



HAL
open science

Analyse des mécanismes assurant la robustesse d'un événement de transdifférenciation : rôle de l'ubiquitine ligase E3 SEL-10

Cécile Delance

► **To cite this version:**

Cécile Delance. Analyse des mécanismes assurant la robustesse d'un événement de transdifférenciation : rôle de l'ubiquitine ligase E3 SEL-10. Biologie du développement. Université de Strasbourg, 2018. Français. NNT : 2018STRAJ027 . tel-03270861

HAL Id: tel-03270861

<https://theses.hal.science/tel-03270861>

Submitted on 25 Jun 2021

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.

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

**ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ
ED414**

Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire (IGBMC)
CNRS UMR 7104

THESE présentée par :

Cécile DELANCE

Soutenue le : **17 Janvier 2018**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**
Discipline / Spécialité : **biologie du développement**

**Analyse des mécanismes assurant la
robustesse d'un événement de
transdifférenciation : rôle de l'ubiquitine
ligase E3 SEL-10.**

Thèse dirigée par :

Mme Sophie Jarriault

IGBMC, université de Strasbourg

Rapporteurs externes :

M Peter Meister

Institut für Zellbiologie,
université de Bern.

M Vincent Bertrand

institut de biologie du
développement de Marseille,
université d'Aix-Marseille.

Membres du jury :

M Stephane Vincent

IGBMC, université de Strasbourg

Mme Chantal Wicky

department of biology,
université de Fribourg

« En science, la phrase la plus excitante que l'on peut entendre,
celle qui annonce des nouvelles découvertes,
ce n'est pas "Eureka" mais "c'est drôle". »

Isaac Asimov

Remerciements

Une thèse n'est pas qu'un travail original de Science. Ce n'est pas qu'un premier travail à durée déterminée. C'est plus que ça. C'est une expérience humaine qui pousse le doctorant à aller au-delà de ses limites, à faire des choses dont il ne se pensait pas capable. Aucune thèse ne peut se faire seule, c'est certes le compte rendu du travail d'une personne, mais cette personne n'aurait pu réussir seule. Je n'aurai jamais pu mener ce projet à terme sans aide. Et c'est ici que je tiens à remercier personnellement toutes les personnes qui ont joué un rôle dans la réussite de mon projet.

A l'origine de ce projet, il y a bien évidemment un laboratoire, une équipe et surtout une chef d'équipe. Sophie Jarriault qui a accepté de me prendre en master sans réfléchir longtemps. Pour m'avoir laissé choisir mon projet que j'ai aimé du début à la fin. Pour m'avoir aidée, pour avoir su gérer mes sautes d'humeur, pour ta patience, je te remercie. Ces quatre ans ont été forts en enrichissement personnel. J'ai découvert certaines facettes de ma personnalité qui aujourd'hui font que j'ai confiance en moi et que nous pouvons discuter de tout. Cet enseignement est peut-être l'une des plus grandes réussites de mon doctorat et cela n'aurait pas pu se faire sans toi.

Avant de remercier les membres de mon laboratoire (ce que je ne vais pas manquer de faire, n'en doutez pas), je tiens à remercier ici les rapporteurs qui ont accepté de lire, critiquer et discuter ce travail de doctorat. Monsieur Stéphane Vincent qui a accepté de faire partie de ce jury de thèse dès la première année, pour ses encouragements et compliments lors du comité de mi-thèse, je vous remercie chaleureusement. Monsieur Christian Lanctôt, qui a immédiatement accepté d'être membre de ce jury, même si cela n'est plus le cas aujourd'hui, et pour toutes les réponses et aides apportées sur la mise au point du smFISH, je vous remercie également. Monsieur Peter Meister, merci d'avoir accepté au dernier moment de faire partie de ce jury de fin de thèse et d'avoir accepté de faire partie du comité de mi-thèse. Les discussions abordées à cette occasion ont été importantes pour la suite de mon travail de recherche. Madame Chantale Wicky qui a très gentiment accepté de faire partie de ce jury et de prendre le temps de lire ce manuscrit. Monsieur Vincent Bertrand pour sa gentillesse, et pour avoir accepté instantanément d'être membre du jury. Je me réjouis d'avance de pouvoir en discuter de vive voix avec vous tous.

Je remercie les équipes du laboratoire Sophie Jarriault. J'ai vu deux équipes se succéder, deux équipes différentes, mais qui m'ont beaucoup apporté et soutenue, chacune

à leur manière. Il y a donc beaucoup de monde à remercier ici, mais j'y tiens, c'est ma thèse et j'ai toute la place que je veux ! Soyez prévenus, je ne me restreindrai pas ! :)

En premier lieu, je remercie Steven Zuryn, tu ne liras probablement jamais ces lignes (c'est pour cette raison que je les écris en français), mais je tiens à te remercier ici. Tu as été un excellent tuteur, un super manager et un scientifique fantastique. Tu as été une source d'inspiration et même si je sais que je ne suis pas à ta hauteur scientifiquement, j'ai fait attention à traiter mes stagiaires avec la même bienveillance que tu as eu à mon égard. Tu m'as guidée dans les premiers pas de ce projet, tu m'as aidée à ne pas me laisser abattre par les incompréhensions et les malchances expérimentales. Et je suis certes très contente que tu aies pu ouvrir ce laboratoire chez toi en Australie, mais une partie égoïste en moi aurait souhaité que tu restes encore.

Ensuite parmi les premiers membres de l'équipe que j'ai connus Marie-Charlotte Morin tu as été ma première tutrice dans ce laboratoire, tu m'as appris le rudiment des échanges de chocolats et des paiements de services en chocobons, ça m'a manqué tu sais ? Je sais que tu t'éclates sur scène et au travail, j'en suis ravie pour toi.

Thomas Daniele, premier du nom, tu étais en train de finir ta thèse, j'ai eu le plaisir d'y assister, et malgré la charge de travail que tu subissais à ce moment, tu avais toujours du temps pour moi et pour répondre à mes questions. Sache que je n'ai pas eu cette gentillesse envers les membres de mon laboratoire quand mon tour est arrivé... En tout cas, mon plaisir a été immense quand je t'ai revu à Séville. J'étais contente de voir que tu allais bien, que tu étais épanoui et que tu réussissais. Je suis certaine que ton avenir de scientifique sera plein de réussite, tu en as les capacités.

Arnaud Ahier, comment passer les remerciements de cette équipe sans décrire l'incroyable personnage que tu es ? Je ne sais pas moi-même comment commencer ou quoi te dire. Tu as toujours la patate, toujours content, toujours volontaire. J'ai adoré travailler avec toi, j'ai adoré t'écouter discuter avec Thomas, Marie et Steven. Tous ces moments qui m'ont donné envie de venir au laboratoire et envie d'y rester, je les chérirai longtemps parce qu'ils me sont précieux.

Et là vient le moment où Nadine Fisher se dit que je l'ai oubliée. Mais non Nadinette (comme dirait Severine), je ne t'ai pas oubliée, je t'ai laissée pour ma transition. Toi et moi, on a fait la transition de laboratoire. On a vu cette équipe se métamorphoser et grandir pour la voir devenir ce qu'elle est aujourd'hui. Nadine, tu es la maman du laboratoire et je sais que je pars avant toi de cette équipe, mais je te laisse entre de bonnes mains. Je te remercie du fond de mon cœur pour toute ton énergie positive, tous tes conseils, tous tes soutiens quand je n'allais pas bien, même si de ton côté, tu avais aussi des difficultés. Je te remercie aussi tout particulièrement pour le soutien apporté lors de la fin de cette thèse, tu m'as soulevée et aidée alors que tu avais tes propres préoccupations. Je te souhaite de passer une

bonne fin de carrière et de profiter à fond et en bonne santé d'une retraite bien méritée et probablement pleine d'activités !

Eria, my dear Eria, you're just awesome! You're always here for me. You helped me so much to see the best in me, to give the best of me too!! I loved to discuss with you, even so I don't smoke. ;) I loved from day one to discuss philosophy (or any topic) with you. You have this innate talent to make people self-confident and this is precious and is/was key for me in succeeding my PhD. I thank you sooo much and wish you all the best for your future life in science and in your family, you deserve it.

Que te dire, Christelle Gally ? Plein de choses différentes ! Tu es une personne magnifique, pleine de gentillesse, toujours dans une bienveillance très forte et dans un soutien et une franchise qui n'a jamais faibli avant même que tu rejoignes officiellement et définitivement notre équipe. Tu m'as aidée de tellement de façons que si je devais toutes les décrire, les remerciements seraient plus long que la partie d'introduction de cette thèse. Du coup, même si je me suis promis de ne pas me restreindre dans la partie des remerciements, je vais quand même en garder pour moi. Ce sera nos petits moments secrets, comme une succession de parties de cartes la nuit, une expérience de vortexage, des images qui font sauter de joie. Tous ces moments sont des pépites de trois ans et même si j'ai eu de gros « bas » pendant ces trois ans, je ne retiendrai que ça et j'espère qu'il en sera de même pour toi. Je te souhaite de t'épanouir, d'avoir un projet avec Claudia qui porte ses fruits prometteurs à maturité et de rester dans une belle équipe.

Sevinou ! oh ma Séverinouuuu ! Qu'aurais-je fait sans toi, que serais-je devenue sans toi ? Je ne sais pas. Ce que je sais c'est que si j'ai réussi, si aujourd'hui je peux me regarder dans une glace et être fière de ce que je suis et de ce que j'ai fait, tu n'y es pas étrangère et si tu avais fait payer tes séances de conseils, je serais sans le sou ! Tu m'as relevé à la force de tes mots, de ta bonté et de ton analyse du fond du gouffre dans lequel j'étais et pour ça, je ne pourrai jamais te remercier assez. Je sais que tu m'en veux de partir, mais saches que tu me manqueras toujours et mes matins ne sont plus les mêmes depuis que tu as une voiture ;) . Je sais que le monde de la science est difficile (dirons-nous) mais tu es l'une des personnes les plus intelligentes qu'il m'ait été donné de rencontrer et s'il te plaît, prends soin de toi. Sois heureuse, restes toi-même. Tu es quelqu'un d'admirable avec une force que je ne pourrai jamais égaler et qui m'inspire. Si j'en écris plus certains vont se demander s'il ne s'agit pas d'une demande en mariage mais tmtc, viens quand tu veux à la maison, on est bien :) !

Sarah, je te connaissais aussi avant même que tu ne rejoignes officiellement notre équipe et déjà à ce moment tu étais là pour moi. Tu as une personnalité très forte et très volontaire. Ne te laisse pas émousser par l'avenir. Sans toi, cette thèse n'aurait pas pu finir aussi bien, mais sache que, même à ses débuts, tu as joué un rôle important pour moi, même

si je l'avoue, tu me fais un peu peur (si si un peu quand même), nos séances câlins me manqueront tout de même.

Et me voici arrivée dans le cœur de la nouvelle équipe, les petits nouveaux, tout repose sur vous. Vous reprenez ce laboratoire et ses valeurs. Mais chacun, à votre manière, vous lui apportez quelque chose d'unique.

Laura tu as tout de suite montré une forte volonté pour maîtriser le modèle. Tu es d'excellent conseil pour progresser et toujours aller de l'avant et ça, c'est cool. Tu as aussi un sacré caractère joyeux qui n'enlève rien au reste ! Merci pour tous tes conseils pour m'aider dans ma vie de doctorante mais aussi dans ma préparation à ma vie après le doctorat.

Anne, tu es une sacrée maman et quelle n'a pas été ma surprise de voir ces adorables sucreries dans mon tiroir à nourriture apparaître périodiquement ! Oui, j'ai une relation particulière avec mon estomac et tu t'en es rendue compte. Mais je te rassure, je ne résume pas notre rencontre à quelques bonbons. Tu es une bonne personne très franche et honnête envers elle-même et les autres. C'est quelque chose que j'apprécie et respecte énormément. Ça a été un plaisir de te faire découvrir le laboratoire et son fonctionnement. Tu as toujours été à mon écoute et je t'en remercie. Je te remercie également d'avoir pris le temps de me donner ton avis sur une partie de cet écrit. Relire une thèse est toujours long et compliqué et je suis vraiment ravie que tu aies accepté de le faire. Je te souhaite de réussir dans la suite de ta vie personnelle et professionnelle.

Claudia you're an amazing girl! Please don't change anything! Get married as you wish to, have a nice live in science and in your couple! I will miss you and I hope you will like to work in our lab, even so I know it will be fine for you and Christelle. Don't let Jaime play with your nerves. Jaime, be a nice boy for once ;).

Jaime, it was a pleasure to finally met you in our lab. You change by us in a very good manner. Please, continue hard working and you will see, you will get it somehow! ;)

Alexandra tu as été une des deux seules stagiaires que j'ai eu le plaisir de tutorer. Et travailler ensemble pendant cette année a été une révélation pour moi grâce aux discussions que nous avons eues. C'est un immense plaisir de voir à quel point tu as progressé et j'espère que ta vie professionnelle te sourira car tu es fantastique.

Olie, même si tu ne travailles pas physiquement dans notre module, je ne pourrais pas oublier de te remercier. Tu as toujours été là pour faire toutes ces boîtes, m'aider à préparer toutes ces expériences et les rendre possibles. Tout cela grâce à toi. Tu le faisais même si c'était au dernier moment ou demandé lors d'un mauvais timing pour toi. Je te

remercie aussi pour toute ta gentillesse et tes attentions. Tu es toujours souriante et avenante, tu as toujours un mot gentil pour tout le monde. Surtout ne change pas, travailler avec toi a été un plaisir !

Et voilà il ne m'a fallu que trois pages pour remercier les membres stricts de notre laboratoire. Mais ne vous y trompez pas. Ce n'est pas fini ! J'aimerais aussi remercier tous les membres de l'équipe de Michel Labouesse : Thann, Shashi, Xinyi, et tout particulièrement Saurabh et Alicia. Saurabh, I will never get bored to run after you and finish by being buy with a crepe or an ice. You are one of my dearest friend and I wish you all the best. Now you are doctor, and a complete future of science sit at your feet, waiting to be taken.

I won't forget the lunch mates Katka, Sushil, Maria, Arantxa, Alex (and the others). It was a pleasure to be with you, I loved to have lunch with you. Those times were an oxygen breath. Always fun and I still own you a role play game evening. I hope I will keep in touch with you. I promise I will do it. :)

Je remercie aussi ma famille qui a toujours été là pour moi. Mon papa qui a relu ce manuscrit à la recherche de fautes alors que le sujet lui est inconnu. Un coach scientifique et personnel toujours présent, toujours à fond ! Ma maman qui m'a soutenue pendant toutes ces longues années où j'étais loin d'elle. Et mon frère pour le soutien inébranlable apporté jusqu'au tout dernier moment et plus encore. Rien que de savoir que vous étiez tous là pour moi suffisait à garder confiance. Je serai fière de vous montrer le fruit de tout ce travail à ma soutenance.

Je remercie aussi mon Lulu. Mon adorable fiancé qui a accepté de faire un sacrifice immense et de renoncer temporairement à notre vie commune tout en assurant un soutien sans faille du début à la fin de cette longue épreuve. Pour les discussions scientifiques les soirs et week ends et pour tout le reste, merci mon chéri. Je t'aime.

Je n'oublierais pas ma belle-famille et tout particulièrement toi Agnès pour m'avoir remonté le moral, m'avoir écoutée et soutenue. C'est important pour moi de t'avoir à mes côtés. Votre foyer a été mon foyer depuis le premier jour et c'est important comme sentiment.

Quentin, tu as directement été cité dans le corps du texte et ça c'est la classe. Mais surtout tu es quelqu'un de super. Toujours là pour moi, même pour de gros travaux. Tu m'as consacré beaucoup de temps (informatique, conseils scientifiques et autres). Tout cela sans rien demander en retour et toujours dans des temps absolument record. Ne t'en fais pas je te donnerai un bon repas en retour. :)

Merci Larissa et Darel. Votre bienveillance, votre gentillesse et amour de la science bien faite ne sera pas oubliée ici.

Pour finir, j'adresserai mes derniers remerciements à une personne particulière que je n'ai rencontré qu'une seule fois. Je parle ici d'une personne qui a joué un rôle sans qu'il ne le sache réellement et sans qui je n'aurais jamais tenu. Jamais je n'aurai progressé à ce point. Vous m'avez montré à quel point on pouvait être heureux de faire quelque chose. Cela m'a d'une part, montré à quel point ce que je faisais ne me satisfaisait pas pleinement. Mais d'autre part, cela m'a surtout donné l'espoir de trouver une activité qui me donnerait ce plaisir. Et par-dessus tout, votre joie est merveilleusement contagieuse. Elle m'a servi de bouée de sauvetage pour éviter que je me noie, une éponge qui efface tout mauvais instant, toutes mauvaises journées. C'est pourquoi je finis par vous remercier, tout ce qui suivra a été le fruit de mon travail, du soutien de mes collègues et de ma famille. Mais aussi le votre, merci Bob Lennon.

En relisant ces remerciements, je me rends compte qu'ils peuvent donner l'impression d'une thèse réalisée dans la détresse et la douleur de chaque instant. Cependant, ne vous y trompez pas, il y a eu beaucoup de moments de joie, et de plaisir tout au long de ces trois ans. Mais c'est dans les moments de grande difficulté que la valeur des gens vous apparaît le plus. Je suis vraiment reconnaissante à tous ces gens pour les bons moments, les soirées ensemble, les discussions au labo, les fous rires et les échanges de nourriture. Je vous aime tous pour ça. Mais je vous aime tous encore plus pour ce que vous avez su faire pour moi dans les moments où j'en avais le plus besoin.

Résumé

Lors du développement, la cellule totipotente restreint son potentiel cellulaire jusqu'à devenir complètement différenciée, avec un destin unique. Cependant, ce mécanisme de différenciation n'est pas irréversible. Les cellules possèdent une plasticité, leur permettant de changer d'identité. Les mécanismes qui permettent ceci à une cellule sont nombreux et sont appelés reprogrammation. L'étude du changement d'identité présente un des enjeux de la biologie du développement. D'une part, comprendre les mécanismes impliqués dans ces événements donnera une meilleure compréhension de ce qui fait l'identité d'une cellule et dans quelle mesure une reprogrammation est possible. D'autre part, les enjeux pour la médecine régénératrice sont importants car changer l'identité d'une cellule ouvre l'opportunité de soigner et régénérer des organes blessés. A long terme, ces recherches permettraient la greffe de tissus sans nécessiter la prise d'immunosuppresseurs, évitant la greffe de « non soi » et les risques de rejet.

Notre laboratoire s'intéresse à l'étude fondamentale de la reprogrammation directe, aussi appelée transdifférenciation. La transdifférenciation (Td) est définie par le changement direct d'identité d'une cellule. C'est-à-dire que la cellule change d'identité sans étape intermédiaire de pluripotence. Le sujet de notre étude est le ver *C. elegans*. Ce dernier est un vers de la classe des nématodes, entièrement transparent. Ce qui permet de suivre *in vivo* un événement de transdifférenciation naturelle qui a lieu au cours du développement larvaire de ce dernier. En effet, une des six cellules rectales : Y se transdifférencie en motoneurone appelé PDA. Ce changement d'identité se fait entre le stade larvaire L1 et le stade larvaire L3. Elle se fait en deux temps principaux. Le premier est la dédifférenciation : la cellule rectale perd son identité de cellule épithéliale et se dissocie du rectum, migrant antérieurement. La seconde étape est appelée redifférenciation : la cellule Y devient un neurone, exprimant des marqueurs de neurogenèse puis développant un axone ainsi que des marqueurs d'identité neuronale. Cette transdifférenciation se fait de manière stéréotypée dans 100% des vers (Jarriault et al., 2008). Le laboratoire a mis en évidence plusieurs gènes impliqués dans le changement d'identité cellulaire. Ces gènes sont classés en deux catégories. La première présente les gènes qui sont impliqués dans le cœur du processus. Ces gènes, une fois mutés et délétés de leur fonction, provoquent un fort défaut de la formation de PDA (<50%). Dans la

deuxième catégorie, les gènes sont impliqués uniquement dans l'efficacité du processus. Ils présentent un faible défaut de formation de PDA (>40%).

Le but de ce travail a été de comprendre comment agissent les facteurs impliqués dans l'efficacité de la transdifférenciation. Pour ce faire, je me suis concentrée dans un premier temps sur l'étude de *sel-10*, une ubiquitine ligase E3, impliquée dans l'efficacité de la Td et agissant en synergie avec *jmjd-3.1* et *wdr-5.1*. Ces deux gènes sont déjà connus pour être impliqués dans l'efficacité et la robustesse du mécanisme (Zuryn et al., 2014). C'est-à-dire la capacité de transdifférenciation de Y dans des conditions défavorables de croissance. Dans un deuxième temps, j'ai essayé de comprendre si *sel-10* était aussi impliqué dans la robustesse du mécanisme. Avant d'essayer de comprendre, dans un troisième temps, comment ces trois mutants agissent sur l'expression de gènes essentiels à la Td et des gènes impliqués dans l'identité neuronale.

I. Interaction entre le système ubiquitine-protéasome et modificatrices d'histones

Le gène *sel-10* avait été identifié au sein du laboratoire dans un double mutant avec *jmjd-3.1*, une déméthylase d'histone H3K27. Mais le rôle de *sel-10*, et par extension celui du système ubiquitine-protéasome, était inconnu au sein de la transdifférenciation. De plus, ce double mutant montre une interaction synergétique avec *jmjd-3.1*. C'est-à-dire que l'effet de la double mutation de *sel-10* et *jmjd-3.1* sur la transdifférenciation est plus importante que la somme du défaut des deux mutations. Ceci indique que la voie de signalisation de l'ubiquitine agit avec l'épigénétique sur une cible commune.

L'étude d'une telle protéine implique plusieurs questions. i/ Quelles sont les caractéristiques principales de la protéine SEL-10 ? ii/ quels sont les partenaires de SEL-10, membres du complexe SCF ? Quelle est la cible ? Le protéasome est-il impliqué ?

Afin de comprendre comment *sel-10* agit au sein de la transdifférenciation, j'ai cloné une protéine de fusion SEL-10::GFP exprimée sous contrôle d'un promoteur des cellules rectales. Cette protéine sauve le phénotype mutant brise la synergie existante entre *sel-10* mutant et *jmjd-3.1* mutant. La modification de cette protéine de fusion permet une étude de la fonction de *sel-10* au sein de la transdifférenciation. Cette expérience permet

de montrer cette dernière dépend de l'expression de *sel-10* au sein des cellules rectales. Et a permis la mise en évidence de l'importance du domaine Fbox, ainsi qu'une indication sur la localisation intra cellulaire de la protéine SEL-10.

J'ai étudié la fonction de l'ubiquitine au sein de la transdifférenciation, en utilisant l'ARN interférant. Ceci a permis de tester les différents membres du complexe SCF, le rôle du protéasome et les potentielles cibles de SEL-10. Cette dernière étude a été réalisée sur la base d'une étude de Iva Greendenvald qui a réalisé une liste des potentielles cibles de SEL-10 *in silico*. Cette liste a été triée en recherchant des facteurs ayant un rôle antagoniste à celui de *jmjd-3*, c'est-à-dire un rôle de répresseur de l'expression des gènes. Ce choix se base sur le fait que SEL-10 est connue pour la dégradation de facteurs de transcription clés tels que Notch, mTor,... et qu'il est supposé qu'elle agît également de cette façon dans la transdifférenciation. Bien que les expériences réalisées pour trouver la ou les cibles de SEL-10 impliquée(s) dans la Td n'ont pas permis de conclure, elles ont permis de trouver de nouveaux potentiels acteurs de la Td.

Les tests afin de mettre en évidence le complexe SCF au sein duquel agit SEL-10, ainsi que le rôle du protéasome n'ont pas permis d'aboutir sur une conclusion vis-à-vis du rôle de SEL-10 et de ses partenaires lors de la transdifférenciation. En revanche, cette expérience a mis en évidence un rôle pour le protéasome et les protéines SCF liées à la dégradation de protéines à supprimer l'effet de la mutation de *jmjd-3.1*. Cette surprenante découverte implique que la perte du protéasome et non seulement non délétère pour le phénomène de transdifférenciation d'Y en PDA, mais qu'en plus ce dernier joue un rôle de répresseur du changement d'identité.

II. *sel-10* est impliqué dans la robustesse de la transdifférenciation d'Y en PDA

Alors que le rôle de *jmjd-3.1* et *wdr-5.1* dans la robustesse du mécanisme a déjà été démontré au sein du laboratoire, la question se pose pour *sel-10*. En effet, ce gène est impliqué dans l'efficacité du mécanisme et agit en synergie avec ces deux gènes, mais les mécanismes cellulaires de réponse au stress sont particuliers. Ainsi, la question se pose : *sel-10* est-il impliqué dans la robustesse de la transdifférenciation ?

L'implication d'un gène dans la robustesse se visualise par une augmentation du défaut de formation de PDA dans des conditions de stress.

Des expériences de stress au UV, paraquate (stress mitochondrial et oxydatif), température, absence de nourriture ont été réalisées avec les simples mutants *sel-10*, *jmjd-3.1*, *wdr-5.1* ainsi que les doubles mutants *sel-10 ; jmjd-3.1* et *sel-10 ; wdr-5.1* (Zuryn et al., 2014). Les résultats fournis sont assez similaires et montrent que *sel-10* serait impliqué dans la robustesse. Bien que son rôle semble varier lorsque les deux stressés : de température et d'absence de nourriture sont induits. Dans ce cas, le défaut induit par l'absence de *sel-10* n'augmente pas et reste comparable à des conditions normales de culture. Cette observation surprenante indique que *sel-10* pourrait avoir un rôle différent suivant les conditions environnementales dans lesquelles se trouve le vers. Par extension, on pourrait supposer que la cible change en fonction des conditions de culture.

III. *sel-10*, *jmjd-3.1* et *wdr-5.1* agissent de manière positive sur l'expression des gènes.

jmjd-3.1 code pour une protéine déméthylase d'histone H3K27. La déméthylation de ce résidu est positivement corrélée avec l'activité transcriptionnelle. *wdr-5.1* code pour un membre du complexe SET1, impliqué dans la méthylation des histones H3K4 (Ang et al., 2011), modification qui est elle aussi corrélée à une chromatine active.

J'ai dans un premier temps réalisé une étude des modifications d'expression des gènes en absence ou en présence de *jmjd-3.1* et *wdr-5.1*. Ces gènes sont soit des gènes essentiels au processus de transdifférenciation (impliquant un fort défaut de l'apparition de neurone) soit des marqueurs neuronaux, explicitant l'identité cellulaire de la cellule en présence ou en absence de ces modificatrices d'histones. En effet, ces dernières étant liées à la régulation de l'expression des gènes et étant essentielles pour l'efficacité et la robustesse de la TD, nous supposons que leur rôle est de permettre d'assurer un niveau de transcription minimal pour les gènes essentiels à la TD. Ainsi, en leur absence, ce niveau minimal ne serait pas toujours atteint (ou alors serait trop variable) et une faible proportion de la population mutante aurait un défaut dans le mécanisme étudié. Cette hypothèse a été approchée expérimentalement grâce à la technique du smFISH (Raj et al., 2008).

Les résultats de cette étude ont permis de conclure que *wdr-5.1* et *jmjd-3.1* agissent effectivement sur l'expression des gènes testés. Le premier présente un effet similaire sur tous les gènes testés alors que *jmjd-3.1* agit de manière plus spécifique sur *cog-1* (marqueur de présence de PDA utilisé au sein du laboratoire) alors que les gènes servants de marqueurs neuronaux montrent une expression non diminuée par l'absence de *jmjd-3.1*.

De la même manière, j'ai recherché si *sel-10* avait un effet similaire sur l'expression de ces mêmes gènes clés. J'ai montré que ce dernier ne présentait pas d'effet sur l'expression des gènes essentiels pour la différenciation du processus alors que les gènes impliqués dans l'identité neuronale étaient légèrement diminués. Cependant, à notre surprise, le gène *cog-1* voit son expression drastiquement diminuée alors que le défaut de formation de PDA observé est relativement faible (environ 10%). Ce fait indique la probable présence d'une étape de régulation de l'expression de ce gène au niveau traductionnel.

En conclusion, pendant mon travail de thèse, j'ai essayé de décortiquer le rôle des gènes impliqués dans l'efficacité et la robustesse du changement d'identité cellulaire d'Y en PDA. J'ai démontré l'implication de ces gènes sur l'expressions de facteurs impliqués dans la transdifférenciation. En montrant que, bien qu'ils possèdent tous un rôle dans l'efficacité et la robustesse, leurs actions sur la transcription est différente entre les trois gènes étudiés.

Au cours de cette étude, j'ai également démontré un nouveau rôle du protéasome et du système ubiquitine-protéasome dans la cellule, ouvrant de nouvelles voies pour l'étude du lien entre le SUP et les modificateurs d'histones.

Table des matières

<u>Résumé</u>	7
I. <u>Interaction entre le système ubiquitine-protéasome et modifcatrices d’histones</u>	8
II. <u>sel-10 est impliqué dans la robustesse de la transdifférenciation d’Y en PDA</u>	9
III. <u>sel-10, jmjd-3.1 et wdr-5.1 agissent de manière positive sur l’expression des gènes.</u>	10
<u>Table des figures</u>	17
<u>Liste des tableaux</u>	20
<u>Abréviations</u>	21
<u>Nomenclature</u>	22
<u>Glossaire</u>	24
<u>Inroduction</u>	27
1. <u>Plasticité cellulaire</u>	27
1.1. <u>Spemann et Mangold</u>	28
1.2. <u>Gurdon</u>	30
1.3. <u>Le paysage de Waddington</u>	32
2. <u>Reprogrammation cellulaire</u>	36
2.1. <u>Reprogrammation induite in vitro</u>	37
2.1.1. <u>Transdifférenciation (Davis)</u>	37
2.1.2. <u>Transition par un état de pluripotence</u>	40
2.2. <u>Reprogrammation induite in vivo</u>	44
2.2.1. <u>Transdifférenciation</u>	44
2.2.2. <u>Transition par un état de pluripotence</u>	46
2.3. <u>Reprogrammation naturelle</u>	47
2.3.1. <u>Transdifférenciation</u>	48
2.3.2. <u>Transition par un état de pluripotence</u>	49
3. <u>Les mécanismes de reprogrammation</u>	51
3.1. <u>Méthodes de reprogrammation</u>	51
3.2. <u>Une reprogrammation homogène ?</u>	53
3.3. <u>L’étude des reprogrammations et leurs limites pour mettre en évidence les mécanismes impliqués</u>	54
4. <u>Notre modèle d’étude</u>	56
4.1. <u>Les avantages du modèle</u>	56
4.1.2. <u>Le ver et ses caractéristiques</u>	56

4.2.	Plasticité cellulaire et reprogrammation chez <i>C. elegans</i>	61
4.2.1.	Est-il possible d'induire un changement d'identité cellulaire chez <i>C. elegans</i> ?	61
4.2.2.	Les mécanismes de la reprogrammation	64
4.3.	Y en PDA un évènement naturel de transdifférenciation	64
4.4.	Mise en évidence des acteurs de la transdifférenciation	69
4.4.1.	Les cibles	69
4.4.2.	Identification des gènes	69
4.4.3.	Etapas et mécanismes cellulaires	70
5.	Comment le processus est-il stéréotypé et invariant ?	73
5.1.	Enzymes ou activité de modifcatrices d'histones	75
5.1.1.	Le rôle de wdr-5.1	76
5.1.2.	Le rôle de jmjd-3.1	79
5.2.	Ubiquitine ligase E3	82
6.	Objectifs de thèse	88
6.1.	Ubiquitine-protéasome système et caractérisation de l'action de SEL-10	88
6.2.	Robustesse de la transdifférenciation	89
6.3.	Implication de la robustesse et transcription	89
	Matériel	92
1.	Les kits	92
2.	Solutions	92
3.	Les sondes de smFISH	93
4.	Matériel d'imagerie	94
5.	Matériel d'injection	94
6.	Oligonucléotides	94
7.	Plasmides	96
8.	Allèles	97
9.	Souches de <i>C. elegans</i>	98
10.	Appareils	99
11.	Logiciels et statistiques	100
	Méthode	101
1.	Culture et travail de <i>C. elegans</i>	101
1.1.	Protocole de javellisation des vers, aussi appelé bleaching	101
1.1.1.	Solutions nécessaires	101
1.1.2.	Protocole	101
1.2.	Observation au microscope des vers	102
1.3.	Protocole de synchronisation	103

1.4.	Protocole de smFISH (single molecule fluorescent in situ hybridation)	104
1.4.1.	Protocole de smFISH :	104
1.4.1.1.	Solutions nécessaires :	104
1.4.1.2.	Protocole fixation :	104
1.4.1.3.	Protocole d'hybridation :	105
1.4.1.4.	Protocole des lavages :	106
1.4.2.	Acquisition des images :	106
1.4.3.	Analyse des images :	107
1.4.4.	Analyse des résultats :	108
1.5.	Injection :	109
1.5.1.	Tirer les aiguilles :	109
1.5.2.	Remplir et casser l'aiguille :	109
1.6.	Intégration	111
1.7.	Expérimentation de stress :	112
1.7.1.	De température :	112
1.7.2.	De privation de nourriture :	112
1.7.3.	Mitochondrial :	112
1.7.4.	De dommages à l'ADN par UV :	112
1.8.	Lyse de vers :	113
2.	Travail de biologie moléculaire :	113
2.1.	Clonages :	113
2.1.1.	Megawhop :	113
2.1.2.	PCR reverse :	113
2.2.	PCR de génotypage :	114
2.3.	Synthèse d'ARNi	114
3.	CRISPR Cas9	114
4.	Analyse statistique	115
4.1.	Analyse des lignées transgéniques	115
4.2.	Analyse des différences entre les mutants et ARNi	115
4.3.	Tests sur les smFISH	115
	Résultats	117
1.	Caractérisation de SEL-10	119
1.1	Quelle est la cible de sel-10 ?	119
1.1.1.	Quelles sont les cibles potentielles de SEL-10 au sein de la transdifférenciation ?	119
1.1.2.	jmjd-2 une modifcatrice d'histone comme potentielle cible de SEL-10 ?	122
1.1.3.	cec-6 modifcatrice de la chromatine comme cible de SEL-10 ?	125
1.2.	Quel est la fonction de sel-10 au sein de la transdifférenciation ?	129

1.2.1.	<u>Dans quelles cellules l'expression sel-10 est-elle nécessaire pour effectuer sa fonction lors de la transdifférenciation ?</u>	129
1.2.2.	<u>Importance du domaine Fbox : le lien entre la protéine SEL-10 et le complexe SCF ?</u> 131	
1.2.3.	<u>La protéine SEL-10 est-elle localisée et active dans un compartiment subcellulaire spécifique ?</u>	136
1.3.	<u>Analyse du complexe SCF : quels sont les partenaires de SEL-10 ?</u>	138
1.3.1.	<u>Quel est le SKR agissant avec SEL-10 ?</u>	138
1.4.	<u>La cible de SEL-10 est-elle dégradée par le protéasome ?</u>	141
1.4.1.	<u>ARN interférant rpn-10 et pbs-5 : test de deux sous unité du protéasome</u>	141
1.4.2.	<u>Mutant rpn-10</u>	144
2.	<u>SEL-10 est-elle impliquée dans le processus de résistance de la transdifférenciation ?</u>	146
2.1.	<u>Les mutants étudiés sont-ils impliqués dans la résistance au stress de température ?</u> ..	146
2.2.	<u>Les mutants étudiés sont-ils impliqués dans la résistance au stress lié à l'absence de nourriture ?</u>	147
3.	<u>Quel est l'impact des modificatrices d'histones et l'ubiquitine ligase E3 SEL-10 sur la transcription de gènes ?</u>	149
3.1.	<u>Quel est le rôle de complexes modifiant les histone WDR-5.1 ou SEL-10 sur la transcription de gènes impliqués dans l'initiation de la dédifférenciation ?</u>	151
3.1.1.	<u>Expression de ceh-6 au sein des mutants wdr-5.1 et sel-10</u>	152
3.1.2.	<u>Expression de sox-2 au sein des mutants wdr-5.1 et sel-10</u>	154
3.1.3.	<u>Expression de hlh-16 au sein des mutants wdr-5.1 et sel-10</u>	155
3.2.	<u>Quel est l'impact de complexes modifiant les histones ou de SEL-10 sur la transcription de gènes impliqués dans la redifférenciation ?</u>	156
3.2.1.	<u>Expression de cog-1</u>	156
3.2.1.1.	<u>Expression de cog-1 au cours du temps dans l'individu sauvage</u>	157
3.2.1.2.	<u>Comparaison de l'expression de cog-1 dans le mutant jmjd-3.1 et l'individu sauvage au cours du temps</u>	159
3.2.1.3.	<u>Expression de cog-1 au sein du mutant sel-10</u>	163
3.2.1.4.	<u>Expression de cog-1 au sein du double mutant sel-10 ; jmjd-3.1</u>	166
3.2.1.5.	<u>Expression de cog-1 au sein du mutant wdr-5.1</u>	167
3.2.1.6.	<u>Expression comparée de cog-1 au sein des différents mutants étudiés</u>	169
3.2.2.	<u>Expression de unc-3</u>	171
3.2.2.1.	<u>Expression de unc-3 au sein de l'individu sauvage</u>	171
3.2.2.2.	<u>Expression de unc-3 au sein du double mutant sel-10 ; jmjd-3.1</u>	173
3.2.2.3.	<u>Comparaison de l'expression de unc-3 au sein des différents mutants</u>	174
3.2.2.4.	<u>Expression de unc-3 au sein du mutant wdr-5.1 à 20°C</u>	174
3.2.3.	<u>Expression de unc-33</u>	175

3.2.3.1.	unc-33 au sein du contrôle et différents mutants	176
3.2.3.2.	Expression de unc-33 au sein du mutant wdr-5.1	178
3.2.4.	Expression de rimb-1	179
3.2.4.1.	Comparaison de l'expression de rimb-1 entre la souche contrôle et les différents mutants	179
4.	Récapitulatif des résultats	181
	Discussion	184
1.	sel-10 sa cible, sa fonction et l'implication du protéasome	185
1.1.	La cible de sel-10 ?	185
1.2.	La fonction de sel-10 ? Observation du domaine Fbox et de la localisation de SEL-10 au sein de la cellule Y	191
1.3.	Le complexe SCF	193
1.4.	L'implication du protéasome	194
2.	La robustesse du processus de transdifférenciation	199
3.	Etude de l'expression des gènes impliqués dans l'initiation du processus de transdifférenciation	200
4.	Etude de l'expression des gènes impliqués dans la redifférenciation ..	203
	Conclusions générales et perspectives	213
	Références	216
	Annexes	226
1.	Les sondes dus smFISH	226
2.	L'analyse du domaine F-box, comparaison entre le domaine F-box de différents domaines	227
	Family alignment for the FBOX domain, CHROMA format	227
3.	Liste des potentielles cibles de SEL-10 intéressantes, classée selon les catégories de fonction de protéine et intérêt au sein de la transdifférenciation	232

Table des figures

- Figure 1** : Schéma d'un spermatozoïde humain selon la théorie de la préformation (p. 28)
- Figure 2** : Schéma de l'expérience de Spemann et Mangold (p. 29)
- Figure 3** : Schéma de l'expérience de transfert nucléaire de Gurdon (p. 31)
- Figure 4** : Paysage de Waddington (p. 34)
- Figure 5** : quantification du paysage de Waddington (p. 35)
- Figure 6** : cycle de vie de *C. elegans* (p. 58)
- Figure 7** : Schéma de la transdifférenciation de Y en PDA (p. 66)
- Figure 8** : représentation schématique du lignage cellulaire de DA9 et Y (p. 72)
- Figure 9** : Schéma de la transdifférenciation de Y en PDA (p.74)
- Figure 10** : récapitulatif de *wdr-5.1* (p. 78)
- Figure 11** : récapitulatif de *jmjd-3.1* (p. 80)
- Figure 12** : adaptation de la figure de Steven Zuryn (p. 81)
- Figure 13** : récapitulatif de *sel-10* (p. 83)
- Figure 14** : Schéma de réalisation d'un pad d'agarose (p. 102)
- Figure 15** : planche représentative des images obtenues en smFISH (p.108)
- Figure 16** : ensemble du matériel de micro-injection (p. 110)
- Figure 17** : image de l'aiguille s'ouvrant contre un capillaire (p.110)
- Figure 18** : modèle d'étude (p. 118)
- Figure 19** : représentation du phosphodégron reconnu par SEL-10 (p. 119)
- Figure 20** : ARNi de *dpy-8* et *jmjd-2* (p. 123)
- Figure 21** : observation de l'effet de la mutation de *jmjd-2* (p. 124)
- Figure 22** : crible ARNi de potentielles cibles de SEL-10 (p.125)
- Figure 23** : ARNi de *cec-6* et *dpy-8* au sein du double mutant *sel-10 ; jmjd-3.1* (p. 125)
- Figure 24** : ARNi de *cec-6* et *dpy-8* au sein du simple mutant *jmjd-3.1* (p. 126)
- Figure 25** : représentation schématique de la protéine *cec-6* (p. 128)
- Figure 26** : observation du défaut de PDA au sein du mutant *cec-6* (p. 128)
- Figure 27** : expérience de sauvetage de phénotype de SEL-10 (p. 138)
- Figure 28** : observation au microscope confocal de mCherry::SEL-10 au sein de PDA (p. 131)
- Figure 29** : expérience de sauvetage de phénotype (p. 132)
- Figure 30** : expérience de dominant négatif sur la protéine mCherry:: Δ Fbox SEL-10 (p.133)

- Figure 31** : expérience de sauvetage de phénotype (p.134)
- Figure 32** : comparaison de la séquence d'acides aminés composants le domaine Fbox entre différentes espèces (p. 134)
- Figure 33** : expérience de sauvetage de phénotype expérience de mutation ponctuelle du domaine Fbox (p.135)
- Figure 34** : étude de la protéine de fusion PH::mCherry::SEL-10 (p.137)
- Figure 35** : expérience d'ARNi sur les SKR (p.140)
- Figure 36** : expérience d'ARNi afin de mettre en évidence le protéasome (p. 143)
- Figure 37** : étude de l'impact de l'absence de *rpn-10* au sein des mutants *sel-10* et *jmjd-3.1* (p. 144)
- Figure 38** : injection d'ARNi ciblant *rpn-10* et *dpy-8* au sein du double mutant *sel-10* ; *jmjd-3.1* (p. 145)
- Figure 39** : étude de l'impact de la température sur le défaut de PDA (p. 147)
- Figure 40** : étude des stress environnementaux sur la transdifférenciation (p. 148)
- Figure 41** : étude de l'impact des mutants *sel-10* et *wdr-5.1* sur l'expression de *ceh-6* (p. 153)
- Figure 42** : étude de l'impact des mutants *sel-10* et *wdr-5.1* sur l'expression de *sox-2* (p. 154)
- Figure 43** : étude de l'impact des mutants *sel-10* et *wdr-5.1* sur l'expression de *hlh-16* (p. 155)
- Figure 44** : étude de l'impact de *syIs63* sur *cog-1* (p. 157)
- Figure 45** : représentation schématique de l'expérience de smFISH (p.158)
- Figure 46** : étude de l'expression de *cog-1* au cours de la transdifférenciation (p.158)
- Figure 47** : étude du rôle de *jmjd-3.1* sur l'expression de *cog-1* au cours de la redifférenciation (p. 160)
- Figure 48** : étude du rôle de *jmjd-3.1* sur *cog-1* en comparaison à la souche contrôle (p. 162)
- Figure 49** : étude du rôle de *sel-10* sur l'expression de *cog-1* au cours de la redifférenciation (p. 164)
- Figure 50** : étude de l'expression de *cog-1* dans le double mutant *sel-10* ; *jmjd-3.1* (p. 166)
- Figure 51** : expression de *cog-1* quantifiée dans la souche *wdr-5.1* lors du début de redifférenciation (p. 168)
- Figure 52** : expression de *cog-1* quantifiée dans la souche *wdr-5.1* lors de la fin de redifférenciation (p. 169)

- Figure 53** : expression de *cog-1* quantifiée lors du début de redifférenciation au sein des différents mutants (p. 170)
- Figure 54** : expression de *unc-3* en milieu et fin de redifférenciation (p. 172)
- Figure 55** : expression de *unc-3* dans le double mutant *sel-10 ; jmj-3.1* (p. 173)
- Figure 56** : expression de *unc-3* quantifiée dans les différents mutants (p. 174)
- Figure 57** : expression de *unc-3* dans le mutant *wdr-5.1* (p. 175)
- Figure 58** : étude de l'expression de *unc-33* lors du milieu de la redifférenciation dans les différents mutants (p. 177)
- Figure 58** : étude de l'expression de *unc-33* lors de la fin de la redifférenciation dans le mutant (p. 178)
- Figure 60** : étude de l'expression de *rimb-1* au sein des différents mutants (p.180)
- Figure 61** : schéma du modèle (p.185)
- Figure 62** : modèle du rôle supposé de *cec-6* (p. 186)
- Figure 63** : Schéma de l'hypothèse du rôle du protéasome (p. 197)
- Figure 64** : Schéma récapitulatif de l'action de *sel-10* et *wdr-5.1* des gènes étudiés lors de la dédifférenciation (p. 202)
- Figure 65** : Schéma des hypothèses concernant le motif d'expression de *cog-1* au sein du mutant *jmjd-3.1* (p. 205)
- Figure 66** : Schéma du rôle des différents gènes lors l'expression de *cog-1* lors de la redifférenciation. (p. 207)
- Figure 67** : résumé des conclusions sur l'effet des différents mutants sur l'expression de *unc-3* et *unc-33*. (p. 208)
- Figure 68** : résumé des conclusions sur l'effet des différents mutants sur l'expression de *rimb-1* (p. 209)
- Figure 69** : résumé des effet de *sel-10*, *jmjd-3.1* et *wdr-5.1* sur les gènes étudiés lors de la redifférenciation (p. 210)
- Figure 70** : Schéma récapitulatif de l'étude (p. 212)

Liste des tableaux

Tableau I : matériel d'imagerie des vers (p.94)

Tableau II : liste des oligonucléotides utilisé (p.95)

Tableau III : liste des plasmides utilisés (p. 96)

Tableau IV : liste des allèles utilisé (p. 97)

Tableau V : liste des souches utilisées (p. 98)

Tableau VI : listes des potentielles cibles de SEL-10 impliquées dans la transdifférenciation (p. 121)

Tableau VII : résumé des résultats (p. 181)

Abréviations

ADN : Acide Désoxyribo Nucléique

ADNc : ADN codant

ARNm : Acide Ribo Nucléique messenger

ARNi : Acide Ribo Nucléique interférant

ARNsg :ARN « single guide) : ARN guide pour le CRISPR Cas9

cf : concentration finale

CID : Contraste interférentiel Différentiel (ou DIC en anglais)

ciPS : chimically induced pluripotent stem cell : cellules souches pluripotente

Dpy : dumpy (phénotype « petit gros »)

Ex : Extra chromosome

fp : n'est pas une abréviation : voir nomenclature.

