and MYC: An Intricate Relationship. *International journal of molecular sciences* 18
- Iritani BM, Delrow J, Grandori C, Gomez I, Klacking M, et al. 2002. Modulation of T-lymphocyte development, growth and cell size by the Myc antagonist and transcriptional repressor Mad1. *EMBO J* 21: 4820-30
- Ito M, Liu Y, Yang Z, Nguyen J, Liang F, et al. 2005. Stem cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis. *Nat Med* 11: 1351-4
- Itoh M, Kiuru M, Cairo MS, Christiano AM. 2011. Generation of keratinocytes from normal and recessive dystrophic epidermolysis bullosa-induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 8797-802
- Ivanova NB, Dimos JT, Schaniel C, Hackney JA, Moore KA, Lemischka IR. 2002. A stem cell molecular signature. *Science* 298: 601-4
- Jaubert J, Cheng J, Segre JA. 2003. Ectopic expression of kruppel like factor 4 (Klf4) accelerates formation of the epidermal permeability barrier. *Development* 130: 2767-77
- Jensen UB, Lowell S, Watt FM. 1999. The spatial relationship between stem cells and their progeny in the basal layer of human epidermis: a new view based on whole-mount labelling and lineage analysis. *Development* 126: 2409-18
- Jones PH, Harper S, Watt FM. 1995. Stem cell patterning and fate in human epidermis. *Cell* 80: 83-93
- Jones PH, Watt FM. 1993. Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression. *Cell* 73: 713-24
- Jozefczuk J, Drews K, Adjaye J. 2012. Preparation of mouse embryonic fibroblast cells suitable for culturing human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Journal of visualized experiments : JoVE*
- Kamel RA, Ong JF, Eriksson E, Junker JP, Caterson EJ. 2013. Tissue engineering of skin. *J Am Coll Surg* 217: 533-55
- Kanzaki T, Olofsson A, Moren A, Wernstedt C, Hellman U, et al. 1990. TGF-beta 1 binding protein: a component of the large latent complex of TGF-beta 1 with multiple repeat sequences. *Cell* 61: 1051-61
- Kato GJ, Barrett J, Villa-Garcia M, Dang CV. 1990. An amino-terminal c-myc domain required for neoplastic transformation activates transcription. *Molecular and cellular biology* 10: 5914-20
- Kato GJ, Lee WM, Chen LL, Dang CV. 1992. Max: functional domains and interaction with c-Myc. *Genes & development* 6: 81-92
- Katz JP, Perreault N, Goldstein BG, Lee CS, Labosky PA, et al. 2002. The zinc-finger transcription factor Klf4 is required for terminal differentiation of goblet cells in the colon. *Development* 129: 2619-28
- Kaur P. 2006. Interfollicular epidermal stem cells: identification, challenges, potential. *J Invest Dermatol* 126: 1450-8
- Kelly K, Cochran BH, Stiles CD, Leder P. 1983. Cell-specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor. *Cell* 35: 603-10
- Kerosuo L, Piltti K, Fox H, Angers-Loustau A, Hayry V, et al. 2008. Myc increases self-renewal in neural progenitor cells through Miz-1. *Journal of cell science* 121: 3941-50
- Khavari PA. 2006. Modelling cancer in human skin tissue. *Nat Rev Cancer* 6: 270-80
- Kime L, Wright SC. 2003. *Mad4* is regulated by a transcriptional repressor complex that contains Miz-1 and c-Myc. *Biochem J*
- Kirstetter P, Anderson K, Porse BT, Jacobsen SE, Nerlov C. 2006. Activation of the canonical Wnt pathway leads to loss of hematopoietic stem cell repopulation and multilineage differentiation block. *Nat Immunol* 7: 1048-56
- Kleinsmith LJ, Pierce GB, Jr. 1964. Multipotentiality of Single Embryonal Carcinoma Cells. *Cancer Res* 24: 1544-51
- Knoepfler PS, Cheng PF, Eisenman RN. 2002. N-myc is essential during neurogenesis for the rapid expansion of progenitor cell populations and the inhibition of neuronal differentiation. *Genes & development* 16: 2699-712