FT: facteur de transcription

GFP : green fluorescent protein.

iPS : induced pluripotent stem cell : cellules souches à pluripotence induite.

IS : n'est pas une abréviation : voir nomenclature.

mCh : mCherry

µg / µL : microgramme / microlitre

M : molaire

mL : millilitre

me : methylation

me2 : di-méthylation

me3 : tri-méthylation

miARN : micro ARN

nt : nucléotides

ON : over night, décrit une incubation sur une nuit.

p : promoteur

PCR : polymerase chain reaction : amplification en chaîne par polymérase

PH : Pleckstrin homologie (domaine protéique)

Qsp : quantité suffisante pour

Rpm : rotation par minute

smFISH : single molecule Fluorescent *In Situ* Hybridation

SUP : système ubiquitine-protéasome

Td : transdifférenciation

Unc : uncoordinated (phénotype : non coordonné)

UV : Ultra violet

Ub : ubiquitine

Vf : volume final

Nomenclature

Le modèle de biologie *C. elegans* présente une nomenclature précise. Ainsi, les gènes sont écrits en *minuscule italique*. Exemple : *sel-10*.

Les allèles de gènes sont écrits à la suite du nom du gène concerné, entre parenthèse, toujours en minuscule italique. Les allèles sont composés de deux lettres et d'un nombre. Les lettres sont spécifiques d'un laboratoire. Il est ainsi possible de connaître l'origine de la mutation grâce à son nom. Le laboratoire de Sophie Jarriault possède les lettres *fp*. Exemple *sel-10(fp27)*.

Le promoteur d'un gène est indiqué par le nom du gène qu'il promeut suivi de la lettre « p » le tout en minuscule italique. Exemple : *col-34p*.

Chez *C. elegans*, il est possible de muter un gène au sein du génome. Mais il est également possible d'exprimer un gène de manière artificielle en l'injectant. On parle alors d'extra chromosome. Ils s'écrivent avec les deux lettres d'allèles du laboratoire (en minuscule italique) suivi de « *Ex* » en italique puis d'un numéro. Exemple : *fpEx838*. On indiquera ce que contient cet extra chromosome entre crochet (minuscule italique). Ainsi sera écrit le gène d'intérêt, son promoteur et le 3'UTR. Tous ces éléments sont séparés par deux fois deux points. Le marqueur de co-injection sera écrit à la suite dans un autre crochet. Exemple : *fpEx838 [col-34p::mCh::sel-10 cDNA::unc-54 3'UTR][odr-1::dsRed]*.

Note : le marqueur de co-injection n'apparaîtra que dans la partie matériel et méthode de cette thèse afin de faciliter la lecture. De même, il est possible que seul le nom de l'extra chromosome apparaisse (surtout dans les figures afin de faciliter leur lisibilité).
Note 2 : le 3'UTR sera toujours présent dans le plasmide, mais le même 3'UTR ayant été utilisé tout au long de ma thèse, il est possible qu'il ne soit pas explicité au cours de certaines parties de ce mémoire. Un exemple concret est montré juste au-dessus : *[odr-1::dsRed]* ce plasmide possède un 3'UTR qui n'apparaît pas. Le tableau des souches utilisées sera en revanche complet.

Grace à différentes méthodes, l'extra chromosome peut être intégré au génome. « *Ex* » devient alors « *Is* ». Exemple : *fpIs101 [col-34p::PH::GFP::unc-54 3'UTR] [odr-1::dsRed]*.

Lors de l'écriture d'un génotype, les gènes sont séparés par des points virgules s'ils sont sur des chromosomes différents. Les gènes sont classés par ordre de chromosome et selon leur localisation sur ce dernier s'ils sont liés (I ;II ;III ;IV ;V ;VI ;X). Si la position

d'un gène est inconnue (cartographie du gène impossible ou extra-chromosome) alors ce dernier sera écrit en dernier. Le numéro du chromosome peut être indiqué en chiffre romain (Note : X n'est pas le chromosome 10 mais le chromosome sexuel X). Exemple : *syIs63 IV ; sel-10 (fp27) V ; jmjd-3.1(fp15) X ; fpEx838 [col-34p::mCh::sel-10 cDNA::3'UTR][odr-1::dsRed]*.

Le nom des souches de vers est constitué de deux lettres et d'un nombre. Le tout est écrit en majuscule droite. Comme pour les allèles, les lettres sont spécifiques d'un laboratoire travaillant sur *C. elegans*. Le laboratoire de Sophie Jarriault possède les lettres IS. Exemple : IS2358.

Il peut être suivi de deux points et du génotype de la souche. De manière générale, le génotype d'une souche sera de préférence écrit afin de faciliter la compréhension.

Les protéines sont écrites en majuscule droite et si plusieurs protéines ou domaines de protéines sont fusionnés, ils seront séparés par deux fois deux points. Exemple : PH::GFP.

Les phénotypes sont composés de trois lettres dont la première est en majuscule. Exemple : Dpy correspond au phénotype « petit gros ».

Glossaire

Cellule différenciée : cellule qui possède une fonction et un état stable à travers le temps.

Une cellule différenciée peut potentiellement se diviser, mais elle ne donnera naissance qu'à des cellules de la même identité.

Cellule souche : cellule qui est capable de se diviser indéfiniment et de donner naissance à un ou plusieurs types cellulaires de cellules différenciées.

Classe I : classe de mutant présentant un défaut de PDA caractérisé par un arrêt de la transdifférenciation lors de la dédifférenciation ou avant. Ce défaut est observable par la présence de trois cellules épithéliales dans le plan antérieur ventral du rectum.

Classe II : classe de mutant présentant un défaut de PDA caractérisé par un arrêt de la transdifférenciation lors de la redifférenciation. La cellule Y a migré antérieurement du rectum, seules deux cellules sont présentes dans le plan antérieur ventral.

Classe III : classe de mutant présentant un défaut de classe I et de classe II au sein de sa population.

Dédifférenciation : perte d'une identité cellulaire différenciée qui élargit l'ensemble des destins cellulaires possibles.

Etat cellulaire : « un état cellulaire est atteint quand le transcriptome du réseau d'expression des gènes est stable. Une population de cellule est homogène au sein d'un même état quand leur transcriptome est similaire. Le développement est caractérisé par un ensemble d'états cellulaires menant à un destin spécifique (cellule différenciée). »(Moris et al., 2016)

Expression : l'expression d'un gène correspond au taux de transcription et/ou de traduction de ce gène, suivant l'observation réalisée. Ainsi, l'expression d'un gène peut être assimilé à l'ensemble des transcrits d'une cellule. Cette définition n'est pas universelle mais sera appliquée au cours de ce travail.

Gène maître : gène nécessaire et suffisant pour permettre

Pluripotence : état cellulaire définissant une cellule capable de donner naissance à l'ensembles des types cellulaires formant un individu à l'exception des types cellulaires formant les annexes extra-embryonnaires.

Redifférenciation : obtention d'une nouvelle identité cellulaire après avoir subi une étape de dédifférenciation.

Reprogrammation : changement d'identité cellulaire pour quitter un état différencier ou un destin cellulaire précis. Ce changement peut se faire de manière direct (il sera

alors associé à la transdifférenciation) ou se faire dans le cas d'une reprogrammation pluripotente. La cellule reprogrammée passera alors par un état de cellule pluripotente avant d'obtenir une nouvelle identité cellulaire.

Transdifférenciation : changement d'état cellulaire d'une cellule différenciée en un autre type cellulaire, phénotypiquement différent sans intermédiaire pluripotent stable.(Christoforou et al., 2017; Zuryn et al., 2012)

Totipotence : Capacité d'une cellule à donner naissance à la totalité des types cellulaires possibles au sein d'un individu. Y compris les annexes extra-embryonnaires qui ne sont pas comprises dans les destins cellulaires d'une cellule pluripotente.

Unipotence : cellule qui ne peut donner naissance qu'à un seul type cellulaire différencié.

Introduction

Introduction

1. Plasticité cellulaire

Le développement d'un individu pluricellulaire se fait à partir d'une seule cellule qui, à elle seule, va permettre de donner naissance à toutes les cellules de l'organisme.

Cette cellule œuf se divise et restreint son potentiel cellulaire* jusqu'à donner naissance à des cellules complètement différenciées aboutissant en un organisme pluricellulaire complexe. Au cours de ce processus de développement, la cellule zygotique totipotente* se divise et se différencie, passant par différentes identités cellulaires. L'une des premières étapes de ces transitions au cours desquelles le potentiel cellulaire se restreint correspond au passage des cellules totipotentes en cellules pluripotentes*. Ces dernières seront capables de donner naissance à tous les types cellulaires d'un organisme (à l'exception des annexes extra-embryonnaires, que seules les cellules totipotentes produisent). Puis, les cellules deviennent multipotentes* et donneront naissance à un nombre plus restreint de types cellulaires tels que les cellules souches hématopoïétiques (à l'origine, entre autres, de toutes les cellules du sang). Lors d'une dernière étape de différenciation (division asymétrique), les cellules souches multipotentes deviennent unipotentes* ou directement différenciées. Une division asymétrique est une cellule qui se divise, donnant naissance à deux cellules filles différentes. Ces deux identités peuvent être différentes de l'identité de la cellule mère. Mais dans la majorité des cas, une des cellules renouvelle l'identité de la cellule mère alors que l'autre cellule fille devient différenciée.

Ces observations sont réalisées depuis les débuts de la biologie du développement (XVII^{ème} siècle-bien qu'elle intéresse les savants et philosophes depuis l'antiquité) avec notamment les recherches de Caspar Friedrich Wolff. Ce scientifique prussien a étudié le développement embryonnaire du poussin, décrivant les différentes étapes du développement. Il a démontré l'hypothèse de l'épigénèse. Impliquant que lors de l'embryogénèse, les organes se forment les uns après les autres. Cette hypothèse est proposée pour la première fois par Hippocrate puis reprise par Aristote. Opposée à cette hypothèse, il y a la préformation. C'est l'idée selon laquelle les individus sont préformés dans l'œuf et ne font que grandir en taille, défendue par Lazzaro Spallanzani et proposée

par Aristote qui l'avait pensée mais pas défendue. L'une des images les plus connues de la préformation est celle de l'homonculus (Figure 1).



Figure 1 : Schéma d'un spermatozoïde humain selon la théorie de la préformation.

Dans son étude, C.F. Wolff montre que le développement est composé de différentes étapes au cours desquelles les organes se différencient les uns après les autres à partir de feuilletts embryonnaires. Ces observations annihilent définitivement l'hypothèse de la préformation, montrant que l'embryon n'est pas un organisme miniature qui grandira. Ces observations précises ont soulevé plusieurs questions majeures : i) A partir de quand une cellule est-elle engagée dans son destin cellulaire ? ii) Comment la différenciation cellulaire est-elle contrôlée ? iii) Cette spécialisation cellulaire est-elle irréversible ? Si non, quels sont les mécanismes qui permettent une inversion du destin cellulaire, et peuvent-ils exister naturellement ou être induits ?

1.1. Spemann et Mangold

Spemann et Mangold ont voulu connaître à partir de quel moment une cellule est programmée vers son destin et si certaines cellules pouvaient influencer le destin de leurs voisines.

Historiquement, les expériences de Spemann et Mangold sur le triton ont permis de démontrer que le destin d'un ensemble de cellules pouvait être changé si leur environnement était modifié (spemann, 1924). Plus précisément, Spemann et Mangold ont réalisé une expérience de transplantation entre deux embryons d'espèces de tritons différents. Leur pigmentation était différente, permettant de distinguer l'origine des cellules. Découpant une zone supérieure latérale de la lèvre blastoporale, zone apparaissant lors de la gastrulation et de la mise en place de l'archentéron, ils ont transplanté ce morceau d'embryon sur la face ventrale de l'autre embryon. Après développement, ils ont observé

l'apparition de deux crêtes neurales, formant par la suite deux tritons siamois rejoints par leur ventre. En termes de développement, deux dos se sont complètement formés. Spemann et Mangold ont montré que le destin cellulaire « ventral » des cellules de l'embryon greffé avait changé pour devenir « dorsal ». En effet, ils ont observé l'apparition de deux plaques neurales et ont montré que les cellules formant la plaque neurale supplémentaire ne provenaient pas exclusivement du greffon, mais également des cellules de l'hôte (figure 2).

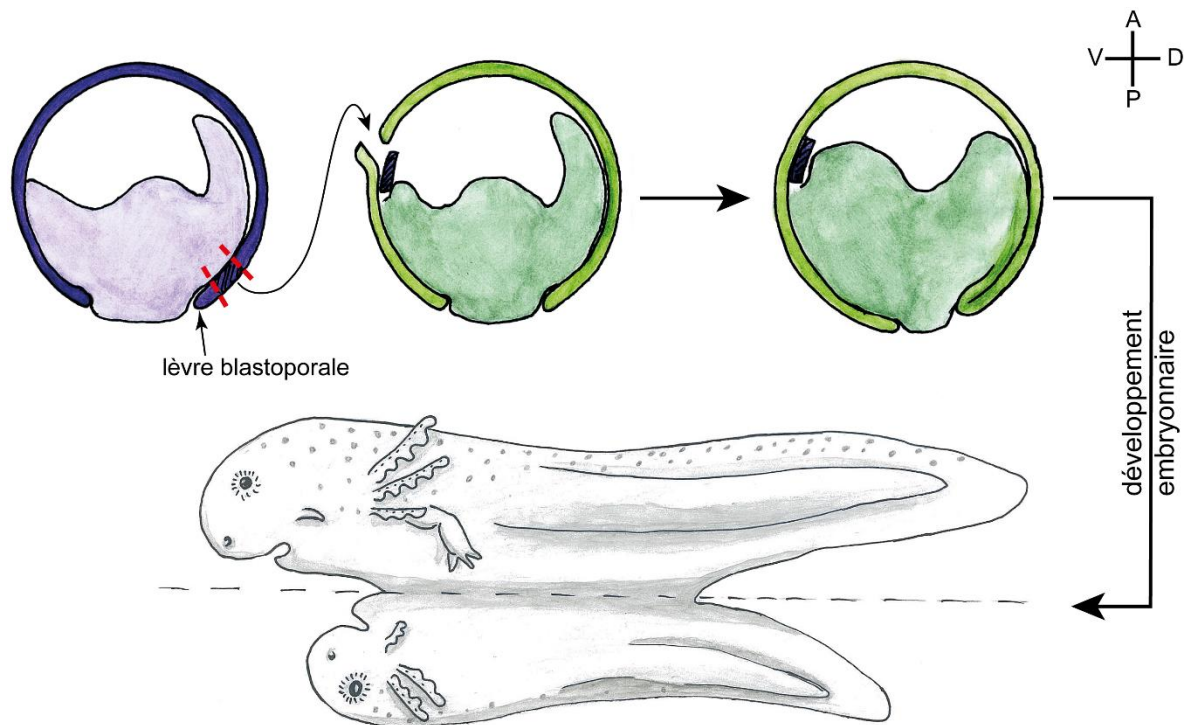


Figure 2 : Schéma de l'expérience de Spemann et Mangold. La section supérieure de la lèvre blastoporale est greffée d'un embryon légèrement plus développé (violet) sur la face ventrale d'un autre embryon (vert). Le développement embryonnaire de l'embryon greffé continue jusqu'à donner deux tritons siamois, rejoints par leur ventre. Le schéma est adapté de la publication de Spemann et Mangold (spemann, 1924) ainsi que du livre de cours (Raven, 2007). A/P Antérieur/Postérieur ; D/V : Dorso/ Ventral

Cette découverte majeure a mis en évidence que des signaux cellulaires sont transmis par certaines cellules, modifiant l'environnement de cellules proches dont le développement doit être déterminé. Cet environnement, aussi appelé « niche », regroupe à la fois l'ensemble des signaux cellulaires émis par des cellules voisines et reçus par la cellule d'intérêt (hormones, ...), des connexions physiques entre les cellules, et des éventuelles tensions mécaniques auxquelles pourrait être soumise la cellule souche.

En résumé, Spemann et Mangold proposent un modèle selon lequel certaines cellules influenceraient le destin cellulaire des cellules voisines. Ces dernières répondent

aux variations de leur environnement en modifiant leur fonctionnement en conséquence. De plus, le destin cellulaire est déterminé avant que la cellule ne présente une différenciation. On en convient donc que le destin d'une cellule dépend en partie de son environnement. Ces expériences ont permis une grande avancée dans la compréhension de la biologie du développement et vaudront à Spemann le prix Nobel en 1935.

1.2. Gurdon

Cependant, la découverte de Spemann ne permet pas de comprendre comment les cellules qui induisent le changement identitaire d'autres cellules se sont elles-mêmes spécialisées et différenciées. A cette époque, deux hypothèses s'opposent. D'un côté, il y a l'idée selon laquelle l'ADN serait spécifiquement dégradé au cours de la différenciation cellulaire. De l'autre côté, il y a l'hypothèse selon laquelle seules certaines parties de l'ADN seraient lues et que d'autres parties seraient spécifiquement ignorées. L'enjeu entre ces deux hypothèses était de savoir si oui ou non, l'identité cellulaire pouvait être inversée, mais également de mieux comprendre quels pourraient être les mécanismes impliqués dans la différenciation cellulaire. C'est avec la volonté de répondre à cette question que Gurdon fait des expériences de transplantation nucléaire chez *Xenopus laevis* (Gurdon et al., 1958). Cette technique avait déjà été réalisée par T. King et R. Briggs sur la grenouille *Rana pipiens*. Ces auteurs avaient transplanté des noyaux de cellules embryonnaires dans une cellule zygotique énuclée (King and Briggs, 1955).

Dans la continuité des travaux de King et Briggs, l'idée de Gurdon était de prendre le noyau d'une cellule différenciée et de l'implanter dans une cellule zygotique préalablement énuclée, puis d'observer son développement (figure 3). Si la cellule totipotente perdait du matériel génétique afin de devenir une cellule différenciée, alors le noyau d'une telle cellule serait incapable de donner un autre type cellulaire que le sien. Par conséquent, la cellule zygotique avec un noyau de cellule différencié serait incapable de permettre le développement embryonnaire d'un individu. A l'inverse, si la cellule ne perdait pas d'ADN au cours du développement, alors les facteurs présents dans la cellule zygotique devraient être suffisants pour permettre la réinitialisation de la lecture de l'ADN, et ainsi un développement embryonnaire complet. En effet, l'ADN n'est pas transcrit avant un certain nombre de divisions cellulaires (4 chez le Xénope), car le zygote utilise les ARN messagers présents dans le cytoplasme. Ces ARNm proviennent de l'ovocyte et sont

essentiels pour les premières étapes du développement embryonnaire (Raven, 2007). L'expérience réalisée par Gurdon permet d'obtenir deux conclusions principales. Premièrement, il n'y a pas de perte d'ADN, que donc le génome est lu séquentiellement. Deuxièmement, les éléments contenus dans le cytoplasme de la cellule zygote sont suffisants pour permettre la reprogrammation d'un noyau différencié et le développement complet (capable de reproduction) de l'individu à partir d'un noyau de cellule différenciée.

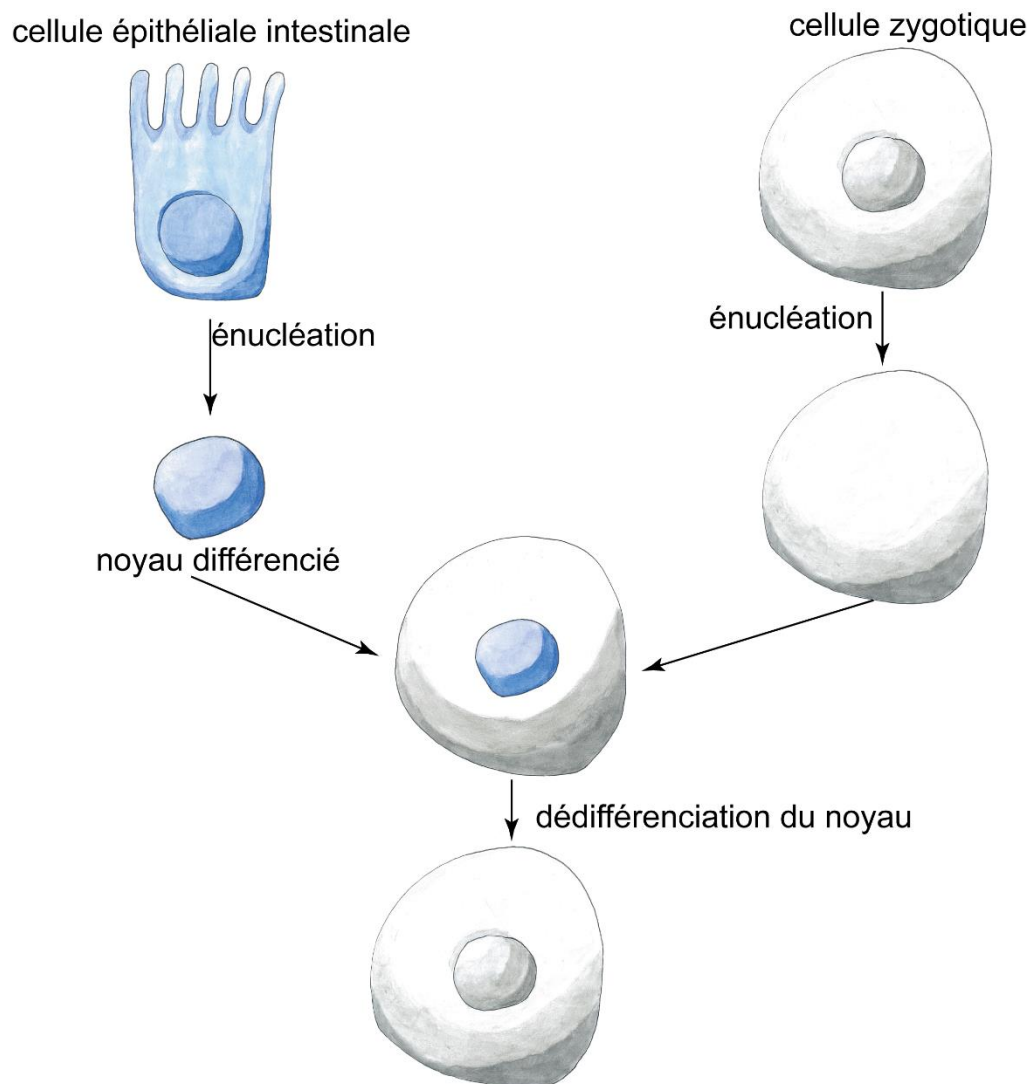


Figure 3 : schéma de l'expérience de transfert nucléaire de Gurdon. Un noyau de cellule intestinale est transféré dans une cellule zygote énucléée. Le développement embryonnaire se fait normalement et le noyau différencié se dédifférencie.

Cette découverte est un bond majeur dans la compréhension du développement et des mécanismes gérant la différenciation. Cela démontre que le destin cellulaire d'une

cellule différenciée n'est pas irréversible, ouvrant la voie pour des recherches sur le clonage et la médecine régénératrice. Cette technique de transfert nucléaire donnera naissance à la bien connue Dolly, en 1997 (Wilmut et al., 1997) qui est le premier grand mammifère cloné. En transplantant un noyau de cellule différenciée d'une brebis blanche (glande mammaire) dans une cellule zygotique d'une brebis noire, Wilmut *et al.* ont obtenu un mouton blanc après gestation par la brebis noire.

Les conclusions de Gurdon ont également été à la base des recherches sur l'induction du changement d'identité cellulaire *in vitro* (Davis et al., 1987; Takahashi and Yamanaka, 2006; Taylor and Jones, 1979). Ces recherches seront détaillées plus tard dans cette introduction.

1.3. Le paysage de Waddington

Le développement de la cellule œuf et sa différenciation au cours de l'embryogénèse (et du développement en général) peuvent être visualisés comme le trajet d'une bille dévalant une pente vallonnée. Plus la bille est en altitude, plus son potentiel de différenciation est important. Ce potentiel correspond au nombre de chemins accessibles. En effet, tous les embranchements de vallons sont encore devant elle. A l'inverse, plus l'altitude est faible, plus le potentiel est restreint (FIG.4A et B). Cette métaphore du développement a été proposée par Waddington pour la première fois en 1939 (Waddington, 1939). Il perfectionnera son modèle en 1942 puis 1957 (Waddington, 1942, 1957) à la lumière des nouvelles avancées en biologie du développement. Mais Waddington décrit un paysage qui n'est pas stable. Ce dernier peut être modifié : certains destins cellulaires peuvent être privilégiés par rapport à d'autres. Des facteurs peuvent influencer la morphologie du paysage, le faisant varier. Dans un cas la pente d'un vallon peut être plus importante, les crêtes l'entourant plus ou moins prononcées. Les facteurs permettant ces modifications sont appelés par Waddington « épigénétiques ». Il s'agit de l'ensemble des facteurs reçus par la cellule de la part de son environnement, mais également de l'ensemble de l'influence des gènes les uns sur les autres c'est à dire des marques sur l'ADN (et autour : histones) qui régulent l'expression des gènes. Aujourd'hui l'étude de ces marques tient une part importante dans la recherche sur le développement et la reprogrammation cellulaire, et est devenue une branche de la génétique : l'épigénétique (Qin et al., 2016).

Le paysage de Waddington peut être utilisé pour visualiser les reprogrammations cellulaires qui ont lieu au cours du développement. Deux cas sont extrêmement intéressants : il s'agit des cas de la transdifférenciation* et de la reprogrammation par étape de pluripotence*. La transdifférenciation correspond au changement d'identité d'une cellule différenciée en un autre type cellulaire différencié. Les travaux de Davis ont montré que certaines crêtes n'étaient pas infranchissables par la cellule alors qu'elle a atteint une identité différenciée (FIG.4D). Dans son expérience Davis induit un changement d'identité directe d'une cellule de fibroblaste à un cardiomyocyte. Les détails de ce changement d'identité seront présentés ultérieurement. Le deuxième cas représente la capacité de la cellule à « remonter la pente » de la différenciation pour revenir à un état naïf (FIG.4C). Ce mécanisme permet à la cellule d'entamer un nouveau processus de différenciation qui l'emmènera à une potentielle identité différente et sera également décrit ultérieurement.

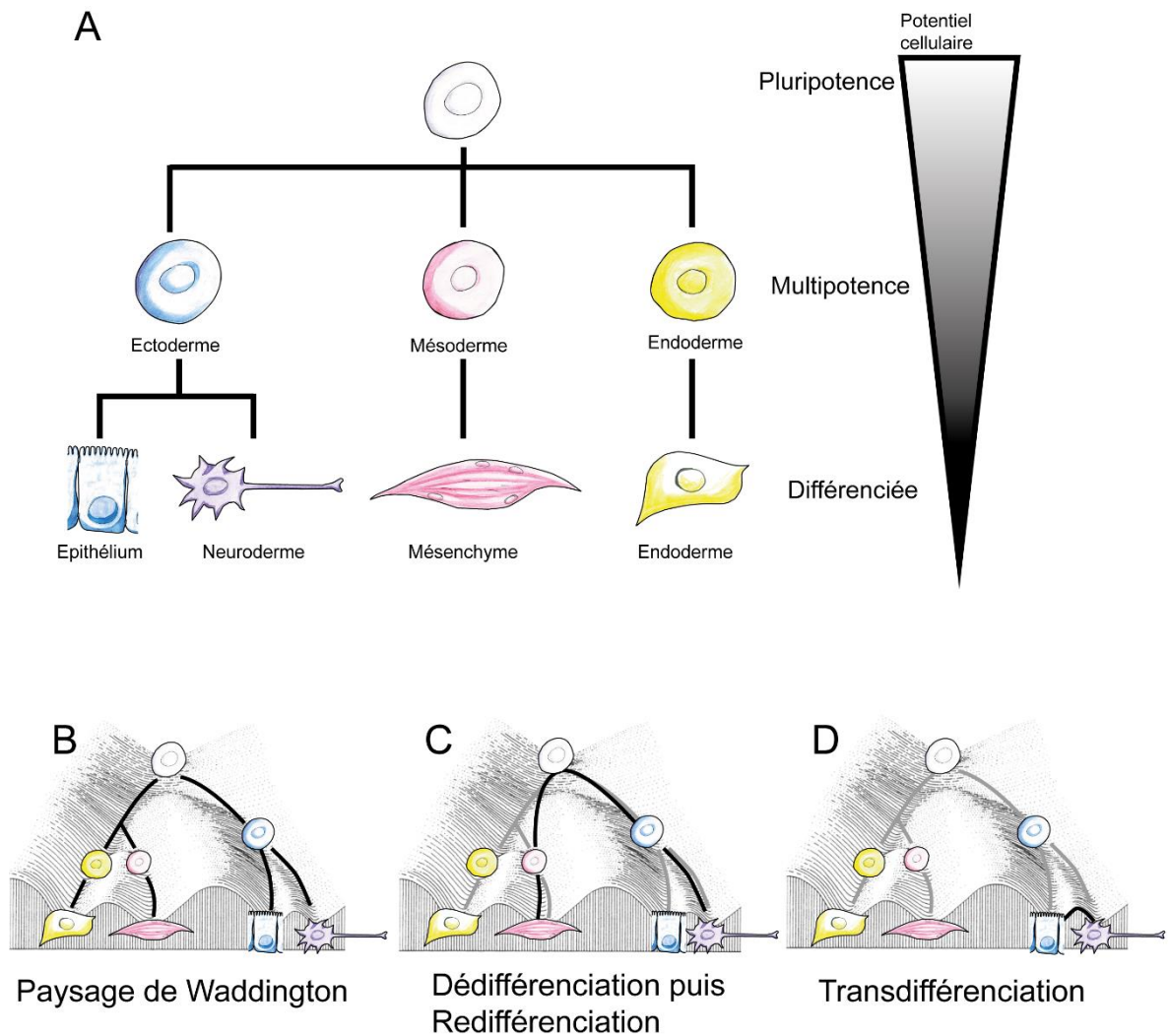


Figure 4 : **A)** représentation du potentiel cellulaire. La cellule pluripotente en blanc restreint son potentiel, se différenciant en cellule multipotente **B)** Description du paysage de Waddington où la cellule dévale une pente en se différenciant, adapté de la publication de Waddington (Waddington, 1942). **C)** Représentation de la dédifférenciation puis Redifférenciation, notamment réalisé dans le cas de cellules pluripotentes induites. **D)** schéma de la transdifférenciation, la cellule ne gagne pas de potentiel cellulaire intermédiaire.

C'est à la lumière de ces découvertes que certaines équipes se sont attelées à la quantification du paysage de Waddington. En effet, ce sont des gènes qui sont impliqués dans le destin cellulaire et sont responsables des embranchements « choisis » par la cellule. De plus, de récentes études montrent que la facilité qu'à une cellule pour changer d'identité est variable d'un type cellulaire à l'autre (Guo et al., 2014; Sinagra and Fabris, 2016). C'est à partir de ces constatations et de l'avancée des techniques d'analyse du transcriptome que certaines équipes ont réussi à quantifier le paysage de Waddington. Ceci a permis de multiples avancées telles que : la quantification de boucles de régulation entre deux gènes

déterminant un destin cellulaire par rapport à un autre (Bhattacharya et al., 2011), ou encore la meilleure compréhension de ce qui définit l'identité cellulaire (Efroni et al., 2015; Li and Wang, 2013; Moris et al., 2016).

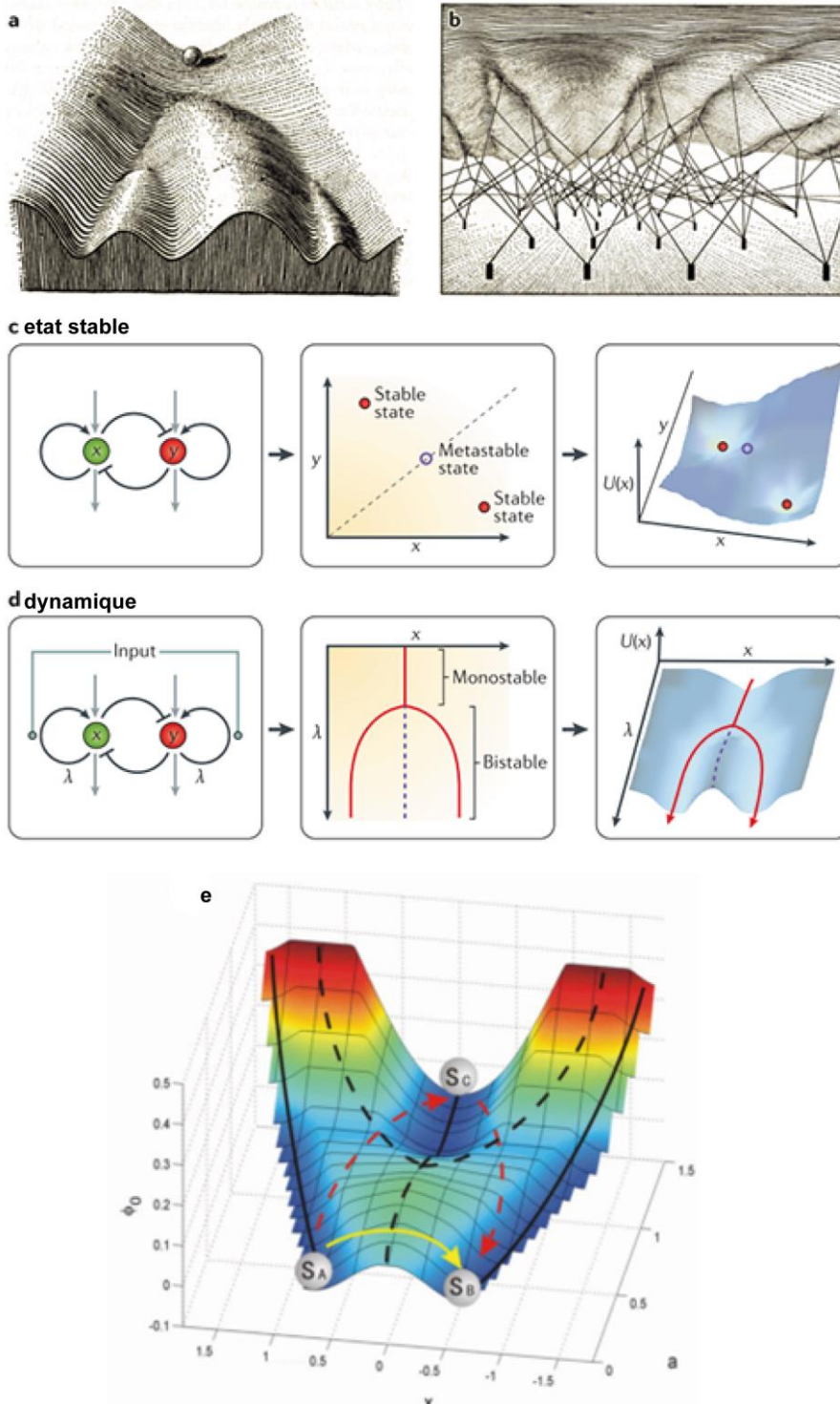


Figure 5 : **a)** et **b)** représentent le paysage de Waddington tel qu'il a été dessiné par Waddington. La représentation **b)** décrit l'action des gènes sur la morphologie du paysage de Waddington. **c)** représente la quantification génique réalisés sur deux gènes s'inhibant mutuellement et donnant lieu à la formation de deux identités cellulaires et un état cellulaire transitoire, instable. **d)** décrit l'interaction entre deux gènes s'inhibant mutuellement mais dont l'expression dépend d'un ou plusieurs facteurs (génétique ou épigénétique). Dans ce cas, le passage d'une identité cellulaire à l'autre n'est plus possible par une identité transitoire mais par une modification de la balance de l'expression des gènes (input). **e)** représente une nouvelle version du paysage de Waddington, S_c correspond à l'identité cellules pluripotentes. S_a et S_b sont deux identités de cellules

différenciées. La flèche jaune représente la transdifférenciation et les flèches rouges en pointillé représentent la dédifférenciation à un état de pluripotence puis la redifférenciation. Les figures **a**, **b**, **c)** et **d)** sont issues de la publication de Moris (Moris et al., 2016). La figure **e)** est issue de Xu (Xu et al., 2014).

L'aspect épigénétique a pu être quantifié. Ce dernier peut se traduire par la capacité qu'a un facteur de transcription pour se fixer à sa région d'intérêt. L'ADN est une molécule enroulée autour de protéines appelée histones. Ces histones possèdent une queue qui va pouvoir changer de conformation en fonction des modifications qui lui sont apportées. De cette conformation dépendront 2 choses.

La première est que certaines protéines sont spécialisées dans la reconnaissance de certaines modifications de queue d'histones. Ces protéines sont chargées du changement de conformation de la chromatine ou de la transcription des gènes, par exemples.