- Références bibliographiques -

- Kogut I, Roop DR, Bilousova G. 2014. Differentiation of human induced pluripotent stem cells into a keratinocyte lineage. *Methods Mol Biol* 1195: 1-12
- Koizumi H, Kartasova T, Tanaka H, Ohkawara A, Kuroki T. 1996. Differentiation-associated localization of small proline-rich protein in normal and diseased human skin. *Br J Dermatol* 134: 686-92
- Kolarsick, Kolarsick, Goodwin. Anatomy and Physiology of the Skin. *Ouvrage Chapter 1*
- Kolarsick PAJ, Kolarsick MA, Goodwin C. 2011. Anatomy and Physiology of the Skin. *Journal of the Dermatology Nurses' Association* 3: 203-13
- Koster MI, Roop DR. 2004. The role of p63 in development and differentiation of the epidermis. *Journal of Dermatological Science* 34: 3-9
- Kretzner L, Blackwood EM, Eisenman RN. 1992. Transcriptional activities of the Myc and Max proteins in mammalian cells. *Current topics in microbiology and immunology* 182: 435-43
- Kuchinke U, Grawe F, Knust E. 1998. Control of spindle orientation in Drosophila by the Par-3-related PDZ-domain protein Bazooka. *Curr Biol* 8: 1357-65
- Laherty CD, Yang WM, Sun JM, Davie JR, Seto E, Eisenman RN. 1997. Histone deacetylases associated with the mSin3 corepressor mediate mad transcriptional repression. *Cell* 89: 349-56
- Lamb R, Ambler CA. 2013. Keratinocytes propagated in serum-free, feeder-free culture conditions fail to form stratified epidermis in a reconstituted skin model. *PloS one* 8: e52494
- Land H, Parada LF, Weinberg RA. 1983. Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* 304: 596-602
- Lange C, Mix E, Frahm J, Glass A, Muller J, et al. 2011. Small molecule GSK-3 inhibitors increase neurogenesis of human neural progenitor cells. *Neurosci Lett* 488: 36-40
- Lansdorp PM, Dragowska W. 1993. Maintenance of hematopoiesis in serum-free bone marrow cultures involves sequential recruitment of quiescent progenitors. *Exp Hematol* 21: 1321-7
- Lavker RM, Sun TT. 1982. Heterogeneity in epidermal basal keratinocytes: morphological and functional correlations. *Science* 215: 1239-41
- Lavker RM, Sun TT. 1983. Epidermal stem cells. *The Journal of investigative dermatology* 81: 121s-7s
- Lechler T, Fuchs E. 2005. Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin. *Nature* 437: 275-80
- Lenihan C, Rogers C, Metcalfe AD, Martin YH. 2014. The effect of isolation and culture methods on epithelial stem cell populations and their progeny-toward an improved cell expansion protocol for clinical application. *Cytotherapy* 16: 1750-9
- Li A, Simmons PJ, Kaur P. 1998. Identification and isolation of candidate human keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 3902-7
- Li C-x, Li H-g, Huang L-t, Kong Y-w, Chen F-y, et al. 2017. H19 lncRNA regulates keratinocyte differentiation by targeting miR-130b-3p. *Cell Death & Disease* 8: e3174
- Li D, Kular L, Vij M, Herter EK, Li X, et al. 2019a. Human skin long noncoding RNA WAKMAR1 regulates wound healing by enhancing keratinocyte migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116: 9443-52
- Li HX, Han M, Bernier M, Zheng B, Sun SG, et al. 2010. Kruppel-like factor 4 promotes differentiation by transforming growth factor-beta receptor-mediated Smad and p38 MAPK signaling in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 285: 17846-56
- Li J, Chen Y, Xu X, Jones J, Tiwari M, et al. 2019b. HNRNPK maintains epidermal progenitor function through transcription of proliferation genes and degrading differentiation promoting mRNAs. *Nature communications* 10: 4198
- Li J, Zheng H, Wang J, Yu F, Morris RJ, et al. 2012a. Expression of Kruppel-like factor KLF4 in mouse hair follicle stem cells contributes to cutaneous wound healing. *PLoS One* 7: e39663
- Li J, Zheng H, Yu F, Yu T, Liu C, et al. 2012b. Deficiency of the Kruppel-like factor KLF4 correlates with increased cell proliferation and enhanced skin tumorigenesis. *Carcinogenesis* 33: 1239-46
- Lim X, Tan SH, Koh WL, Chau RM, Yan KS, et al. 2013. Interfollicular epidermal stem cells self-renew via autocrine Wnt signaling. *Science* 342: 1226-30

- Références bibliographiques -

- Limat A, French LE, Blal L, Saurat JH, Hunziker T, Salomon D. 2003. Organotypic cultures of autologous hair follicle keratinocytes for the treatment of recurrent leg ulcers. *J Am Acad Dermatol* 48: 207-14
- Liu Y, Elf SE, Miyata Y, Sashida G, Liu Y, et al. 2009. p53 regulates hematopoietic stem cell quiescence. *Cell Stem Cell* 4: 37-48
- Lo Celso C, Prowse DM, Watt FM. 2004. Transient activation of beta-catenin signalling in adult mouse epidermis is sufficient to induce new hair follicles but continuous activation is required to maintain hair follicle tumours. *Development* 131: 1787-99
- Loewer S, Cabili MN, Guttman M, Loh YH, Thomas K, et al. 2010. Large intergenic non-coding RNA-RoR modulates reprogramming of human induced pluripotent stem cells. *Nat Genet* 42: 1113-7
- Lopez-Pajares V, Qu K, Zhang J, Webster DE, Barajas BC, et al. 2015. A lncRNA-MAF:MAFB transcription factor network regulates epidermal differentiation. *Dev Cell* 32: 693-706
- Luscher B, Larsson LG. 1999. The basic region/helix-loop-helix/leucine zipper domain of Myc proto-oncoproteins: function and regulation. *Oncogene* 18: 2955-66
- Lyman SD, James L, Vanden Bos T, de Vries P, Brasel K, et al. 1993. Molecular cloning of a ligand for the flt3/flk-2 tyrosine kinase receptor: a proliferative factor for primitive hematopoietic cells. *Cell* 75: 1157-67
- Lymboussaki A, Kaipainen A, Hatva E, Vastrik I, Jeskanen L, et al. 1996. Expression of Mad, an antagonist of Myc oncoprotein function, in differentiating keratinocytes during tumorigenesis of the skin. *Br J Cancer* 73: 1347-55
- Lyssiotis CA, Foreman RK, Staerk J, Garcia M, Mathur D, et al. 2009. Reprogramming of murine fibroblasts to induced pluripotent stem cells with chemical complementation of Klf4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 8912-7
- Mackenzie IC. 1970. Relationship between mitosis and the ordered structure of the stratum corneum in mouse epidermis. *Nature* 226: 653-5
- Mandai M, Watanabe A, Kurimoto Y, Hirami Y, Morinaga C, et al. 2017. Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *N Engl J Med* 376: 1038-46
- Marcotte R, Chen JM, Huard S, Wang E. 2005. c-Myc creates an activation loop by transcriptionally repressing its own functional inhibitor, hMad4, in young fibroblasts, a loop lost in replicatively senescent fibroblasts. *J Cell Biochem* 96: 1071-85
- Marcotte R, Qian JF, Chen J, Wang E. 2003. hMad4, c-Myc endogenous inhibitor, induces a replicative senescence-like state when overexpressed in human fibroblasts. *J Cell Biochem* 89: 576-88
- Martin GR. 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 7634-8
- Massague J, Chen YG. 2000. Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev* 14: 627-44
- Masson-Gadais B, Fugere C, Paquet C, Leclerc S, Lefort NR, et al. 2006. The feeder layer-mediated extended lifetime of cultured human skin keratinocytes is associated with altered levels of the transcription factors Sp1 and Sp3. *Journal of cellular physiology* 206: 831-42
- Matsumoto K, Hashimoto K, Hashiro M, Yoshimasa H, Yoshikawa K. 1990. Modulation of growth and differentiation in normal human keratinocytes by transforming growth factor-beta. *J Cell Physiol* 145: 95-101
- Maximow A. 1909. The Lymphocyte as a stem cell common to different blood elements in embryonic development and during the post-fetal life of mammals. *Folia Haematologica* 8. : 125-34.
- McMahon SB, Wood MA, Cole MD. 2000. The essential cofactor TRRAP recruits the histone acetyltransferase hGCN5 to c-Myc. *Mol Cell Biol* 20: 556-62
- Millet C, Yamashita M, Heller M, Yu LR, Veenstra TD, Zhang YE. 2009. A negative feedback control of transforming growth factor-beta signaling by glycogen synthase kinase 3-mediated Smad3 linker phosphorylation at Ser-204. *The Journal of biological chemistry* 284: 19808-16
- Moles JP, Watt FM. 1997. The epidermal stem cell compartment: variation in expression levels of E-cadherin and catenins within the basal layer of human epidermis. *J Histochem Cytochem* 45: 867-74

- Références bibliographiques -

- Montagnani S, Rueger MA, Hosoda T, Nurzynska D. 2016. Adult Stem Cells in Tissue Maintenance and Regeneration. *Stem cells international* 2016: 7362879
- Morris RJ, Potten CS. 1994. Slowly cycling (label-retaining) epidermal cells behave like clonogenic stem cells in vitro. *Cell Prolif* 27: 279-89
- Morris RJ, Potten CS. 1999. Highly persistent label-retaining cells in the hair follicles of mice and their fate following induction of anagen. *J Invest Dermatol* 112: 470-5
- Mou H, Vinarsky V, Tata PR, Brazauskas K, Choi SH, et al. 2016. Dual SMAD Signaling Inhibition Enables Long-Term Expansion of Diverse Epithelial Basal Cells. *Cell Stem Cell* 19: 217-31
- Munger JS, Huang X, Kawakatsu H, Griffiths MJ, Dalton SL, et al. 1999. The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell* 96: 319-28
- Murry CE, Keller G. 2008. Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. *Cell* 132: 661-80
- Nair SK, Burley SK. 2003. X-ray structures of Myc-Max and Mad-Max recognizing DNA. Molecular bases of regulation by proto-oncogenic transcription factors. *Cell* 112: 193-205
- Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, et al. 2008. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nature biotechnology* 26: 101-6
- Neel BG, Hayward WS, Robinson HL, Fang J, Astrin SM. 1981. Avian leukosis virus-induced tumors have common proviral integration sites and synthesize discrete new RNAs: oncogenesis by promoter insertion. *Cell* 23: 323-34
- Niemann C, Owens DM, Hulsken J, Birchmeier W, Watt FM. 2002. Expression of DeltaNlcf1 in mouse epidermis results in differentiation of hair follicles into squamous epidermal cysts and formation of skin tumours. *Development* 129: 95-109
- Niemann C, Watt FM. 2002. Designer skin: lineage commitment in postnatal epidermis. *Trends Cell Biol* 12: 185-92
- Norman B, Davis J, Piatigorsky J. 2004. Postnatal gene expression in the normal mouse cornea by SAGE. *Investigative ophthalmology & visual science* 45: 429-40
- O'Connor NE. 1981. Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells. *Lancet* 1: 75-8
- Ohyama M. 2007. Hair follicle bulge: a fascinating reservoir of epithelial stem cells. *J Dermatol Sci* 46: 81-9
- Oshima H, Rochat A, Kedzia C, Kobayashi K, Barrandon Y. 2001. Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells. *Cell* 104: 233-45
- Oshimori N, Fuchs E. 2012. Paracrine TGF-beta signaling counterbalances BMP-mediated repression in hair follicle stem cell activation. *Cell stem cell* 10: 63-75
- Owens P, Han G, Li AG, Wang XJ. 2008. The role of Smads in skin development. *J Invest Dermatol* 128: 783-90
- Papini S, Cecchetti D, Campani D, Fitzgerald W, Grivel JC, et al. 2003. Isolation and clonal analysis of human epidermal keratinocyte stem cells in long-term culture. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 21: 481-94
- Paramio JM, Casanova ML, Segrelles C, Mittnacht S, Lane EB, Jorcano JL. 1999. Modulation of cell proliferation by cytokeratins K10 and K16. *Mol Cell Biol* 19: 3086-94
- Paramio JM, Segrelles C, Ruiz S, Jorcano JL. 2001. Inhibition of protein kinase B (PKB) and PKCzeta mediates keratin K10-induced cell cycle arrest. *Mol Cell Biol* 21: 7449-59
- Park IH, Arora N, Huo H, Maherali N, Ahfeldt T, et al. 2008. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 134: 877-86
- Pasi CE, Dereli-Oz A, Negrini S, Friedli M, Fragola G, et al. 2011. Genomic instability in induced stem cells. *Cell Death Differ* 18: 745-53
- Patel S, Xi ZF, Seo EY, McGaughey D, Segre JA. 2006. Klf4 and corticosteroids activate an overlapping set of transcriptional targets to accelerate in utero epidermal barrier acquisition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 18668-73