La deuxième implication d'une modification d'histones est que la conformation de cette dernière va pouvoir agir de manière directe ou non sur la capacité d'un facteur de transcription à se fixer à une séquence d'ADN. Le facteur de transcription reconnaît une séquence d'ADN et se fixe à cette dernière pour former le complexe d'initiation de transcription. Cependant, cette protéine n'est pas fixe sur l'ADN, et l'affinité qui existe entre la protéine et l'ADN dépend des modifications d'histones. Cette dernière variable peut être modélisée et quantifiée afin de connaître les effets d'une telle modification d'affinité sur l'identité cellulaire.

Le paysage de Waddington avait été proposé pour illustrer ce qui se passait *in vivo* au cours du développement et les différents types de reprogrammation cellulaire qui sont décrites ci-après.

2. Reprogrammation cellulaire

Grace aux travaux de Spemann, Mangold et Gurdon, la propriété plastique des cellules est démontrée.

L'étude de la reprogrammation cellulaire (le fait qu'une cellule change de voie par rapport à celle à laquelle elle était destinée) est un vaste domaine : induire le changement d'identité cellulaire, ou observer une reprogrammation naturelle *in vivo*, sont deux choses différentes.

On distinguera donc : d'une part la reprogrammation naturelle de la reprogrammation induite par un expérimentateur (cette dernière pouvant être réalisée *in vivo* et *in vitro*.); et d'autre part, la reprogrammation directe (appelée transdifférenciation) de l'indirecte (la cellule est passée par un état de pluripotence avant d'obtenir une nouvelle identité).

2.1. Reprogrammation induite *in vitro*

2.1.1. Transdifférenciation (Davis)

Changer l'identité d'une cellule *in vitro* permet de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la transdifférenciation, le contrôle de l'environnement étant plus précis qu'*in vivo*. En utilisant un petit composé chimique (5-azacytidine, seul) sur une culture de fibroblastes, Taylor et Jones (1979) réussissent à induire le changement d'identité cellulaire des fibroblastes en myoblastes. A l'époque, l'équipe ne comprend pas encore le processus cellulaire à l'origine du changement. Il faudra attendre 1982 pour comprendre que la molécule avait inhibé une méthyl-transférase, modifiant ainsi l'expression d'un ensemble de gènes (Jones and Taylor, 1980; Taylor and Jones, 1982). En 1987, Davis *et al.* démontrent que seul un gène est nécessaire et suffisant pour induire ce changement d'identité : myoD. Cette découverte extrêmement importante montre que l'identité cellulaire peut se jouer sur l'expression d'un seul gène, qui à lui seul va conduire à un changement d'identité cellulaire précis (Davis et al., 1987). C'est la première description de la transdifférenciation*, le changement d'identité cellulaire d'une cellule différenciée (ici les fibroblastes) en un autre type cellulaire différencié (ici des cellules musculaires).

Aujourd'hui ces découvertes ont ouvert un grand nombre de champs de recherches d'une part dans la compréhension des mécanismes impliqués dans la reprogrammation cellulaire et d'autre part dans les potentielles applications thérapeutiques ciblant l'identité cellulaire.

2.1.1.1. Utilisation de petites molécules

Historiquement, c'est dans un premier temps l'utilisation de petites molécules qui ont permis la reprogrammation des fibroblastes en cellules musculaires. Les petites molécules permettent de modifier le motif d'expression des gènes et de changer le destin cellulaire, y compris celui d'une cellule différenciée (Batty et al., 2016; Taylor and Jones, 1982). Dans l'exemple de la 5-azacytidine, le changement direct d'identité d'une cellule était possible, aboutissant à une cellule musculaire en augmentant l'expression du gène *myoD*.

De récentes études montrent que l'utilisation de ces molécules peut induire l'expression de gènes clés et ainsi augmenter l'efficacité du changement d'identité, y compris pour permettre une dédifférenciation (Christoforou et al., 2017). Ces molécules agissent principalement en inhibant certaines enzymes au cours du processus (Christoforou et al., 2017; Jones and Taylor, 1980).

L'enjeu de l'utilisation des petites molécules est de comprendre la cascade d'évènements faisant suite à l'inhibition de la protéine cible. Dans le cas de Davis et al., mettre en évidence le gène clé du changement d'identité cellulaire a demandé le travail de beaucoup d'autres personnes en amont, de la chance et une observation précise de ses échantillons. Seul un gène était clé pour le changement d'identité. Cependant, ce dernier n'était pas le seul dont l'état avait été modifié et comprendre si et comment ces modifications ont pu (ou non) agir sur la reprogrammation est quelque chose de difficile à réaliser, surtout dans une population cellulaire *in vitro* qui n'est pas toujours homogène. De plus, les milieux cellulaires sont souvent composés de sérum bovin, contenant certains facteurs dont les effets sur la croissance cellulaire sont essentiels au changement d'identité cellulaire induit mais dont les cibles et mécanismes d'action ne sont que peu connus, élargissant ainsi la liste des gènes potentiellement impliqués dans cette reprogrammation.

L'utilisation de petites molécules dans le cadre de la recherche fondamentale est donc compliquée à cause de la difficulté de mettre en évidence les modifications directement induites par leur effet. Mais les nouvelles technologies d'analyse sont de plus en plus performantes (analyses du transcriptome au niveau de la cellule unique, ...).

Malgré cet inconvénient, les petites molécules ont un avenir dans le domaine de la reprogrammation cellulaire, et plus largement dans celui de l'identité cellulaire. Par exemple, ce type de molécules est actuellement utilisé dans la lutte contre le cancer, qui est un changement d'identité cellulaire non contrôlé. De plus, réussir à comprendre quelles

molécules modifient l'expression de quels gènes pourrait permettre de diminuer la nécessité de transférer certains facteurs de transcriptions potentiellement instables.

2.1.1.2. *La transdifférenciation par expression d'un facteur de transcription*

Davis *et al.* ont donc mis en évidence que myoD est un gène maître, nécessaire et suffisant pour induire l'identité musculaire et même reprogrammer une cellule déjà différenciée.

Depuis ces recherches, d'autres gènes ont été mis en évidence pour induire la reprogrammation d'une cellule différenciée. Certains pour induire une identité neuronale (Ascl1, neuroD1, ...) (Biswas and Jiang, 2016), d'autres sont impliqués dans la spécialisation en cellules du cœur, cardiomyocyte. Dans ce dernier cas, un cocktail de gènes est utilisé pour induire la reprogrammation (Gata4, Mef2c et Tbx5) (Chen et al., 2017). D'autres gènes peuvent être ajoutés au cocktail pour augmenter l'efficacité de la reprogrammation tel que Hand2 (Srivastava and DeWitt, 2016).

Il est également possible de reprogrammer des fibroblastes en cellule β du pancréas à l'aide d'un cocktail de facteurs de transcription (Mgn3, Pdx1 et Mafa) (Chen et al., 2017).

Cette petite liste n'est qu'un aperçu de toutes les reprogrammations directes qui ont pu être réalisées *in vitro*. Je n'en ferai pas de liste exhaustive, mais soulignerai avec intérêt que bien que les cellules de fibroblastes soient des cellules souvent utilisées, parce que faciles à maintenir en culture (entre autres raisons), il ne s'agit pas du seul type cellulaire capable de reprogrammation. Les cellules pro-B sont souvent reprogrammées pour donner des cellules de la lignée hématopoïétique (Stadtfield and Hochedlinger, 2010).

L'un des buts proposés, à long terme, pour la reprogrammation induite est de pouvoir appliquer les outils développés pour la médecine régénératrice. C'est-à-dire, induire *in vivo* le changement d'identité. Cette partie sera discutée plus tard.

2.1.2. Transition par un état de pluripotence

2.1.2.1. *Les cellules pluripotentes induites (iPS)*

L'expérience de Davis ne montre pas de dédifférenciation, la cellule n'est pas retournée à un état naïf pour reprendre une autre identité cellulaire différenciée, on parle alors de transdifférenciation. Il faudra attendre les travaux de Tanaka et Yamanaka pour qu'une cellule perde son identité cellulaire et retourne à un état naïf pluripotent. C'est la découverte des cellules souches à pluripotence induite (iPS) (Takahashi et al., 2007; Takahashi and Yamanaka, 2006). Dans leurs travaux, ils démontrent que la transfection de 4 facteurs de transcription est nécessaire et suffisante pour induire le changement d'identité cellulaire passant d'une cellule différenciée (fibroblastes) à un état de cellule souche pluripotente. Les quatre facteurs, appelé cocktail de Yamanaka sont : c-Myc ; Klf4 (remplaçant Nanog initialement utilisé dans l'étude de 2006), Oct3/4 et Sox2. Ils déclenchent une cascade d'évènements et de remaniements du profil transcriptionnel cellulaire qui vont induire le changement d'identité. Depuis cette étude révolutionnaire pour le domaine, de meilleurs techniques de transmission des transgènes ont été mis au point pour permettre la dédifférenciation de cellules différenciées (retour au stade de pluripotence). L'efficacité de la reprogrammation de cellules en cellules iPS se traduit par le pourcentage de cellules capables de garder une identité pluripotente, malgré un nombre de passages important. Parallèlement, de nouvelles méthodes ont également vu le jour pour diriger la différenciation. (Graf, 2011)

Les cellules iPS ont la particularité de pouvoir être maintenues dans cet état de pluripotence (elles vont se diviser et garder leur état indifférenciées). Il est également possible d'induire une redifférenciation aboutissant à de nouveaux fibroblastes ou à d'autres types cellulaires tels que des neurones (Maury et al., 2015) ou des cellules cardiaques (Ribeiro et al., 2015), mais aussi vers des types cellulaires multipotents comme des cellules souches hématopoïétiques (Kambal et al., 2011)). Ces expériences ont permis de démontrer la plasticité dont étaient capables les cellules différenciées : l'identité d'une cellule n'est pas fixe et est soumise à l'expression de ses facteurs de transcription.

2.1.2.2. *Les applications de l'utilisation des cellules iPS*

Cette nouvelle identité cellulaire induite *in vitro* ouvre la porte à la médecine régénératrice. Les nouvelles cellules obtenues à partir des iPS du patient peuvent être réimplantées sans se soucier de la compatibilité avec le système immunitaire et donc s'affranchir d'un possible rejet de greffe. Comme ce fut le cas au Japon en 2014 lors de la première implantation de cellules épithéliales de rétines issus d'iPS, démontrant ainsi l'applicabilité clinique de cette technologie et permettant aux scientifiques de faire des pronostics sur l'utilisation des iPS dans les prochaines années (Li and Izpisua Belmonte, 2016).

Takahashi et Yamanaka ont transfecté des fibroblastes avec une série de gènes connus pour induire et maintenir la pluripotence dans les cellules somatiques. Cette expérience se base sur les données issues d'études sur les cellules souches embryonnaires et sur la fusion entre les cellules somatiques et souches embryonnaires (Takahashi and Yamanaka, 2006).

Les cellules souches embryonnaires sont des cellules dérivées de la masse interne des blastocystes et sont également présentes dans le cordon ombilical. Elles peuvent donner naissance à tous les types cellulaires dérivants du mésoderme, de l'ectoderme ou de l'endoderme. Ce sont donc des cellules pluripotentes, et qui peuvent être maintenues dans cet état *in vitro* (Hanson et al., 2017). De plus, lorsqu'une cellule somatique (différenciée) est fusionnée à une cellule embryonnaire, le noyau de la cellule différenciée est reprogrammé et devient pluripotent, signifiant que l'état de pluripotence surpasse celui de différencié (Malinowski and Fisher, 2016). Les études réalisées sur ces deux modèles ont permis de mettre en évidence des gènes induisant la dédifférenciation et essentiels pour le maintien de cette identité au cours du temps. C'est selon ces critères que Takahashi et Yamanaka ont choisi Klf4, Oct3/4 et Sox2. Pour ce qui est de c-Myc, il provient de l'observation des facteurs qui sont fréquemment surexprimés dans les cellules cancéreuses. L'idée derrière ce choix est que les cellules cancéreuses sont des cellules différenciées qui perdent leur identité, entrent en cycle cellulaire non contrôlé et maintiennent cette identité nouvelle. L'étude des gènes impliqués dans la cancérogénèse permet d'une part de découvrir les mécanismes liés à la perte d'identité cellulaire (gènes surexprimés) et d'autre part les mécanismes liés au contrôle de cette identité (gènes diminués). Bien évidemment, une cellule cancéreuse n'est pas qu'une cellule changeant d'identité. C'est une cellule qui

échappe aux contrôles internes permettant la régulation à la fois du cycle cellulaire, de l'expression de gènes, de réparation de l'ADN. Mais l'étude du transcriptome cancérigène donne des pistes sur de nouveaux gènes.

Une fois les cellules pluripotentes obtenues, il est possible de les redifférencier en induisant l'expression de gènes connus pour être des dirigeants du destin cellulaire. Par exemple, le gène *myoD* déjà cité précédemment avec l'expérience de Davis (Davis et al., 1987). Il y a également *neuroD1* qui va induire le changement d'identité en neurones (Guo et al., 2014). Ce dernier est souvent ajouté à un autre facteur (*Ascl1*) afin de diriger la différenciation neuronale (Guo et al., 2014). Ainsi, les gènes maîtres permettent non seulement la transdifférenciation comme énoncé dans la partie précédente, mais également la redifférenciation de cellules pluripotentes en cellules différenciées.

Depuis les travaux de Takahashi et Yamanaka des variations du cocktail utilisé pour la dédifférenciation ont été mises au point pour augmenter l'efficacité de la dédifférenciation. L'objectif est d'augmenter la proportion de cellules perdant leur identité différenciée. C'est aussi d'augmenter la robustesse afin de permettre la culture et la conservation des cellules iPS dans un état pluripotent. On considère qu'une bonne lignée iPS doit pouvoir subir plus de 30 passages sans perdre son identité de cellule pluripotente (communication personnelle, Quentin Muller)

Réussir à obtenir tous les types cellulaires présents chez un individu représente un enjeu capital pour la médecine régénératrice. Cependant, changer le profil d'expression d'une cellule en surexprimant certains gènes peut modifier la balance de la cellule, puisque l'utilisation de gènes impliqués dans la formation de tumeur est toujours nécessaire. Bien que le cocktail de Yamanaka ait été découvert depuis dix ans, ce type de gène est toujours essentiel à la formation de cellules iPS. Cette expression induit d'importantes contraintes sur l'utilisation de cette technique à des fins thérapeutiques. Mais l'expression de gènes impliqués dans la formation de tumeurs n'est pas le seul problème des cellules iPS reprogrammées. En effet, ces dernières ne sont pas stables et leur destin cellulaire peut varier, y compris après une redifférenciation complète. Cela représenterait un risque non négligeable pour la santé d'une personne traitée avec des cellules iPS reprogrammées. De plus, la transfection des facteurs de transcription en utilisant des rétrovirus ne permet pas de contrôler la localisation génomique de l'insertion de ce facteur, et est plus efficace quand les cellules sont en cours de division. Ce fait est un problème pour plusieurs raisons.

Premièrement, cela rend difficile la quantification de l'efficacité du processus de reprogrammation et le suivi des cellules tout au long de ce processus. Deuxièmement, l'induction de division cellulaire est un risque supplémentaire de génération de cancer (Richard et al., 2011).

Grâce à la technique de mutagenèse dirigée CRISPR-Cas9, il est possible de cibler le locus d'insertion du gène et d'en cibler plusieurs à la fois (Zhou et al., 2014). Cette technique permet de diriger l'insertion d'un gène au sein du génome grâce à une protéine endonucléase (Doudna and Charpentier, 2014). Une méthode variante de ce domaine existe pour réguler l'expression de gène ciblé. Dans cette technique, la protéine a été modifiée en inactivant son domaine catalytique et en la fusionnant à un domaine d'activation d'expression permettant la surexpression de gènes cibles (Fay, 2006).

Ce système rend donc difficile la compréhension et l'étude des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans le changement d'identité. Il semble difficilement viable en tant que solution pour la médecine régénérative. Mais avec les nouvelles techniques, telles que les cultures 3D (Takagi et al., 2016), le CRISPR-Cas9 (Zhou et al., 2014) et les connaissances acquises depuis ces dix dernières années, des possibilités existent. On peut citer l'exemple des études pour effectuer des greffes de peau (Takagi et al., 2016), pour tenter de soigner la maladie de Parkinson (Lindvall et al., 2004; Takagi et al., 2005) ou rétablir l'intégrité du système immunitaire de patients immuno-déprimés (Brault et al., 2017). L'utilisation de cellules souches induites semble trop complexe pour être un bon modèle d'étude des mécanismes de reprogrammation. Cependant, elle a l'avantage de permettre, en laboratoire et sans utilisation de cellules souches embryonnaires, de créer tous les types cellulaires existant au sein d'un individu adulte, permettant une étude fondamentale de la notion de niche cellulaire. Il est possible de recréer dans des matrices tridimensionnelles des peaux artificielles issues de cellules iPS redifférenciées (Takagi et al., 2016), Quentin Muller, données non publiées). Suite à la création de ce genre de modèle sain à partir d'iPS, la technologie de dédifférenciation et de redifférenciation permet de modéliser des pathologies *in vitro* à partir de cellules humaines alors que seuls des modèles animaux existent pour les étudier (Gomez Limia et al., 2017).

2.2. Reprogrammation induite *in vivo*

2.2.1. Transdifférenciation

Induire une transdifférenciation *in vivo* aurait l'avantage de ne pas élargir le spectre des destins cellulaires (dédifférenciation) et donc de diminuer la surexpression de gènes cancérigènes. En effet, la surexpression d'un gène est généralement suffisante pour induire un changement d'identité cellulaire.

Par exemple, l'utilisation d'un rétrovirus permettant l'expression de *pha-4* est suffisant pour détourner *in vivo* une cellule de son identité cellulaire (blastomère *C. elegans* (Horner et al., 1998)). Ce gène est ce qu'on appelle un gène maître (Chan and Kyba, 2013). Il est nécessaire et suffisant pour induire un destin cellulaire dans une cellule différenciée ou non (Chan and Kyba, 2013). Il existe différents gènes maîtres dirigeant divers types cellulaires. Ici, *pha-4* est le gène maître du pharynx. On peut également citer NeuroD1 qui va permettre d'induire le changement cellulaire en neurones (Guo et al., 2014). Cette étude est détaillée un peu plus loin dans cette partie.

Cependant, réussir à cibler *in vivo* un groupe de cellules et à forcer leur reprogrammation est un challenge biologique nécessitant de surmonter plusieurs problèmes. Les principaux sont : Pouvoir suivre chaque cellule touchée par la reprogrammation, effectuer la vérification fonctionnelle et identitaire du nouveau type cellulaire, s'assurer de sa stabilité, ainsi que de ne pas avoir ciblé d'autres cellules du corps.

L'excellente étude de Qian *et al.* s'attelle au problème et montre une reprogrammation *in vivo* traçable et quantifiable. Lors d'un infarctus du myocarde, les fibroblastes cardiaques se divisent et migrent vers le cœur afin de « cicatriser » la blessure. Dans cette étude, les auteurs transfectent ces fibroblastes cardiaques avec les gènes *Gata4*, *Mef2c* et *Tbx5* en utilisant des rétrovirus. En ligaturant l'artère coronaire de souris, ils miment les effets d'un infarctus du myocarde, induisant la mort d'une partie des cardiomyocytes qui ne sont plus irrigués par le sang. En induisant l'expression des trois facteurs de transcription précédemment énoncés, les fibroblastes transfectés changent de destin cellulaire et deviennent des cardiomyocytes fonctionnels. Ces derniers sont capables de communication avec les cellules voisines et assurent un meilleur rétablissement de la fonction cardiaque après un infarctus du myocarde. Cependant cette technique repose sur la transfection de

cellules et reste dangereuse pour induire le changement d'identité car les gènes portés par les rétrovirus s'insèrent dans l'ADN. De plus, le site d'insertion est aléatoire, il ne peut être dirigé par l'expérimentateur et ceci présente un risque majeur pour le bon fonctionnement de la cellule. Un gène essentiel pourrait être muté par l'insertion du gène porté par le vecteur.

Des alternatives utilisant des micro ARN, des petites molécules ou encore des vecteurs différents que celui des rétrovirus pourraient être explorées (*Qian et al., 2012*). L'utilisation de ces méthodes alternatives permet d'augmenter l'efficacité de la reprogrammation cellulaire (Chen et al., 2017; Zeng et al., 2017). Cette efficacité est essentielle pour permettre une reprogrammation, mais également pour maintenir la nouvelle identité cellulaire. En effet, si la reprogrammation d'une cellule revient à changer l'identité d'une cellule, elle consiste aussi à effacer l'identité première. Cet effacement peut ne pas être complètement efficace et dans certains cas, une cellule reprogrammée, pourra retourner à son identité initiale (Hanna et al., 2010). Une reprogrammation *in vivo* vise à reprogrammer une cellule d'un seul type cellulaire en un autre type cellulaire. Cependant, il est difficile de cibler, localiser et stopper le processus de reprogrammation (Guo et al., 2014).

Un autre exemple prometteur de régénération, utilisant cette technique de reprogrammation, est celui de la régénération neuronale. Dans une étude, Guo *et al.* (Guo et al., 2014) démontrent que l'injection *in vivo* de rétrovirus, vecteur du gène NeuroD1 permet la transdifférenciation de cellules gliales en division en neurones chez la souris. Grâce à des enregistrements électrophysiologiques et un marqueur neuronal cortical Ctip2, les auteurs ont démontré que ces neurones sont fonctionnels, capables de connexions et de transmission d'information au reste du réseau neuronal du cortex somatosenseur. Ainsi, les connexions neuronales sont restaurées et il est intéressant de noter que ce changement d'identité est encore possible dans un individu âgé de 14 mois. Les auteurs démontrent que 90% des astrocytes se transdifférencient en neurones glutaminergiques et qu'une petite proportion de cellules NG2 (précurseur oligodendrocytes) sont infectées par le rétrovirus, avant de se transdifférencier en neurone gabaergique. Bien qu'aucune indication ne soit donnée sur le pourcentage de population d'astrocytes ou de cellules NG2 touchées, une augmentation significative de cellules neuronales est observée. De plus, un test cognitif pourrait être intéressant afin de savoir si une perte cognitive, due à la perte de neurones, peut réellement être inversée par cette méthode. Cependant, la preuve que ces neurones néoformés soient capables de transmettre une information au reste du réseau est

extrêmement encourageante et démontre que cette étude présente un grand intérêt pour la médecine régénératrice. En effet, les maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer pourraient être retardées ou soignées grâce à une telle méthode.

L'avenir de cette technique serait de trouver une méthode d'induction de la transdifférenciation autre que celle des rétrovirus puisque ces derniers présentent trop de risques pour être utilisés sur l'Homme à des fins thérapeutiques.

Une autre possibilité est de transplanter des précurseurs neuronaux qui vont finir leur différenciation en s'adaptant à leur environnement. La niche dans laquelle ils seront transplantés fournira les signaux nécessaires à la fois au guidage des axones, aux connexions à effectuer et à la différenciation du type de neurone lui-même (motoneurone, interneurone, neurones gabaergiques, glutamatergiques...) (Svendsen et al., 1997). Cette technique reste peu efficace puisque trop peu de cellules transplantées parviennent à finir leur différenciation (Chen et al., 2011; Li et al., 2015). Une solution pour mettre au point cette méthode, serait de mieux comprendre les mécanismes de la transdifférenciation naturelle (qui apparaît très efficace et robuste).

2.2.2. Transition par un état de pluripotence

Réaliser une reprogrammation *in vivo* implique plusieurs difficultés. L'une d'entre elles est de savoir si une reprogrammation à un état de pluripotence est seulement possible *in vivo*. Le corps entier est un environnement qui ne peut pas réellement être contrôlé et ce qui a été précédemment mis en évidence comme nécessaire pour une reprogrammation *in vitro* pourrait ne pas être suffisant *in vivo*.

Pour répondre à cette question, l'étude de Abad *et al.* a réalisé une souche mutante exprimant les facteurs Sox2, c-Myc, Klf4 et Oct4 (Abad et al., 2013). L'expression de ces facteurs intégrés au génome se fait sous contrôle d'un promoteur inductible (tTA) ubiquitaire. Ainsi après injection de doxycycline, les cellules expriment les quatre facteurs de Yamanaka. Après injection, les cellules ont montré une capacité pour la reprogrammation. Les auteurs se sont intéressés à différents organes et ont cherché l'expression de Nanog comme marqueur de reprogrammation en cellule pluripotente et l'expression de la cassette des quatre gènes. Ils ont constaté que le taux de cellules exprimant Nanog était assez faible en comparaison aux cellules exprimant le cocktail de

gènes. Mais parmi les cellules exprimant Nanog, il est intéressant de savoir que les auteurs ont trouvé des cellules iPS au sein du système sanguin. Une partie de ces cellules reprogrammées sont devenues des cellules cancéreuses de type tératomes. C'est-à-dire que leur identité a été modifiée, devenant des cellules à l'identité toute autre. Les tératomes sont connus pour contenir différents types cellulaires en leur sein (neurones, dents, ...). Lors du développement embryonnaire, ces différentes cellules sont issues des différents feuillets embryonnaires, l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme. Ceci indique que les cellules dont la reprogrammation avait été induite *in vivo* présentent réellement une fonction pluripotente.

Une deuxième étude (Choi et al., 2015), utilisant le même type de souris exprimant les quatre facteurs de reprogrammation sous contrôle d'un promoteur inductible ont ajouté un marqueur fluorescent Oct4-GFP afin de vérifier l'activation de l'expression de la cassette transgénique. L'utilisation de ce marqueur fluorescent a permis aux auteurs, Choi *et al.*, d'étudier l'identité cellulaire des cellules reprogrammées. Ils ont mis en évidence que ces cellules pluripotentes avaient des marqueurs épigénétiques proches des cellules souches embryonnaires. Ils n'ont cependant pas trouvé de preuve que ces cellules reprogrammées soient totipotentes. Ces cellules ne peuvent donner naissance à des cellules du trophoctoderme. Cependant, que ce soit *in vivo* ou *in vitro*, ces cellules sont pluripotentes, capable de se différencier dans les différents types cellulaires issus des trois feuillets cellulaires embryonnaires.

2.3. Reprogrammation naturelle

L'étude de la reprogrammation naturelle *in vivo* correspond au changement d'identité cellulaire au sein d'un organisme sans que cette reprogrammation ne soit induite par l'expérimentateur.

Ce phénomène est observé chez plusieurs organismes, la salamandre, l'axolotl, le plathelminthe, et même chez les mammifères. Différentes cellules sont capables de reprogrammation. Il existe deux contextes de reprogrammation naturelle *in vivo* observables : les reprogrammations dues à des blessures (traumatiques ou pathologiques) et les reprogrammations apparaissant au cours du développement normal.

L'étude de ces reprogrammations donne l'opportunité de comprendre comment l'identité cellulaire est modifiée tout en étant contrôlée. Comment les animaux sont-ils capables de régénération *in vivo* est une question qui anime les scientifiques depuis longtemps. Reaumur est considéré comme le père de cette discipline et avait remarqué que les écrevisses étaient capables de régénération après avoir perdu un membre après amputation (Call et al., 2005).

2.3.1. Transdifférenciation

Dans le cas de la transdifférenciation, il y a plusieurs exemples de reprogrammation cellulaire suite à une blessure. L'un d'eux est le changement d'identité des cellules α du pancréas qui se transdifférencient en cellules β en cas de perte massive de la population de cellules β . Cette Td a été décrite chez la souris (Thorel et al., 2010), et démontrée en suivant les cellules α , et en montrant que ces dernières passaient par un état de transition où les cellules expriment à la fois les marqueurs des cellules α et des cellules β .

C'est ce que proposent de faire Thorel *et al.* dans leur étude sur la régénération des cellules β dans le pancréas (Thorel et al., 2010). Grâce à une lignée de souris transgéniques, une injection de toxine diphtérique (dans des souris âgées de deux mois) permet la destruction de la quasi-totalité des cellules β du pancréas. Une observation de la régénération de ces cellules prouva à l'équipe que la perte massive et rapide de ce type cellulaire induit la formation de nouvelles cellules β . L'un des objectifs de cette étude était de trouver l'origine des cellules responsables de cette régénération. Ce qui a été réussi en utilisant différentes techniques de traçage cellulaire et ils ont ainsi démontré que les cellules pancréatiques nouvellement formées venaient des cellules α du pancréas. Ces cellules, à l'origine impliquées dans la synthèse de glucagon ont changé d'identité pour pallier au déficit en cellules β . Cette découverte est importante pour les recherches sur le diabète, car, habituellement, il n'y a pas de régénération suite à la perte de cellules β . Thorel *et al.* démontrent d'une part que seules des conditions particulières (ablation importante et rapide des cellules β) permettent l'induction d'une réponse de la part de cellule α pour entraîner la régénération, et d'autre part, que ce dernier type cellulaire est capable de transdifférenciation. On parle de potentiel de transdifférenciation. La compréhension des mécanismes sous-jacents à cette transdifférenciation est importante, car cela ouvre de nouvelles possibilités pour induire la formation de nouvelles cellules β après leur perte

suite à la maladie. Cependant ces études sont difficiles car les cellules ne sont pas accessibles et leur traçabilité reste un défi compliqué à relever.

Pour ce qui est de transdifférenciation naturelle *in vivo* ne faisant pas suite à un évènement traumatique, le ver *C. elegans* regorge d'exemples. Nous reviendrons plus en détail sur ce modèle et ces exemples.

2.3.2. Transition par un état de pluripotence

Il existe plusieurs exemples de régénération naturelle passant par un état de pluripotence. L'axolotl, le plathelminthe ou encore la salamandre sont des organismes connus pour leur capacité de régénération passant par un état de pluripotence. Par exemple, dans le cas de la salamandre, l'animal peut régénérer un membre entier si ce dernier venait à être sectionné. Les cellules qui sont au niveau de la blessure seront recouvertes d'une couche d'épiderme puis se dédifférencient en cellules pluripotentes avant de se diviser et se différencier pour former un nouveau membre (Brookes, 1997).

Comprendre comment la dédifférenciation s'effectue *in vivo* permettrait de comprendre les mécanismes moléculaires entraînant une cellule différenciée à devenir pluripotente tout en maintenant un contrôle strict de son identité cellulaire. Pour ce faire, la salamandre est un bon modèle de régénération par dédifférenciation. Aujourd'hui encore, les mécanismes permettant la dédifférenciation sont méconnus et font l'objet de plusieurs études. De même, le contrôle de la signalisation permettant la formation d'un membre opérationnel est clé dans la régulation de la redifférenciation des cellules du membre. En effet, l'extrémité d'un membre est composée de doigts, ces doigts ne sont pas tous les mêmes et la longueur du membre à régénérer est également étroitement contrôlée. La partie dorsale du membre est également différente de la partie ventrale. Ainsi, les cellules en prolifération à l'extrémité du bourgeon doivent recevoir des signaux permettant de différencier les axes du membre (proximo-distal/ antéro-postérieur/ dorso-ventral). Ces signaux vont induire les différentes identités cellulaires permettant la formation d'un membre parfaitement fonctionnel sans risque de dégénérescence cellulaire. Comprendre ces interactions géniques et les cascades de signalisation qui en découlent servirait à éviter la formation de cancer due à la surexpression de facteurs de transcriptions impliqués dans la formation de tumeur, tel que c-Myc, dont le risque a été précédemment discuté sur le

chapitre des cellules iPS. Le contrôle cellulaire effectué à la fois sur la division cellulaire, importante au moment de la régénération, et la différenciation cellulaire sont les clés fondamentales permettant l'application de cette méthode pour la médecine régénératrice. Cependant, la tâche reste très difficile. Le suivi des cellules est difficile puisque l'animal n'est pas transparent. Et étudier les différentes identités cellulaires qui se succèdent au cours du processus est complexe alors que ces cellules se divisent de manière importante et que toutes les cellules ne sont pas forcément au même stade de la régénération cellulaire.

Parmi les trois organismes modèles cités ci-dessus, seul le ver plat et transparent permet un suivi cellulaire efficace. Cependant observer les cellules n'est pas suffisant pour pouvoir étudier un processus dans son ensemble. Les outils de modification génique sont essentiels pour tester des hypothèses sur le rôle de certains gènes et pouvoir tester leur rôle au sein de la reprogrammation. Car, pouvoir modifier ou suivre l'expression d'un ou plusieurs gènes est l'outil clé du biologiste pour comprendre le rôle de ce dernier au sein du processus étudié. Il est essentiel de pouvoir exprimer des rapporteurs fluorescents, pouvoir muter spécifiquement des gènes ou encore les surexprimer. Les recherches sur le ver plat sont en cours pour réussir à débloquent ces différents outils et de bonnes pistes sont ouvertes par les cellules souches du ver plat. Ces cellules sont capables de divisions cellulaires et de donner naissance à plusieurs type cellulaires (Eisenhoffer et al., 2008). Seulement six d'entre elles sont suffisantes pour permettre la régénération d'un individu complet mourant. Cette régénération n'est possible que grâce à l'existence de gradients de concentration de protéines responsables de la formation de l'axe antéro-postérieur (Egger et al., 2006). Les cellules de l'individu nouvellement formées sont toutes issues des cellules souches. Ainsi, modifier les gènes de ces cellules permettrait d'étudier le développement d'un individu dont le génome aurait été préalablement modifié (mutants, marqueurs fluorescents, ...) (Eisenhoffer et al., 2008). Quant à l'Axolotl, il n'est pas transparent et ses capacités de régénération sont très similaires (malgré des mécanismes différents) à celles de la salamandre. Etudier ces deux organismes modèles en parallèle permet entre autres de vérifier à quel point un processus est conservé entre deux espèces.

3. Les mécanismes de reprogrammation

Nous avons vu précédemment différents exemples d'études de reprogrammation cellulaire et leurs potentielles applications pour la science et la médecine. Mais tous ces événements de reprogrammation sont potentiellement différents. Existe-il des mécanismes communs entre chaque méthode de reprogrammation et entre les types de reprogrammation eux-mêmes ? existe-t-il des types cellulaires plus enclins à la reprogrammation que d'autres ? Comment maintenir la nouvelle identité cellulaire ? Comment la diriger ?

Toutes ces questions sont clés pour comprendre la plasticité cellulaire, la reprogrammation et le potentiel intérêt pour étudier un type de reprogrammation par rapport à un autre.

3.1. Méthodes de reprogrammation

Plusieurs méthodes ont été mises en place pour induire une reprogrammation cellulaire. La plus connue est l'utilisation de virus pour induire l'expression de facteurs de transcription clés qui vont induire la perte d'un destin cellulaire et l'expression d'un nouveau transcriptome correspondant à une nouvelle identité. Cette identité peut être pluripotente (dans les cas des iPS) ou différenciée dans le cas de différenciation directe. Le ou les gènes utilisés sont les clés de l'identité nouvelle. Les gènes maîtres sont nécessaires et suffisants pour induire une reprogrammation. Ils permettent d'exprimer les gènes en aval qui sont nécessaires pour le changement d'identité. La reprogrammation en cellule pluripotente nécessite l'expression de plusieurs gènes (un minimum de quatre) et parmi ces quatre gènes trois sont responsables de l'activation de l'identité pluripotente (sox2, oct4, klf4) alors que le quatrième gène (cMyc) facilite l'accès à la chromatine pour les autres facteurs (Soufi et al., 2012). Il est possible d'induire la dédifférenciation d'une cellule différenciée en iPS à l'aide de petites molécules. L'expression de cet ensemble de facteurs de transcription conduit à l'expression successive de gènes induisant un remodelage du transcriptome et par conséquent de l'identité cellulaire. Ces étapes successives sont nécessaires pour permettre la régulation de gènes à inhiber ou exprimer pour mener à un état stable. C'est également un processus qui s'étend dans le temps et peut nécessiter plusieurs semaines. La différenciation d'une cellule pluripotente induite (iPS) ou naturelle

(cellules souche embryonnaire) se fait également par expression d'un facteur de transcription qui est souvent un gène maître ou un cocktail de facteurs de transcription. En fonction des gènes exprimés, l'efficacité du processus peut varier (Chen et al., 2017).

Un cocktail de petites molécules peut également être suffisant pour la reprogrammation de fibroblastes adultes ou embryonnaires en trois semaines de traitement. Ces molécules chimiques agissent sur différentes voies cellulaires pour permettre la reprogrammation. Souvent, les petites molécules sont impliquées dans l'inhibition de protéines liées à l'épigénétique (Qin et al., 2017), mais certaines agissent sur le signal cellulaire et l'apoptose, la voie « wingless », des modérateurs de la sénescence cellulaire ou encore des modulateurs du métabolisme (Biswas and Jiang, 2016).

Dans ces différents cas, l'expression de facteurs de transcription n'est plus la source de la reprogrammation mais une conséquence. La physiologie de la cellule est modifiée par l'action des petites molécules, augmentant sa plasticité cellulaire, induisant une complète reprogrammation. Dans le cas de cellules reprogrammées en cellules iPS par cette technique, on parle de ciPS (chemically induced pluripotency stem cell) (Biswas and Jiang, 2016).

L'utilisation de petites molécules peut augmenter de 200% l'efficacité de la reprogrammation de fibroblastes en l'espace d'une semaine de traitement (Biswas and Jiang, 2016). Cette augmentation de l'efficacité se fait en inhibant une enzyme transférase de groupement méthyl. La méthylation des queues d'histone en épigénétique est principalement liée à la diminution de l'expression des gènes. Lors de la reprogrammation d'une cellule, l'inhibition des gènes responsables de l'identité différenciée (identité de départ) est essentielle. Cela peut se faire par l'expression de gènes tels que Sox2 (qui est responsable de la répression de beaucoup de gènes d'identité terminale) ou hand2 (impliqué dans l'inhibition de la voie de signalisation TGF- β principalement exprimée dans les fibroblastes) (Chen et al., 2017).

Afin de reprogrammer une cellule, il est aussi possible d'utiliser des micro ARN (miARN). Ces petits fragments d'ARN sont responsables de la régulation de l'expression spécifique de certains gènes. Certains microARN agissent comme des ARN interférents et inhibent par conséquent la traduction des gènes cibles (Hu et al., 2014). Cependant, ces miARN n'agissent pas tous de la même façon. Certains guident des protéines pour cibler

des régions spécifiques de l'ADN. Selon de la fonction de la protéine à laquelle ils sont liés (en complexe), l'expression de ces micro ARN peut avoir une fonction régulatrice positive ou négative sur ces régions spécifiques de l'ADN (Stadtfeld and Hochedlinger, 2010; Zeng et al., 2017). L'utilisation de microARN pour permettre la reprogrammation apporte l'avantage de pouvoir utiliser certains virus, inutilisables jusque là, comme vecteurs Il est également intéressant de remarquer que l'utilisation de ces petits ARN peut se faire en complément de l'utilisation de facteurs de reprogrammation et va permettre l'augmentation de l'efficacité de la reprogrammation, y compris dans le cadre de reprogrammation directe (Srivastava and DeWitt, 2016).

3.2. Une reprogrammation homogène ?

La reprogrammation d'une cellule ne peut être induite avec 100% d'efficacité. Même lors de reprogrammation naturelle, il peut arriver que la reprogrammation ne soit pas d'une efficacité totale (Habener and Stanojevic, 2012). Cette constatation peut s'expliquer de diverses manières.

La plasticité cellulaire n'est pas la même entre deux types cellulaires pour plusieurs raisons. L'une d'entre elles est que la reprogrammation induite ou naturelle implique souvent la division cellulaire. Pour l'induction d'une reprogrammation, l'utilisation de virus (lentivirus ou adénovirus et assimilés) ou de petites molécules est un procédé nécessitant des cellules en division pour permettre une reprogrammation efficace. Cette nécessité rend difficile voire impossible la reprogrammation de certains types cellulaires en utilisant ces méthodes de reprogrammation. L'utilisation de rétrovirus permet la reprogrammation de cellules ne se divisant pas ou peu tels que les neurones (Guo et al., 2014). De plus, tous les types cellulaires ne présentent pas les mêmes modifications épigénétiques ou autres, certaines rendent très difficile la reprogrammation (Nashun et al., 2015).

C'est en partie pour cette raison que les études sont réalisées sur des fibroblastes. C'est également parce que les fibroblastes sont des cellules faciles à cultiver et à récupérer *in vivo*. De plus, les fibroblastes sont des cellules qui interviennent directement au moment de blessures. Dans le cadre d'infarctus du myocarde, les fibroblastes cardiaques sont des

cellules qui se regroupent autour de la blessure et se divisent (Qian et al., 2012; Sinagra and Fabris, 2016).

L'homogénéité d'une reprogrammation se mesure également en fonction de la population cellulaire à reprogrammer. Aucune reprogrammation induite n'a une efficacité de 100%. Ceci peut s'expliquer par différents aspects. Premièrement, il est très difficile *in vivo* de cibler spécifiquement un seul type cellulaire. Ce problème peut être détourné *in vitro* car des cultures de cellules peuvent être réalisées à partir d'un seul type cellulaire. Et deuxièmement, toutes les cellules ne sont pas touchées par les agents responsables de la reprogrammation de la même façon. Il est impossible de contrôler avec quelle efficacité le vecteur de la reprogrammation se transmet entre les cellules. De plus, toutes les cellules ne sont pas nécessairement dans des conditions optimales de reprogrammation. Même si l'agent inducteur du changement d'identité pénètre une cellule en quantité optimale, le moment dans lequel se trouve le cycle cellulaire est important. Toutes les phases du cycle cellulaire ne permettent pas de modification profonde au sein du transcriptome. De plus, indépendamment de la période du cycle cellulaire, l'accessibilité de certaines régions de la chromatine n'est pas la même d'une cellule à l'autre.

L'accessibilité de la chromatine mène directement à un autre problème de la reprogrammation, qui est de maintenir la nouvelle identité cellulaire. Au sein d'une culture de cellules iPS, on espère pouvoir faire 30 passages sans que les cellules ne changent d'identité ; mais après différenciation, les cellules sont souvent instables et ne peuvent subir que quelques passages (<10) avant de dégénérer (communication personnelle Quentin Muller). De plus, les reprogrammations directes sont également touchées par un phénomène similaire et il arrive que les cellules redifférenciées retournent à leur identité d'origine. Ce changement de destin cellulaire non souhaité lors d'une reprogrammation rend plus difficile encore l'analyse des mécanismes impliqués dans la plasticité cellulaire.