- Références bibliographiques -

- Pearson S, Sroczynska P, Lacaud G, Kouskoff V. 2008. The stepwise specification of embryonic stem cells to hematopoietic fate is driven by sequential exposure to Bmp4, activin A, bFGF and VEGF. *Development* 135: 1525-35
- Peehl, Ham. 1980. Growth and differentiation of human keratinocytes without a feeder layer or conditioned medium.
- Pellegrini G, Dellambra E, Golisano O, Martinelli E, Fantozzi I, et al. 2001. p63 identifies keratinocyte stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 3156-61
- Peters G. 1990. Oncogenes at viral integration sites. *Cell Growth Differ* 1: 503-10
- Petronczki M, Knoblich JA. 2001. DmPAR-6 directs epithelial polarity and asymmetric cell division of neuroblasts in *Drosophila*. *Nat Cell Biol* 3: 43-9
- Peus D, Hamacher L, Pittelkow MR. 1997. EGF-receptor tyrosine kinase inhibition induces keratinocyte growth arrest and terminal differentiation. *J Invest Dermatol* 109: 751-6
- Philippeos C, Telerman SB, Oules B, Pisco AO, Shaw TJ, et al. 2018. Spatial and Single-Cell Transcriptional Profiling Identifies Functionally Distinct Human Dermal Fibroblast Subpopulations. *The Journal of investigative dermatology* 138: 811-25
- Pietenpol JA, Munger K, Howley PM, Stein RW, Moses HL. 1991. Factor-binding element in the human c-myc promoter involved in transcriptional regulation by transforming growth factor beta 1 and by the retinoblastoma gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 10227-31
- Polioudakis D, Bhinge AA, Killion PJ, Lee BK, Abell NS, Iyer VR. 2013. A Myc-microRNA network promotes exit from quiescence by suppressing the interferon response and cell-cycle arrest genes. *Nucleic Acids Res* 41: 2239-54
- Polo JM, Anderssen E, Walsh RM, Schwarz BA, Nefzger CM, et al. 2012. A molecular roadmap of reprogramming somatic cells into iPS cells. *Cell* 151: 1617-32
- Potten CS. 1974. The epidermal proliferative unit: the possible role of the central basal cell. *Cell Tissue Kinet* 7: 77-88
- Potten CS, Loeffler M. 1990. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 110: 1001-20
- Poulson ND, Lechler T. 2010. Robust control of mitotic spindle orientation in the developing epidermis. *J Cell Biol* 191: 915-22
- Pulverer B, Sommer A, McArthur GA, Eisenman RN, Luscher B. 2000. Analysis of Myc/Max/Mad network members in adipogenesis: inhibition of the proliferative burst and differentiation by ectopically expressed Mad1. *J Cell Physiol* 183: 399-410
- Qian H, Tryggvason K, Jacobsen SE, Ekblom M. 2006. Contribution of alpha6 integrins to hematopoietic stem and progenitor cell homing to bone marrow and collaboration with alpha4 integrins. *Blood* 107: 3503-10
- Queva C, Hurlin PJ, Foley KP, Eisenman RN. 1998. Sequential expression of the MAD family of transcriptional repressors during differentiation and development. *Oncogene* 16: 967-77
- Queva C, McArthur GA, Iritani BM, Eisenman RN. 2001. Targeted deletion of the S-phase-specific Myc antagonist Mad3 sensitizes neuronal and lymphoid cells to radiation-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 21: 703-12
- Queva C, McArthur GA, Ramos LS, Eisenman RN. 1999. Dwarfism and dysregulated proliferation in mice overexpressing the MYC antagonist MAD1. *Cell Growth Differ* 10: 785-96
- Rachidi W, Harfourche G, Lemaitre G, Amiot F, Vaigot P, Martin MT. 2007. Sensing radiosensitivity of human epidermal stem cells. *Radiother Oncol* 83: 267-76
- Ramalho-Santos M, Yoon S, Matsuzaki Y, Mulligan RC, Melton DA. 2002. "Stemness": transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells. *Science* 298: 597-600
- Reisdorf P, Lawrence DA, Sivan V, Klising E, Martin MT. 2001. Alteration of transforming growth factor-beta1 response involves down-regulation of Smad3 signaling in myofibroblasts from skin fibrosis. *Am J Pathol* 159: 263-72
- Rheinwald JG, Green H. 1975a. Formation of a keratinizing epithelium in culture by a cloned cell line derived from a teratoma. *Cell* 6: 317-30