3.3. L'étude des reprogrammations et leurs limites pour mettre en évidence les mécanismes impliqués

Induire (naturellement ou expérimentalement) une reprogrammation au sein d'une cellule différenciée implique de profonds changements et un remodelage de la cellule, parfois tant moléculaire que morphologique. L'étude de l'effet des vecteurs de la

reprogrammation sur une cellule permet de connaître et comprendre l'ensemble des voies cellulaires qui sont impliquées dans le changement d'identité. Cette étude consiste à mettre en évidence à la fois les éléments responsables de la plasticité cellulaire et les voies cellulaires en aval qui sont modifiées par ces facteurs.

Comme nous l'avons vu précédemment, il existe différents types de mécanismes servant la reprogrammation. Alors que certains modifient directement l'expression des gènes, d'autres modifient la chromatine et les marques épigénétiques, modifiant à la fois la plasticité cellulaire et le transcriptome. Mettre en évidence les différentes cascades et successions de facteurs impliqués dans la reprogrammation nécessite de surmonter différentes difficultés qui dépendent du modèle d'étude et de la programmation cellulaire en elle-même.

L'un des challenges principaux de l'étude de la reprogrammation est de déterminer l'identité cellulaire et de suivre ses variations au cours du temps. Il y a donc à la fois une difficulté liée au suivi de la ou des cellules en cours de reprogrammation, et au besoin d'analyses qui sont suffisamment précises pour mettre en évidence les enchainements de facteurs moléculaires mis en œuvre.

In vitro, il est plus facile de suivre les cellules et leurs identités. Entre les techniques de FACS et autres techniques d'imagerie en fixant les cellules à un moment donné, il est possible en théorie de suivre l'évolution de la reprogrammation. *In vivo* le suivi cellulaire se fait à l'aide de protéines fluorescentes ou après fixation. L'étude du transcriptome de ces cellules est compliquée et dépend aussi de l'efficacité du processus. Si une seule cellule au sein d'une population change d'identité, il est difficile de mettre en évidence ses différences d'expression. Les techniques d'analyses se développent cependant et sont en train de se démocratiser, permettant l'analyse de cellules uniques. Dans le futur, ces techniques permettront de faciliter les analyses épigénétiques et transcriptomiques. Les méthodes pour comprendre le rôle des micro ARN sont également en train de se développer.

Ces méthodes permettent une analyse globale de la reprogrammation, mettent en évidence l'implication de nouveaux facteurs dans le changement d'identité. Il est ensuite possible de faire une analyse plus précise et fine sur le rôle de ce facteur et les autres éléments avec lesquels il peut interagir. Cependant, cette étude passe par la création de

mutants de ce facteur, ce qui n'est pas toujours possible, y compris dans certains modèles animaux qui ne permettent pas de réaliser de mutagenèse dirigée (ce cas et principalement impliqué dans les reprogrammations naturelles *in vivo*).

4. Notre modèle d'étude

Parmi toutes les reprogrammations précédemment étudiées, qu'elles soient induites ou naturelles, l'une des limitations communes est le suivi des cellules.

In vitro, le maintien d'une identité stable après redifférenciation est un problème clé. Car souvent, les marques épigénétiques de la précédente identité ne sont pas supprimées. Ainsi, après plusieurs passages cellulaires, la lignée n'est plus stable. Elle est soit immortalisée (cancéreuse) (communication orale Quentin Muller) soit retournée à un état identitaire précédent (Hanna et al., 2010). Il faudrait garantir la stabilité de l'identité cellulaire afin d'éviter les dégénérescences cellulaires en cancer ou les inversions de l'identité (retour à l'identité cellulaire à l'origine de la reprogrammation). Une manière de contourner tous ces inconvénients est l'étude du ver *Caenorhabditis elegans*. Cet organisme modèle possède en effet une batterie d'avantages permettant de faciliter l'étude des mécanismes liés à la reprogrammation cellulaire.

4.1. Les avantages du modèle

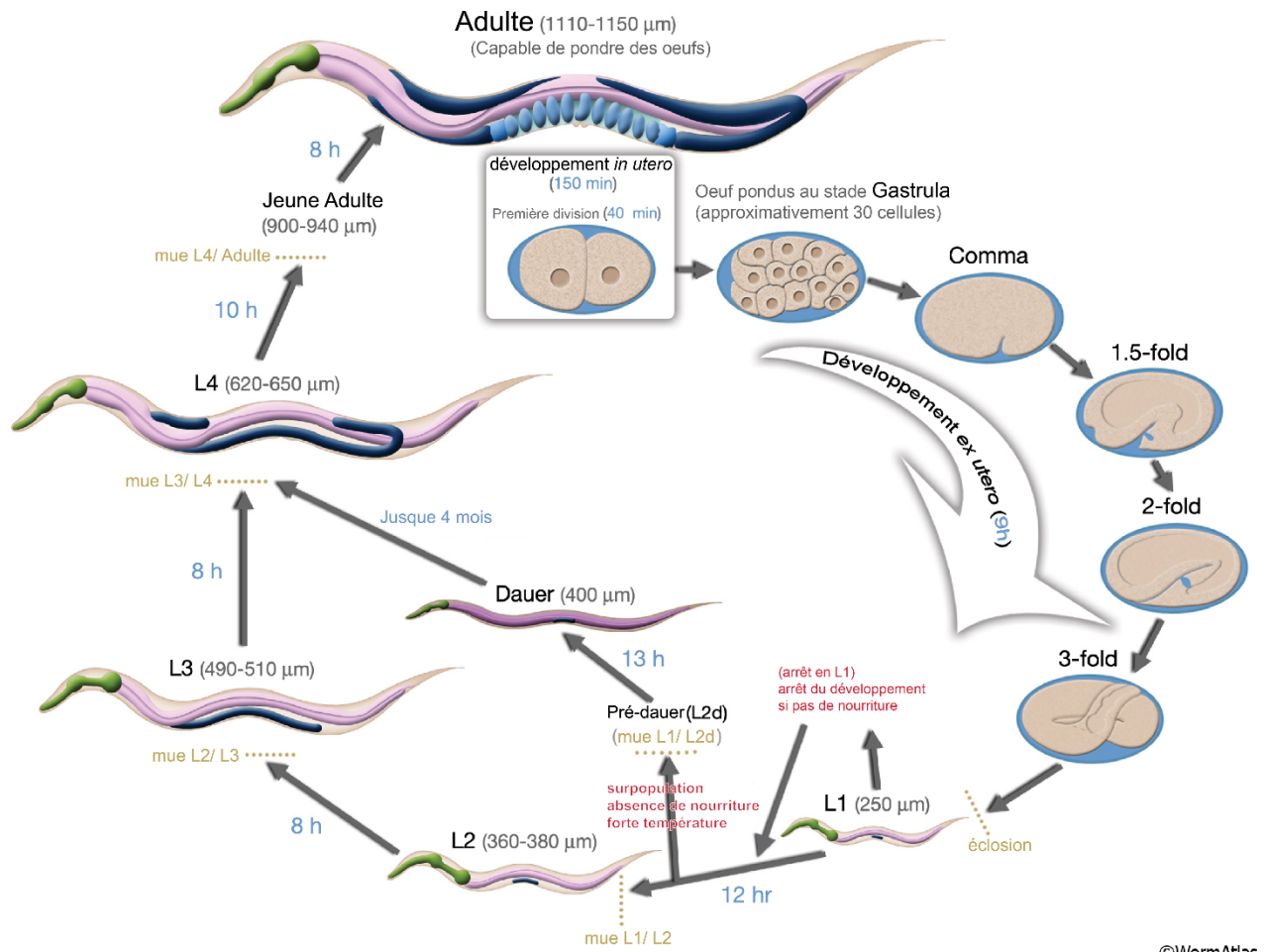
4.1.2. Le ver et ses caractéristiques

C. elegans est un modèle qui présente beaucoup d'avantages. Ce ver de la classe des Nématodes est un ver transparent d'un millimètre de long à l'âge adulte, et a la particularité de se développer de manière stéréotypée.

Les nématodes sont des vers ronds qui possèdent une cuticule, un tube digestif complet mais pas d'appareil respiratoire ou circulatoire. *C. elegans* est hermaphrodite et autofécond : un seul individu peut donner naissance jusqu'à 300 œufs. Ainsi, il est possible d'avoir facilement une importante population qui sera génétiquement identique.

Le cycle de vie de ce ver (Figure 6) se divise en six phases. La phase embryonnaire commence in utero pendant 120 minutes avant que l'œuf ne soit pondu et qu'il éclore 9 h plus tard. Se succèdent ensuite 4 stades larvaires de durées différentes, avant le stade adulte capable de fécondation. Chaque stade du développement larvaire est séparé par une mue permettant au ver de se séparer de sa cuticule et de grandir en taille. Si, au moment de l'éclosion, les conditions environnementales ne sont pas propices au développement du ver (forte température, absence de nourriture, surpopulation, ...), ce dernier entrera dans un stade de résistance, appelé « L1 arrest » ou arrêt L1. C'est à ce stade qu'il est préférable de congeler les larves afin de former une banque de vers et de pouvoir les utiliser plus tard sans risque de dérive génétique, c'est-à-dire l'accumulation de mutations apparaissant aléatoirement au cours des générations de *C. elegans*.

Si ces conditions défavorables surviennent à partir du stade L2, le ver entrera en stade « dauer » qui est un stade de résistance extrême. Dans cette condition, le ver peut survivre à de fortes variations de température, d'hygrométrie ou une absence de nourriture pendant une durée prolongée.



©WormAtlas

Figure 6 : Cycle de vie de *C. elegans* montrant les différentes étapes de la vie du ver et leur durée à 22°C. Le cycle total dure environ 3 jours à cette température. L'embryogénèse, les quatre stades larvaires séparés par une mue, le stade adulte et le stade dauer qui intervient quand le ver est dans des conditions environnementales défavorables.

La totalité du cycle dure environ 4 jours (à 20°C), ce qui donne un temps de génération très court. Cette durée peut être modifiée en changeant la température d'incubation des vers. A 15°C, le développement sera ralenti et prendra jusqu'à un jour de plus alors qu'à 25°C, le développement se fait plus rapidement et peut prendre un jour de moins. Il est donc possible de faire varier la vitesse de développement des vers en fonction des besoins expérimentaux.

La génétique de *C. elegans* est assez simple. Avec 5 paires de chromosomes autosomiques et une paire de chromosomes sexuels, les 97 000 000 paires de bases du génome ont été entièrement séquencées.

L'apparition rare d'une erreur lors de la méiose permet la formation des mâles, augmentant ainsi la mixité génique au sein d'une population. Cette erreur apparaît généralement après un stress (absence de nourriture, température élevée, ...)

En laboratoire, les mâles servent à obtenir des croisements entre différents mutants afin d'analyser les liens génétiques qui peuvent exister entre ces mutants.

De plus, différentes techniques d'édition du génome sont disponibles pour pouvoir muter spécifiquement une séquence du génome (« *knock out* ») ou y ajouter une séquence (« *knock in* »). L'une de ces techniques d'édition est la technique de MosSCI par Frøkjær-Jensen Christian. Cette technique permet d'insérer des fragments d'ADN au niveau de région Mos du génome. Ces régions ont elle-même été insérées aléatoirement au sein du génome et C. Frøkjær-Jensen a mis à la disposition de la communauté scientifique plusieurs souches présentant une insertion MosSCI à différentes localisations.

Une autre possibilité, plus récente et permettant une plus grande variété de possibilité de locus génétiques, est celle appelée CRISPR-Cas9. Cette technique a été le résultat de l'étude de bactéries et leurs mécanismes de défense face à une infection virale par E. Charpentier et J. Doudna. Elles ont mis en évidence une endonucléase qui permet de couper l'ADN à un locus précis, choisi par l'expérimentateur. La seule condition est que le locus doit contenir les dinucléotides GC (Doudna and Charpentier, 2014; Farboud and Meyer, 2015).

Très récemment, la technique UAS-Gal4 a été mise au point chez *C.elegans* (Wang et al., 2017). Cette technique très largement utilisée chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* et *drosophila melanogaster* permet de diriger l'expression contrôle de gènes d'intérêt. Une modification de cette technique permet d'étudier les interactions protéines-protéines (Wang et al., 2017). Ce qui permet de mettre en évidence les cibles protéiques d'une protéine d'intérêt.

Afin d'étudier l'expression ou la fonction d'une protéine d'intérêt, il est possible d'injecter un plasmide contenant le gène d'intérêt sous contrôle d'un promoteur choisi. Grâce au séquençage du génome, les informations sur les promoteurs sont accessibles. De plus, le ver étant transparent, les protéines de fusion avec des protéines fluorescentes sont un excellent moyen de suivre et étudier l'expression d'un gène. Cette technique est rapide et facile à réaliser. Cependant, tous les vers d'une même lignée ne sont pas transgéniques, on parle de taux de transmission. De plus, l'array extrachromosomal ne se transmet pas à toutes les cellules, on parle alors de mosaïsme. Pour éviter ces deux problèmes, il est possible d'intégrer l'array au sein du génome.

Le *knock in* permet d'exprimer le transgène d'intérêt pour qu'il s'exprime dans toute la descendance. Contrairement à l'array extachromosomal, une insertion garantie une expression stable au sein du même ver (évite le mosaïsme) et assure une transmission respectant les lois de Mendel. Cette protéine de fusion sera alors visible au microscope si elle est exprimée en assez grande quantité par les cellules. Cette technique permet donc de visualiser le motif d'expression d'une protéine au sein d'un organisme vivant.

Il est possible de réaliser un *knock in* de manière aléatoire (rayon X), ou de manière dirigée (CRISPR-Cas9, MoscI).

Ce ver se nourrit de bactéries *Escherichia coli* modifiée : OP50 et est cultivé dans des boîtes de Petri remplies de gélose, toutes ces choses sont faciles d'accès en laboratoire et simples à mettre en place. Tous ces arguments mis ensemble permettent d'affirmer que *C. elegans* est un excellent modèle pour des études génétiques. Ces études, en utilisant la génétique comme outils, permettent de répondre à des questions principales sur le développement, le fonctionnement neuronal, la mémoire, ... Notamment, comprendre l'interaction entre les gènes et le réseau de régulation des gènes. A savoir : Comment un gène agit-il sur l'expression d'un autre gène ? Comment un réseau d'activation génique permet-il le développement du ver ? Comment certains gènes sont-ils spécifiquement impliqués dans le passage de l'information neuronal d'une cellule à l'autre ?...

Sa petite taille, le fait qu'il soit transparent tout au long de sa vie et qu'il ait un nombre fini de cellules somatique a permis à Sulston *et al.* de suivre les cellules tout au long du développement et de décrire leur devenir cellulaire. Ils ont remarqué que toutes les divisions cellulaires du développement ont lieu au même moment entre tous les individus et donnent naissance aux mêmes types cellulaires. En observant le développement de plusieurs vers, Sulston, *et al.* ont pu caractériser le lignage cellulaire, décrivant chaque division et nommant toutes les cellules apparaissant jusqu'à l'âge adulte. Ces divisions sont donc stéréotypées dans la séquence et le temps. Ils ont nommé toutes les cellules suivant l'orientation de leur division (a/p : antéropostérieur et l/r : left/right) et du blastomère duquel ces cellules dérivent.

Les cellules différenciées possèdent un nom dépendant de leur fonction (exemple : hyp7 qui est une cellule de l'hypoderme), de leur morphologie (exemple : PDA, pour postérieur Dorsal Antérieur) ou a été donné de manière aléatoire (B : cellule rectale).

Ainsi, le lignage cellulaire est connu et invariant. Ce qui permet d'une part de suivre très précisément le destin d'une cellule et d'autre part de clairement connaître l'effet d'une mutation sur le lignage cellulaire ou sur l'identité de l'une d'elles.

C'est donc également un excellent modèle pour l'étude de l'identité cellulaire sur lequel beaucoup d'outils sont déjà développés et son entretien reste facile, rapide et peu coûteux.

4.2. Plasticité cellulaire et reprogrammation chez *C. elegans*

Ce modèle animal *C. elegans* est particulièrement connu pour l'invariance de son lignage cellulaire et donc l'absence de plasticité cellulaire. Par exemple, lors du début de l'embryogénèse, la cellule E naît et est responsable de la formation de toutes les cellules de l'endoderme. C'est également cette cellule qui initie le processus de gastrulation chez *C. elegans*. Lorsque l'on réalise une ablation de E, la gastrulation n'a pas lieu et aucune autre cellule voisine ne réagit au changement d'environnement provoqué par la perte de cette cellule (Laufer et al., 1980). Dans d'autres modèles animaux, tels que chez l'humain, par exemple, l'ablation d'une cellule au début d'embryogénèse n'induit aucun problème pour le reste du développement. Les cellules voisines se divisent ou se reprogramment pour assurer le bon déroulement de l'embryogénèse.

De plus, dès la première division cellulaire, les deux cellules AB et P1 ne sont pas identiques et ne peuvent être interchangeables. Tant dans leurs morphologies que dans leurs fonctions (comprendre ici les cellules auxquelles elles vont donner naissance) ces deux cellules sont très différentes.

C. elegans possède donc une apparente robustesse au sein de son identité cellulaire et de l'identité des cellules au cours du développement embryonnaire.

4.2.1. Est-il possible d'induire un changement d'identité cellulaire chez *C. elegans* ?

L'une des premières découvertes d'une potentielle plasticité de l'identité cellulaire chez *C. elegans* provient de la façon dont le lignage a été mis en évidence. Grâce à une ablation laser et le fait que les cellules ne changent pas d'identité malgré la disparition de leur voisine, il a été déduit que le destin cellulaire était cellule-autonome. C'est-à-dire que le destin de la cellule ne provient pas de son environnement.

Cependant, il a été démontré que lorsqu'une cellule est ablatée, les cellules autour ont tendance à prendre l'espace laissé par cette dernière et, par conséquent, être en contact avec des cellules avec lesquelles elles n'auraient pas été en contact dans le cas contraire. Dans son étude, J.R. Priess et J.N. Thomson démontrent que le destin cellulaire « pharynx » peut être induit dans certain blastomère suite à une ablation laser de cellules embryonnaires (Priess and Thomson, 1987). Ils ont donc mis en évidence que chez *C. elegans* tous les destins cellulaires ne sont pas nécessairement autonome cellulaire, mais peuvent être induits par un contact cellule-cellule.

Plusieurs équipes, impressionnées par l'invariance du lignage cellulaire, ont induit l'expression de différents facteurs de transcriptions (gènes maîtres) afin de modifier le lignage cellulaire de *C. elegans*.

Le destin cellulaire « pharynx » peut également être induit par l'expression de *pha-4*, gène maître permettant de conduire l'identité de cellule du pharynx (Horner et al., 1998). Les cellules ne peuvent changer leur identité que pendant l'embryogénèse.

L'endoderme se forme à partir de la cellule E dans l'embryon qui apparait au stade 8 cellules. Induire l'expression du gène *end-1*, par choc thermique à différents moments du développement embryonnaire permet de reprogrammer les blastomères (Zhu et al., 1998). Cette expérience a été concluante à partir du stade 20 cellules, stade auquel le promoteur peut effectivement être activé. L'embryon continue alors son développement embryonnaire alors que la totalité des cellules présentent une identité d'endoderme. Cet embryon mutant présente moins de cellules que l'embryons sauvage (environ 200 contre 545) et ceci semble cohérent avec le lignage cellulaire de la cellule E.

Il est intéressant de noter que dans cette expérience, les embryons âgés de 200 cellules ou plus sont incapables de changer de destin cellulaire malgré l'expression de *end-1*. Ceci indique que la plasticité cellulaire chez *C. elegans* existe malgré une apparente robustesse. Mais passé un certain stade, le destin cellulaire semble scellé (Zhu et al., 1998).

L'expression du gène maître des muscles *hll-1*, homologue de MyoD, est exprimé lors de l'embryogénèse au stade 90 cellules (Krause et al., 1990). L'expression de ce gène est clé pour le destin cellulaire musculaire et une surexpression de ce gène, change le destin cellulaire de la lignée de l'endoderme pour les différencier en cellules musculaire

(Fukushige and Krause, 2005). Dans cette étude, les auteurs n'ont mis en évidence aucune double identité au sein des cellules embryonnaires, mettant en évidence que les deux voies « endoderme » et « musculaire » (et donc issus du mésoderme) s'inhibent mutuellement ou à défaut sont exclusives l'une de l'autre.

D'autres destins cellulaires sont inductibles au cours de l'embryogénèse. L'expression du facteur de transcription *lin-26* induit une identité épithéliale (Quintin et al., 2001).

La reprogrammation des cellules de *C. elegans* est donc possible, malgré une apparente absence de plasticité cellulaire. Cependant, passé un certain stade du développement, toute reprogrammation semble compromise. Pourtant, il a été possible de reprogrammer certaines cellules différenciées chez *C. elegans*. Les cellules de des gonades peuvent être reprogrammées et se différencier en neurones, ou cellule musculaire. Ce type de reprogrammation ressemble à l'apparition d'un tératome et est dû à la mutation de *gld-1*, impliquée, avec *mex-3*, dans la régulation de l'expression des gènes maintenant la totipotence. Les doubles mutants *gld-1* et *mex-3* présentent des gonades anormales, comportant des cellules neuronales, des cellules intestinales ou musculaire. Cette multitude d'identité cellulaire rappelle la reprogrammation *in vivo* par état de pluripotence (Ciosk et al., 2006).

Il existe chez le ver des exemples de reprogrammation naturelles *in vivo*. Certains de ces exemples seront décrits ultérieurement dans la partie 4.3.

Bien que ce type de reprogrammation existe chez *C. elegans*, ces exemples de reprogrammation sont robustes et ces cellules ne peuvent obtenir une identité cellulaire différente. Le lignage de *C. elegans* est invariant. L'effet de la surexpression d'un gène maître sur un exemple de transdifférenciation naturelle sera discuté ultérieurement dans cette introduction.

4.2.2. Les mécanismes de la reprogrammation

Chez *C. elegans*, les mécanismes de reprogrammation semblent se baser sur les mêmes principes que ceux observés lors de reprogrammations induites dans d'autres organismes modèles, y compris les cellules murines et humaines.

L'expression d'un facteur de transcription spécifique est à l'origine de la cascade d'évènements menant à la reprogrammation cellulaire. Cette reprogrammation ne peut se faire à partir de cellules totalement différenciées, chez *C. elegans*, indiquant qu'il existe des mécanismes protégeant les cellules différenciées contre des reprogrammations. Ces mécanismes peuvent être sous la forme d'expression de facteurs régulateurs (inhibiteur) qui empêchent l'expression de voies alternatives.

L'épigénétique et les modificatrices d'histones jouent également un rôle dans le maintien de l'identité cellulaire ou à l'inverse, peuvent favoriser la reprogrammation et donc la plasticité cellulaire (Patel and Hobert, 2017; Wainwright and Scaffidi, 2017).

Les micro ARN existent également chez *C. elegans* mais leur rôle est encore peu connu. Cependant, l'implication de *lin-4* et *let-7*, impliqués dans le lignage cellulaire lors du développement larvaire, laissent supposer que tout comme chez les mammifères, les micro ARN ont un rôle dans le contrôle du destin cellulaire. Ces deux miARN sont supposés agir sur la régulation de l'expression des gènes (Vella, 2005).

On peut donc supposer que les voies impliquées dans la reprogrammation cellulaire et le changement d'identité sont probablement conservées au cours de l'évolution et que bien que le ver *C. elegans* présente des mécanismes de résistance à la reprogrammation, les découvertes réalisées sur ce ver seront probablement transposables sur d'autres organismes modèles.

4.3. Y en PDA un évènement naturel de transdifférenciation

Le rectum du ver est composé de six cellules : Y, U, K, K', F et B. Les cellules forment 3 anneaux rectaux, chacun composé d'une paire de cellules rectales Y/B, U/F, K/K'. Lors du développement, deux cellules rectales vont changer. La première est la

cellule K qui se divise pour donner naissance à Ka et Kp. La deuxième est la cellule Y qui va migrer antérieurement du rectum et être remplacée par une autre cellule P12.pa.

Au cours du développement larvaire, la cellule K se divise en deux cellules Ka (qui reste au sein du rectum) et Kp qui se différencie en neurone DVB. Cette transition identitaire peut être considérée comme une transdifférenciation. Elle est issue d'une division asymétrique durant laquelle la voie Wnt joue un rôle important. Sur la figure 7, DVB n'est pas représentée, mais la cellule K (au stade larvaire L1) est remplacée par Ka (au stade larvaire L3). La division de la cellule K a lieu lors de la fin du stade larvaire L1. C'est pourquoi sur la figure 7, K est représentée au stade larvaire L1 et KA lors des stades L2 et L3. Nous ne détaillerons pas ici les processus impliqués dans ce changement d'identité car la transdifférenciation de la cellule K en DVB ne fait pas partie de ce travail. C'est une autre transdifférenciation qui a été le modèle de cette étude car cellule K n'est pas la seule à changer d'identité.

La cellule Y migre antérieurement du rectum. Simultanément, la cellule P12.pa prend la place de Y au sein du rectum. La perte d'une cellule rectale est délétère pour la fonction fécale, qui est elle-même essentielle. La cellule P12.pa naît au cours du stade L1, issue de l'hypoderme du ver. A l'issue de la migration de la cellule Y, cette dernière change d'identité pour devenir le motoneurone PDA (Postérieur Dorsal Antérieur). Ce changement d'identité a dans un premier temps été observé par DIC lors de l'analyse et du suivi du lignage cellulaire. Ce dernier montrait une migration de la cellule Y et un changement de morphologie indiquant un changement de fonction. D'une cellule épithéliale, la cellule Y devenait un motoneurone PDA. Cette reprogrammation a été décrite, par notre laboratoire, comme une transdifférenciation, il y a bien transition entre deux identités cellulaires spécialisées (Jarriault et al., 2008). Cette reprogrammation se passe en deux étapes principales : la première est la dédifférenciation au cours de laquelle la cellule Y perd son identité de cellule épithéliale rectale et migre antérieurement à l'extérieur du rectum. Simultanément, une autre cellule, p12.pa, prend la place de Y au sein du rectum et assure la fonction de Y lors de la perte de cette cellule. La seconde étape est une étape de redifférenciation au cours de laquelle la cellule Y obtient une identité neuronale. Cependant, la dédifférenciation ici n'est pas liée à un gain de pluripotence, il n'y a pas d'autre destin cellulaire pour la cellule Y que de devenir un neurone. Ce changement d'identité est une transdifférenciation puisque Y possède une identité terminale

fonctionnelle de cellule épithéliale rectale, étant l'une des six cellules formant le tube rectal, elle est essentielle à la survie du ver. Cette fonction sera assurée lors de migration de Y par la cellule nouvellement formée P12.pa. D'ailleurs, il est à noter que cette migration de la cellule Y n'est pas essentielle à la transdifférenciation (Jarriault et al., 2008). La cellule neurale PDA nouvellement formée est un motoneurone ne présentant aucun marqueur d'identité épithéliale, sa morphologie et sa localisation sont différentes de Y.

Ce changement d'identité est extrêmement efficace puisqu'il a lieu dans tous les vers au même moment du développement. Il a lieu dans la totalité des cas sauvages, toujours au même moment du développement entre le stade larvaire L1 et la fin du stade L2 (figure 7). Ce changement d'identité est également très rapide, environ 9h contre plusieurs jours pour d'autres changements d'identité, comme par exemple le cas du pancréas, la transdifférenciation des cellules α en cellules β commence 5 jours après la perte des cellules β . De plus, il est extrêmement robuste, c'est-à-dire que dans des conditions de stress environnemental, la transdifférenciation a toujours lieu avec la même efficacité chez les animaux sauvages (Zuryn et al., 2014).

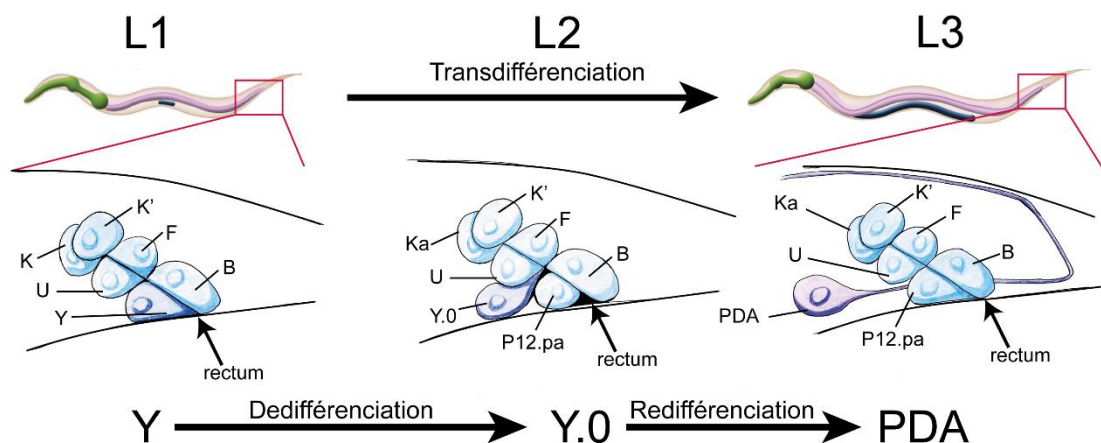


Figure 7 : Schéma de la transdifférenciation de Y en PDA. La cellule migre antérieurement du rectum et est remplacée par P12.pa. La transdifférenciation a lieu pendant le stade larvaire L2. La cellule Y.0 est dédifférenciée, puis se redifférencie en PDA.

Cette transdifférenciation d'une cellule épithéliale à neuronale est souvent comparée à la neurogénèse au cours du développement embryonnaire, les cellules qui donneront naissance à l'ensemble du système nerveux proviennent de la plaque neurale, composée de cellules épithéliales. Ainsi, on pourrait penser que les neurones proviennent tous de la transdifférenciation d'une cellule épithéliale en cellule neuronale (Raven, 2007). De plus, en comparant les gènes exprimés dans PDA et ceux qui sont essentiels à la transdifférenciation d'Y en PDA, on remarque que beaucoup sont similaires aux gènes impliqués dans la neurogénèse chez *C. elegans* (Hobert, 2010, 2016).

En quoi ce changement d'identité est-il différent d'une neurogénèse ? Une réponse possible vient du fait que la cellule Y reste unipotente tout au long de son changement d'identité et que, malgré la perte de son identité épithéliale (étape de dédifférenciation) elle ne gagne pas de potentiel identitaire (Richard et al., 2011). En réalisant une expérience d'expression de l'homologue du gène maître* myoD (*hlh-1*) (induisant l'identité cellulaire musculaire) (Fukushige and Krause, 2005), il n'est pas possible de détourner Y (ni aucun intermédiaire de la Td) de son destin cellulaire et l'induction de l'expression du gène maître à différents moments de la transdifférenciation bloque le processus de reprogrammation. (Richard et al., 2011).

La transdifférenciation d'Y en PDA peut être comparée aux cellules de la plaque neurale qui peuvent donner naissance à plusieurs types cellulaires tels que des neurones, des oligodendrocytes ou des astrocytes. La similitude qui existe entre le motif d'expression de la cellule Y (au cours de son changement d'identité) et des précurseurs neuronaux est liée au fait, qu'une fois enclenchées, la neurogénèse et la redifférenciation en neurone utilisent les mêmes voies de signalisation. Cette similitude est un outil intéressant, puisque la neurogénèse est mieux connue que la transdifférenciation d'Y en PDA. Il est donc possible de se baser sur ces similarités pour prédire l'implication de nouveaux gènes ou mieux comprendre la différence de signalisation qui existe entre la transdifférenciation et la neurogénèse. Ceci permettra d'isoler les gènes spécifiquement impliqués dans le contrôle et la régulation du processus de transdifférenciation.

Le ver étant transparent, plusieurs outils permettent d'observer et de suivre la transdifférenciation de la cellule Y en PDA. Dans un premier temps, la simple observation microscopique en CID permet de voir les cellules rectales ainsi que la migration de la cellule Y hors du rectum. Cependant, il est difficile de continuer cette observation une fois cette cellule dédifférenciée. Le laboratoire a développé des marqueurs fluorescents

permettant, d'une part de localiser la cellule au sein du ver, mais aussi d'obtenir une information sur son identité. Un marqueur est un transgène (généralement intégré) qui comporte une protéine fluorescente sous contrôle d'un promoteur associé à une identité cellulaire. L'obtention de marqueurs est une étape difficile lors de la mise en place d'un nouveau modèle d'étude (ici la transdifférenciation d'Y en PDA). Ce travail est long et permet aujourd'hui au laboratoire d'avoir un nombre intéressant d'outils permettant l'étude de la reprogrammation à diverses étapes de cette dernière. Par exemple, le marqueur le plus courant de PDA au sein de notre laboratoire est *cog-1*, ce gène s'exprime au début de la redifférenciation et son expression est sensible à la présence d'autres facteurs importants pour la transdifférenciation.

Ce gène est impliqué dans la différenciation asymétrique des neurones chez *C. elegans*, notamment la différence de fonction neuronale entre ASEL et ASER (Chang et al., 2003). *cog-1* est exprimé dans les deux neurones mais pas au même niveau d'expression. Il est également impliqué dans la formation de la vulve (Palmer et al., 2002). Cependant, bien que ce marqueur soit présent dans différentes cellules du ver (autres motoneurones, vulve, ...), PDA est suffisamment isolée de ces autres cellules exprimant *cog-1* pour être facilement observable *in vivo*, faisant du transgène *cog-1p::cog-1::gfp* un bon marqueur de l'identité de PDA.

Ce marqueur, bien que précoce dans la redifférenciation de la cellule PDA, est exprimé tout au long de la vie du ver, son expression n'est donc pas transitoire ce qui permet d'observer la présence de PDA à différents moments de la vie du ver, dès le stade larvaire L3. Il permet également de distinguer l'axone du motoneurone, aidant à l'identification des différents phénotypes mutants. Les gènes *unc-33* et *rimb-1* (anciennement *tag-168*) sont deux gènes exprimés lors de la redifférenciation (Richard et al., 2011). Ils peuvent servir de marqueurs de l'identité neuronale puisque *rimb-1* est un gène pan neuronal impliqué dans la connexion synaptique (source : uniprot, wormbase) et que *unc-33* est impliqué dans la formation des axones et du guidage de ces derniers sans être un marqueur pan-neuronal mais reste exprimé dans les motoneurones, les neurones sensoriels et les interneurones (Li et al., 1992).

Afin de pouvoir étudier précisément l'identité de la cellule, d'autres marqueurs sont également disponibles, par exemple *egl-5* met en évidence l'identité des cellules rectales dès leur naissance lors de l'embryogénèse. Cependant, ce marqueur est présent dans d'autres cellules proches des cellules rectales dès le stade larvaire L2, ce qui rend difficile

l'identification des cellules rectales. C'est pourquoi *col-34*, un autre marqueur plus tardif peut également être utilisé. Ce dernier s'exprime exclusivement au sein des six cellules rectales du stade embryonnaire 3-fold jusqu'au stade adulte. Ce marqueur est l'un des plus utilisés dans cette étude (avec *cog-1*), car il permet de diriger l'expression de protéines au sein des cellules rectales seules et également de localiser et compter facilement les cellules rectales.

Parmi les marqueurs de l'identité rectale, aucun des deux précédemment énoncés n'est spécifique de la cellule Y. Cependant, des recherches au sein de notre laboratoire ont mis en évidence que *hlh-16* est exprimé dans certains neurones, au niveau de la partie antérieure du ver ainsi que dans la cellule Y. Ce gène est spécifiquement exprimé dans la cellule Y, parmi toutes les cellules rectales. En utilisant deux marqueurs : un marqueur spécifique des cellules rectales : *egl-5* et *hlh-16*, il est possible d'isoler la cellule Y des autres cellules car c'est dans cette seule cellule que l'expression de ces deux gènes est commune.

4.4. Mise en évidence des acteurs de la transdifférenciation

4.4.1. Les cibles

Tous ces marqueurs sont des outils permettant l'analyse des différents mutants que nous possédons au sein du laboratoire, obtenus en détournant, à notre avantage, l'exceptionnelle efficacité de la transdifférenciation. Puisque le changement d'identité cellulaire de Y en PDA a lieu dans tous les vers sauvages (ce qui a été vérifié par le laboratoire), la sélection de vers ne présentant pas de PDA après mutagenèse aléatoire assure la mise en évidence d'un ou plusieurs gènes impliqués dans la transdifférenciation. Le but de cette mutagenèse aléatoire est d'avoir la certitude qu'un gène important pour la transdifférenciation a été muté. Les mutants ainsi sélectionnés ont ensuite été isolés, séquencés et identifiés. Afin de simplifier ce processus au mieux, le laboratoire a mis au point une nouvelle technique en se basant sur deux points principaux : le lavage du fond génétique de la souche et le séquençage haut débit.

4.4.2. Identification des gènes

a) Le lavage du fond génétique de la souche est un croisement retour. Cette méthode se base sur la sélection des vers ne présentant pas de PDA, tout en les croisant

plusieurs fois à la suite avec la souche d'origine. Il est ainsi possible de supprimer les mutations qui sont apparues à cause du processus de mutagenèse aléatoire qui ne sont pas essentielles pour le processus de transdifférenciation de Y.

b) Le séquençage haut débit de la souche d'origine et de la souche mutée, lavée de son fond génétique, permet de cibler la séquence d'ADN contenant la mutation délétère pour la transdifférenciation de Y (Zuryn and Jarriault, 2013; Zuryn et al., 2010).

Les études sur les gènes impliqués dans la transdifférenciation nous permettent de mettre en évidence certaines interactions géniques et de montrer qu'il existe pour certains de ces gènes une fenêtre d'action et d'expression dans le temps.

4.4.3. Etapes et mécanismes cellulaires

La transdifférenciation se fait en plusieurs étapes : la dédifférenciation suivie de la redifférenciation. Tous les mutants sélectionnés présentent un arrêt de la transdifférenciation et grâce au processus en plusieurs étapes, il est possible de déterminer à quel moment le gène a été essentiel pour la reprogrammation cellulaire de Y en PDA. Il existe deux phénotypes distincts :

- 3 cellules localisées sur le même plan dans la région antérieure du rectum indiquent que la transdifférenciation a été stoppée lors de l'initiation du processus. La cellule Y n'a pas migré mais la cellule P12.pa est également présente et différenciée en cellule épithéliale rectale.
- 2 cellules épithéliales sur le même plan, localisées dans la partie antérieure du rectum indiquent que la transdifférenciation a été stoppée après la migration de la cellule Y mais avant que la redifférenciation n'ait eu lieu. On peut remarquer qu'il existe un mutant présentant un phénotype « 2 cellules épithéliales » qui présente en fait une absence de la cellule Y. Il y a donc deux cellules dans le même plan : P12.pa et U. Mais pas du tout de cellule Y.

On parle de phénotype de classe I. A l'inverse, quand le processus s'est arrêté au moment de la redifférenciation, donc après la migration de la cellule Y hors du rectum, la cellule P12.pa peut prendre sa place au sein du rectum et on observe que deux cellules épithéliales. On parle alors de phénotype de classe II. Le phénotype de classe III correspond aux gènes qui sont impliqués dans les deux étapes du processus.

Il est intéressant de noter que la majorité des gènes identifiés comme étant impliqués dans la transdifférenciation sont des gènes conservés au cours de l'évolution. Ils

sont notamment présents chez l'humain, comme par exemple, *sox-2*, *ceh-6* (*oct-4*), *sem-4*, *lin-12* (NOTCH), qui sont tous des facteurs de transcription essentiels pour l'initiation du processus. Mais il y a aussi des facteurs jouant un rôle dans l'efficacité du processus et ces derniers sont majoritairement liés à des modifications épigénétiques avec des facteurs conservés au cours de l'évolution comme *set-1*, *jmjd-3.1*, *wdr-5.1*.

Parler de la transdifférenciation de Y en PDA impose, selon moi, de se poser plusieurs questions. La première a été : comment ce changement d'identité est-il induit ? Pourquoi Y est-elle capable de changer d'identité et pas la cellule B, par exemple ?

L'une des réponses à ces premières questions se trouve notamment dans l'analyse du gène *lin-12*, si ce dernier est muté (perte de fonction), la transdifférenciation ne peut pas avoir lieu car la cellule Y n'est pas spécifiée et devient une cellule DA9 surnuméraire. En revanche, lorsqu'un mutant gain de fonction *lin-12* est exprimé dans le ver, deux PDA apparaissent. Ce PDA surnuméraire provient de l'ancêtre de la cellule DA9, la cellule controlatérale homologue de Y c'est-à-dire que lors du développement et des annotations du lignage cellulaire les précurseurs des deux cellules Y et Da9 ont subi les mêmes types de division (voir figure 8). Ainsi le précurseur de Y est ABprpppaaaa alors que DA9 provient de ABplpppaaaa. On parle de cellules controlatérales. Au moment de leur troisième division, ces deux cellules étaient sœurs, elles ont ensuite subi le même type de division jusqu'à devenir des cellules différenciées.