- Références bibliographiques -

- Rheinwald JG, Green H. 1975b. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 6: 331-43
- Rheinwald JG, Green H. 1977. Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocytes. *Nature* 265: 421-4
- Rhyu MS, Jan LY, Jan YN. 1994. Asymmetric distribution of numb protein during division of the sensory organ precursor cell confers distinct fates to daughter cells. *Cell* 76: 477-91
- Rippon HJ, Bishop AE. 2004. Embryonic stem cells. *Cell Prolif* 37: 23-34
- Rochat A, Kobayashi K, Barrandon Y. 1994. Location of stem cells of human hair follicles by clonal analysis. *Cell* 76: 1063-73
- Romano RA, Smalley K, Magraw C, Serna VA, Kurita T, et al. 2012. DeltaNp63 knockout mice reveal its indispensable role as a master regulator of epithelial development and differentiation. *Development* 139: 772-82
- Ronfard V, Rives JM, Neveux Y, Carsin H, Barrandon Y. 2000. Long-term regeneration of human epidermis on third degree burns transplanted with autologous cultured epithelium grown on a fibrin matrix. *Transplantation* 70: 1588-98
- Rosnet O, Marchetto S, deLapeyriere O, Birnbaum D. 1991. Murine Flt3, a gene encoding a novel tyrosine kinase receptor of the PDGFR/CSF1R family. *Oncogene* 6: 1641-50
- Ruetze M, Gallinat S, Wenck H, Deppert W, Knott A. 2010. In situ localization of epidermal stem cells using a novel multi epitope ligand cartography approach. *Integr Biol (Camb)* 2: 241-9
- Saneyoshi T, Kume S, Amasaki Y, Mikoshiba K. 2002. The Wnt/calcium pathway activates NF-AT and promotes ventral cell fate in *Xenopus* embryos. *Nature* 417: 295-9
- Satterwhite DJ, White RL, Aarke ME, Moses HL. 2001. TGF-B1 Regulates the Expression of Multiple Max-Interacting Transcriptions Factors in Balb/MK Cells : Implications for Understanding the Mechanism of Action of TGF-B1. *Pediatric Research*
- Schluter H, Paquet-Fifield S, Gangatirkar P, Li J, Kaur P. 2011. Functional characterization of quiescent keratinocyte stem cells and their progeny reveals a hierarchical organization in human skin epidermis. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 29: 1256-68
- Schneider MR, Schmidt-Ullrich R, Paus R. 2009. The hair follicle as a dynamic miniorgan. *Curr Biol* 19: R132-42
- Schober M, Schaefer M, Knoblich JA. 1999. Bazooka recruits Inscuteable to orient asymmetric cell divisions in *Drosophila* neuroblasts. *Nature* 402: 548-51
- Schofield R. 1978. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 4: 7-25
- Schreiber-Agus N, Meng Y, Hoang T, Hou H, Jr., Chen K, et al. 1998. Role of Mxi1 in ageing organ systems and the regulation of normal and neoplastic growth. *Nature* 393: 483-7
- Schubert W, Bonnekoh B, Pommer AJ, Philipsen L, Bockelmann R, et al. 2006. Analyzing proteome topology and function by automated multidimensional fluorescence microscopy. *Nat Biotechnol* 24: 1270-8
- Segre JA, Bauer C, Fuchs E. 1999. Klf4 is a transcription factor required for establishing the barrier function of the skin. *Nature genetics* 22: 356-60
- Seifert JR, Mlodzik M. 2007. Frizzled/PCP signalling: a conserved mechanism regulating cell polarity and directed motility. *Nat Rev Genet* 8: 126-38
- Sellak H, Wu S, Lincoln TM. 2012. KLF4 and SOX9 transcription factors antagonize beta-catenin and inhibit TCF-activity in cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 1823: 1666-75
- Sen GL, Boxer LD, Webster DE, Bussat RT, Qu K, et al. 2012. ZNF750 is a p63 target gene that induces KLF4 to drive terminal epidermal differentiation. *Developmental cell* 22: 669-77
- Seoane J, Le HV, Shen L, Anderson SA, Massague J. 2004. Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation. *Cell* 117: 211-23
- Shang S, Hua F, Hu ZW. 2017. The regulation of beta-catenin activity and function in cancer: therapeutic opportunities. *Oncotarget* 8: 33972-89
- Shats I, Gatz ML, Chang JT, Mori S, Wang J, et al. 2011. Using a stem cell-based signature to guide therapeutic selection in cancer. *Cancer Res* 71: 1772-80

- Références bibliographiques -

- Shen-Li H, O'Hagan RC, Hou H, Jr., Horner JW, 2nd, Lee HW, DePinho RA. 2000. Essential role for Max in early embryonic growth and development. *Genes & development* 14: 17-22
- Shen Q, Yu W, Fang Y, Yao M, Yang P. 2017. Beta-catenin can induce hair follicle stem cell differentiation into transit-amplifying cells through c-myc activation. *Tissue & cell* 49: 28-34
- Shie JL, Chen ZY, Fu M, Pestell RG, Tseng CC. 2000. Gut-enriched Kruppel-like factor represses cyclin D1 promoter activity through Sp1 motif. *Nucleic acids research* 28: 2969-76
- Shields JM, Christy RJ, Yang VW. 1996. Identification and characterization of a gene encoding a gut-enriched Kruppel-like factor expressed during growth arrest. *The Journal of biological chemistry* 271: 20009-17
- Shields JM, Yang VW. 1998. Identification of the DNA sequence that interacts with the gut-enriched Kruppel-like factor. *Nucleic acids research* 26: 796-802
- Shipley GD, Pittelkow MR, Wille JJ, Jr., Scott RE, Moses HL. 1986. Reversible inhibition of normal human prokeratinocyte proliferation by type beta transforming growth factor-growth inhibitor in serum-free medium. *Cancer Res* 46: 2068-71
- Siegel PM, Shu W, Massague J. 2003. Mad upregulation and Id2 repression accompany transforming growth factor (TGF)-beta-mediated epithelial cell growth suppression. *J Biol Chem* 278: 35444-50
- Slusarski DC, Pelegri F. 2007. Calcium signaling in vertebrate embryonic patterning and morphogenesis. *Dev Biol* 307: 1-13
- Sorrell JM, Caplan AI. 2004. Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. *J Cell Sci* 117: 667-75
- Stark HJ, Boehnke K, Mirancea N, Willhauck MJ, Pavesio A, et al. 2006. Epidermal homeostasis in long-term scaffold-enforced skin equivalents. *J Investig Dermatol Symp Proc* 11: 93-105
- Strieder V, Lutz W. 2002. Regulation of N-myc expression in development and disease. *Cancer letters* 180: 107-19
- Strudwick XL, Lang DL, Smith LE, Cowin AJ. 2015. Combination of low calcium with Y-27632 rock inhibitor increases the proliferative capacity, expansion potential and lifespan of primary human keratinocytes while retaining their capacity to differentiate into stratified epidermis in a 3D skin model. *PLoS One* 10: e0123651
- Suzuki D, Pinto F, Senoo M. 2017. Inhibition of TGF-beta signaling supports high proliferative potential of diverse p63(+) mouse epithelial progenitor cells in vitro. *Sci Rep* 7: 6089
- Swamynathan S, Kenchegowda D, Piatigorsky J, Swamynathan S. 2011. Regulation of corneal epithelial barrier function by Kruppel-like transcription factor 4. *Investigative ophthalmology & visual science* 52: 1762-9
- Swamynathan SK, Davis J, Piatigorsky J. 2008. Identification of candidate Klf4 target genes reveals the molecular basis of the diverse regulatory roles of Klf4 in the mouse cornea. *Investigative ophthalmology & visual science* 49: 3360-70
- Swamynathan SK, Katz JP, Kaestner KH, Ashery-Padan R, Crawford MA, Piatigorsky J. 2007. Conditional deletion of the mouse Klf4 gene results in corneal epithelial fragility, stromal edema, and loss of conjunctival goblet cells. *Molecular and cellular biology* 27: 182-94
- Tai SK, Yang MH, Chang SY, Chang YC, Li WY, et al. 2011. Persistent Kruppel-like factor 4 expression predicts progression and poor prognosis of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 102: 895-902
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, et al. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131: 861-72
- Takahashi K, Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663-76
- Taylor G, Lehrer MS, Jensen PJ, Sun TT, Lavker RM. 2000. Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell* 102: 451-61
- Thomas KR, Capecchi MR. 1987. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51: 503-12
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, et al. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282: 1145-7

- Références bibliographiques -

- Tien YT, Chang MH, Chu PY, Lin CS, Liu CH, Liao AT. 2015. Downregulation of the KLF4 transcription factor inhibits the proliferation and migration of canine mammary tumor cells. *Vet J* 205: 244-53
- Till JE, Mc Culloch E. 1961. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 14: 213-22
- Todaro, Green. 1963. QUANTITATIVE STUDIES OF THE GROWTH OF MOUSE EMBRYO CELLS IN CULTURE AND THEIR DEVELOPMENT INTO ESTABLISHED LINES
- Tolar J, Xia L, Lees CJ, Riddle M, McElroy A, et al. 2013. Keratinocytes from induced pluripotent stem cells in junctional epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol* 133: 562-5
- Ton-That H, Kaestner KH, Shields JM, Mahatanankoon CS, Yang VW. 1997. Expression of the gut-enriched Kruppel-like factor gene during development and intestinal tumorigenesis. *FEBS Lett* 419: 239-43
- Trowbridge IS, Omary MB. 1981. Human cell surface glycoprotein related to cell proliferation is the receptor for transferrin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 3039-43
- Tumbar T, Guasch G, Greco V, Blanpain C, Lowry WE, et al. 2004. Defining the epithelial stem cell niche in skin. *Science* 303: 359-63
- van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, de Lau W, Oving I, et al. 2002. The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* 111: 241-50
- Vandomme J, Touil Y, Ostyn P, Olejnik C, Flamenco P, et al. 2014. Insulin-like growth factor 1 receptor and p38 mitogen-activated protein kinase signals inversely regulate signal transducer and activator of transcription 3 activity to control human dental pulp stem cell quiescence, propagation, and differentiation. *Stem Cells Dev* 23: 839-51
- Vaughan FL, Kass LL, Uzman JA. 1981. Requirement of hydrocortisone and insulin for extended proliferation and passage of rat keratinocytes. *In vitro* 17: 941-6
- Viglietto G, Motti ML, Bruni P, Melillo RM, D'Alessio A, et al. 2002. Cytoplasmic relocation and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer. *Nature medicine* 8: 1136-44
- Waikel RL, Kawachi Y, Waikel PA, Wang XJ, Roop DR. 2001. Deregulated expression of c-Myc depletes epidermal stem cells. *Nature genetics* 28: 165-8
- Waikel RL, Wang XJ, Roop DR. 1999. Targeted expression of c-Myc in the epidermis alters normal proliferation, differentiation and UV-B induced apoptosis. *Oncogene* 18: 4870-8
- Wallingford JB, Fraser SE, Harland RM. 2002. Convergent extension: the molecular control of polarized cell movement during embryonic development. *Dev Cell* 2: 695-706
- Wan H, Stone MG, Simpson C, Reynolds LE, Marshall JF, et al. 2003. Desmosomal proteins, including desmoglein 3, serve as novel negative markers for epidermal stem cell-containing population of keratinocytes. *J Cell Sci* 116: 4239-48
- Wan H, Yuan M, Simpson C, Allen K, Gavins FN, et al. 2007. Stem/progenitor cell-like properties of desmoglein 3dim cells in primary and immortalized keratinocyte lines. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 25: 1286-97
- Webb A, Li A, Kaur P. 2004. Location and phenotype of human adult keratinocyte stem cells of the skin. *Differentiation* 72: 387-95
- Wei D, Gong W, Kanai M, Schlunk C, Wang L, et al. 2005. Drastic down-regulation of Kruppel-like factor 4 expression is critical in human gastric cancer development and progression. *Cancer Res* 65: 2746-54
- Weiss A, Attisano L. 2013. The TGFbeta superfamily signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 2: 47-63