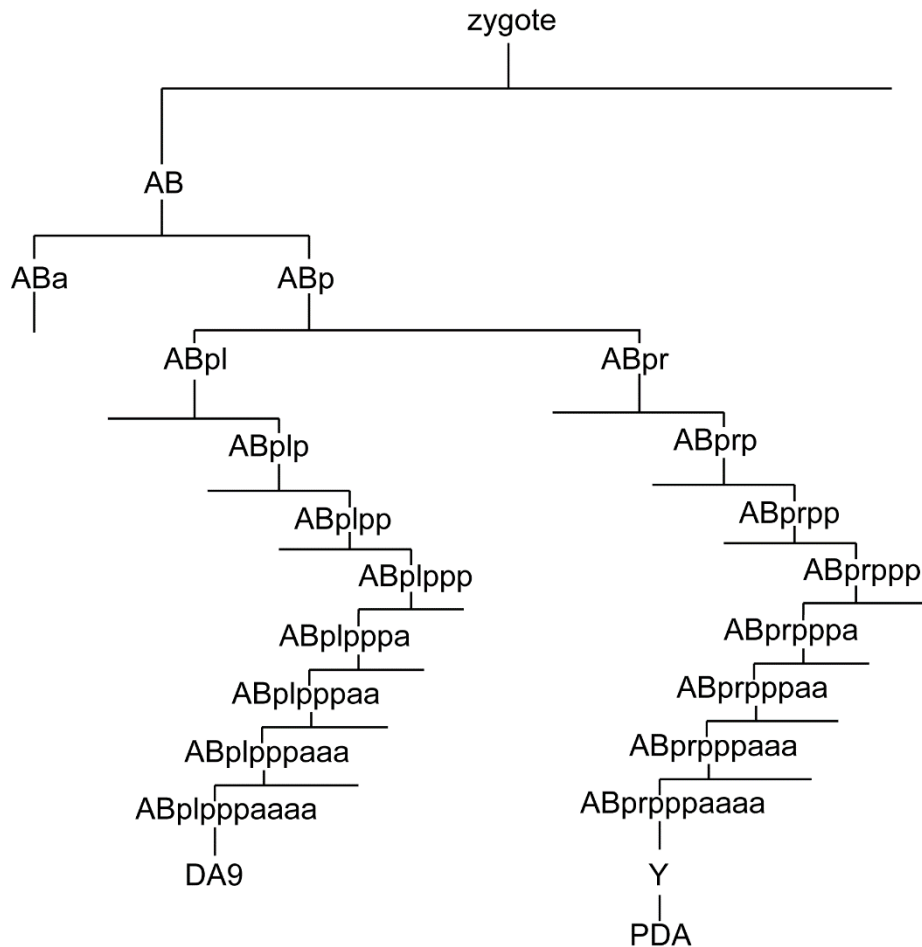


Figure 8 : représentation schématique du lignage cellulaire de DA9 et Y. Ces deux cellules sont controlatérales et ces deux lignages cellulaires se séparent lors de la troisième division embryonnaire.

Un signal NOTCH/*lin-12* est suffisant pour induire la transdifférenciation dans ces deux cellules en PDA. DA9 est originellement un neurone moteur, exprimant des marqueurs cellulaires différents de ceux exprimés par PDA et sa morphologie est également différente (Teichmann and Shen, 2011). On peut supposer qu'elles possèdent un facteur cellulaire commun, conservé au cours des divisions ou encore que DA9, au moment de l'impulsion du signal NOTCH, est au contact de la source. Mais ce n'est pas le seul signal nécessaire pour permettre à la cellule Y de changer d'identité, plusieurs gènes sont absolument essentiels à ce changement d'identité.

De plus, les études réalisées jusqu'à présent par les différents membres de notre laboratoire ont montré que l'élément temporel joue un rôle essentiel dans la transdifférenciation. Par exemple, si *lin-12* est exprimé trop tôt ou tard par rapport à son profil d'expression habituel, la transdifférenciation n'aura pas lieu. On peut donc parler de

fenêtre temporelle d'activité des gènes. *lin-12* n'est pas le seul gène à avoir une action contrôlée dans le temps.

Le gène *lin-15A* présente un défaut de PDA de classe I lorsqu'il est muté. Il s'agit d'un gène exprimé en opéron qui est essentiel pour la transdifférenciation et dans le développement de la vulve du ver. La protéine LIN-15A possède un domaine THAP impliqué dans la liaison des protéines à l'ADN. Il s'agit d'un des seuls gènes ne possédant pas d'homologue connu car la diversité de protéines possédant un domaine THAP et l'absence de connaissances rend difficile la mise en évidence d'un potentiel homologue de *lin-15A*. La fonction exacte de ce gène au sein de la transdifférenciation n'est pas encore complètement comprise. Jusqu'à présent, le laboratoire a démontré que ce gène appartient également à la catégorie des gènes à fenêtre temporelle d'activité. L'induction contrôlée de l'expression de ce gène permet de mettre en évidence que passé un certain moment de la transdifférenciation (fin de l'initiation de la transdifférenciation), il n'est plus possible de permettre la transdifférenciation.

Ainsi la spécificité de Y serait due à une succession précise de facteurs impliqués dans la transdifférenciation. Ces derniers agissent de manière précise et contrôlée dans le temps.

L'autre question qui est celle qui m'a motivée et passionnée pour mon travail de thèse était de comprendre comment ce processus peut-il être invariant, aussi efficace et robuste ?

5. Comment le processus est-il stéréotypé et invariant ?

Chaque mutant du laboratoire présente un défaut de PDA qui lui est propre. Ce défaut correspond à la pénétrance du mutant, c'est-à-dire le pourcentage de vers ne présentant pas de PDA. Ainsi, au sein d'un même mutant, une partie de la population surmonte la perte du gène en question et la transdifférenciation a lieu normalement, alors qu'une autre partie de la population n'y parvient pas et est comptabilisé comme défaut de Td.

Il est donc possible de séparer les différents mutants en deux catégories en fonction de leur pénétrance.

D'une part, certains gènes sont impliqués dans le cœur du processus et sont essentiels au changement d'identité. Ils présentent donc une forte pénétrance du défaut de PDA car il est plus difficile pour le processus de passer outre l'absence de ce gène. Ce défaut est considéré comme grand quand il dépasse 50%. On peut citer dans cette partie des gènes de classe I tels que *ceh-6*, *sox-2*, *ceh-6*, *hlh-16*. La perte de ces gènes implique l'apparition d'un défaut de la transdifférenciation d'Y en PDA, stoppant le processus de reprogrammation avant que la cellule Y ne migre.

Dans la catégorie des gènes de classe II, il y a principalement *unc-3*. Ce gène est essentiel pour la redifférenciation. Son absence provoque plus de 80% de défaut de PDA et touche également la formation d'autres neurones. *unc-3* est un facteur de transcription impliqué dans la neurogénèse et la spécialisation de tous les motoneurones, certains interneurones et les neurones cholinergiques.

D'autre part, certains facteurs ne sont pas essentiels au processus mais y jouent un rôle. Ce type de facteurs se distingue par le fait qu'au sein d'une population mutante seul un petit pourcentage de cette population n'a pas de PDA (environ 30%). Les gènes qui sont impliqués sont majoritairement impliqués dans l'épigénétique. On peut y trouver *jmjd-3.1* ou encore *wdr-5.1*, deux enzymes modificatrices d'histones (Zuryn et al., 2014) et *sel-10*, impliquée dans l'ubiquitination (ubiquitine ligase E3) (figure 9).

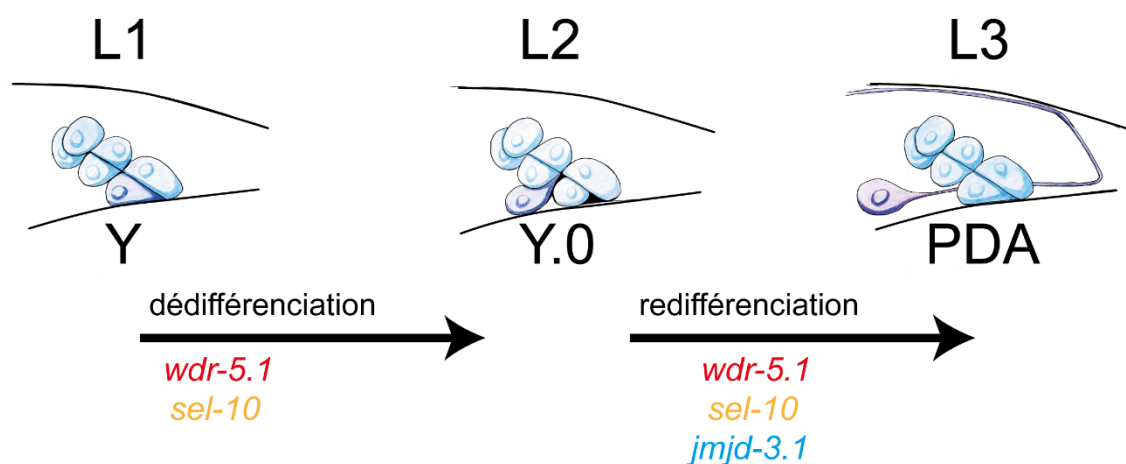


Figure 9 : Schéma de la transdifférenciation d'Y en PDA. *wdr-5.1* et *sel-10* sont impliqués dans les deux étapes de dédifférenciation et de redifférenciation (classe III). *jmjd-3.1* est seulement impliqué dans la redifférenciation de la cellule Y.0 en PDA (classe II).

Chez *C. elegans*, les principales modifications épigénétiques réellement démontrées sont des modifications d'histones. La méthylation de l'ADN a été supposée en 2012 par l'équipe de Gao (Gao et al., 2012). Mais aucune 5méthyl-cytosine a été mise en évidence. C'est en 2016 que la méthylation de l'adénine (N⁶-Adénine) est mise en évidence (Greer et al., 2015). Chez l'humain cette modification épigénétique est liée à une répression de l'expression des gènes (Wu et al., 2016). Cependant, chez *C. elegans*, sa fonction n'a pas été clairement définie.

On peut donc considérer que les modifications d'histones sont les principales modification épigénétiques ou sont, à minima les modifications connues pour réguler l'expression des gènes. Ces modifications d'histones impliquent une meilleure accessibilité de l'ADN pour les facteurs de transcription ou alors une meilleure stabilité de ces derniers sur les régions promotrices. Bien évidemment, il existe aussi des modifications d'histones impliquées dans la fermeture de l'ADN et la diminution de la stabilité des facteurs de transcription sur leurs régions cibles. Ces facteurs sont importants pour le destin cellulaire car plusieurs études sur la quantification du paysage de Waddington se basent non seulement sur les régulations faites entre facteurs de transcription mais également sur la force de liaison qui est faite entre le facteur de transcription et la région régulatrice cible. De cette interaction peut dépendre le destin cellulaire. (Li and Wang, 2013; Qin et al., 2016)

5.1. Enzymes ou activité de modificatrices d'histones

Les modifications épigénétiques sont, chez *C. elegans* essentiellement liées à des modifications d'histones. Ces modifications sont liées aux queues d'histones et assurent l'état de la chromatine. Le passage de l'euchromatine à l'hétérochromatine se fait par la reconnaissance de certaines marques épigénétiques et le remodelage de la chromatine par un ensemble de protéines (Bannister and Kouzarides, 2011). Mais ces modifications n'ont pas pour seul rôle d'ouvrir ou de fermer la chromatine. Elles sont également essentielles pour guider et faciliter la transcription de gènes (Shilatifard, 2006). Les facteurs de transcription impliqués dans la transdifférenciation agissent de manière séquentielle dans le temps. Ces facteurs de transcription sont responsables de la transcription d'autres gènes, donnant forme à la cascade de gènes impliqués dans la transdifférenciation (Samson et al., 2014). Cette séquence d'expression est régulée par différents mécanismes cellulaires. L'un

d'entre eux est l'épigénétique. Les protéines impliquées dans les modifications d'histones forment des complexes protéiques agissant avec les facteurs de transcription, permettant de cibler des régions précises de l'ADN (Wang et al., 2015).

5.1.1. Le rôle de *wdr-5.1*

WDR-5.1 est une protéine faisant partie du complexe SET-1. Ce complexe est impliqué dans la modification de l'histone H3K4me, impliquée dans la régulation de l'expression des gènes. Ce complexe protéique est responsable de la di- et tri-méthylation 2, 3 de l'histone 3 lysine 4. Cette modification est positivement corrélée avec l'activation de l'expression de gènes cibles. Connue pour être impliquée dans le changement d'identité de Y en PDA, *wdr-5.1* est également impliquée dans la régulation de l'expression des gènes lors de l'embryogénèse ou encore dans la formation de la lignée germinale. Membre du complexe SET-1, le rôle de *wdr-5.1* est connu pour intervenir dans le contrôle de la conformation de la chromatine et de la régulation de l'expression des gènes. Ce complexe SET-1, aussi appelé complexe COMPASS, ou encore MLL est composé de cinq protéines conservées de la levure *Saccharomycète Cerevisiae* à l'humain : Cps50/RbBP5, Cps30/WDR5, SET1/MLL1, Cps25/Dpy30 et Cps60/Ash2L (les deux noms de protéines correspondent aux noms chez la levure/l'humain). Chez *C. elegans*, les membres du complexe SET-1 sont *rbbp-5*, *wdr-5.1*, *set-1*, *dpy-30* et *ash-2*. Il est nommé d'après la protéine SET1/MLL1 comportant un domaine méthyltransferase afin de méthyler H3K4. WDR5 et AshL2 possèdent un domaine WD40 impliqué dans la reconnaissance de l'histone 3 lysine 4 (Takahashi et al., 2011). La protéine WDR-5.1 est composée de 7 répétitions WD40 (selon la base de données uniprot). Les sous unités composant le complexe SET-1/COMPASS peuvent varier d'une espèce à l'autre. Chez *C. elegans*, il varie suivant les stades du développement et le tissu cellulaire. Par exemple, WDR5 possède trois homologues au sein du ver : *wdr-5.1*, *wdr-5.2* et *wdr-5.3*. Les deux premiers gènes sont redondants lors de la formation de la gonade. En revanche, lors de l'embryogénèse, *wdr-5.1* seul semble important pour la triméthylation des histones H3K4 (Li and Kelly, 2011, 2014). Lors de la transdifférenciation de Y en PDA, *wdr-5.1* a un effet plus important que les autres membres du complexe COMPASS lors du changement d'identité. Dans son étude, Steven Zuryn montre que la mutation de *wdr-5.1* induit un plus fort défaut de PDA que d'autres membres du complexe SET-1. Les gènes *set-1*, *set-2*, *ash-2* et *dpy-30* présentent tous un défaut de transdifférenciation plus faible que *wdr-5.1* (Zuryn et al., 2014). De plus, la mutation du gène *wdr-5.1* est la seule du complexe SET-1 à avoir

été sélectionnée à la suite du crible de mutagénèse aléatoire. Ce dernier ne permet pas (ou difficilement) de mettre en évidence des acteurs de la transdifférenciation. Ce qui pourrait indiquer que *wddr-5.1* a un rôle central au sein du complexe SET-1 et pour la transdifférenciation de Y en PDA.

Comme énoncé dans la partie précédente de cette introduction, *wdr-5.1* est un gène de classe III, c'est-à-dire qu'il est essentiel à la fois pour l'étape de dédifférenciation et celle de redifférenciation. On peut quantifier la proportion de vers mutants avec un blocage à l'une ou l'autre étape en comptant le nombre de cellules épithéliales dans le rectum antérieur. Le gène *wdr-5.1* a été étudié au sein du laboratoire car un allèle mutant *fp9* a été isolé lors de l'expérience de mutagénèse aléatoire. Cependant, les études réalisées au laboratoire jusqu'à présent n'ont pas été faites en utilisant cet allèle pour deux raisons.

Premièrement, il s'agit d'une substitution 370 Isoleucine vers Lysine (370 I→K). D'après la base de données uniprot, quatre acides aminés sont particulièrement importants pour la fonction de WDR-5.1. Ils ont été mis en évidence par similarité avec les autres protéines homologues, les acides aminés 149, 175, 305 et 364. Ainsi, on peut supposer que la substitution de l'isoleucine 370 en lysine modifie la structure tridimensionnelle de la protéine, modifiant son activité. Mais ce n'est pas un mutant nul et cela rend difficile toute étude préliminaire sur la fonction de la protéine WDR-5.1 car il n'est pas possible de discriminer si un effet léger sur la transdifférenciation est dû à une action résiduelle de WDR-5.1 ou un rôle non essentiel dans le processus.

Deuxièmement, le défaut de PDA présenté par le mutant issu de la mutagénèse aléatoire est supérieur à celui présenté par *wdr-5.1*(allèle nul). Nous faisons l'hypothèse qu'un second gène est également muté et nécessite de plus amples recherches.

Ainsi, c'est l'allèle nul de *wdr-5.1* qui a été utilisé, présentant une délétion de 695 nucléotides, induisant un décalage du cadre de lecture et provoquant l'apparition d'un codon stop au niveau de l'acide aminé 119. La protéine WDR-5.1 n'est pas détectable dans le mutant *wdr-5.1(ok1417)* indiquant qu'il s'agissait d'un réel mutant nul (Li and Kelly, 2011). De plus, la quasi-totalité des domaines WD sont situés en aval du codon stop, permettant raisonnablement de conclure que cette protéine ne possède pas de fonction de liaison au complexe SET-1 et donc ne permet pas la méthylase d'histones.

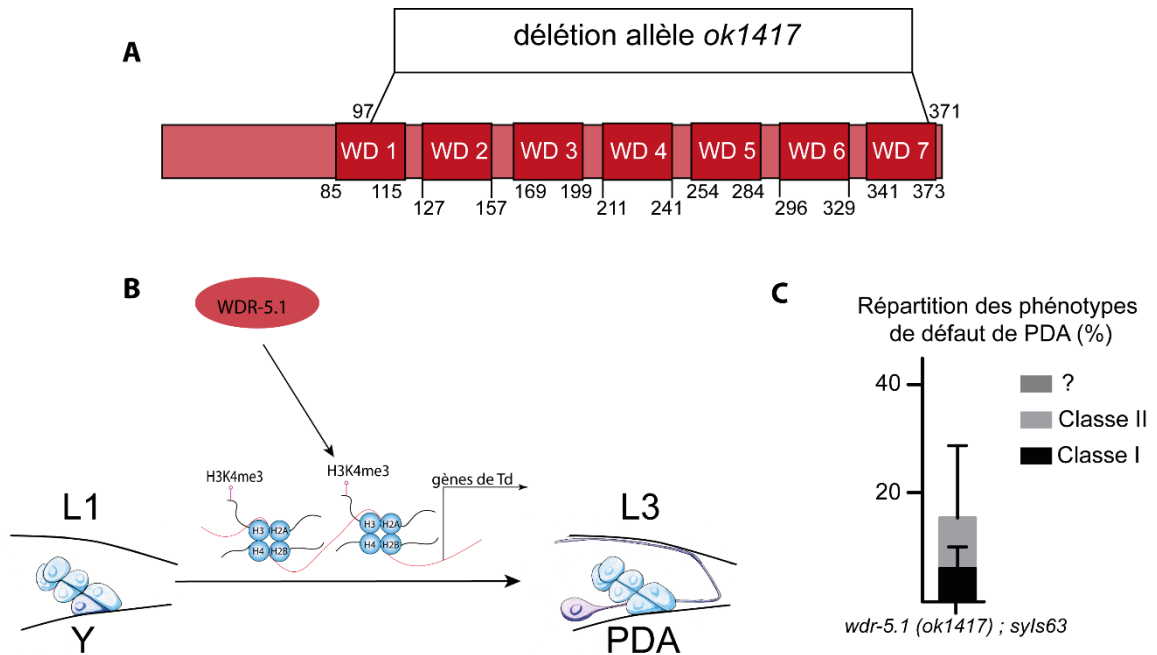


Figure 10 : **A)** Représentation graphique de la protéine WDR-5.1 les chiffres indiquent les positions en acides aminés des différents domaines protéiques (bas) et mutations (haut). **B)** représentation schématique de l'action de WDR-5.1 sur la transdifférenciation de Y en PDA. **C)** graphique représentant le défaut de PDA (en pourcentage de population $n=276$) et les phénotypes du défaut de transdifférenciation. Classe I correspond à 3 cellules dans le rectum antérieur. Classe II correspond à 2 cellules épithéliales dans le rectum antérieur et le « ? » indique qu'il n'y a pas de motoneurone observable mais que le nombre de cellules épithéliales n'a pas pu être observé.

Sur 276 vers observés à 20°C, Steven Zuryn montre qu'en moyenne 86,1% possèdent un PDA, la transdifférenciation s'est effectuée correctement. Par conséquent, 13,9% présentent une absence de PDA se divisant en 3 catégories : classe I (5,4%), classe II (7,5%) et inconnu (1%). Cette dernière catégorie correspond aux vers qui ne présentent pas de PDA mais pour lesquels il n'a pas été possible de compter le nombre de cellules épithéliales.

WDR-5.1 n'est pas la seule protéine impliquée dans l'épigénétique à avoir été mise en évidence dans le crible de mutagenèse aléatoire. Il y a également JMJD-3.1, montrant ainsi que les modificatrices d'histones jouent une part non négligeable dans la transdifférenciation.

5.1.2. Le rôle de *jmjd-3.1*

JMJD-3.1 est une protéine déméthylase me²/me³ de la lysine 27 de l'histone H3 (noté H3K27), homologue de JMJD3 chez l'humain. Cette fonction est antagoniste de la fonction du groupe polycomb. Ce dernier, impliqué dans la méthylation de H3K27, a un rôle dans la répression de l'expression des gènes (Burchfield et al., 2015; Vandamme et al., 2012; Zuryn et al., 2014). Une expression anormale (mutée ou surexprimée) du groupe polycomb provoque une expression anormale d'autres gènes entraînant des modifications sur l'identité cellulaire et provoquant également des cancers chez les mammifères (Burchfield et al., 2015; Tokunaga et al., 2016; Vandamme et al., 2012; Williams et al., 2014).

Les deux protéines JMJD-3.1 (chez *C. elegans*) et JMJD3 (chez l'humain) sont impliquées dans la différenciation neuronale (Burchfield et al., 2015). JMJD3 est également impliqué dans plusieurs maladies et développement embryonnaires (Burchfield et al., 2015). Son rôle dans l'identité cellulaire est démontré depuis qu'il agit en complexe avec p53, une protéine impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire et le maintien de l'intégrité du génome (Williams et al., 2014). Son rôle dans la formation de cancer et la perte d'identité cellulaire a aussi été mis en évidence dans le cancer colorectal (Tokunaga et al., 2016).

JMJD-3.1, tout comme son homologue vertébré possède un domaine jumonji C (JMJC), catalysant la déméthylation des me²/me³ H3K27. *jmjd-3.1* est également impliqué dans la migration de la gonade, régulé par *utx-1* (Vandamme et al., 2012). Ce dernier gène code également une protéine modificatrice d'histone, mais dans le cas de la transdifférenciation d'Y en PDA, *utx-1* ne semble pas avoir la même fonction qu'impliquant la régulation de la formation de *jmjd-3.1*. Tout comme *wdr-5.1*, *jmjd-3.1* présente des homologues : *jmjd-3.2* et *jmjd-3.3*, deux gènes possédant la même fonction que *jmjd-3.1* mais qui ne sont pas impliqués dans la transdifférenciation de Y en PDA.

L'étude de Steven Zuryn suppose que *jmjd-3.1* forme un complexe avec *unc-3* afin de cibler la déméthylation des queues d'histones H3K27 des gènes cibles de *unc-3*.

Le gène *jmjd-3.1* est exclusivement impliqué dans la redifférenciation de la transdifférenciation, il s'agit donc d'un gène de classe II : tous les vers présentant un défaut de PDA possèdent deux cellules épithéliales. Sur 285 vers, j'observe en moyenne 32% de défaut de PDA.

Il existe plusieurs allèles de *jmjd-3.1* issus du crible de mutagénèse aléatoire, tous ne sont pas mutés de la même façon au sein de ce gène. Pour toute cette étude, j'ai exclusivement travaillé avec l'allèle *fp15*. Cet allèle possède un codon stop au sein du domaine JmjC, inactivant la fonction de la protéine JMJD-3.1. Son incapacité à démétyler le variant d'histone H3K27 a été démontré *in vitro* (Zuryn et al., 2014).

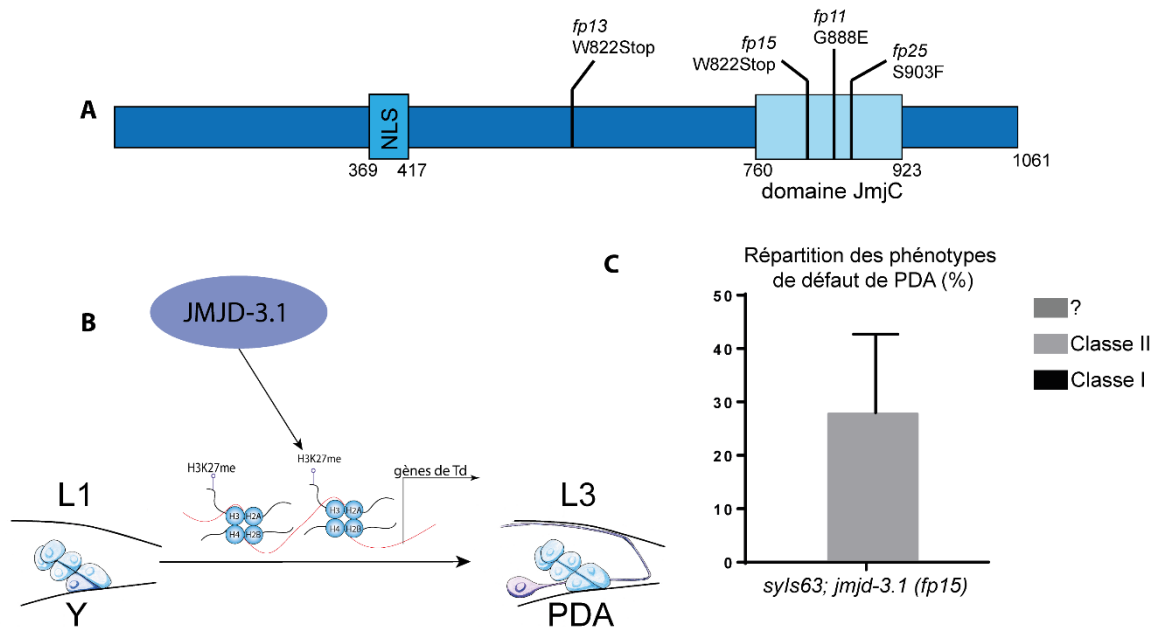


Figure 11 : **A)** Représentation graphique de la protéine JMJD-3.1 les chiffres indiquent les positions en acides aminés des différents domaines protéiques (bas) et mutations (haut). **B)** représentation schématique de l'action de JMJD-3.1 sur la transdifférenciation de Y en PDA. **C)** graphique représentant le défaut de PDA (en pourcentage de population n=276) et les phénotypes du défaut de transdifférenciation. Classe II correspond à 2 cellules épithéliales dans le rectum antérieur et ? indique qu'il n'y a pas de motoneurone observable mais que le nombre de cellules épithéliales n'a pas pu être observé.

Ces deux modificateurs d'histones sont impliqués dans l'efficacité du processus. Cette efficacité est caractérisée par le faible défaut de PDA présenté par les mutants. Les gènes impliqués dans l'efficacité du processus ne sont pas essentiels pour la reprogrammation en tant que telle mais permettent d'assurer le taux de reprogrammation

de 100%. Les protéines liées aux modifications d'histones sont impliquées dans l'assurance de la transcription des gènes clé, garantissant ainsi le fort taux d'efficacité.

Les conditions de stress cellulaire sont des conditions particulières pendant lesquelles la machinerie de transcription peut être détournée de son programme de transcription pour permettre à la cellule de produire de nouvelles protéines assurant la survie face au stress. Chaque stress peut impliquer une réponse différente de la part des cellules. Par exemple, un stress de forte température va induire la formation de protéines HSP (Heat Shock Protein) qui sont des protéines chaperonnes, elles aident les autres protéines à garder leur conformation malgré la chaleur. En revanche, un stress induit par des rayons ultraviolets provoque la formation de cassures à l'ADN qui doivent être repérées et réparées afin que la cellule garde son intégrité génomique.

Tous ces stress vont donc influencer sur la robustesse du processus de transdifférenciation et les gènes *jmjd-3.1* et *wdr-5.1* sont impliqués dans la robustesse de la transdifférenciation. En conditions environnementales de stress, induites par une température élevée pour le ver, une irradiation aux rayons ultraviolets, un stress oxydatif ou cytotoxique et expérimentées par Zuryn *et al*, ces derniers démontrent une augmentation de la proportion de défaut de PDA.

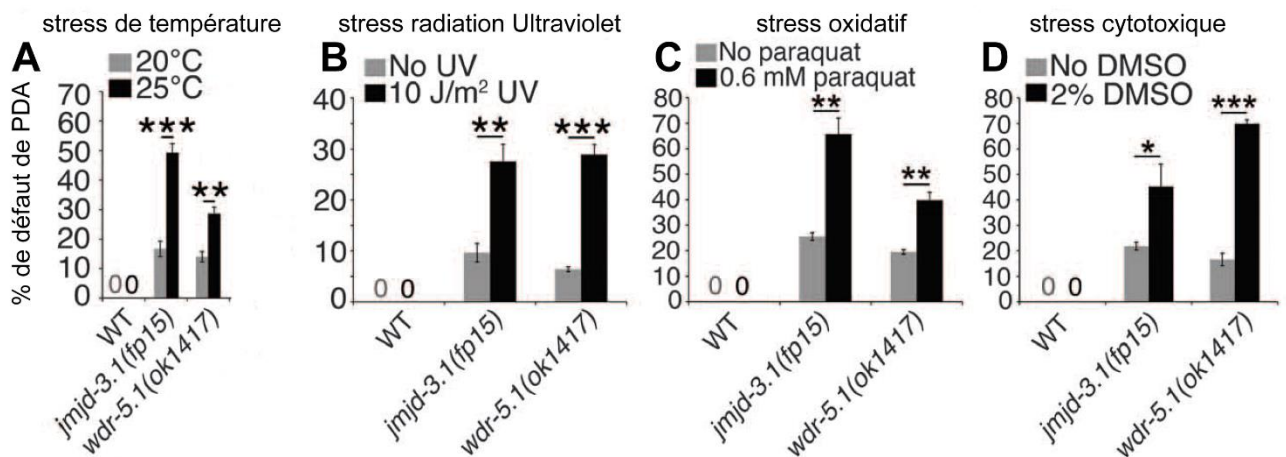


Figure 12 : adaptation de la figure de l'étude de Zuryn *et al*. 4 conditions de stress sont expérimentées sur trois souches différentes. La souche WT : *syIs63[cog-1p::cog-1::gfp]. syIs63 ; jmjd-3.1(fp15)* et *wdr-5.1(ok1417) ; syIs63*. Les barres d'erreurs indiquent l'erreur standard de la moyenne. $n > 100$ vers. *** $p < 0.001$. ** $p < 0.01$. * $p < 0.05$. (Zuryn *et al.*, 2014)

Les mutants *jmjd-3.1* et *wdr-5.1* sont donc probablement impliqués dans le maintien de la transcription des gènes impliqués dans la reprogrammation. Assurant la robustesse du

processus malgré le besoin de la cellule de modifier son transcriptome pour assurer sa survie malgré le stress. Par ailleurs, dans ces conditions de stress les différents mutants présentent l'apparition de phénotypes tel que le phénotype Rol pour les vers mutant *jmjd-3.1* alors que les mutants *wdr-5.1* présentent une importante stérilité et létalité. Ces effets montrent que ces gènes ont un impact sur la physiologie du ver, au-delà de la transdifférenciation d'Y en PDA.

5.2. Ubiquitine ligase E3

Les modifications d'histones sont-elles le seul mécanisme permettant d'assurer l'efficacité et la robustesse de la transdifférenciation ?

Des résultats préliminaires du laboratoire suggèrent que non, mettant en évidence l'implication de SEL-10 dans l'efficacité de la transdifférenciation.

Cette protéine est une ubiquitine ligase E3, une protéine impliquée dans l'ubiquitination des protéines a été découverte par Steven Zuryn lorsqu'il a mis en évidence l'allèle *fp15* de *jmjd-3.1*. La réalisation d'un crible par mutagenèse aléatoire, tel que celui qui a été réalisé par le laboratoire, se base sur la sélection d'un phénotype. C'est-à-dire, l'absence de PDA, plus la pénétrance est importante, plus il a été facile de suivre la mutation d'intérêt pour la mettre en évidence. *sel-10* était muté dans le même ver que le porteur de la mutation *jmjd-3.1* que je viens d'introduire. Cette double mutation augmente le défaut du simple mutant *jmjd-3.1* passant ce dernier de 20-30% à 70% de défaut de PDA. Après étude du génome, la mutation au sein du gène *sel-10* a été mise en évidence par Steven Zuryn qui a démontré que cette dernière était responsable de l'importante augmentation du défaut de *jmjd-3.1*. Il a exprimé *sel-10cDNA* au sein des cellules rectales afin de démontrer ce fait avant d'isoler l'allèle mutant *fp27* pour avoir la souche simple mutante. Il met alors en évidence qu'il s'agit d'un mutant de classe III présentant une faible pénétrance, seulement 10% de PDA sont absents dans le mutant.

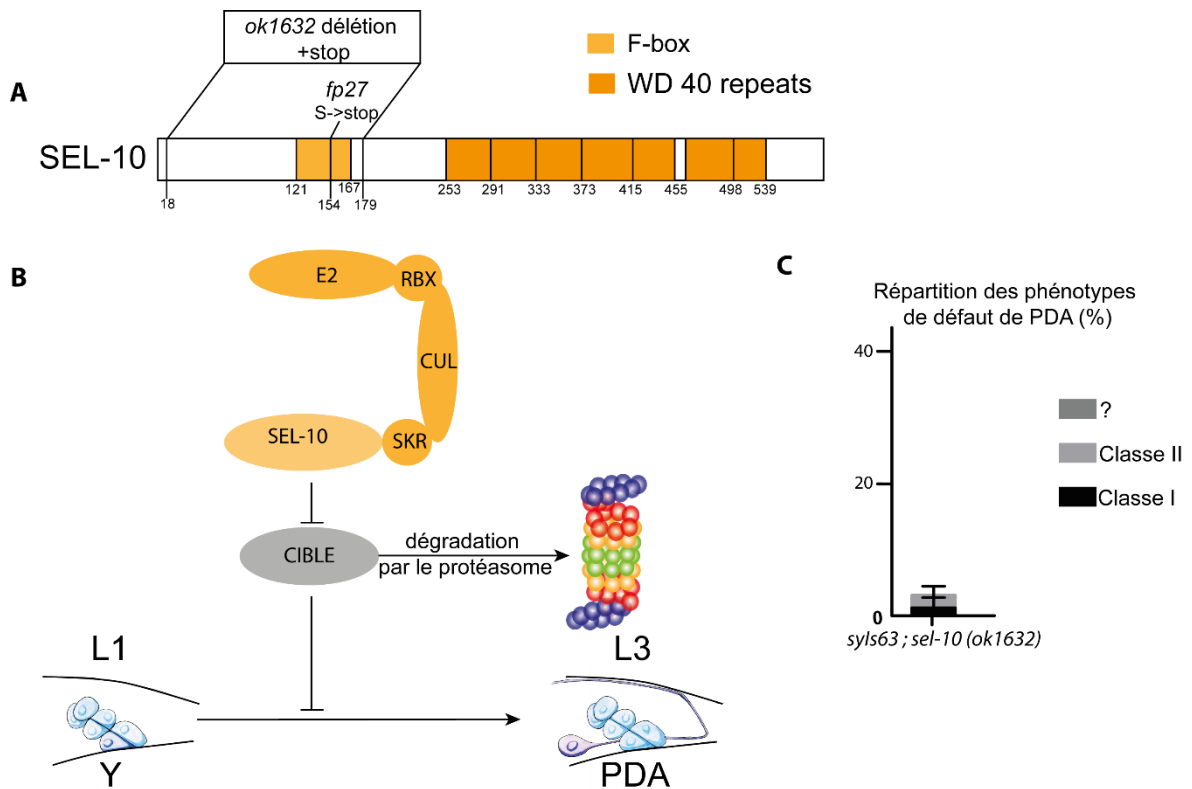


Figure 13 : **A)** Représentation graphique de la protéine SEL-10 les chiffres indiquent les positions en acides aminés des différents domaines protéiques et mutations. **B)** représentation schématique de l'action de SEL-10 sur la transdifférenciation de Y en PDA. La protéine SEL-10 est représentée avec le complexe SCF. La protéine cible de l'ubiquitine est probablement dégradée par le protéasome représenté sur ce schéma. **C)** graphique représentant le défaut de PDA (en pourcentage de population n=276) et les phénotypes du défaut de transdifférenciation. Classe I correspond à 3 cellules dans le rectum antérieur. Classe II correspond à 2 cellules épithéliales dans le rectum antérieur et le « ? » indique qu'il n'y a pas de motoneurone observable mais que le nombre de cellules épithéliales n'a pas pu être observé.

Le séquençage de cet allèle le présente comme un codon stop prématuré, impliquant qu'il s'agit probablement d'un mutant nul. L'implication d'une mutation dans le gène *sel-10* a été confirmée par le sauvetage de phénotype réalisé par Steven Zuryn.

Lors de cette étude, deux allèles sont utilisés : *fp27*, l'allèle mis en évidence par le laboratoire et *ok1632* qui est une délétion importante au sein du gène et d'une insertion de quelques nucléotides. Cet allèle a été créé par le « *C. elegans* knockout consortium » (Consortium, 2012) et caractérisé dans l'étude de Killian *et al.* (Killian *et al.*, 2008) et est également un mutant nul. Les deux allèles de *sel-10* présentent la même pénétrance, ainsi les deux mutants *jmjd-3.1(fp15)* et *sel-10(fp27)* sont considérés comme étant des mutants nuls fonctionnellement. Comme l'augmentation de la pénétrance du défaut de PDA au sein du double mutant est supérieure à la somme du défaut des deux simples mutants, on peut

parler de synergie entre les deux gènes. Le terme synergie est correctement employé ici, puisque l'expression des gènes ne fait pas partie de la même voie de signalisation, sinon le défaut du double mutant aurait atteint la même pénétrance que le simple mutant avec le défaut le plus élevé. Cependant les voies de signalisation ne sont pas complètement différentes, sinon les taux de pénétrance se seraient simplement additionnés. Il s'agit bien de deux gènes, aux voies de signalisation différentes mais aux cibles communes au sein de la cellule.

SEL-10 est une ubiquitine ligase E3, il s'agit une protéine possédant deux types de domaines protéiques : le domaine Fbox et le domaine WD40. Ce dernier domaine est présent en 7 répétitions, formant le domaine de reconnaissance de protéines cibles de l'ubiquitine. Le domaine Fbox permet à SEL-10 de se lier à la protéines SKR, la liant ainsi au complexe d'ubiquitination qui s'appelle complexe SCF (SKR-Cullin-Fbox). Ce complexe est composé d'une ligase E2, RBX, Culin, SKR et enfin une E3 possédant également un domaine Fbox. Il assure la reconnaissance de protéines et leur ubiquitination spécifique.

L'ubiquitine est une protéine de 76 aminoacides et est fixée sur des protéines cibles, modifiant leur destin. Suivant le type d'ubiquitination, le devenir au sein de la cellule de la protéine ciblée va varier. C'est le complexe d'ubiquitination qui est responsable de l'ubiquitination spécifique des protéines et du type d'ubiquitination qui sera réalisée (Aguilar and Wendland, 2003; Nelson et al., 2013). L'ubiquitination d'une protéine consiste à la liaison d'une protéine d'ubiquitine à l'un des résidus lysine de la protéine cible.

Cette étape de liaison de la protéine d'ubiquitine à une protéine cible peut être reproduite plusieurs fois, on parle de poly ubiquitination. Il en existe de plusieurs sortes, ayant différentes fonctions biologiques. L'ubiquitine peut être à son tour ubiquitinée sur l'un de ses résidus lysine, on parle de chaîne de poly-ubiquitine. Mais la protéine cible peut également être ubiquitinée à divers endroits ou alors être mono ubiquitinée. Tous ces types d'ubiquitination ont des rôles différents et certains sont plus communs que d'autres. Par exemple, la poly-ubiquitination en chaîne par la lysine K48 dirige la protéine ubiquitinée vers la dégradation par le protéasome 26S.

En revanche, une poly-ubiquitination en chaîne par le résidu de lysine 63 indique un recrutement protéique, une internalisation à la membrane ou une absorption endosomale (Nelson et al., 2013). Cette modification est également liée à la réparation de l'ADN. Il existe également des mono-ubiquitinations qui vont modifier la conformation de la protéine et en changer la fonction, cependant elles sont plus difficiles à mettre en évidence et sont de fait, plus rares (Aguilar and Wendland, 2003). Historiquement, l'ubiquitination des protéines conduit à leur dégradation et est donc liée à la chaîne K48. L'ubiquitination et les fonctions qui lui sont associées sont très conservées au sein de l'évolution, présentes chez tous les eucaryotes. Et un système similaire a été mis en évidence chez les archaées et certaines bactéries (Darwin, 2009; Humbard and Maupin-Furlow, 2013; Maupin-Furlow, 2013).

L'ubiquitination d'une protéine se fait en plusieurs étapes. Dans un premier temps, l'ubiquitine ligase E1 active l'ubiquitine, rendant possible sa liaison à l'ubiquitine E2. Cette dernière protéine fait partie d'un complexe d'ubiquitine, c'est-à-dire qu'elle est liée à d'autres protéines incluant au moins une ubiquitine ligase E3. Cette dernière est chargée de la reconnaissance spécifique des protéines à ubiquitiner. Action rendue possible par l'ubiquitine ligase E2, enzyme dont dépend le destin de la protéine et de sa cible au sein de la cellule.

Le complexe SCF n'est pas le seul complexe d'ubiquitination. Ces complexes sont définis en fonction des domaines protéiques de l'ubiquitine ligase E3. On peut citer 3 types de complexes : SCF, HECT et RING. Ces complexes, bien que tous impliqués dans l'ubiquitination de protéines sont tous essentiels à la cellule.

SEL-10 est une protéine possédant deux types de domaines protéiques : le domaine Fbox et le domaine WD40. Ce dernier domaine est présent en 7 répétitions, formant le domaine de reconnaissance de protéines cibles de l'ubiquitine. Le domaine Fbox permet à SEL-10 de se lier à la protéine SKR, la liant ainsi au complexe SCF, composé d'une ligase E2, RBX, Culin, SKR et enfin une E3 possédant également un domaine Fbox.