- Références bibliographiques -

- Werner S, Beer H-D, Mauch C, Luscher B, Werner S. 2001. The Mad1 transcription factor is a novel target of activin and TGF-B action in keratinocytes : possible role of Mad1 in wound repair and psoriasis. *Oncogene*
- Whitton JT, Everall JD. 1973. The thickness of the epidermis. *Br J Dermatol* 89: 467-76
- Wickett RR, Visscher MO. 2006. Structure and function of the epidermal barrier.
- Wilson A, Murphy MJ, Oskarsson T, Kaloulis K, Bettess MD, et al. 2004. c-Myc controls the balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Genes & development* 18: 2747-63
- Wodarz A, Ramrath A, Kuchinke U, Knust E. 1999. Bazooka provides an apical cue for Inscuteable localization in Drosophila neuroblasts. *Nature* 402: 544-7
- Worringer KA, Rand TA, Hayashi Y, Sami S, Takahashi K, et al. 2014. The let-7/LIN-41 pathway regulates reprogramming to human induced pluripotent stem cells by controlling expression of prodifferentiation genes. *Cell Stem Cell* 14: 40-52
- Xiong X, Schober M, Tassone E, Khodadadi-Jamayran A, Sastre-Perona A, et al. 2018. KLF4, A Gene Regulating Prostate Stem Cell Homeostasis, Is a Barrier to Malignant Progression and Predictor of Good Prognosis in Prostate Cancer. *Cell Rep* 25: 3006-20 e7
- Yagi K, Furuhashi M, Aoki H, Goto D, Kuwano H, et al. 2002. c-myc is a downstream target of the Smad pathway. *J Biol Chem* 277: 854-61
- Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, et al. 1998. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell* 2: 305-16
- Yang F, Liu YH, Dong SY, Ma RM, Bhandari A, et al. 2016. A novel long non-coding RNA FGF14-AS2 is correlated with progression and prognosis in breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 470: 479-83
- Yet SF, McA'Nulty MM, Folta SC, Yen HW, Yoshizumi M, et al. 1998. Human EZF, a Kruppel-like zinc finger protein, is expressed in vascular endothelial cells and contains transcriptional activation and repression domains. *The Journal of biological chemistry* 273: 1026-31
- Yoon HS, Chen X, Yang VW. 2003. Kruppel-like factor 4 mediates p53-dependent G1/S cell cycle arrest in response to DNA damage. *The Journal of biological chemistry* 278: 2101-5
- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, et al. 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318: 1917-20
- Zenz R, Eferl R, Kenner L, Florin L, Hummerich L, et al. 2005. Psoriasis-like skin disease and arthritis caused by inducible epidermal deletion of Jun proteins. *Nature* 437: 369-75
- Zhang C, Lee HJ, Shrivastava A, Wang R, McQuiston TJ, et al. 2018. Long-Term In Vitro Expansion of Epithelial Stem Cells Enabled by Pharmacological Inhibition of PAK1-ROCK-Myosin II and TGF-beta Signaling. *Cell reports* 25: 598-610 e5
- Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, et al. 2003. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 425: 836-41
- Zhang N, Zhang J, Shuai L, Zha L, He M, et al. 2012. Kruppel-like factor 4 negatively regulates beta-catenin expression and inhibits the proliferation, invasion and metastasis of gastric cancer. *Int J Oncol* 40: 2038-48
- Zhang P, Andrianakos R, Yang Y, Liu C, Lu W. 2010. Kruppel-like factor 4 (Klf4) prevents embryonic stem (ES) cell differentiation by regulating Nanog gene expression. *J Biol Chem* 285: 9180-9
- Zhang W, Geiman DE, Shields JM, Dang DT, Mahatan CS, et al. 2000. The gut-enriched Kruppel-like factor (Kruppel-like factor 4) mediates the transactivating effect of p53 on the p21WAF1/Cip1 promoter. *The Journal of biological chemistry* 275: 18391-8
- Zhao W, Hisamuddin IM, Nandan MO, Babbitt BA, Lamb NE, Yang VW. 2004. Identification of Kruppel-like factor 4 as a potential tumor suppressor gene in colorectal cancer. *Oncogene* 23: 395-402
- Zhu AJ, Haase I, Watt FM. 1999. Signaling via beta1 integrins and mitogen-activated protein kinase determines human epidermal stem cell fate in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 6728-33
- Zhu AJ, Watt FM. 1999. beta-catenin signalling modulates proliferative potential of human epidermal keratinocytes independently of intercellular adhesion. *Development* 126: 2285-98