Chez *C. elegans*, il existe 6 culines, 21 SKR, 2 RBX et plusieurs centaines d'ubiquitines ligase E2. Les membres du complexe SCF sont donc redondants mais certains sont spécialisés dans un type d'ubiquitination. Ainsi, le complexe le plus connu est celui comportant *srk-1*, *cul-1* et *rbx-2*, impliqué dans la dégradation par le protéasome de protéines cibles (Aguilar and Wendland, 2003; Nelson et al., 2013). Les ubiquitines ligases E2 et E3 dépendent du substrat, c'est-à-dire de la protéine cible de l'ubiquitine (Nelson et al., 2013).

SEL-10 est conservée au sein du règne animal. Chez l'humain, son homologue s'appelle FBW7, protéine impliquée dans la dégradation de protéines cibles comme la partie intracellulaire de NOTCH, mTor, cycline E, c-Jun ou c-Myc. FBW7 possède 3 isoformes : α , β et γ (uniprot, (Bielskiene et al., 2015)) aux séquences légèrement différentes, si bien que l'isoforme β est cytoplasmique alors que les isoformes α et γ sont présents au sein du noyau des cellules. Plus précisément, l'isoforme α se situe dans le nucléoplasme pendant que l'isoforme γ est localisé dans le nucléolus (Popov et al., 2007; Welcker et al., 2004). Des mutations dans le gène FBW7 sont trouvées dans un certain nombre de cancers. FBW7 joue un rôle de suppresseur de tumeur, elle est, par exemple, mutée dans 31% des leucémies et dans 35% des cancers des canaux biliaires (Akhoondi et al., 2007). Dans cette même étude, les auteurs mettent en évidence que la perte d'un allèle de ce gène dans une souris mutante $p53^{-/+}$ implique une mutation plus importante du deuxième allèle de ce dernier gène. Ce taux important de mutation dans les cancers indique que FBW7 a un rôle dans le contrôle et le maintien de l'identité cellulaire. Ce rôle est confirmé par d'autres fonctions connues de FBW7. Par exemple, un autre rôle intéressant de FBW7 est lié au fait qu'elle régule la partie intracellulaire de NOTCH, régulant l'expression des cibles de ce facteur de transcription. La voie NOTCH est assez particulière dans le sens où le facteur de transcription NOTCH est une partie de protéine transmembranaire. Cette interaction cellule-cellule, active le récepteur de NOTCH qui va être clivé, libérant le domaine intracellulaire du domaine NOTCH appelé NID. C'est ce domaine qui est le facteur de transcription, il se lie à l'ADN et transcrit les gènes en aval de NOTCH.

Ce gène a été montré comme ayant un rôle dans le maintien et le renouvellement des cellules souches neurales (Jeon et al., 2011; Wen et al., 2009). Ainsi, en absence de l'ubiquitine ligase E3, l'activité de NOTCH perdure, provoquant un développement anormal du cerveau chez les souris mutantes. La balance entre l'identité « cellule souche neuronale » et « neurone différencié » est perturbée, penchant du côté de l'identité de cellules souches neuronales à cause de l'expression prolongée de NOTCH (Hu et al., 2011). De manière générale, FBW7 a un rôle important au sein de la détermination d'une identité cellulaire, que ce soit dans le maintien d'une identité ou lors de la différenciation cellulaire (Hoeck et al., 2010; Jandke et al., 2011). Cette protéine est impliquée dans de nombreux processus cellulaires qui ne sont pas tous cités ici (Takeishi and Nakayama, 2014).

La protéine SEL-10 a été décrite pour la première fois comme l'ubiquitine ligase E3 responsable de la dégradation de la partie intracellulaire de NOTCH/*lin-12* (Hubbard et

al., 1997), localisée au sein du cytoplasme (Dorfman et al., 2009). SEL-10 a aussi été montré comme impliqué dans la féminisation du ver, supposément en ciblant FEM-1 et FEM-3 (Jager et al., 2004). WDR-5.1 possède également un rôle au sein de cette voie de signalisation en promouvant l'expression du gène TRA-1 (Li and Kelly, 2014). Le destin cellulaire ovocyte/spermatozoïde est décidé par la balance d'expression entre les gènes *fem-1*, *fem-2*, *fem-3* et le gène *tra-1*. Ce dernier gène induit le destin cellulaire féminin et est inhibé par les gènes *fem* qui sont des ubiquitines ligases E2. C'est donc une balance d'expression et une régulation précise des gènes *fem* qui permet une détermination du destin sexuel du ver (au niveau des gonades, mais également les cellules somatiques). (Ding et al., 2007; Dorfman et al., 2009).

Puisque SEL-10 est impliquée dans la dégradation de la partie intracellulaire de NOTCH et qu'une trop longue expression de ce dernier facteur au sein de la cellule Y a été montrée comme délétère pour la transdifférenciation, il est surprenant de remarquer que la pénétrance du mutant *sel-10* est si faible. De plus une partie du défaut impliqué par la mutation de ce gène et présent lors de la redifférenciation, impliquant que l'étape d'initiation a été passée avec succès alors que c'est l'étape dans laquelle est impliquée NOTCH/*lin-12*. L'hypothèse la plus probable dans le cas de la transdifférenciation de Y en PDA est qu'un autre mécanisme cellulaire est impliqué dans la dégradation de NOTCH. Une autre ubiquitine ligase pourrait avoir un rôle redondant à SEL-10. De plus, d'autres protéines sont responsables de la dégradation de NOTCH non actif par l'endosome (Grant and Greenwald, 1997; Moretti et al., 2012) ou encore en ciblant l'activateur de NOTCH/*lin-12* à savoir *glp-1* (Grant and Greenwald, 1997).

Au sein de la transdifférenciation d'Y en PDA, seule l'implication de cette protéine dans le processus est connue. La synergie existante entre *jmjd-3.1* et *sel-10* avait été découverte en mettant en évidence l'existence de ce mutant. En parallèle, Steven Zuryn a également créé et quantifié l'effet de la double mutation *wdr-5.1* et *sel-10*, cherchant à savoir si une synergie similaire pouvait être observée avec un autre gène impliqué dans la modification d'histone ayant une pénétrance similaire à *jmjd-3.1*. Il en résulte que le double mutant *wdr-5.1(ok1417); sel-10(ok1632)* présente également une augmentation importante du défaut de PDA. Le résultat de cette étude est qu'il existe effectivement une synergie entre *sel-10* et *wdr-5.1*, bien que les deux gènes soient de classe III, c'est principalement le défaut de classe I qui est augmenté. Ceci implique que les deux gènes

agissent sur un processus commun lors de l'étape de dédifférenciation. A l'inverse, la synergie entre *jmjd-3.1* et *sel-10* induit une augmentation du défaut de classe II, plus évident dans ce cas puisque *jmjd-3.1* appartient exclusivement à cette catégorie.

Le lien qui unit la voie de l'ubiquitine et celle de l'épigénétique n'est que peu connu. Il existe des ubiquitinations de queues d'histones qui ont été mises en évidence dans différents organismes, incluant *C. elegans* telles que la mono-ubiquitination de H2B (Cecere et al., 2013) ou encore H2A (Samson et al., 2014). Ces modifications sont impliquées dans la régulation de l'expression des gènes, notamment en facilitant la transcription par la polymérase polIII. Cependant, je n'ai pas trouvé d'implication de SEL-10 dans cette voie cellulaire dans la littérature, la protéine semble être exclusivement liée à la dégradation spécifique des protéines par le protéasome. De plus, La protéine SEL-10 et son homologue FBW7 semblent être exclusivement cytoplasmiques, il est donc improbable que SEL-10 soit directement lié à l'épigénétique en tant que modificateur d'histone. L'interdépendance de l'ubiquitination des protéines et de l'épigénétique lors du changement d'identité cellulaire est donc une piste d'étude à explorer.

6. Objectifs de thèse

Le but principal de ma thèse a été de comprendre la complexité des mécanismes qui assurent la robustesse d'un événement de transdifférenciation naturel en caractérisant le mutant *sel-10* et son rôle au sein de la transdifférenciation.

6.1. Ubiquitine-protéasome système et caractérisation de l'action de SEL-10

Dans un premier temps, j'ai cherché à savoir comment la protéine SEL-10 agissait au sein de la transdifférenciation. Ce mécanisme est-il cellule autonome ? Dans quel compartiment cellulaire est localisée la protéine SEL-10 ? Grâce à des expériences de sauvetage de phénotype, il a été possible de répondre à ces questions en exprimant un transgène exprimant le gène *sel-10* au sein du double mutant *sel-10 ; jmjd-3.1*. Le sauvetage du phénotype de *sel-10* au sein de ce double mutant est suffisant pour briser la synergie qui existe entre les deux gènes *sel-10* et *jmjd-3.1*.

Dans un deuxième temps, j'ai cherché quels étaient les partenaires de SEL-10 ? Et si le protéasome a un potentiel rôle dans la transdifférenciation et la synergie entre *sel-10* et *jmjd-3.1*. Cette expérience par ARNi a pour rôle de connaître le devenir de la ou les cibles de SEL-10. Cette méthode permet de tester efficacement et rapidement un ensemble de gènes, permettant de discriminer quels gènes sont impliqués dans la transdifférenciation.

Enfin, directement liée à cette question, vient la grande problématique du travail sur une protéine ubiquitine ligase, c'est-à-dire connaître la cible protéique à ubiquitiner. En se basant sur la littérature qui montre un rôle robuste de SEL-10 dans la dégradation des protéines, une hypothèse a été formulée pour expliquer la synergie entre *jmjd-3.1 / wdr-5.1* et *sel-10*. Cette dernière suppose que la cible de *sel-10* est impliquée dans la répression de l'expression des gènes. En effet, si en absence de *sel-10* une protéine n'est plus dégradée et que l'action de *jmjd-3.1* ou *wdr-5.1* est suffisante pour permettre un faible effet sur la transdifférenciation, alors cette protéine a une fonction antagoniste à celle de ces deux derniers gènes : à savoir une fonction de répression de l'expression des gènes.

6.2. Robustesse de la transdifférenciation

L'une des questions posées par cette étude est de savoir si *sel-10* a un rôle dans la robustesse de la transdifférenciation. En effet, puisque ce dernier agit en synergie avec *jmjd-3.1* d'une part et *wdr-5.1* d'autre part. Comme ces deux gènes sont impliqués dans la robustesse de ce changement d'identité, il nous a paru intéressant de déterminer si la synergie observée est révélatrice d'une action de *sel-10* sur la robustesse de la transdifférenciation de Y. Nous avons par ailleurs examiné si *sel-10* était impliqué dans la protection contre différents types de stress (ou si différents types de stress requièrent l'activité de *sel-10*)

6.3. Implication de la robustesse et transcription

Afin d'expliquer le rôle de *jmjd-3.1* et *wdr-5.1* assurant la robustesse de la transdifférenciation, l'une des hypothèses avancées est que ces modificatrices d'histones assurent l'expression des gènes cibles au-dessus d'une certaine limite, en dessous de

laquelle la transdifférenciation n'est plus possible. Cette sécurité est particulièrement importante car dans des conditions défavorables environnementales, d'autres gènes sont exprimés et les machineries de transcription et traduction sont recrutées pour ces nouveaux gènes. Les modifications épigénétiques assurent que les gènes impliqués dans la transdifférenciation continuent à être exprimés à un niveau invariant et/ou invariable. Afin de tester cette hypothèse, il a fallu quantifier l'expression de gènes impliqués dans la transdifférenciation ou indicateurs de cette dernière dans une cellule unique. L'approche abordée a été de réaliser un smFISH (single molécule Fluorescent In Situ Hybridation). Cette technique permet la quantification d'ARNm dans un ver fixé. La cellule d'intérêt est préalablement marquée pour permettre une quantification précise au sein de cette cellule (tous les détails de cette expérience sont présentés dans la partie « matériel et méthode » et seront rapidement rappelés dans la partie « Résultats »). Plusieurs expériences de smFISH ont donc été réalisées à différents moments de la redifférenciation en condition de stress avec le mutant *jmjd-3.1*. La transcription de quatre gènes a donc été quantifiée : *cog-1*, *unc-33*, *rimb-1* et *unc-3*. Ce sont tous les quatre des gènes exprimés lors de la redifférenciation de Y en PDA et deux d'entre eux sont des marqueurs de l'identité pan neuronale. *rimb-1* est un marqueur terminal de l'identité neuronale, il est considéré comme un marqueur pan neuronal. *unc-33* est un gène impliqué dans la formation et le guidage des axones. *unc-3* est un gène impliqué dans la redifférenciation de Y en PDA. Il est exprimé dans tous les motoneurones, mais également dans certains autres neurones, tels que certains interneurones. Il s'agit d'un facteur de transcription qui est clé pour la redifférenciation. Une hypothèse suppose qu'il agit en amont de *jmjd-3.1* et forme un complexe avec ce dernier afin d'activer spécifiquement les gènes impliqués dans la suite de la redifférenciation (Zuryn et al., 2014). *cog-1* est le marqueur de PDA que nous utilisons actuellement pour observer la transdifférenciation. Il est impliqué dans la neurogenèse comme sélecteur d'identité entre ASEL et ASER.

Cette expérience a également été réalisée avec le mutant *wdr-5.1* avec des marqueurs de l'initiation de la transdifférenciation : *hlh-16*, *sox-2* et *ceh-6*.

Alors que *sel-10* agit en synergie avec les deux modifcatrices d'histones *jmjd-3.1* et *wdr-5.1*, il est légitime de se demander comment l'expression de ces gènes se comporte en présence du mutant *sel-10* et des double mutants *wdr-5.1 ; sel-10* et *sel-10 ; jmjd-3.1*.

Le but de cette expérience est également de savoir si ces gènes agissent spécifiquement sur certains gènes ou s'ils ont une action plus globale sur le transcriptome.

Matériel
&
Méthodes

Matériel

1. Les kits

Machery Nagel	NucleoSpin Gel and PCR clean up Nucleobon Xtra-Midi NucleoSpin Plasmid
Qiagen	QIAprep® Spin Miniprep kit RNeasy Mini Kit
Promega	T7 RNA polymerase

2. Solutions

H ₂ O libre d'ARNase	1mL DEPC (sigma Aldrich) 1L H ₂ O ultrapure Incuber >24h à température ambiante, autoclaver
M9	3.0 g KH ₂ PO ₄ 6.0 g Na ₂ HPO ₄ 0.5 g NaCl 1.0 g NH ₄ Cl H ₂ O Qsp 1L
Tampon de PCR 10X Aliquoter en volumes de 1mL et conserver à -20°C.	15 mM MgCl ₂ 500 mM KCl 100 mM Tris-HCl, pH 8.3 à 25°C
PBS 10X	80g NaCl 2g KCl 14,4g Na ₂ HPO ₄ 2.4g KH ₂ PO ₄ H ₂ O libre d'ARNase Qsp 1L
Solution javelisation (« bleaching ») Faire frais, dans la mesure du possible.	5mL NaOH 10M 5mL javel (5% sodium hypochlorite) Eau distillée Qsp 50mL
Tampon de fixation Aliquoter en volumes de 1mL et conserver à -20°C.	16mL PFA 16% 4mL PBS 10X

	20mL H ₂ O libre d'ARNase, déionisée et stérile.
Solution d'hybridation Aliquoter en volumes de 100µL et conserver à -20°C.	1g dextran sulfate 10mg <i>Escherichia coli</i> ARNt 100µL 200mM vanadyl ribonuclease complex 40µL 50mg/mL BSA libre d'ARNase 1mL Formamide (10% concentration finale) H ₂ O libre d'ARNase, déionisée et stérile Qsp 10mL
Tampon de Lyse	50µL Protéinase K 100µL Tampon de PCR 10X 850µL H ₂ O ultrapure
Solution de lavage	5mL Formamide (10% concentration finale) 5mL 20X SSC 40mL H ₂ O libre d'ARNase, déionisée et stérile
SSC 20X	175.3g NaCl 88.2g trisodium citrate pH 7.0 H ₂ O libre d'ARNase, déionisée et stérile Qsp 1L

3. Les sondes de smFISH

Les sondes sont obtenues par le site stellaris (<https://www.biosearchtech.com/stellaris-designer>). Les paramètres proposés par le site pour la sélection des sondes est déjà celui considéré comme optimum par la communauté scientifique (communication orale). Nombre maximal de sonde par ARN cible : 48 ; longueur des oligonucléotides : 20nt ; espace minimal entre deux oligonucléotides : 2nt. Le nombre minimum de sondes par set est 25. Les sondes sont reçues en conditionnement sec et sont resuspendues suivant le protocole de Biosearch technologie La concentration mère est de 100µM dans un volume de 50µL. Les sondes sont ensuite aliquotées en petits volumes (4-10µL) puis stockées à -20°C.

Les sondes ciblant les ARNm de *cog-1*, *rimb-1*, *unc-3* et *unc-33* ont été commandées par moi (voir tableau annexes). Les sondes ciblant *hlh-16*, *ceh-6* et *sox-2* étaient déjà présentes au sein du laboratoire.

4. Matériel d'imagerie

Le système d'imagerie utilisé est décrit dans le tableau ci-dessous :

Tableau I : matériel d'imagerie des vers (smFISH et autres observation confondues)

Microscope	Zeiss imager Z1
Lampe fluorescente	HBO100
Objectifs	100X 1,3ON huile 40X 1.3 ON huile 10X
Filtre (Quasar 670)	Ref : F-36-523 Excitation : 628/40 ; Emission : 692/40 ; dichroïque : 660
Filtre GFP	filter set 38 Excitation : 470/40 ; Emission : 525/50 ; dichroïque : 495
Filtre DAPI	Filter set 49 Excitation : 365 ; Emission : 445 ; dichroïque : 395
Filtre dsRed	Filter set 43 Excitation : 545 ; Emission : 605 ; dichroïque : 570
Camera	iKon-M (Andore)
Logiciel de capture	micromanager

5. Matériel d'injection

Microscope	Zeiss Axiovert 100
Micromanipulation	eppendorf
Capillaires	HARVARD apparatus 1.0 OD x0.58 ID x100L mm
Tireuse d'aiguilles	Model P-97 sutter instrument
Huile	700 Halocarbon oil (Halocarbon Products, River Edge, NJ)
Sourcil	Poil de sourcil scotché à un cure dent.
Lamelle d'injection	Menzel Gläser 25X60mm #1
Micro injecteur	Eppendorf FemtoJet-express
Loupe binoculaire	Wild M3C Heerbrugg Switzerland
Azote sous pression	Alfagaz TM 1 azote SmARTOP

6. Oligonucleotides

Les oligonucléotides ont été synthétisés par SigmaAldrich.

Le tableau ci-dessous décrit l'ensemble des oligonucléotides utilisés.

Tableau II : liste des oligonucléotides utilisés	
Megawhop insertion de mCh en C-term de SEL-10	
sz235F mCh-col-34	caccaaaccaccactgcatacaATGGTCTCAAAGGGTGAAGAAGATAAC
sz236R mCh-col-34	gtgtacatcatttctgtgccacatCTTATACAATTCATCCATGCCACCTGTC
Délétion du domaine Fbox	

sz237F sel-10 (fbox)	cagcgtgattcctctcctgc
sz238R sel-10(fbox)	tggatgatgttaactcttcgacacc
Localisation membrane plasmique	
cd38F col-34_PH	caccaaaccaccactgcatacaATGcacgggctccaggatgacccggacc
cd38R PH_mCherry	GTTATCTTCTTCACCCTTTGAGACCATctctgcccgtggtccatggag
Localisation nucléaire	
cd181F 2NLS sel-10	cacaccaaacaccactgcatacaatgacagcaccgaaaaaaag
cd182R 2NLS sel-10	GTTATCTTCTTCACCCTTTGAGACCATTTTCTACCGGTACTTTGCG
Mutation ponctuelle P->A domaine F box	
cd108F fbox P->A	ctctgcctcgtctgagctcgg
cd109R fbox P->A	ccgagctcgacagcgaggcaggag
<i>col-34p ::Fbox ::mCherry ::sel-10 ADNc ΔFbox</i>	
cd52F col -34 Fbox	CAAACCACCCTGCATAACAATGCTCCCTGTTCGAGCTCGGAATG
cd53R Fbox mCh	CTTCTTCACCCTTTGAGACCATAAGACTCTTCCAAATTTTGTC
<i>col-34p::PH::gfp</i>	
cd54	CTCCATGGACCAGCGGCAGAAGATAGAGTAAAGGAGAAGAACTTTT CAC
cd55	CAGTTGGAATTCTAGGAATGCTATTTGTATAGTTCATCCATCCATGC CA
CRISPR Cas9 <i>cec-6</i>	
cd110F <i>cec-6</i> sgRNA 1	gaaattcaaggatctcgtGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG
cd111 R <i>cec-6</i> sgRNA1	tacgagatcctgaatttcCaagacatctcgcaataggag
cd112 F <i>cec-6</i> sgRNA2	GTACGGAAAGCACTAAACGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG
cd113R <i>cec-6</i> sgRNA2	CGTTTAGTGCTTTCCGTACCaaagacatctcgcaataggag
Séquençage <i>cec-6</i>	
cd132 F <i>cec-6</i> seq 1	CCCAGCCGCAGCCTGTTTTC
cd133 F <i>cec-6</i> seq 2	CGCTCAGTTGCTGGAATGCTTG
Génotypage <i>jmjd3.1(fp15)</i>	
Sz2	gctctagacgattaggaacgtaggcatcaaa
BDR974	TACATCACAAGAAGTCCTCGAA
Génotypage <i>sel-10(ok1632)</i>	
sz138	CATATGTGGCCACGAAATGTATGT
sz139	cagaccttgcaacacaaactg
sz140	ctcaaggacatactccactgttc
Génotypage <i>wdr-5.1(ok1417)</i>	
sz80	caatttcgcatcaaatccgactg
sz81	gatgttctgaactggatgacaatcg
sz141	ctgttccgagatactttccaca
Génotypage <i>rpn-10</i>	
cd59	gctcgatattccatccgaaa
cd60	GGAAATCTCCGTTGCGCATG
cd61	GAAGATCGTCCACAATTTGCTGC
Génotypage <i>jmjd-2</i>	
sz233	gggcaaattgccggaattga
sz241	tggaatatgaatcggctgggc
Expériences ARNi	
cd3 bet-1a/b F	taatacgactcactatagggcagcggagaccaatcacaac
cd4 bet-1a/b R	taatacgactcactataggggaatacataaagcaaccga
cd5 <i>cec-6</i> F	taatacgactcactataggggccaagatgtgtccgatta
cd6 <i>cec-6</i> R	taatacgactcactatagggaaattccattccgcattg
cd13 <i>nhl-2</i> F	taatacgactcactatagggatgcaccacgagtcacatt
cd14 <i>nhl-2</i> R	taatacgactcactatagggcaacgcaccgagaaagteta
cd21 <i>zfp-1</i> F	taatacgactcactatagggtaaaacggaacttcatcca
cd22 <i>zfp-1</i> R	taatacgactcactataggggttggatccaggtgatgtg
cd34 F <i>rpn-10</i>	taatacgactcactatagggcaagtctgtccacagaacaagg

cd35 R rpn-10	taatacgactcactataggggatccgatgaagagaacaacg
cd36 F pbs-5	taatacgactcactatagggaccattggcgctcgtcta
cd37 R pbs-5	taatacgactcactatagggcatcgtggcaaccatacga
cd142 F skr-4 RNAi	taatacgactcactataggggtgagccaagaagtcgaaaa
cd143 R skr-4 RNAi	Taatacgactcactatagggcacattctgggtggtcacttc
cd144 F skr-5 RNAi	taatacgactcactatagggatgagcagcgaagagcaaga
cd145 R skr-5 RNAi	taatacgactcactatagggcagaggtgacattttcaatgg
cd146 F skr-6 RNAi	taatacgactcactataggggtggtgaatgggattccg
cd147 R skr-6 RNAi	taatacgactcactatagggccaacctagcacgaatttga
cd 148 F sk-7 RNAi	taatacgactcactatagggctgacttgattgttgcctcc
cd149 R skr-7 RNAi	taatacgactcactatagggctcctttgcagccttctc
cd157 Fskr-9RNAi	taatacgactcactatagggcgactgatcgttgcctgta
cd158 Rskr-9RNAi	taatacgactcactatagggtttgaagttgatggctcag
cd159 Fskr-10RNAi	taatacgactcactatagggactaccaacaatgtccgctg
cd 160 R skr-10RNAi	taatacgactcactataggggttgatccattgaagctacac
cd 161 F skr-11RNAi	taatacgactcactataggggtcgatgccagaggct
cd 162 R skr-11RNAi	taatacgactcactatagggcaactggaattggagccat
cd 163 F skr-12RNAi	taatacgactcactatagggcacaagccgatgcaattc
cd 164 R skr-12RNAi	taatacgactcactataggggttgaacaagtcttacacccaa
cd 165 F skr-13RNAi	taatacgactcactatagggcgaaggttgcgaattgtgt
cd 166 R skr-13RNAi	taatacgactcactatagggtttgaagccagaatcaaatcaa
cd 167 F skr-14RNAi	taatacgactcactataggggactgtttcgttaaacgacg
cd 168 R skr-14RNAi	taatacgactcactatagggctcgtcattttgtcag
cd 169 F skr-15RNAi	taatacgactcactataggggctgagaacgccgagtcaat
cd 170 R skr-15RNAi	taatacgactcactataggggatcccactggaaggact
cd 171 F skr-16RNAi	taatacgactcactatagggacgtctccacaatgggatt
cd 172 R skr-16RNAi	taatacgactcactatagggagtctctcaattgtcgggg
cd 173 F skr-18RNAi	taatacgactcactatagggatccgtgctctccagctct
cd 174 R skr-18RNAi	taatacgactcactatagggttcttttgccttttcgg
cd 175 F skr-19RNAi	taatacgactcactatagggatttctctgcttctcgttcaa
cd 176 R skr-19RNAi	taatacgactcactatagggggcgaatcatagacctgtgg
cd 177F skr-20RNAi	taatacgactcactatagggttccatcatgaccacacc
cd 178 R skr-20RNAi	taatacgactcactatagggggaacgagaattggatctgc
cd 179 F skr-21RNAi	taatacgactcactatagggatcggtcagatcaagccagt
cd 180 R skr-21RNAi	taatacgactcactataggggcacaaagctacagatgctgg

7. Plasmides

Le tableau ci-dessous décrit l'ensemble des plasmides utilisés au cours de ce travail.

Tous ces plasmides possèdent un gène de résistance à l'ampicilline.

Tableau III : liste des plasmides utilisés	
Nom du plasmide	Composition
pSJ976	[<i>col-34p</i> :: <i>sel-10cDNA</i> :: 3'UTR <i>unc-54</i>]
pSJ9032	[<i>col-34p</i> :: <i>mCherry</i> :: <i>sel-10ADNc</i> :: 3'UTR <i>unc-54</i>]
pSJ9033	[<i>col-34p</i> :: <i>mCherry</i> :: <i>sel-10ADNc</i> Δ <i>Fbox</i> :: 3'UTR <i>unc-54</i>]
pSJ9065	[<i>col-34p</i> :: <i>Fbox</i> :: <i>mCherry</i> :: <i>sel-10ADNc</i> Δ <i>Fbox</i> :: 3'UTR <i>unc-54</i>]
pSJ9066	[<i>col-34p</i> :: <i>mCherry</i> :: <i>sel-10ADNc</i> <i>P->A Fbox mutated</i> :: 3'UTR <i>unc-54</i>]
pSJ9067	[<i>col-34p</i> :: <i>PH</i> :: <i>mCherry</i> :: <i>sel-10ADNc</i> ::3'UTR <i>unc-54</i>]
pSJ9064	[<i>col-34p</i> :: <i>2NLS</i> :: <i>mCherry</i> :: <i>sel-10ADNc</i> ::3'UTR <i>unc-54</i>]
pSJ9068	[<i>col-34p</i> :: <i>PH</i> :: <i>gfp</i> ::3'UTR <i>unc-54</i>]

pSJ9063	<i>PDD12 backbone including cec-6 ARNg</i>
---------	--

8. Allèles

Le tableau ci-dessous décrit l'ensemble des allèles utilisés.

Tableau IV : liste des allèles utilisés :		
Nom de l'allèle	Génotype	Type d'allèle
<i>fpEx520</i>	<i>[col-34p :: sel-10ADNc :: 3'UTR unc-54] (20ng/μL) [odr-1dsRed] (50ng/μL)</i>	Extrachromosomal
<i>fpEx865</i>	<i>[col-34p :: mCherry :: sel-10ADNc :: 3'UTR unc-54] (10ng/μL) [odr-1dsRed] (50ng/μL)</i>	Extrachromosomal
<i>fpEx866</i>	<i>[col-34p :: mCherry :: sel-10ADNc :: 3'UTR unc-54] (10ng/μL) [odr-1dsRed] (50ng/μL)</i>	Extrachromosomal
<i>fpEx867</i>	<i>[col-34p :: mCherry :: sel-10ADNc :: 3'UTR unc-54] (10ng/μL) [odr-1dsRed] (50ng/μL)</i>	Extrachromosomal
<i>fpEx909</i>	<i>[col-34p :: mCherry :: sel-10ADNc ΔFbox :: 3'UTR unc-54] (10ng/μL) [odr-1dsRed] (50ng/μL)</i>	Extrachromosomal
<i>fpEx910</i>	<i>[col-34p :: mCherry :: sel-10ADNc ΔFbox :: 3'UTR unc-54] (10ng/μL) [odr-1dsRed] (50ng/μL)</i>	Extrachromosomal
<i>fpEx911</i>	<i>[col-34p :: mCherry :: sel-10ADNc ΔFbox :: 3'UTR unc-54] (10ng/μL) [odr-1dsRed] (50ng/μL)</i>	Extrachromosomal
<i>fpEx921</i>	<i>[col-34p::PH::mch::sel-10ADNc::3'UTR unc-54] (10ng/μL) [odr-1dsRed] (50ng/μL) lignée 1</i>	Extrachromosomal
<i>fpEx922</i>	<i>[col-34p::PH::mch::sel-10ADNc::3'UTR unc-54] (10ng/μL) [odr-1dsRed] (50ng/μL) lignée 2</i>	Extrachromosomal
<i>fpEx923</i>	<i>[col-34p::PH::mch::sel-10ADNc::3'UTR unc-54] (10ng/μL) [odr-1dsRed] (50ng/μL) lignée3</i>	Extrachromosomal
<i>fpEx954</i>	<i>[col-34p :: Fbox:: mCherry :: sel-10ADNc ΔFbox :: 3'UTR unc-54] (10ng/μL) [odr-1dsRed] (50ng/μL)</i>	Extrachromosomal
<i>fpEx998</i>	<i>[col-34p::PH::gfp::3'UTR unc-54] (10ng/μL) [odr-1p::dsRed] (50ng/μL)</i>	Extrachromosomal
<i>fpEx 999</i>	<i>[col-34p :: mCherry :: sel-10ADNc ΔFbox :: 3'UTR unc-54] (10ng/μL) [odr-1dsRed] (50ng/μL)</i>	Extrachromosomal
<i>fpEx1073</i>	<i>[col-34p :: mCherry :: sel-10ADNc P->A Fbox mutated :: 3'UTR unc-54] (10ng/μL) [odr-1dsRed] (50ng/μL)</i>	Extrachromosomal
<i>fpEx1074</i>	<i>[col-34p :: mCherry :: sel-10ADNc P->A Fbox mutated :: 3'UTR unc-54] (10ng/μL) [odr-1dsRed] (50ng/μL)</i>	Extrachromosomal
<i>fpEx1075</i>	<i>[col-34p :: mCherry :: sel-10ADNc P->A Fbox mutated :: 3'UTR unc-54] (10ng/μL) [odr-1dsRed] (50ng/μL)</i>	Extrachromosomal
<i>ok16312</i>	<i>sel-10 (ok1632)</i>	Nul (délétion)
<i>fp27</i>	<i>sel-10 (fp27)</i>	Nul (stop prémature)

<i>fp15</i>	<i>jmjd-3.1 (fp15)</i>	Nul fonctionnel (stop prémature)
<i>ok1417</i>	<i>wdr-5.1 (ok1417)</i>	Nul délétion
<i>tm2966</i>	<i>jmjd-2 (tm2966)</i>	Nul (insertion)
<i>fp30</i>	<i>cec-6 (fp30)</i>	Insertion/délétion (stop prémature) supposé nul
<i>pk1426</i>	<i>rrf-3 (pk1426)</i>	Nul (délétion)
<i>ok1865</i>	<i>rpn-10 (ok1865)</i>	Nul (délétion)
<i>syIs63</i>	<i>[cog-1p::cog-1::gfp]</i>	Transgène intégré
<i>fpIs101</i>	<i>[col-34p::PH::gfp]</i>	Transgène intégré

9. Souches de *C. elegans*

Le tableau ci-dessous décrit l'ensemble des souches utilisées.

Tableau V : liste des souches utilisées	
Nom de la souche	Génotype
IS98	<i>syIs63 IV</i>
IS658	<i>syIs63 IV; jmjd-3.1 (fp15)X</i>
IS665	<i>syIs63 IV ; sel-10 (fp27) V</i>
IS1239	<i>rrf-3(pk1426) II ; syIs63 IV ; jmjd-3.1 (fp15)X</i>
IS1399	<i>syIs63 IV; sel-10(fp27) V; jmjd-3.1(fp15) X; fpEx865</i>
IS1400	<i>syIs63 IV; sel-10(fp27) V; jmjd-3.1(fp15) X; fpEx866</i>
IS1401	<i>syIs63 IV; sel-10(fp27) V; jmjd-3.1(fp15) X; fpEx867</i>
IS1434	<i>wdr-5.1 (ok1417) III; syIs63 IV</i>
IS1678	<i>syIs63 IV; sel-10(ok1632) V</i>
IS1692	<i>syIs63 IV; sel-10(fp27) V; jmjd-3.1(fp15)X</i>
IS1694	<i>syIs63 ; sel-10 (ok1632) ; wdr-5.1 (ok1417)</i>
IS1710	<i>syIs63 IV; sel-10(ok1632) V; jmjd-3.1(fp15)X</i>
IS1758	<i>syIs63 ; rrf-3 (pk1426); sel-10 (ok1632)IV ; jmjd-3.1 (fp15) X</i>
IS1758	<i>rrf-3(pk1426) II ; syIs63 IV ; sel-10 (fp27) ; jmjd-3.1 (fp15)X</i>
IS1797	<i>syIs63 IV; sel-10(fp27) V; jmjd-3.1(fp15) X; fpEx520</i>
IS2533	<i>syIs63 IV; sel-10(fp27) V; jmjd-3.1(fp15) X; fpEx909</i>
IS2534	<i>syIs63 IV; sel-10(fp27) V; jmjd-3.1(fp15) X; fpEx910</i>
IS2535	<i>syIs63 IV; sel-10(fp27) V; jmjd-3.1(fp15) X; fpEx911</i>
IS2549	<i>syIs63 IV; sel-10(fp27) V; jmjd-3.1(fp15) X; fpEx921</i>
IS2550	<i>syIs63 IV; sel-10(fp27) V; jmjd-3.1(fp15) X; fpEx922</i>
IS2551	<i>syIs63 IV; sel-10(fp27) V; jmjd-3.1(fp15) X; fpEx923</i>
IS2553	<i>jmjd-2 (tm2966) II; syIs63</i>
IS2554	<i>jmjd-2 (tm2966) II; syIs63 ; jmjd-3.1(fp15) X</i>
IS2561	<i>rrf-3(pk1426) II ; syIs63 IV ; sel-10 (fp27)^{sel-10 (ok1632)}_{oxTi547} ; jmjd-3.1 (fp15)X</i>
IS2574	<i>jmjd-2 (tm2966) II; syIs63 ; sel-10 (ok1632) V</i>
IS2575	<i>jmjd-2 (tm2966) II; syIs63 ; sel-10 (ok1632) V; jmjd-3.1(fp15) X</i>
IS2665	<i>oxTi547[H2B::tomato] ; jmjd-3.1(fp15) ; syIs63</i>
IS2667	<i>sel-10 (fp27) ; jmjd-3.1(fp15); syIs63 ; fpEX954</i>

IS2668	<i>sel-10 (fp27) ; jmjd-3.1(fp15); syIs63 ; fpEX954</i>
IS2669	<i>sel-10 (fp27) ; jmjd-3.1(fp15); syIs63 ; fpEX954</i>
IS2700	<i>oxTi547[H2B::tomato] ; jmjd-3.1(fp15) ; syIs63 ; fpEx999</i>
IS2831	<i>cec-6 (fp28) syIs63 IV ; dpy-10 (mut dominant)</i>
IS2832	<i>rpn-10 (ok1865) I ; syIs63 IV ; jmjd-3.1 (fp15)</i>
IS2833	<i>rpn-10 I ; syIs63 IV ; sel-10 (ok1632) V</i>
IS2836	<i>syIs63 IV ; jmjd-3.1 (fp15) ; fpEx 999</i>
IS2837	<i>cec-6 (fp30) syIs63 IV ; sel-10(ok1632) V</i>
IS2838	<i>cec-6 (fp30) syIs63 IV ; jmjd-3.1 (fp15) X</i>
IS2839	<i>cec-6 (fp30) syIs63 IV ; sel-10 (ok1632) IV ; jmjd-3.1 (fp15) X</i>
IS2905	<i>fpIs101 X</i>
IS2909	<i>rpn-10 (ok1865) I ; syIs63 IV</i>
IS2984	<i>syIs63 IV ; fpIs101 X</i>
IS2985	<i>syIs63 IV ; sel-10 (ok1632) V ; fpIs101 X</i>
IS2986	<i>syIs63 IV ; sel-10 (ok1632) V ; fpIs101 jmjd-3.1 (fp15) X</i>
IS2989	<i>wdr-5.1 (ok1417) III ; syIs63 IV ; fpIs101 X</i>
IS2990	<i>syIs63 IV ; fpIs101 jmjd-3.1 (fp15) X</i>
IS3177	<i>wdr-5.1 (ok1417) III; syIs63 IV ; sel-10 (ok1632) V ; fpIs101 X</i>
IS3209	<i>syIs63 IV; sel-10(fp27) V; jmjd-3.1(fp15) X; fpEx1073</i>
IS3210	<i>syIs63 IV; sel-10(fp27) V; jmjd-3.1(fp15) X; fpEx1074</i>
IS3211	<i>syIs63 IV; sel-10(fp27) V; jmjd-3.1(fp15) X; fpEx7075</i>

10. Appareils

Incubateur 15°C	Bioconcept Firlabo
Incubateur 20°C	Thermostatschrank / Aqualytic
Incubateur 25°C	Memmert IPP55 plus
Incubateur 32°C	FTC90E Refrigerated incubator VELP
Loupe binoculaire	Leica MZ6
Lampe	Leica CLS 150X
Machine à UV	Stratagene UV crosslinker (Stratalinker)
Micro-injecteur	FemoJet express, Eppendorf
Micro-manipulateur	transferMan NK2, eppendorf
Microscope d'injection	Axiovert 100, Zeiss
Thermocycleur PCR #1	Bio-Rad iCycler Thermal Cycler
Thermocycleur PCR #2	#1837 Bio-Rad MyCycler Thermal Cycler PCR

11. Logiciels et statistiques

Logiciel d'observation des images : imageJ.

Logiciel de mise en page des image et gestion des planches : Indisign.

Réalisation des figures : suite adobe (photoshope, inidign et illustrator).

Réalisation des graphiques : graph pad.

Tests statistiques : Sigmaplot.

Méthode

1. Culture et travail de *C. elegans* :

Les souches de *C. elegans* sont maintenues et cultivées en suivant le protocole de Brenner 1974s.

1.1. Protocole de javellisation des vers, aussi appelé bleaching :

Ce protocole consiste à dissoudre les vers hermaphrodites afin de récupérer les œufs *in utero*. Cette technique peut être utilisée pour différentes raisons. Les deux principales utilisées au cours de ma thèse sont :

- Pour décontaminer une souche d'un champignon ou d'une bactérie
- Pour synchroniser une population de vers. (Cette dernière utilisation a été la principale utilisation de la technique de javellisation).

1.1.1. Solutions nécessaires :

- M9
- Solution de javellisation

1.1.2. Protocol :

1. Laver les boîtes contenant une majorité d'adultes gravides ou contenant des œufs *in utero* avec du M9. Les vers peuvent être placés dans un tube Falcon de 15mL ou dans un eppendorf de 1.5mL dans le cas où le volume de M9 serait très petit (ce sera le cas si la boîte à javelliser est une petite boîte).
2. Centrifuger (1,5min, 1500rpm) et ôter le surnageant.
3. Ajouter 500mL de solution de javellisation.
4. Incuber à température ambiante jusqu'à ce que le vers se casse, libérant ainsi les embryons. Cette étape peut prendre entre 2 et 10 minutes. Note1 : inverser le tube pendant le temps d'incubation est idéal pour la réaction. Il est aussi possible de vortexer afin d'accélérer la réaction. Mais cela n'est pas conseillé car ce traitement risque d'abimer les œufs les plus fragiles. Note 2 : si la solution devient jaune et que la réaction de dissolution des vers ne semble pas continuer, il est possible de centrifuger, ôter le surnageant et ajouter 500mL de solution de javellisation fraîche. Cependant, il est important de savoir que dans ce cas, la réaction sera accélérée et le stade voulu sera atteint très rapidement.
5. Une fois que les adultes ont atteint le stade précédemment décrit, ajouter très rapidement 1mL de M9 avant de centrifuger de nouveau (1,5min ; 1500rpm).

6. Retirer le surnageant, ajouter 1mL de M9 et centrifuger de nouveau (mêmes conditions).
7. Répéter l'étape 6 deux autres fois.
8. Centrifuger une dernière fois, retirer une partie du surnageant afin de pouvoir re-suspendre dans un volume idéal pour pouvoir pipeter les œufs et les déposer sur une nouvelle boîte. Note : le volume idéal dépend de l'expérience voulue, dépend de la concentration d'œufs que l'on souhaite obtenir.

1.2. Observation au microscope des vers :

Afin d'observer la présence ou l'absence de PDA, les vers sont observés au microscope en utilisant un microscope optique Zeiss imager Z1 ou, plus rarement, un microscope Zeiss Axioplan.

Un pad (coussin) d'agarose 2% est préparé sur une lame de microscopie en suivant le schéma suivant.

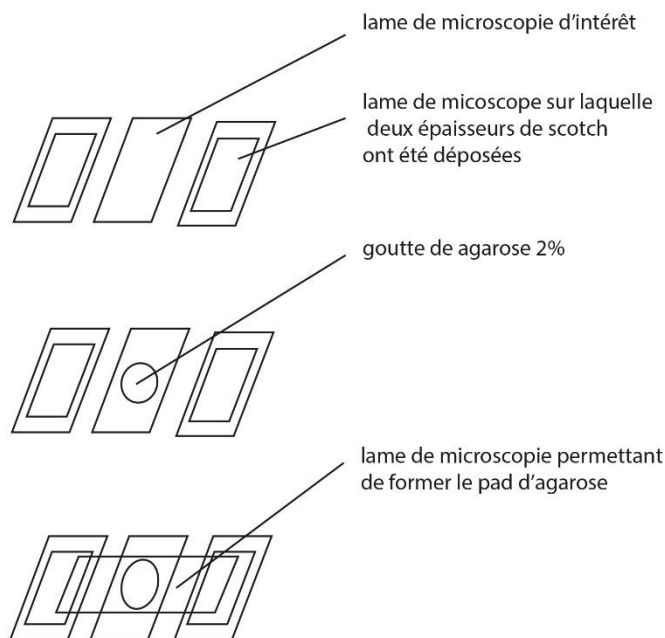


Figure 14 : schéma de réalisation d'un pad d'agarose.

Environ 2 μ L d'azide (25mM) sont déposés sur le pad juste avant d'y déposer les vers. Placer une lamelle sur le pad en veillant à ce que cette dernière ne se déplace pas sur le pad. Si cela venait à être le cas, il est possible de scotcher la lamelle de part et d'autre du pad d'agarose.

Les vers sont ensuite observés au microscope à épi-fluorescence, ainsi qu'en filtre DIC. Dans un premier temps, une observation à l'objectif 10X permet de s'assurer de la morphologie des vers avant de faire une observation au 40X pour observer la présence ou l'absence de PDA. Tous les vers ne possédant pas de PDA (présence de GFP), sont

observés en DIC afin de caractériser le moment d'arrêt de la transdifférenciation. Note : il est possible au DIC 40X d'observer les cellules épithéliales rectales et de les compter à condition que le vers concerné ne soit pas trop vieux (fin du stade L4).

1.3. Protocol de synchronisation :

Pour différentes expériences (expérimentation de stress, smFISH), il est nécessaire de synchroniser la population de vers. Cette méthode est essentielle pour pouvoir observer des vers qui sont au même stade de développement (et de transdifférenciation). Elle se fait en suivant le protocole décrit ci-dessous :

Solutions nécessaires :

- M9
- Solution de javellisation

1. Faire grandir des vers sur des boites NGM de 13cm de diamètre. Le nombre de boite peut varier : avec les mutants que j'ai étudiés, l'idéal trouvé a été entre 2 et 5 boites (dans le cas du smFISH). Ce chiffre dépend du taux de stérilité des vers et du taux de survie des vers.
2. Attendre que les individus atteignent le stade d'adulte gravide (plein d'œufs au sein de la gonade). Puis javelliser (1.1). Incuber les œufs dans 7 à 10mL de M9 dans un tube falcon de 15mL à 20°C sur agitation légère. Note pour le smFISH : déposer 3 gouttes concentrées en œufs par boites NGM sans nourriture (diamètre : 13 cm). Le nombre de boites obtenues doit être de 3 ou 4 par souche pour une sonde de smFISH.
3. Après cette étape d'incubation, les vers sont tous synchronisés en arrêt de stade L1. Ils sont transférés sur boite avec nourriture.
4. Après environ 44h d'incubation à 25°C et 68h à 20°C, les vers sont de jeunes adultes. Ils possèdent environ 2 œufs dans l'utérus.
5. Javelliser les vers et déposer les œufs sur boite (13cm de diamètre) avec nourriture. Note smFISH : Le nombre idéal de boites et de 2 à 4 par souche et par sondes testées.
6. Cette population sera alors le plus synchrone possible. Note smFISH : Incuber pendant 24h à 25°C afin d'obtenir des vers synchrones dans le stade de milieu-fin de L2. Remarque : il est important que les boites ne soient pas trop pleines de vers. Ce fait augmente dramatiquement le taux d'autofluorescence. De même, il est important qu'il reste de la nourriture et que les vers ne soient pas affamés. Ce fait rend le marquage de smFISH difficile et augmente également de bruit de fond des images (autofluorescence).

1.4. Protocole de smFISH (single molecule fluorescent *in situ* hybridation)

Cette technique est utilisée pour observer et quantifier les ARNm au sein d'individus fixés. Quarante sondes spécifiques à un gène s'hybrident à une molécule d'ARNm cible et sont suffisantes pour fournir un signal observable au microscope à fluorescence. Les spots sont ensuite comptés par ordinateur afin de quantifier l'ARNm cible en considérant le ratio suivant : un spot = un ARNm.

Le protocole ci-après décrit les différentes étapes qui doivent être réalisées pour pouvoir effectuer un smFISH chez *C. elegans* dans le stade larvaire L2. Dans le cadre de mon expérience, toutes les étapes d'incubations des vers ont été réalisées à 25°C. La population est synchronisée suivant le protocole 1.3.

1.4.1. Protocole de smFISH :

Le protocole du smFISH se fait en trois étapes : *i* la fixation, *ii* l'hybridation et *iii* des lavages. Toutes ces étapes sont décrites dans le protocole suivant. Ce dernier est basé sur celui du wormbook. (A., 2012)(http://www.wormbook.org/chapters/www_smFISH/smFISH.html#sec2)

1.4.1.1. Solutions nécessaires :

- M9
- PBS
- Tampon de fixation :
- Ethanol 70% (libre d'ARNase) :
- Solution de lavage
- Solution d'hybridation
- Hoechst (1µg/mL)
- Sonde

1.4.1.2. Protocole fixation :

- 1) Laver les boîtes avec du M9 et transférer les vers dans un falcon 15mL.
- 2) Centrifuger (2min ; 1500 rpm) et aspirer le surnageant.
- 3) Ajouter 10mL de M9 pour laver avant de centrifuger de nouveau (mêmes conditions que l'étape 2)
- 4) Re-suspendre dans 1mL de M9 afin de pouvoir séparer les vers par le nombre de tubes qui seront nécessaires pour pouvoir faire l'expérience dans toutes les sondes. Afin de pouvoir réaliser l'expérience jusqu'au bout, s'assurer que le pellet de vers obtenu après centrifugation est d'environ 20µL. Un volume supérieur à 50µL n'est pas optimal pour une hybridation uniforme alors qu'un volume inférieur ne permet pas d'assurer qu'il reste du matériel biologique à la fin du protocole.

- 5) Centrifuger 5 minutes 4400 rpm afin d'obtenir un pellet dense de vers, ôter le surnageant puis re-suspendre dans 1 mL de tampon de fixation (4% PFA dans du PBS 1X)
- 6) Incuber pendant 45 minutes à température ambiante sous agitation constante (rotation). La réaction ne doit pas excéder 45 minutes car cela augmente le taux de bruit de fond (auto fluorescence).
- 7) Centrifuger 5 min ; 4400rpm. (Note : cette centrifugation peut être répétée si le pellet de ver n'est pas suffisant pour permettre de retirer un maximum de surnageant sans perdre de matériel biologique) ôter le surnageant.
- 8) Laver deux fois avec 1 mL de PBS 1X frais pour chaque lavage (les centrifugations entre les lavages se font comme les centrifugations précédentes).
- 9) Centrifuger (5 min ; 4400rpm), ôter le surnageant et re-suspendre dans 1 mL d'éthanol 70%.
- 10) Incuber 'over night' à 4°C avec agitation constante (rotation). Note : l'incubation ON ne peut équivaloir à seulement 12h d'incubation. Cette étape est la clé pour perméabiliser le vers. Les vers peuvent rester arrêtés à cette étape jusqu'à un mois si nécessaire. Cependant, une nuit est l'idéal.

1.4.1.3. Protocole d'hybridation :

- 1) Le lendemain, centrifuger 5 min à 4400rpm. Note : après une incubation aussi longue, malgré la rotation constante, des vers peuvent rester accrocher à la paroi du tube eppendorf. C'est pourquoi il peut être intéressant de faire une deuxième, voir une troisième centrifugation afin de pouvoir récupérer le matériel biologique. Il est aussi possible de pipeter haut et bas afin de détacher les vers de la paroi du tube avant de centrifuger (le faire avec une pipette P100 afin de ne pas endommager les vers).
- 2) Après la centrifugation, ôter le surnageant autant que possible.

A partir de ce point, les échantillons seront sensibles à la lumière. Il est conseillé de faire attention et d'exposer les tubes au moins de lumière possible. Cependant, il est tout de même possible de travailler avec une lampe de bureau installée dans le dos de l'expérimentateur. Les étapes de pipetage de surnageant peuvent se faire, tourner vers la lumière.

- 3) Pendant la centrifugation, préparer les sondes : ajouter 1 µL de sonde pré-diluée à 100 µL de tampon d'hybridation. La sonde *cog-1* fonctionne de manière idéale dans mes mains à une pré-dilution de 1 :50. Les sondes *unc-3*, *unc-33* et *rimb-1* fonctionnent de manière idéale à 1 :10. (Note : la congélation/décongélation des sondes peut être effectuée un certain nombre de fois. Mais ce nombre doit rester limité car l'efficacité des sondes diminue avec le nombre de cycles. C'est pourquoi des petits volumes sont préférables pour le stockage des sondes et de leurs pré-dilutions.
- 4) Re-suspendre les vers dans 1 mL de tampon de lavage (10% formamide). Laisser environ 15 minutes à température ambiante.

- 5) Centrifuger (5min ; 4400rpm) re-suspendre dans 100 μ L de tampon d'hybridation précédemment préparés. **Vortexer fortement**. Note : le tampon d'hybridation est très visqueux et on souhaite, lors de cette étape que les vers soient en suspension dans le tampon. Faire des pipetages haut et bas risquerait d'abimer le matériel biologique puisque l'ouverture du cône de P200 est assez étroite.
- 6) Incuber ON à 30°C. Note : contrairement à l'étape de perméabilisation des vers, cette étape peut être réduite à 12h d'incubation afin de pouvoir économiser un jour de travail. Les tubes doivent être protégé de la lumière par du papier d'aluminium. Ce dernier peut être nettoyé grâce à du RNase away afin de garantir la propreté des tubes (assure l'absence de contamination ARNase). Cependant, il est inutile de les mettre sous agitation/ rotation car le tampon d'hybridation est trop visqueux pour permettre une agitation de l'échantillon. Note : pour une hybridation optimale utilisant la sonde *hlh-16*, une température de 32°C pendant 24h a été effectuée.

1.4.1.4. Protocole des lavages :

- 1) Le lendemain, ajouter 1mL de tampon de lavage et vortexer. Centrifuger (5min ; 4400rpm) et aspirer le surnageant.
- 2) Re-suspendre dans un autre 1mL de tampon de lavage. Incuber 30min à 30°C.
- 3) Centrifuger (5min ; 4400rpm) et ôter le surnageant.
- 4) Ajouter 50-100 μ L de tampon de DAPI et laisser incuber une minute avant de centrifuger 5min à 4400rpm puis d'ôter le surnageant.
- 5) Ajouter 1mL de 2X SSC, centrifuger (5min ; 4400rpm) ôter une partie du surnageant pour re-suspendre dans un volume compris entre 20 et 50 μ L.
- 6) Le montage des vers se fait en pipétant 2 à 5 μ L de vers sur un pad d'agarose 2%. Dans le cas d'un volume de ver pipeté qui serait trop important, il est intéressant de pipeter à la bouche le liquide excédent. 2 μ L de vectashield sont pipetés sur la lamelle puis cette dernière est placée sur le pad d'agarose. Il est alors aisément possible de mélanger les vers dans la solution de vectashield.
- 7) Placer une lamelle sur le pad et scotcher la de part et d'autre afin de la tenir en place sans risque d'abimer l'échantillon.

1.4.2. Acquisition des images :

Pour tous les échantillons, des Z-stack ont été réalisés avec un pas de 0,8 μ m et un temps d'exposition de 500ms pour les images de sonde, 100ms pour la GFP et 50ms pour le DAPI. Puisque les vers sont déshydratés, puis réhydratés, il n'est pas utile de faire d'images en DIC car la morphologie du vers n'est pas conservée au cours du processus.

1.4.3. Analyse des images :

Les images sont traitées en utilisant le logiciel Starsearch créé par Raj *et al.* Ce logiciel permet de sélectionner une ou plusieurs zones d'intérêt et de contrôler la limite de détection des points sur chaque image. Pour chaque vers, la totalité du Z-stack réalisé dans le canal Quasar 670 et une à deux images clés du canal GFP sont utilisées afin de mettre en évidence les régions d'intérêts. Dans toutes les expériences, trois zones d'intérêts étaient sélectionnées :

- 1) La zone correspondant à la cellule d'intérêt : Y/Y.0/PDA
- 2) Une zone correspondant à une cellule théoriquement non impliquée par la mutation étudiée. (B pour les gènes permettant l'étude de la dédifférenciation et VA13 pour l'étude de la redifférenciation)
- 3) Une zone dans laquelle aucun signal spécifique ne devait être visible.

Remarque : la sonde *hlh-16* est un cas particulier car ce gène ne s'exprime en théorie que dans la cellule Y. Cependant, un certain nombre de spots ont pu être observé dans la cellule B. C'est pourquoi cette cellule a été sélectionnée. Il ne s'agit probablement pas d'un signal spécifique mais il s'agit d'un signal supérieur à celui de la zone négative.

Pour chaque image Quasar 670 d'un Z-stack, le niveau de détection est le même pour les 3 zones et est sélectionné de telle sorte à ce qu'il n'y ait aucun spot observé dans la 3^{ème} zone (contrôle négatif, interne). Le niveau de détection peut être différent d'une image à l'autre du Z-stack et la valeur obtenue est référencée pour chaque image. Ces valeurs ne seront pas montrées au cours de cette dissertation.

Cette limite de détection est le point clé de l'analyse des images car c'est cette valeur qui détermine la taille d'un spot.

Pour chaque zone de chaque vers, une image des spots détecté est faite sur l'image qui possède le plus de signal et/ou une image représentative du Z-stack. Une image des zones d'intérêt est également enregistrée pour chaque vers. Voici un exemple du type d'image que cela peut représenter :

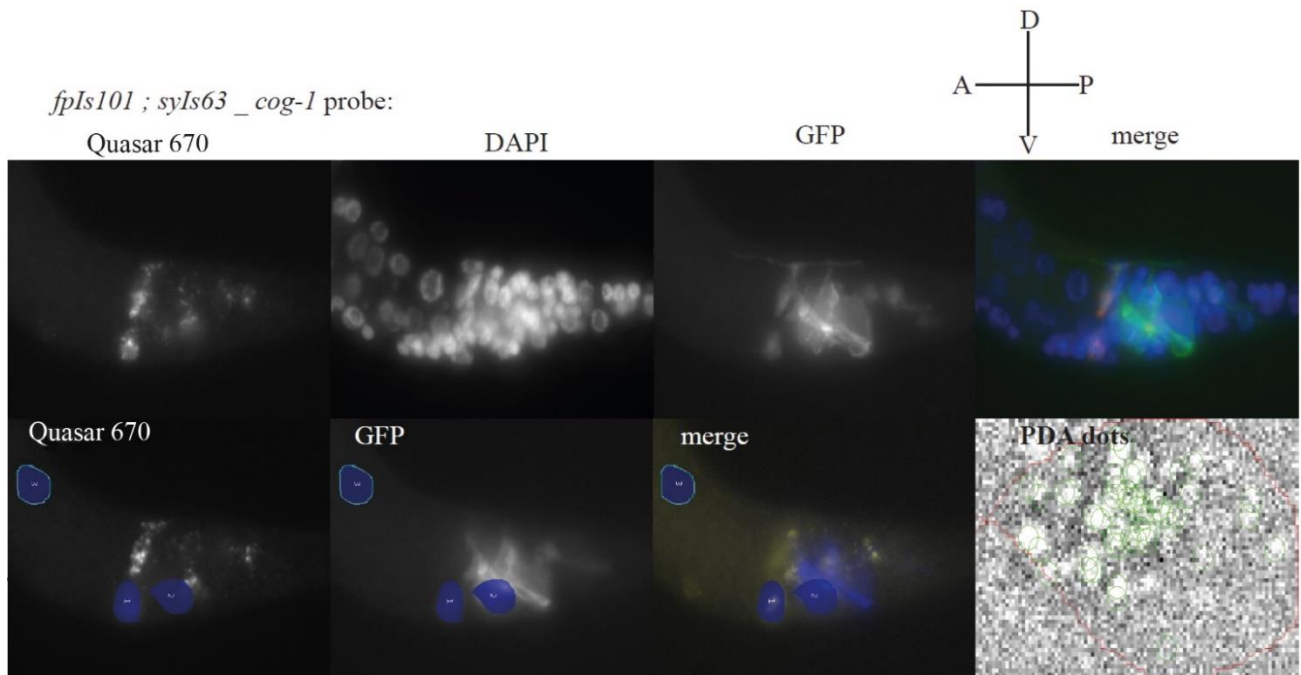


Figure 15 : planche représentant un exemple représentatif des images obtenues par smFISH et analyse de ces dernières. Il s'agit d'un marquage avec la sonde *cog-1* dans le génotype contrôle *syIs63 ; fpIs101*. La première ligne d'images correspond à acquisition au microscope (chaque image montrée est l'accumulation du Z-stack en une image). La seconde ligne représente les images enregistrées au cours de l'analyse de ce vers grâce au logiciel Starsearch. On peut y voir les 3 zone d'intérêt ainsi que les points détectés sur une des images du stack. Les spots sont signalés par les cercles verts. A/P ; D/V correspondent respectivement eux axes Antérieur/Postérieur ; Dorso/Ventral.

1.4.4. Analyse des résultats :

Une fois la totalité des images d'un vers analysées, le logiciel fournis un tableau Excel comportant le nombre de spots par zones d'intérêt et par images. Ce nombre est additionné pour chaque zones et les totaux des zones 1 et 2 sont analysés ensemble dans un graphique à point dans le logiciel Prism 7 (graph pad). Un test t pairé est utiliser pour comparer les zones 1 et 2 au sein d'un même génotype. Un test t non pairé est utilisé pour comparer une même zone entre deux génotypes différents. Le logiciel Graph pad fournit lui-même les calculs et approximation à apporter pour le cas d'une distribution non Gaussienne des échantillons et/ou d'une variance différente d'un échantillon à l'autre.

1.5. Injection :

Les vers sont injectés pour deux raisons différentes. Pour obtenir des lignées transgéniques portant un array extrachromosomique. Dans le premier cas, les vers (jeunes adultes uniquement) seront injectés dans la gonade alors que pour le second cas, l'injection se fera préférentiellement (mais non nécessairement) dans la gonade et sur des animaux qui seront soit en stade larvaire L4 ou sur de jeunes adultes.

1.5.1. Tirer les aiguilles :

Un capillaire est introduit dans la tireuse d'aiguille qui va le casser en deux aiguilles. Afin que les aiguilles obtenues soient suffisamment fines pour injecter les vers sans les tuer, les conditions suivantes sont utilisées : T°C obtenue par le ramp test ; pull : 45 ; vet : 75 ; Del : 90.

1.5.2. Remplir et casser l'aiguille :

- 1) Centrifuger le mix d'injection, pendant 30min, 4°C et pipeter 0.5µL du surnageant dans l'aiguille.
- 2) Attendre jusqu'à la disparition de toutes les potentielles bulles au sein du capillaire.
- 3) Monter le capillaire sur le dispositif de micro-injection.



Figure 16 : ensemble du dispositif de micro injection du laboratoire de Sophie Jarriault.

- 4) Déposer une goutte d'huile sur une lamelle et y placer un morceau de capillaire brisé.
- 5) Casser l'aiguille en la frottant contre le morceau de capillaire brisé tout en injectant jusqu'à obtenir l'apparition de bulle d'eau le long du capillaire et ou de l'aiguille (voir image ci-dessous).

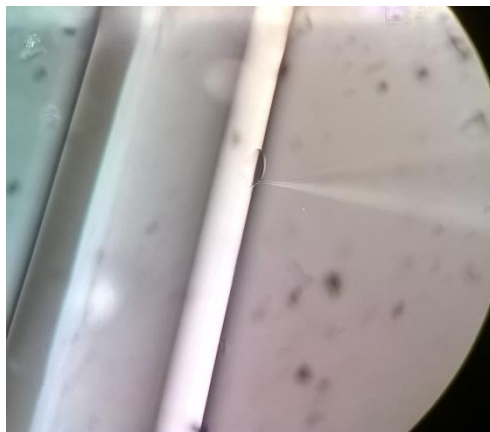


Figure 17 : vue microscopique de l'aiguille s'ouvrant contre un capillaire.

- 6) Sur une lamelle, faire sécher un coussin d'agarose 2%.
- 7) Déposer les vers à l'aide d'un sourcil sur l'agarose sécher et le recouvrir d'huile. Il ne devrait pas bouger le temps de l'injection.
- 8) Injecter le ver dans la gonade.

- 9) Récupérer le ver à l'aide du sourcil et le déposer sur une boite NGM avec nourriture.
- 10) Les vers sont isolés 1 par boite et leur descendance est observé à la recherche du marqueur de co-injection. Il s'agit des F1 transgénique. Ces derniers sont à leur tour isolés 1 par boite et leur descendance est observée. Si cette dernière présente des individus transgéniques, il s'agit d'une lignée indépendante.

Note : pour les ARNi, les hermaphrodites injectés sont séparés 1 par boite (avec nourriture) pendant 24h, avant d'être transférés sur une nouvelle boite (toujours 1 par boite). Les injections d'ARNi se font au sein de mutants *rrf-3(pk1426)* est essentielle pour garantir une efficacité des ARNi au sein des cellules rectales. Sans cette mutation, la technique d'ARNi ne fonctionne que peu au sein des cellules rectales et neuronales. De plus, l'injection est plus efficace qu'une expérience par nourriture. En effet, il est possible de faire manger des bactéries exprimant les ARNi par le ver pour ce que l'inhibition des gènes cibles ait lieu.

1.6. Intégration

Il est possible d'intégrer un array extrachromosomique en utilisant une machine à rayons X, induisant des cassures de l'ADN, il est possible d'intégrer un array extrachromosomique au moment de la réparation de l'ADN. Cette intégration est aléatoire il faudra donc cartographier la localisation de l'intégrant.

- 1) Piquer 100 vers au stade larvaire L4 sur boite NGM sans nourriture.
- 2) Irradier les vers suivant le protocole suivant
 - a. Préchauffer la machine à rayons X.
 - b. Placer la boite dans la machine sans son couvercle.
 - c. Irradier 4 minutes
- 3) Placer 5 vers par boite NGM avec nourriture, les laisser pendant 2 semaines.
- 4) Découper et transférer un centimètre de gélose de chaque boites NGM sur une nouvelle boite.
- 5) Isoler 20 vers transgéniques pour chaque boite possédée.
- 6) Observer la génération suivante. Les boites comptant 100% d'individus transgénique seront repiquée et croisée avec la souche WT afin de laver le génome de mutations indésirables apparues à la suite de l'irradiation.
- 7) 6 croisements retours sont faits afin que le nettoyage du génotype soit considéré comme étant complet.
- 8) La cartographie du génotype peut se faire en suivant le protocole suivant.(Fay, 2006)

1.7. Expérimentation de stress :

1.7.1. De température :

Les vers sont placés sur des boîtes NGM avec nourriture à 25°C en incubateur. Les vers ont passé, au minimum, une génération complète avant d'être observés à cette température et n'ont jamais été affamés. Un contrôle développé à 20°C est conduit en parallèle.

1.7.2. De privation de nourriture :

Les vers sont maintenus dans des conditions favorables de développement à 20°C ou à 25°C pendant au moins une génération avant d'être javélisés (protocole 1.1). Les œufs sont déposés sur boîte NGM sans nourriture pendant 7 jours. Ils sont ensuite transférés sur boîte avec nourriture et sont observés au microscope lorsqu'ils ont atteint le stade larvaire L3-L4. Un contrôle bleaché mais déposé sur boîte NGM avec nourriture est réalisé en parallèle.

1.7.3. Mitochondrial :

Le stress mitochondrial est induit par la présence de paraquat au sein de boîte NGM sur lesquelles les vers sont cultivés. Le paraquat induit une inhibition de la chaîne de respiration de la mitochondrie, induisant un stress énergétique et un stress oxydatif aux vers.

- 1) Couler des boîtes NGM +1mM paraquat.
- 2) Déposer 100µL de culot de bactérie OP50 sur la boîte.
- 3) Bleacher des adultes pleins d'œufs et déposer environ 100 œufs sur la boîte avec paraquat.
- 4) Observer les boîtes et s'assurer que la quantité de bactérie OP50 est toujours suffisante et en ajouter si nécessaire.
- 5) Après 4 jours observer la présence ou l'absence de PDA. Faire ceci même si les vers semblent avoir atteint un stade d'arrêt larvaire.
- 6) Un échantillon contrôle sur boîtes NGM sans paraquat est réalisé en parallèle avec toutes ses souches concernées par l'expérience.

1.7.4. De dommages à l'ADN par UV :

Faire grandir les vers dans des conditions favorables de développement pendant au moins une génération (20°C, boîtes NGM avec nourriture, non contaminée). Bleacher les adultes gravides, laisser les œufs dans falcon 15mL contenant maximum 15mL de M9. Après une nuit avec une légère agitation à 20°C, tous les œufs ont éclos et les vers sont arrêtés en stade larvaire L1. Placer les vers sur boîte sans nourriture et les placer sans

couvercle dans la machine à UV. Provoquer 1 pulse d'UV à 10mJ/m². Laver les vers de la boîte NGM sans nourriture et les placer sur une nouvelle boîte avec nourriture. Observer les individus lorsqu'ils ont atteint le stade larvaire L3-L4. Un échantillon contrôle non irradié est traité et analysé en parallèle.

1.8. Lyse de vers :

Les vers peuvent être lysés afin de rendre accessible l'ADN génomique des animaux. Cette technique permet de réaliser une PCR de génotypage des vers, assurant le suivi de mutation au cours de croisements.

- Pipeter 15µL de tampon de lyse dans le capuchon de tube PCR 0,2mL.
- Placer un hermaphrodite gravide dans le tampon de lyse.
- Centrifuger brièvement.
- Plonger quelques secondes dans l'azote liquide, décongeler dans la main puis renouveler cette étape.
- Incuber à 65°C pendant une heure. Puis 15minutes à 95°C.

Le Lysa peut ensuite être stocké à 4°C pendant 48h max. mais il est recommandé de réaliser la PCR de génotypage après la lyse.

2. Travail de biologie moléculaire :

2.1. Clonages :

2.1.1. Megawhop :

Le mégawhop est une technique d'insertion d'ADN au sein d'un plasmide par PCR. Cette technique a été réalisée en suivant le protocole décrit par Miyazaki (Miyazaki, 2011).

2.1.2. PCR reverse :

Cette technique permet de supprimer une séquence d'ADN d'un plasmide par PCR. Le squelette du plasmide est amplifié à partir d'oligonucléotides délimitant la séquence à supprimer. Le plasmide est ensuite circularisé grâce à un protocole de ligation.

2.2. PCR de géotypage :

Les mutations *sel-10(ok1632)*, *jmjd-3.1(fp15)*, *rpn-10(ok1865)*, *wdr-5.1(ok1417)*, *cec-6(fp27)* ont été suivis par géotypage. Pour connaître les oligonucléotides nécessaires pour le géotypage de chacun de ces gènes, se référer au tableau des oligonucléotides. Les PCR de géotypage se font dans un volume final de 50µL, incluant 3µL de lysat, 5µL de tampon de PCR 10X, 0,5µL de chaque oligonucléotides, dNTP et TAQ polymérase. Les conditions de PCR utilisées sont les même pour tous les géotypages : 94°C/30s ; 55°C/30s ; 68°C/1min30s.

Pour le géotypage de *jmjd-3.1(fp15)*, une étape de restriction via enzyme NlaIV est nécessaire pour discriminer l'allèle sauvage, de l'allèle mutant.

Pour le géotypage de *cec-6*, une restriction en utilisant BsiWI est nécessaire.

2.3. Synthèse d'ARNi

Les ARN interférant ont été amplifié à partir de la banque de plasmides Ahringer (Qu et al., 2011). Le plasmide était purifié par kit de miniprep avant d'être séquencé et qu'une PCR avec un oligonucléotide T7 ne soit utilisé. Si le gène d'intérêt n'était pas présent dans la banque, le gène était amplifié avec des oligonucléotides créés à partir du site internet <http://www.dkfz.de/signaling/e-rnai3/>.

Dans les deux cas, une transcription *in vitro* est réalisée en utilisant le kite proméga. Avant d'être traité avec de la DNaseI puis l'ARN double brin est purifié en utilisant le kit Qiagen. Un gel d'agarose est réalisé pour vérifier la taille des ARNi et leur quantité.

3. CRISPR Cas9

Nous avons injecté 40 vers hermaphrodite syIs63 avec un mix

- *cec-6* sgARN (20 ng/µL), (obtenu par megawhop utilisant les oligonucléotide cd110 et cd111)
- *dpy* sgARN (20 ng/µL)
- PBSK (100 ng/µL).

Le mix a été centrifugé avant injection à 11 000 rpm pendant 30 min. Les vers injectés ont été placés dans des boîtes de pétri (20°C), à hauteur de 3 vers par boîte.

Tous les vers transgéniques F1 ayant un phénotype Dpy et 20 vers aléatoire provenant des boîtes dans lesquelles les vers Dpy ont été prélevés. Les vers prélevés ont été placés individuellement dans des boîtes de pétri (20°C). Nous avons ensuite attendu que les vers isolés aient pondus au moins 15 œufs de la génération F2. Les F1 ont alors été lysés et génotypés, les mutants ont été séquencés puis analysés par bioinformatique grâce au logiciel APE.

4. Analyse statistique

4.1. Analyse des lignées transgéniques

Le test ANOVA à deux facteurs a été réalisé après avoir vérifié qu'il n'y a pas de lien de corrélation. Ce test permet à la fois d'analyser les lignées transgéniques entre elles et les vers transgénique et non transgénique au sein des même lignées. Si le test d'ANOVA présente une différence significative, un test Post-hoc de Bonferroni a été réalisé afin de déterminer les différences. Le critère de décision α était de 0,05.

4.2. Analyse des différences entre les mutants et ARNi

Les différences entre les mutants ont été testés grâce à un test t de Student, car il s'agit toujours de comparer deux groupes : un simple mutant et un double ou encore un double mutant avec un triple. Ce test n'est réalisable qu'après avoir vérifié la condition de normalité et l'homoscédasticité. Dans le cas contraire, un Mann-Whitney a été réalisé. Le critère de décision α était de 0,05. Lorsqu'une expérience est réalisée deux fois, un teste de Mc Nemar est utilisé.

4.3. Tests sur les smFISH

Les smFISH ont été testés grâce à une ANOVA à un facteur si la normalité était vérifiée, et par une ANOVA sur les rangs dans le cas contraire. Ce test a été réalisé pour comparer l'expression d'un gène au sein d'une même cellules (B/VA13/PDA/Y) entre les différents mutants. Les différences entre la cellule d'intérêt et la cellule contrôle au sein d'un même mutant ont été mises en évidence grâce à un test t de Student. Le critère de décision α était de 0,05. Si l'ANOVA met en évidence une différence, une analyse post hoc de Turkey est réalisée.

Résultats

Résultats

La mutation des gènes *sel-10*, *wdr-5.1* et *jmjd-3.1* provoque un défaut de transdifférenciation de la cellule Y en PDA.

Les gènes *sel-10* et *wdr-5.1* présentent une synergie du défaut de PDA. Cette dernière est également visible entre les gènes *jmjd3.1* et *sel-10* (figure 18). SEL-10 est une ubiquitine ligase E3. Sa fonction est probablement liée à la dégradation d'une protéine cible. La synergie entre une ubiquitine ligase E3 et des modificatrices d'histones n'a jamais été analysée et va être abordée par plusieurs aspects.

Cette synergie implique qu'en absence de SEL-10, la cible de cette dernière est présente en quantité supérieure, mais que la présence de *jmjd-3.1* ou de *wdr-5.1* est suffisante pour minimiser son effet négatif sur la transdifférenciation. Cet effet négatif est déduit du fait que toutes les cibles connues de SEL-10 sont dégradées par le protéasome (de la Cova and Greenwald, 2012; Grant and Greenwald, 1997). Quand les deux gènes *sel-10* et *jmjd-3.1* (ou *wdr-5.1*) sont mutés, alors l'effet négatif de la cible de SEL-10 n'est plus contre balancé et le défaut de PDA est important (figure 18).

Ce modèle de la synergie implique que la cible de SEL-10 et JMJD-3.1/WDR-5.1 agissent sur le même processus cellulaire. Dans cette hypothèse, il s'agirait de la transcription.

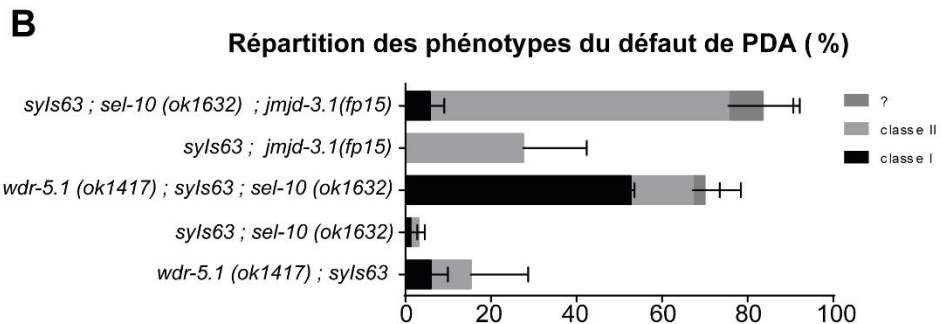
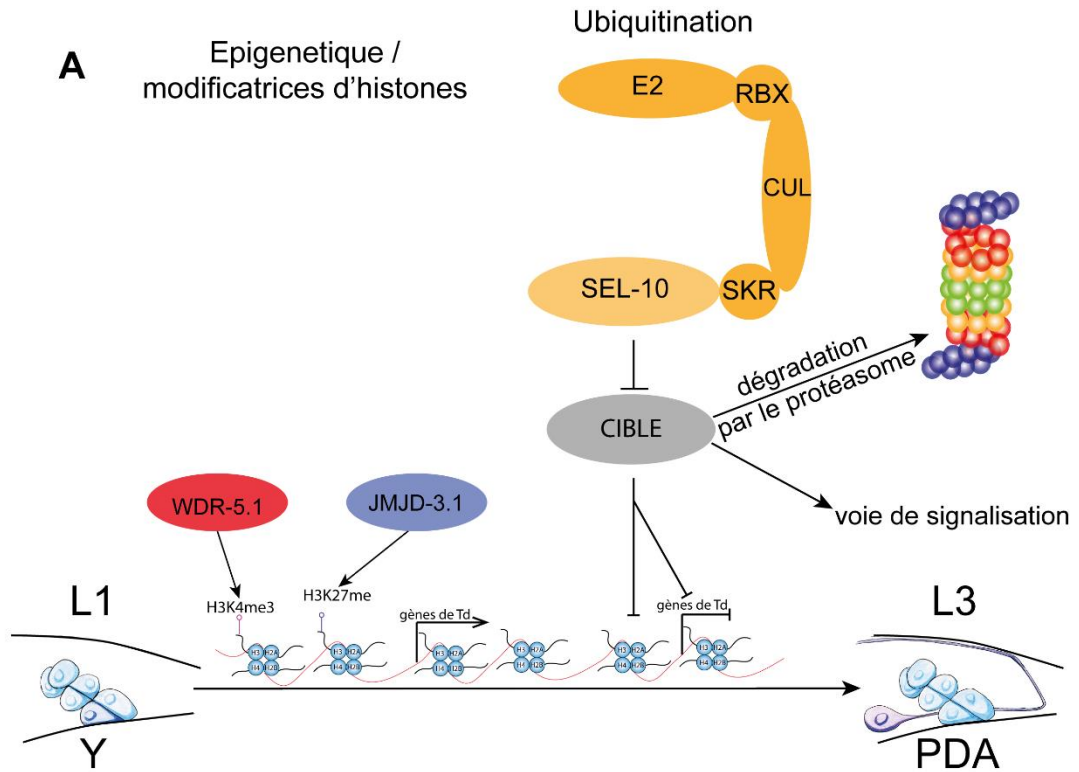


Figure 18 : **A)** modèle de l'action des différentes protéines d'intérêt sur la transdifférenciation d'Y en PDA. La protéine WDR-5.1 méthyle le variant d'histone H3K4. JMJD-3.1 déméthyle H3K27. SEL-10 ubiquitine une cible protéique qui est soit dégradée par le protéasome, soit impliquée dans une autre voie de signalisation (activation/ inactivation protéique, autophagie, ...) les différents anneaux du protéasome sont représentés par différentes couleurs. **B)** représentation graphique du défaut de PDA et de la répartition de phénotype par mutant. Classe I : arrêt de la transdifférenciation pendant l'initiation du processus. Classe II : arrêt de la transdifférenciation lors de l'étape de redifférenciation. ? : indique que le nombre de cellules épithéliales n'a pas pu être déterminé dans ce mutant. n>90 N=3 expérience réalisée à 20°C.

L'une des premières difficultés pour comprendre le rôle de SEL-10 au sein de la transdifférenciation est de connaître la cible reconnue par cette protéine.

1. Caractérisation de SEL-10

1.1 Quelle est la cible de *sel-10* ?

1.1.1. Quelles sont les cibles potentielles de SEL-10 au sein de la transdifférenciation ?

La plus grande difficulté du travail sur une protéine ubiquitine ligase est de trouver sa (ses) cible(s).

Claire de La Cova et Iva Greenwald ont travaillé sur le rôle de *sel-10* lors de l'organogenèse de la vulve chez *C. elegans* (de la Cova and Greenwald, 2012) Ceci a amené Claire de La Cova à établir une liste *in silico* de cibles potentielles de SEL-10. Cette liste *in silico* des potentielles cibles de SEL-10 (609 facteurs) a été établie après avoir mis en évidence la séquence d'acides aminés du phosphodégron, c'est-à-dire la séquence reconnue par SEL-10. Grâce à cette liste, les auteurs ont mis en évidence une nouvelle cible de SEL-10, qu'elles ont étudié.

Le phosphodégron est composé de 7 acides aminés : deux acides aminés hydrophobes, une thréonine, une proline, deux acides aminés variables, une sérine ou thréonine. Cette séquence peut être visualisée de la manière suivante (figure 19).

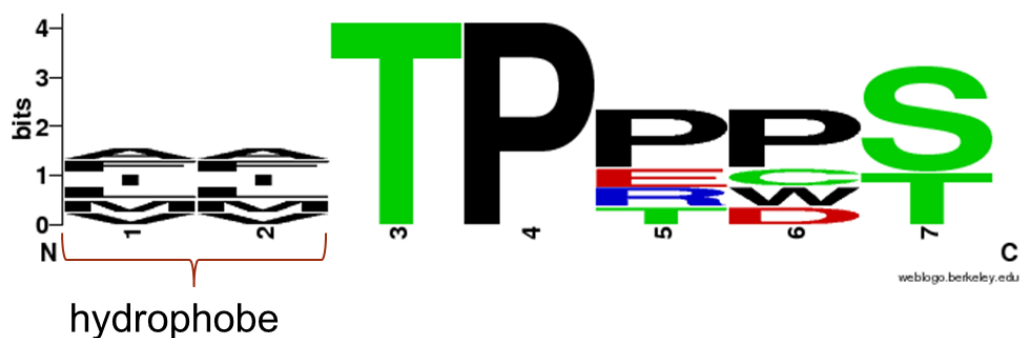


Figure 19 : représentation du phosphodégron reconnu par SEL-10. Cette séquence a été mise en évidence par Claire de la Cova et son équipe (de la Cova and Greenwald, 2012). J'ai pu créer cette représentation visuelle à partir des données de cette dernière étude et weblogo.berkeley.edu.

Mon hypothèse majeure est que SEL-10 est probablement impliquée dans la dégradation de sa cible par ubiquitination. Cette hypothèse est issue du fait que l'ubiquitination est majoritairement liée à la dégradation des protéines (Kipreos and Pagano, 2000) et que SEL-10 n'a pas d'autre rôle connu (de la Cova and Greenwald, 2012; Hoeck et al., 2010; Wu et al., 2001). En l'absence de *sel-10*, on peut supposer que la

quantité de protéine(s) cible(s) est plus importante que dans l'individu sauvage. Du fait que l'absence de *sel-10* implique un défaut de PDA, on peut déduire que cette protéine a probablement un rôle négatif sur la transdifférenciation. De plus, l'expression importante de la cible (dûe à l'absence de SEL-10) cumulée à la mutation de *jmjd-3.1* ou *wdr-5.1*, provoque une synergie au sein du défaut de transdifférenciation. J'ai analysé la liste des potentielles cibles de SEL-10 en sélectionnant les gènes qui peuvent avoir un rôle antagoniste à *jmjd-3.1* ou *wdr-5.1*. Ces modificatrices d'histones sont supposément impliquées dans l'expression positive de gènes. C'est pour cette raison que j'ai dans un premier temps ciblé les protéines qui ont un rôle négatif dans l'expression des gènes. Cela comprend bien évidemment les gènes codants pour des répresseurs de l'expression, c'est-à-dire des protéines se liant à l'ADN et impliquées dans la répression de l'expression des gènes, mais également des protéines impliquées dans les modifications épigénétiques, ou encore des protéines se liant aux ARNm, inhibant leur traduction. 25 gènes appartiennent à cette catégorie (voir annexe, liste jaune).