- Références bibliographiques -

- Zhu XJ, Liu Y, Dai ZM, Zhang X, Yang X, et al. 2014. BMP-FGF signaling axis mediates Wnt-induced epidermal stratification in developing mammalian skin. *PLoS genetics* 10: e1004687
- Zimmerman K, Legouy E, Stewart V, Depinho R, Alt FW. 1990. Differential regulation of the N-myc gene in transfected cells and transgenic mice. *Molecular and cellular biology* 10: 2096-103
- Zinin N, Adameyko I, Wilhelm M, Fritz N, Uhlen P, et al. 2014. MYC proteins promote neuronal differentiation by controlling the mode of progenitor cell division. *EMBO reports* 15: 383-91

- Références bibliographiques -

RESUME/ABSTRACT

Titre : Contrôle de l'expansion *ex vivo* de précurseurs kératinocytaires humains fonctionnels : implication des facteurs de transcription KLF4 et MAD4.

Mots clés : Cellules souches adultes, épiderme, kératinocytes, régénération, MXD4, KLF4, prolifération, immaturité.

Résumé : Dans le contexte de la médecine régénérative cutanée, l'amplification massive en culture de PK est souvent requise mais elle peut s'accompagner d'une induction de la différenciation conduisant à une perte de potentiel régénératif. L'expansion *ex vivo* de précurseurs fonctionnels nécessite de contrôler deux processus : d'une part l'activation de la prolifération et d'autre part la préservation de l'immaturité. Mon laboratoire d'accueil a identifié les gènes *KLF4* et *MXD4* comme candidats potentiels dans le contrôle de ces processus. Mon travail de thèse a porté sur l'étude du rôle de *KLF4* et *MXD4* dans le contrôle des balances « quiescence/prolifération » et « immaturité/différenciation » au sein des PK de la peau humaine.

Nous montrons que la répression de *KLF4* comme celle de *MXD4* inhibe la différenciation kératinocytaire et augmente la prolifération et la clonogénicité des précurseurs, aboutissant à un potentiel régénératif accru dans des modèles de reconstruction épidermique *in vitro* et pour *KLF4* de xénogreffes *in vivo*. Les mécanismes des effets liés à *KLF4* passent notamment par l'inhibition de la voie du TGF β 1 et par la voie Wnt/ β -caténine.

Les effets liés à *MXD4* sont contrôlés par la quantité de dimères c-MYC/MAX et MAD4/MAX, et impactent la voie TGF- β . Malgré des mécanismes partiellement similaires, l'intervention d'effecteurs épigénétiques non codants pourrait conférer des spécificités à chacun de ces deux gènes : des ARN long non-codants, qui pourraient réguler le caractère immature des PK, ont été identifiés.

Notre concept a été démontré initialement en utilisant des outils de recherche, et notamment des inhibitions stables de l'expression de *KLF4* et *MXD4*. Nous montrons également qu'une inhibition transitoire, donc applicable à un contexte clinique, est également fonctionnelle, en utilisant l'ARN interférence ou une inhibition moléculaire. La répression par la kenpaullone pourrait notamment constituer un outil prometteur pour promouvoir l'expansion de précurseurs épithéliaux fonctionnels.

Title : Expansion control of ex vivo functional human keratinocyte precursor cells : implication of KLF4 and MAD4 transcription factors.

Keywords : Adult stem cells, epidermis, keratinocytes, regeneration, MXD4, KLF4, proliferation, immaturity.

Abstract : In the context of cutaneous regenerative medicine, massive amplification of keratinocyte precursor cells is usually required but can be accompanied with induction of differentiation, resulting in a loss of regenerative potential. *Ex vivo* expansion of functional precursors needs to control two processes : to activate proliferation in one hand, and to preserves immaturity in the other hand. My host laboratory has identified *KLF4* and *MXD4* genes as candidates that might control these processes. My thesis was focused on studying *KLF4* and *MXD4* roles in controlling the balance "quiescence/proliferation" and "immaturity/differentiation" of human skin keratinocytes precursors.

We have shown that repression of *KLF4* and *MXD4* inhibits keratinocyte differentiation and increases proliferation and clonogenicity of precursors, resulting in enhanced regenerative potential in *in vitro* epidermis reconstruction assay, and for *KLF4*, in *in vivo* xenografts assays. Mechanisms of the effects linked to *KLF4* include inhibition of TGFB1 pathway and Wnt/ β -catenin pathway.

Effects linked to *MXD4* are controlled by the respective quantity of c-MYC/MAX and MAD4/MAX heterodimers, and also impact TGF- β pathway. Despite partially similar mechanisms, intervention of non-coding epigenetic factors might confer the specific regulation to each of these genes : long non-coding RNA, that might regulate immature character of keratinocytes precursor cells, have been identified.

Our concept has been initially demonstrated using research tools, in particular stable repression of *KLF4* and *MXD4*. We then show that a transient inhibition, applicable to a clinical context, is also functional, by using RNA interference or molecular inhibition. *KLF4* and *MXD4* transient repression by kenpaullone might constitutes a promising molecular tool to promotes *ex vivo* expansion of functional epithelial precursor cells.