Dans un deuxième temps, j'ai regroupé les gènes qui étaient impliqués dans la liaison à l'ARN messager en supposant que des protéines qui se lient à l'ARN soient potentiellement impliquées dans la limitation de la traduction, et la régulation de cette dernière. Il y a 11 gènes dans cette catégorie (voir annexe, liste vert clair).

Dans un troisième temps, j'ai également sélectionné les protéines possédant un domaine de liaison à l'ADN mais pour lesquelles le rôle sur la transcription n'est pas connu. Il y a 43 gènes dans cette catégorie (voir annexe, liste bleue).

Parmi ces trois catégories, j'ai ensuite cherché si certains de ces gènes avaient déjà été mis en évidence comme ayant un rôle dans la transdifférenciation d'Y en PDA. J'ai également privilégié les protéines modificatrices d'histones ou remodelant la chromatine comme *jmjd-3.1* et *wdr-5.1/set1*. Ces gènes sont annotés en vert dans la liste en annexe.

J'ai ainsi pu isoler une dizaine de cibles potentielles de SEL-10. Ces dernières sont présentées dans le tableau suivant :

Nom du gène	Description	groupe
bet-1	Reconnait les histones acétylées [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_871879]	1
zfp-1	ZFP-1 joue un rôle dans la répression d'expression des gènes, basée sur la similarité de séquences, ZFP-1 est prédit pour être associé à la chromatine [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P34447]_	1
B0336.3	Protéine de liaison à l'ARN 26, impliquée dans la régulation négative de l'activité phosphatase [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q10954]	1
cbp-1	CBP-1 possède une activité d'acétylase d'histones <i>in vitro</i> CBP-1 possède également un domaine riche en glutamine/ asparagine. Cette protéine est impliquée dans l'embryogénèse pour la différenciation de toutes les cellules somatiques non neuronales [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P34545]_	1
cec-6	Protéines contenant un Chromodomain; modificatrice de l'organisation de la chromatine	1
Y57G11B.6	Facteur de répression à la transcription, impliquée dans les sous divisions du cerveau en développement et le développement du télencéphale (chez l'humain)	1
F10B5.3	Protein F10B5.3 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q09534]_ Isoform 1 de Sal-like protéine 1 chez l'humain. Est impliquée dans la répression de la transcription, important pour l'organogénèse.	1
sem-4	Membre de la famille SEx Muscle anormale (sem-4). Protéine possédant un domaine en doigt de zinc. SEM-4 est essentielle pour le développement neuronal, mésodermal et les cellules de la lignée de la vulve. [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_491997]. Ce gène est connu pour être un acteur principal de la transdifférenciation de Y en PDA. Cependant, il n'a pas été étudié en tant que potentielle cible de SEL-10 pour plusieurs raisons. La première est que <i>sem-4</i> a un rôle positif sur la transdifférenciation, ce qui ne correspond pas au premier modèle réalisé pour la potentielle cible de SEL-10. Deuxièmement, en présence de <i>jmjd-3.1</i> , l'expression anormale de <i>sem-4</i> devrait avoir un rôle minime sur la transdifférenciation. Ce qui n'est pas le cas puisque la perte de <i>sem-4</i> est catastrophique pour la transdifférenciation. Et troisièmement, la synergie entre <i>sel-10</i> et <i>jmjd-3.1</i> présente une augmentation spécifique du défaut de classe II alors que <i>sem-4</i> est essentiel pour l'initiation de la transdifférenciation.	1
mab-3	Protéine "male abnormal 3" agissant comme répresseur de <i>ref-1</i> chez le mâle et permet l'expression de LIN-32, un facteur de transcription proneuronal [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:O18214]_	1
sel-7	Suppresseur/Enhancer de membre de la famille <i>lin-12</i> deux domaines PEST prédits. Expression localisée dans le noyau et impliquée dans l'activation de l'expression [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_510392]	2
nhl-2	Membre de la famille protéique contenant un domaine NHL (ring finger b-box coiled coil) régule l'efficacité des interactions ciblées par micro ARN et augmente l'expression génique durant le développement post embryonnaire et pour la polarité de l'embryon. [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_498026]	3
jmjd-2	Lysine-specific demethylase 4 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9U297] impliquée dans la déméthylation de l'histone H3K9 et H3K36, impliquée dans la répression de l'expression des gènes.	1

Tableau VI : liste des potentielles cibles de SEL-10 impliquées dans la transdifférenciation.

Parmi ces gènes je me suis particulièrement intéressée à *jmjd-2*, *cec-6*, *zfp-1*, *nhl-2* et *bet-1*.

jmjd-2 et *cec-6* sont deux gènes liés à la chromatine.

jmjd-2 est une modificateur d'histone (H3) déméthylant les résidus K36 et K9. La déméthylation du variant d'histone H3K36 est positivement corrélée avec la répression de l'expression des gènes (Black et al., 2010). Alors que la déméthylation du variant H3K9 est corrélée avec l'expression des gènes (Takahashi et al., 2011). Ces rôles opposés de *jmjd-2* laissent supposer que la fonction de JMJD-2 dépend probablement des complexes protéiques avec lesquels cette protéine est liée. On peut supposer que JMJD-2 peut avoir un rôle négatif sur la transdifférenciation en inhibant les gènes impliqués dans ce processus et en favorisant l'expression de gènes inhibiteurs de cette reprogrammation cellulaire.

cec-6 code pour une modificateur de l'organisation de la chromatine : la protéine CEC-6 possède un chromodomaine qui est impliqué dans le passage de l'euchromatine à l'hétérochromatine (Jones et al., 2000). On peut donc supposer que *cec-6* est impliquée dans la répression de l'expression des gènes.

Les gènes *zfp-1* et *nhl-2* ont été mis en évidence dans un crible double hybride réalisé précédemment au laboratoire. De plus ces gènes sont associés à la répression de l'expression des gènes, ou au moins à la liaison à l'ADN.

Le gène *bet-1* est connu pour être impliqué dans le maintien de l'identité cellulaire chez *C. elegans* (Shibata et al., 2010). BET-1 est une protéine protégeant les histones acétylées et protège les histones des désacétylases d'histones. Si *bet-1* est impliqué dans le maintien de l'identité épithéliale neuronale, alors il est important que sa protéine soit dégradée lors de la redifférenciation.

1.1.2. *jmjd-2* une modificateur d'histone comme potentielle cible de SEL-10 ?

Il s'agit d'une modificateur d'histone ayant un rôle antagoniste à celui de *jmjd-3.1*. Elle est impliquée dans la déméthylation de l'histone H3K36 et H3K9, ce qui en fait une cible potentielle de SEL-10 de choix.

J'ai testé cette hypothèse en l'inactivant par ARNi dans un triple mutant *rrf-3* (*pk1426*) ; *sel-10* (*fp27*) ; *jmjd-3.1* (*fp15*) et qui comprend également dans le fond génétique le transgène intégré *syIs63*. C'est un marqueur fluorescent de la transdifférenciation [*cog-1p* :: *cog-1* :: *gfp*] permettant de visualiser la présence du motoneurone PDA. Le gène *rrf-3* est essentiel pour permettre l'efficacité des ARNi au sein des cellules rectales, car cette technique est peu efficace dans les cellules neuronales et rectales. *rrf-3* est impliqué dans l'inhibition du processus d'ARNi. De plus, il n'a pas d'influence sur le taux de

transdifférenciation au sein des différents mutants. Il sera donc présent dans le fond génétique de toutes les souches utilisées pour réaliser une expérience d'ARNi. Pour une question de simplicité de compréhension, ce mutant sera présenté comme double mutant (en référence aux mutations de *sel-10* et *jmjd-3.1*) malgré la présence de la mutation *rrf-3*.

Si la cible de *sel-10* est diminuée par ARNi alors le défaut de PDA du double mutant devrait lui aussi diminuer. Le haut pourcentage de défaut de formation de PDA observé chez le double mutant *sel-10 ; jmjd-3.1* devrait être supprimé s'il n'y a qu'une seule cible. En revanche, si plusieurs protéines sont ciblées par SEL-10 et agissent au sein de la transdifférenciation, alors on peut supposer que le défaut de PDA diminuera partiellement.

Défaut de PDA (%) dans la souche
rrf-3 (pk1426) ; syIs63 ; sel-10 (ok1632) ; jmjd-3.1 (fp15)
expérience d'ARNi

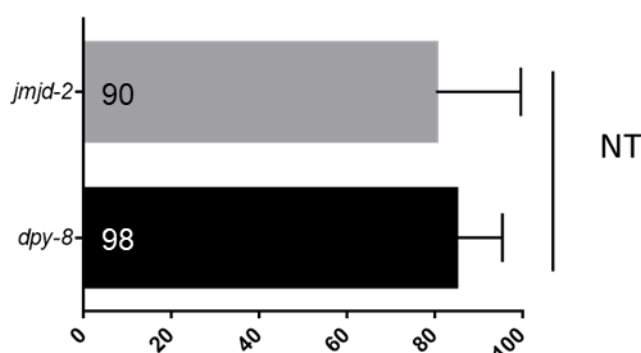


Figure 20 : ARNi de *dpy-8* et *jmjd-2* au sein du triple mutant *rrf-3 (pk1426) ; syIs63 ; sel-10 (ok1632) ; jmjd-3.1 (fp15)*. Test t de Student. NT : test non significatif (cependant, le test manque de puissance). N=3. Expérience réalisée à 20°C.

NOTE : dans ce graphe, comme dans tous les suivants, sera représenté le défaut de transdifférenciation observé dans les différentes conditions testées, et noté « % défaut de PDA », ou « défaut de PDA » dans le reste du texte. Pour obtenir ce chiffre du défaut de transdifférenciation, l'absence du neurone PDA à partir du stade larvaire L3 est recherchée (comme détaillé dans les Méthodes).

Plus de vingt vers double mutants ont été injectés et leur descendance a été observée pour connaître le taux de transdifférenciation de PDA. Une légère diminution (de 10%) a été observée en comparant au contrôle ARNi *dpy-8*. Ce contrôle est un contrôle négatif, l'ARNi *dpy-8* n'a pas d'effet connu sur la transdifférenciation. Il assure simplement que les deux échantillons observés sont dans les mêmes conditions à l'exception de la nature de l'ARNi. J'ai alors croisé un allèle mutant de *jmjd-2* avec les mutants *sel-10*, *jmjd-3.1* et réalisé le triple mutant *syIs63 ; sel-10 (ok1632) ; jmjd-2(tm1299) ; jmjd-3.1(fp15)* ainsi que

chacun des deux doubles mutants *jmjd-2 ; sel-10* et *jmjd-2 ; jmjd-3.1*. Les observations de ces lignées sont présentées dans la figure suivante.

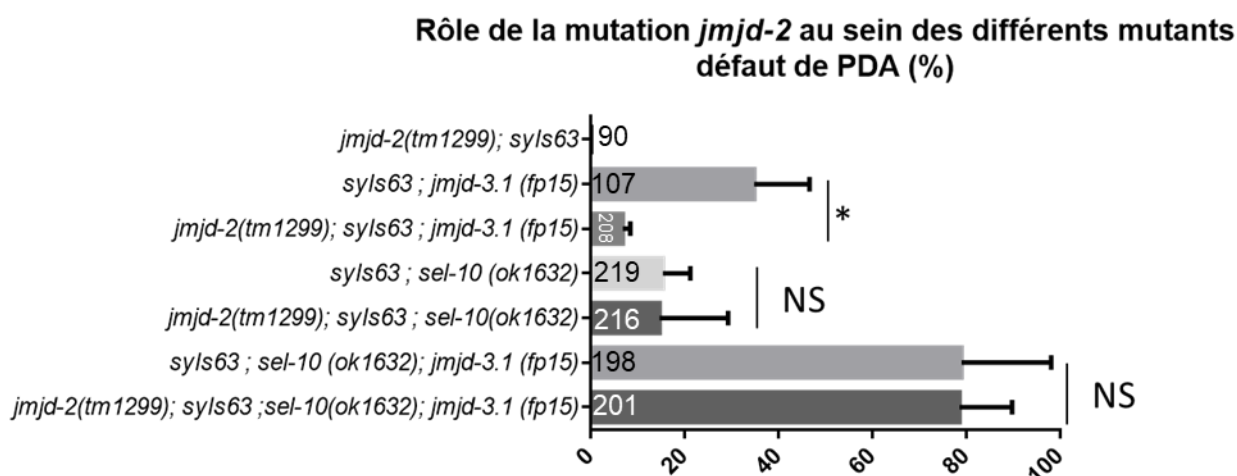


Figure 21 : Observation de l'effet de la mutation de *jmjd-2* au sein de la transdifférenciation. NS : non significatif. Les valeurs d'étiquettes correspondent aux nombres de vers observés. NS= non significatif. * : p valeur < 0.05 par test t de Student. N=3. Expérience réalisée à 20°C.

En effet, l'absence de *jmjd-2* n'induit aucun défaut de transdifférenciation. De plus, cette mutation n'induit pas une suppression du fort défaut de transdifférenciation observé dans le double mutant *sel-10(ok1632) ; jmjd-3.1(fp15)* : *jmjd-2* n'est donc probablement pas la cible impactant négativement la transdifférenciation et qui serait sur-représentée en absence de *sel-10* dans notre hypothèse. A l'appui de cette conclusion, aucune suppression du défaut de transdifférenciation dû à l'absence de *sel-10* n'est observée dans le double mutant *syls63 ; sel-1(ok1632) ; jmjd-2(tm1299)*. La mutation *jmjd-2* n'a pas d'impact sur le mutant *sel-10*. En revanche, la mutation de *jmjd-2* supprime de manière significative la mutation *jmjd-3.1*. Ces résultats indiquent un potentiel rôle de *jmjd-2* au sein de la transdifférenciation, mais pas en tant que cible de SEL-10, car il n'y a aucun impact de la mutation de *jmjd-2* au sein du double mutant *sel-10 ; jmjd-3.1*.

Un mini crible ARNi basé sur le même principe que pour *jmjd-2* a été réalisé pour tester la potentielle implication de *cec-6*, *zfp-1*, *nhl-2* et *bet-1*. Comme précédemment, l'expérience a été réalisée dans des conditions normales de température et dans le double mutant *sel-10 ; jmjd-3.1* contenant *rrf-3(pk1426)* et *syls63* dans le fond génétique.

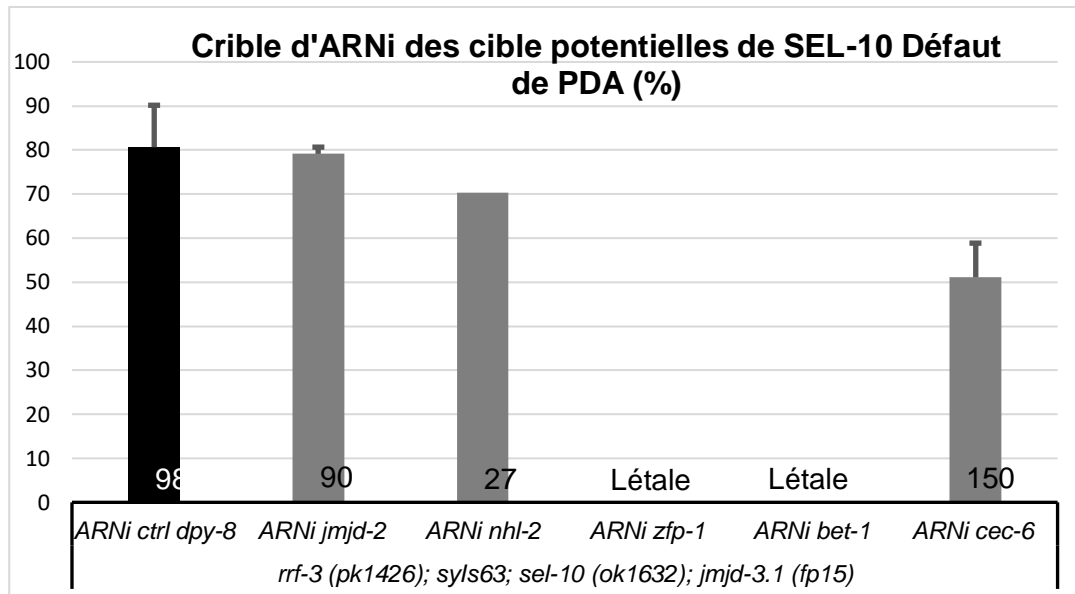


Figure 22 : crible RNAi de potentielles cibles de SEL-10 au sein du double mutant *syIs63 ; sel-10(ok1632) ; jmjd-3.1 (fp15)*. Cette souche possède également la mutation *rrf-3 (pk1426)* sensibilisant la souche aux ARNi. N=1. Expérience réalisée à 20°C.

L'inactivation de *cec-6* par ARNi entraîne une diminution significative du défaut de PDA, indiquant que *cec-6* impacte la transdifférenciation, au contraire de *jmjd-2* et *nhl-2*. Les gènes *zfp-1* et *bet-1* présentent 100% de létalité, et n'ont donc pas pu être testés. J'ai donc décidé de continuer à travailler sur *cec-6*.

1.1.3. *cec-6* modificatrice de la chromatine comme cible de SEL-10 ?

L'ARNi contre *cec-6* présente une diminution du défaut de PDA. Cette expérience a été répétée une nouvelle fois afin de s'assurer qu'il ne s'agit pas d'artéfacts.

Défaut de PDA (%) dans la souche *rrf-3 (pk1426) ; syIs63 ; sel-10 (ok1632) ; jmjd-3.1 (fp15)* expérience d'ARNi

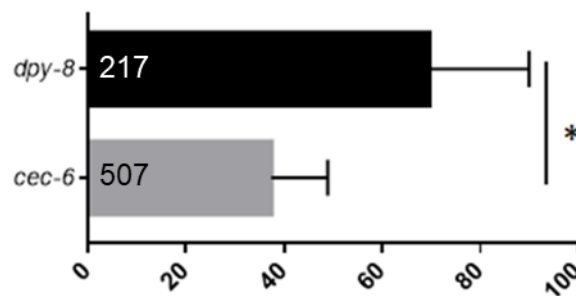


Figure 23 : Injection ARNi de *cec-6* et *dpy-8* au sein du mutant *rrf-3 (ok1426) ; syIs63 ; sel-10 (ok1632) ; jmjd-3.1 (fp15)*. La diminution observée lors de l'injection de l'ARNi de *cec-6* est significative. * : $p < 0.05$ test t de Student. N=5. Expérience réalisée à 20°C.

cec-6 est un gène impliqué dans le remodelage de la chromatine, notamment pour fermer la chromatine et la rendre inaccessible aux différents facteurs de transcription. La diminution de défaut de PDA observée lors de la diminution du gène *cec-6* est reproductible et significative. Ceci suggère que CEC-6 pourrait être la cible de SEL-10. Néanmoins, supprimer la synergie existante entre *sel-10* et *jmjd-3.1* peut également être obtenu en supprimant la mutation de *jmjd-3.1* directement. Afin de tester cette hypothèse, j'ai injecté l'ARNi ciblant *cec-6* au sein du mutant *rrf-3(pk1426) ; syls63 ; jmjd-3.1(fp15)*. L'ARNi ciblant *dpy-8* a servi de contrôle de l'expérience.

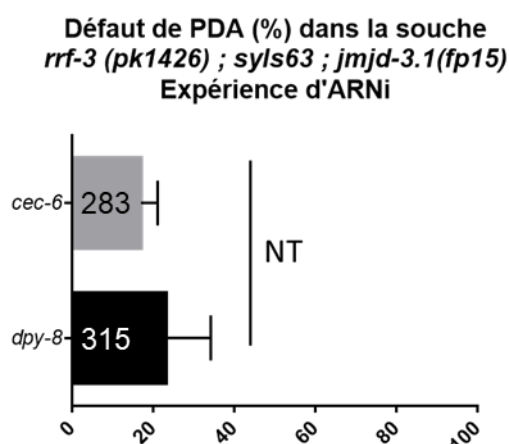


Figure 24 : injection par ARNi au sein du mutant *rrf-3 (pk1426) ; syls63 ; jmjd-3.1 (fp15)*. Chaque ver injecté est isolé sur une boîte différente et la progéniture des vers injectés est observée. NT : test non significatif (cependant, le test manque de puissance). N=3. Expérience réalisée à 20°C.

Il n'y a pas de différence de pénétrance du défaut de PDA entre les animaux où *cec-6* a été inactivé et les animaux contrôle (*dpy-8*) ce qui implique que la diminution observée dans le double mutant sensibilisé aux ARNi *sel-10 ; jmjd-3.1* est due à une suppression de l'effet de la mutation de *sel-10* spécifiquement. Afin de confirmer le rôle de *cec-6* au sein de la transdifférenciation, et d'étudier son impact en l'absence totale du produit du gène, il faut utiliser un mutant nul. C'est-à-dire un mutant où la fonction du gène n'est plus assurée (mutant nul fonctionnel) ou un mutant qui ne présente pas d'expression d'ARNm.

La protéine CEC-6 possède deux types de domaines principaux, un chromodomaine, à la base de sa fonction et deux coïl-coïl domaine, domaine de structure de protéine.

Il n'existe pas d'allèle mutant de *cec-6* : nous avons donc décidé de réaliser une inactivation par CRISPR au locus endogène de ce gène. La technique CRISPR Cas9 est

une technique de mutagenèse dirigée, basée sur l'action d'une endonucléase qui coupe l'ADN double brin au niveau d'une séquence précise de l'ADN. Cette séquence doit comporter le couple de nucléotides CG, et l'endonucléase est conduite au niveau de la séquence d'ADN précise en se liant à un ARN guide (ARNg). Cet ARNg possède 19 nucléotides qui sont complémentaires à la séquence d'ADN cible. Une partie de l'ARNg est invariant et sert à la liaison à la protéine Cas9 (Barrangou et al., 2007; Doudna and Charpentier, 2014). Nous avons réalisé un co-CRISPR permettant de sélectionner les vers [Dpy] au sein desquels l'endonucléase coupe le gène *dpy-10*. En induisant une mutation ponctuelle, l'allèle *dpy-10* obtenu est un allèle dominant négatif, permettant une sélection efficace des vers (Arribere et al., 2014).

Cette technique a été adaptée à différents organismes modèles et notamment *C. elegans*. Lorsque l'ADN double brin est coupé par l'endonucléase, il arrive que la réparation ne se passe pas correctement et que des nucléotides soient ajoutés ou retirés par rapport à la séquence sauvage. Ceci provoque l'apparition d'un décalage du cadre de lecture et donc un codon stop prémature.

Le gène *cec-6* est localisé sur le chromosome IV, très près du marqueur *syIs63*. C'est pour cela que la souche IS98 *syIs63* a été injectée directement (voir matériel et méthode pour les détails pratiques). Nous avons obtenu 152 vers transgéniques, dont environ 100 vers étaient Dpy. Parmi tous ces vers, 10 ont été génotypés comme étant hétérozygotes et ont été séquencés. Trois allèles ont été caractérisés :

- *fp28* présente une délétion de 5 nucléotides, induisant un décalage du cadre de lecture et la présence d'un codon stop prémature à l'acide aminé 40.
- *fp29* présente une délétion de 11 nucléotides induisant un décalage du cadre de lecture et la présence d'un codon stop prémature en position 38.
- *fp30* présente la délétion d'un nucléotide et l'insertion de 8 autres, induisant un décalage du cadre de lecture provoquant l'apparition d'un codon stop prémature à la position 44.

Ce dernier allèle ayant été obtenu le premier sous la forme homozygote et ne présentant pas de différence significative par rapport aux autres allèles, c'est cet allèle qui a été utilisé pour la suite des expériences.

La sélection de la mutation s'est faite par génotypage PCR puis digestion, car la séquence ciblée en début de gène est une séquence palindromique. Les mutants trouvés ont été isolés et la séquence ciblée a été séquencée par séquençage de Sanger.

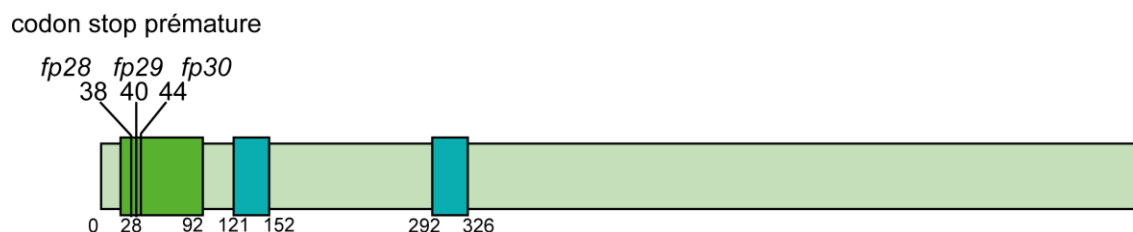


Figure 25 : représentation schématique de la protéines CEC-6, les différents domaines protéiques et les allèles mutants. Le domaine vert clair est le chromodomaine. Les deux domaines vert foncé correspondent aux domaines coil-coil.

J'ai obtenu un mutant nul de *cec-6* présentant un décalage du cadre de lecture et un stop prématuré. Ce mutant a été croisé avec les souches

- *syIs63 ; sel-10 (ok1632)*
- *syIs63 ; jmjd-3.1 (fp15)*
- *syIs63 ; sel-10 (ok1632) ; jmjd-3.1 (fp15)*

J'ai observé la formation de PDA dans chacune de ces souches (figure 26).

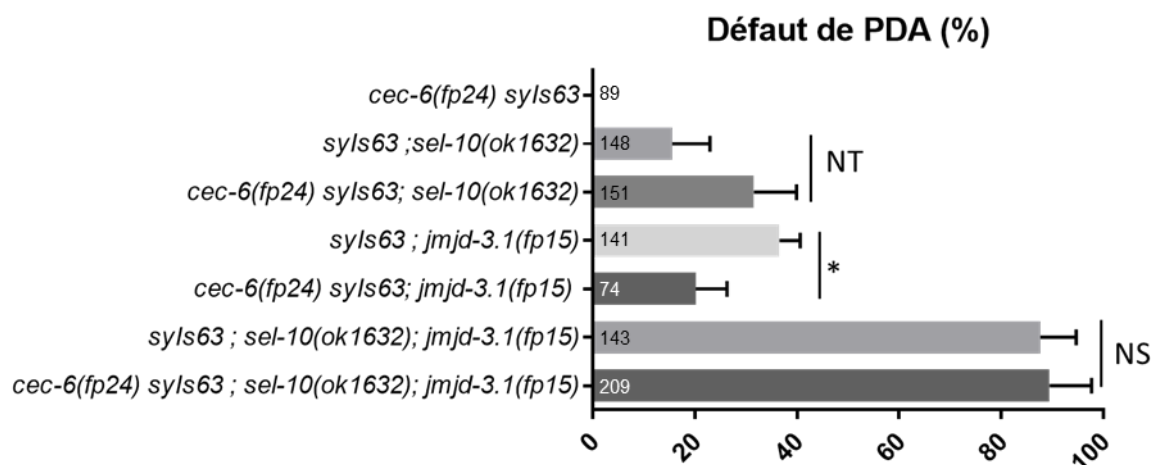


Figure 26 : observation du défaut de PDA au sein du mutant *cec-6* et son effet sur le défaut des mutants *sel-10* et *jmjd-3.1*. NS : non significatif. * : $p < 0.05$. NT : le test statistique n'est pas assez puissant pour conclure. N=3. Expérience a été réalisée à 20°C.

On observe une suppression significative du défaut de *jmjd-3.1* par la mutation *cec-6*. Ainsi qu'une tendance de *cec-6* à augmenter le défaut de *sel-10*. Cependant la puissance du test réalisé dans cette expérience n'est pas suffisante pour conclure qu'il y a une

différence significative. Ceci laisse penser que *cec-6* joue bien un rôle antagoniste à *jmjd-3.1* lors de la transdifférenciation.

Cependant, il n'y a pas de différence significative observable entre le double mutant *sel-10 ; jmjd-3.1* et le triple mutant *cec-6 ; sel-10 ; jmjd-3.1*. L'absence de *cec-6* ne reproduit pas l'effet de son inactivation par ARNi au sein du double mutant *sel-10 ; jmjd-3.1*.

1.2. Quel est la fonction de *sel-10* au sein de la transdifférenciation ?

1.2.1. Dans quelles cellules l'expression *sel-10* est-elle nécessaire pour effectuer sa fonction lors de la transdifférenciation ?

SEL-10 est une protéine composée par deux domaines principaux. Un domaine Fbox impliqué dans la liaison à la protéine SKR, permettant le lien entre SEL-10 et le reste du complexe SCF (cf figure 13 de l'intro). Il s'agit d'un domaine composé de 7 répétitions de domaines WD40 qui permettent la reconnaissance de la ou les protéine(s) cible(s) de l'ubiquitine. Afin d'étudier la fonction de cette protéine, détailler son rôle au sein de la transdifférenciation, mettre en évidence le devenir de la cible de l'ubiquitine et son identité, nous avons décidé de réaliser en premier lieu une expérience de sauvetage de phénotype. Cette expérience me permettra de confirmer que c'est bien la réduction (perte ?) de l'activité de *sel-10* qui entraîne une augmentation du défaut de PDA dans les mutants *jmjd-3.1* et de préciser le focus cellulaire d'activité de *sel-10*. Pour ce faire, j'ai cloné un plasmide comportant le promoteur *col-34p*, la séquence de mCherry « wormifiée » (adapté au biais d'utilisation des codons de *C. elegans*), l'ADN codant de *sel-10* et la séquence 3'UTR du gène *unc-54* qui permet une bonne expression du plasmide sans modifier son profil d'expression. Grâce au promoteur *col-34p*, l'expression de la protéine de fusion mCherry::SEL-10 se fera dans les six cellules rectales, dont la cellule Y, du stade embryonnaire « 3 fold » jusqu'au stade adulte (Kagias et al., 2012).

Exprimer la protéine SEL-10 au sein des cellules rectales devrait restaurer sa fonction au sein de la transdifférenciation, et donc diminuer le défaut observé au sein du double mutant. Cette diminution devrait atteindre le niveau de défaut de PDA observé dans le simple mutant *jmjd-3.1*. Ce type d'expérience est un sauvetage de phénotype. Cette expérience de sauvetage de phénotype ne peut pas être réalisée dans le simple mutant *sel-10* car ce dernier présente une pénétrance trop faible pour pouvoir observer l'effet d'une diminution du défaut de transdifférenciation. C'est pour cette raison que la protéine de

fusion sera exprimée dans le double mutant *syIs63 ; sel-10 (fp27) ; jmjd-3.1 (fp15)*. Restaurer l'expression de *sel-10* au sein de ce double mutant permet de briser l'effet de synergie qui augmente la visibilité du défaut.

Lors de l'étude préliminaire du mutant *sel-10*, Steven Zuryn a réalisé une expérience de sauvetage, exprimant *sel-10ADNc* seul. Il a pu observer une diminution du défaut de PDA. Réaliser la protéine de fusion entre SEL-10 et une protéine fluorescente permet de vérifier le motif d'expression et la localisation de cette dernière.

Cette protéine de fusion est suffisante pour permettre de sauver le phénotype de *sel-10* au sein du double mutant *sel-10 ; jmjd-3.1*.

Lors des observations de la présence des vers transgéniques, j'ai pu confirmer l'expression de la protéine de fusion dans les cellules rectales par observation du signal de fluorescence (mCherry dans les cellules rectales, figure 28).

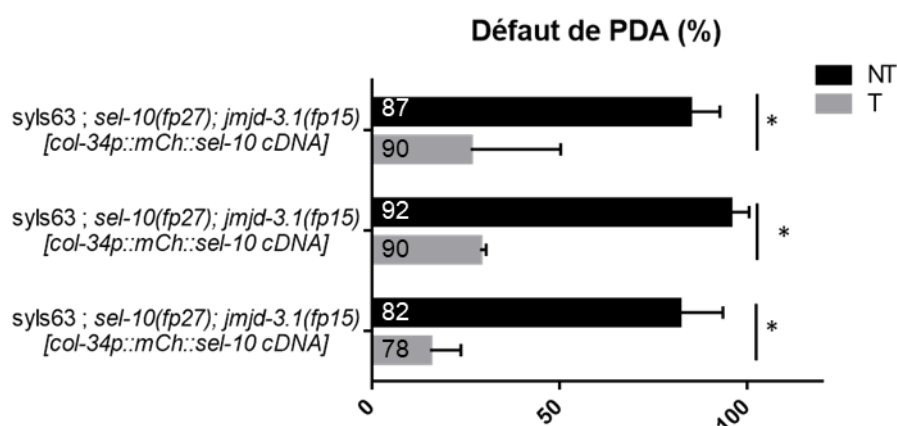


Figure 27 : expérience de sauvetage de phénotype de *sel-10* au sein du double mutant *sel-10 ; jmjd-3.1*. Les trois souches correspondent à trois lignées indépendantes IS1399, IS1400 et IS1401. Chaque observation a été réalisée en trois fois. T : transgénique. NT : non Transgénique. * : $p < 0,05$ t test de Student. L'expérience a été réalisée à 20°C.

La protéine de fusion mCh::SEL-10 est suffisante pour restaurer la fonction de *sel-10*. L'expression du transgène étant exclusivement limitée aux cellules rectales, on peut supposer que la protéine SEL-10 agit de manière autonome au sein de la cellule Y (figure 27). Ensuite, puisqu'une expression de *sel-10* à partir du stade embryonnaire 3 fold est suffisante pour le sauvetage, alors que la cellule Y est née vers 290 min de développement, ceci suggère que l'activité de *sel-10* dans la transdifférenciation n'est pas cruciale dans la jeune cellule Y. Enfin, une observation au microscope confocal a permis de voir que la protéine de fusion est localisée dans le cytoplasme de la cellule Y.

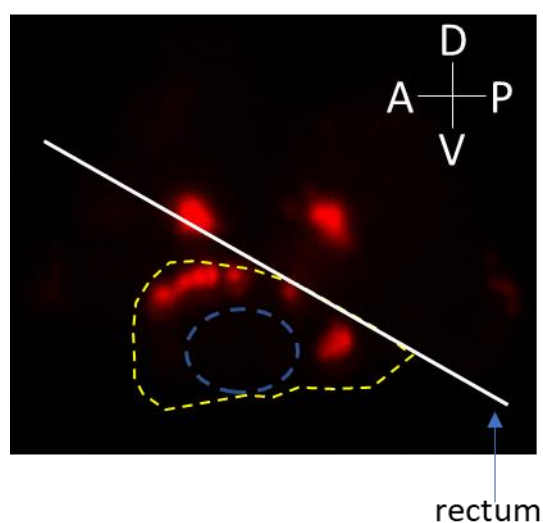


Figure 28 : observation au microscope confocal. Le contour de la cellule Y est délimité en pointillés jaunes. Le noyau de cette même cellule est détourné par la ligne en pointillés bleus. La barre blanche présente le rectum du ver. Cette observation est réalisée sur un ver en stade jeune L1 n=10, observé au confocal objectif X100. A/P : axe antéro-posérieur D/V : axe dorso-ventral

1.2.2. Importance du domaine Fbox : le lien entre la protéine SEL-10 et le complexe SCF ?

Le domaine Fbox est celui qui relie la protéine SEL-10 à SKR et donc au reste du complexe SCF. Afin de tester l'importance de la Fbox, et par là l'implication potentielle d'un complexe SCF lors de la transdifférenciation, nous avons examiné l'activité de formes mutées de SEL-10. Les nucléotides codants pour ce domaine Fbox ont été supprimés par PCR inverse pour obtenir la protéine SEL-10 Δ Fbox. Cette modification de la protéine SEL-10 a été réalisée sur la protéines de fusion mCherry::SEL-10. Cette protéine de fusion permet de vérifier l'expression du construit, et donc de pouvoir conclure sur sa fonction.

Comme précédemment, j'ai injecté ce construit dans le double mutant *sel-10 ; jmjd-3.1* et obtenu trois lignées indépendantes (IS2533, IS2534 et IS2534).

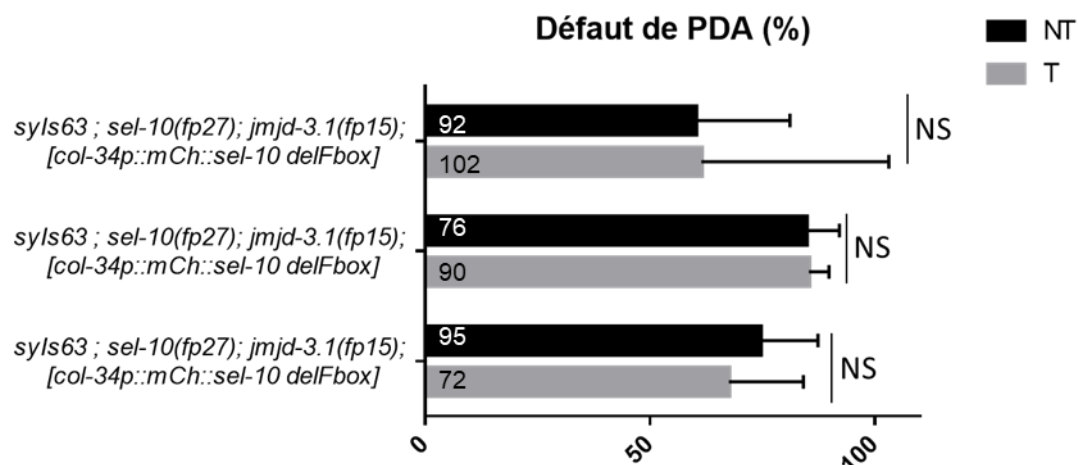


Figure 29 : expérience de sauvetage de phénotype. Les trois souches correspondent à trois lignées indépendantes. Chaque observation a été réalisée en trois fois. T : transgénique. NT : non Transgénique. NS : non significatif par test t de Student. L'expérience a été réalisée à 20°C.

La perte du domaine Fbox par délétion ne permet pas le sauvetage du phénotype (figure 29), suggérant que ce domaine est essentiel à l'activité de SEL-10 lors de la transdifférenciation. L'expression de la protéine SEL-10 est vérifiée grâce à la fluorescence de mCherry à laquelle elle est fusionnée. Cette fluorescence a été observée dans la quasi-totalité des vers transgéniques des trois lignées (>95%).

Il est envisageable que la protéine SEL-10, possédant un domaine de répétition WD40 fonctionnel mais pas de domaine Fbox, se comporte comme un dominant négatif. En effet, une hypothèse propose que la protéine SEL-10 Δ Fbox reconnaîtrait la protéine cible, mais ne permettrait pas l'ubiquitination de cette dernière, la séquestrant ainsi. Pour tester cette hypothèse, j'ai croisé le double mutant transgénique de la souche IS2533 *syIs63 ; sel-10 (fp27) ; jmjd-3.1 (fp15) ; fpEx909 [col-34p ::mCh :: sel-10 Δ Fbox]* (qui avait le meilleur taux de transmission) avec une souche balancier de *sel-10 : oxTi547[eft-3p ::H2B ::tomato]*. Cette souche exprime H2B tomato dans toutes les cellules somatiques. J'ai ainsi sélectionné par génotypage PCR la conservation de la mutation *jmjd-3.1(fp15)* et la perte de l'allèle mutant de *sel-10 (fp27)*. J'ai ensuite croisé ce simple mutant *oxTi547 ; syIs63 ; jmjd-3.1 (fp15) ; fpEx 909* avec une souche IS98 : *syIs63* afin d'éliminer le balancier et obtenir la souche *syIs63 ; jmjd-3.1 (fp15) ; fpEx909*. Si la délétion du domaine Fbox permet d'obtenir l'effet d'un dominant négatif, alors son expression au sein du simple mutant *jmjd-3.1* devrait mimer la perte d'activité *sel-10* et augmenter le défaut de PDA.

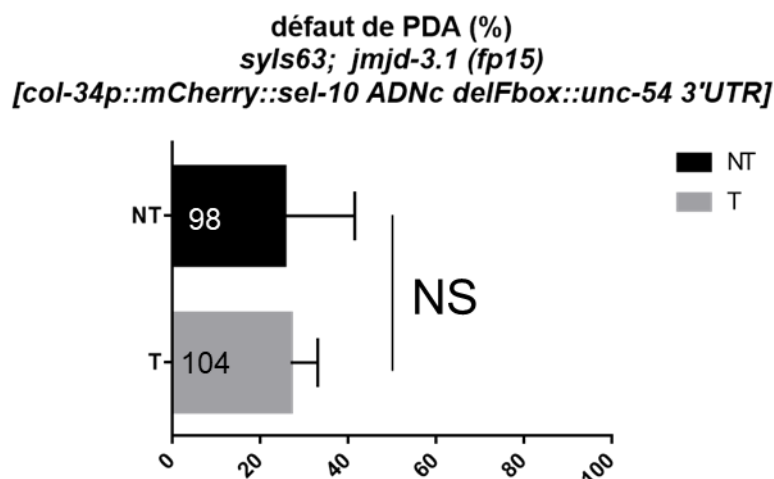


Figure 30 : expérience de dominant négatif sur la protéine *mCh::SEL-10 Δ Fbox*. Chaque observation a été réalisée en trois fois. T : transgénique. NT : non Transgénique par test t de Student. NS : non significatif. Expérience réalisée à 20°C.

Le défaut du simple mutant *jmjd-3.1* n'est pas augmenté au sein de la transdifférenciation. Ainsi, au vu de ces résultats, nous pouvons conclure que la protéine *mCh::SEL-10 Δ Fbox* n'agit pas comme un dominant négatif au sein de la transdifférenciation.

Afin de mieux comprendre la fonction du domaine Fbox, j'ai voulu vérifier si ce dernier fonctionne de manière indépendante. Le domaine Fbox seul a été cloné en N-terminal de la protéine de fusion *mCh::SEL-10 ADNc Δ Fbox*. J'ai ainsi obtenu la protéine de fusion comportant *Fbox::mCh::SEL-10 Δ Fbox::Fbox*. J'ai injecté ce construit au sein des cellules rectales du double mutant *sel-10 ; jmjd-3.1*.

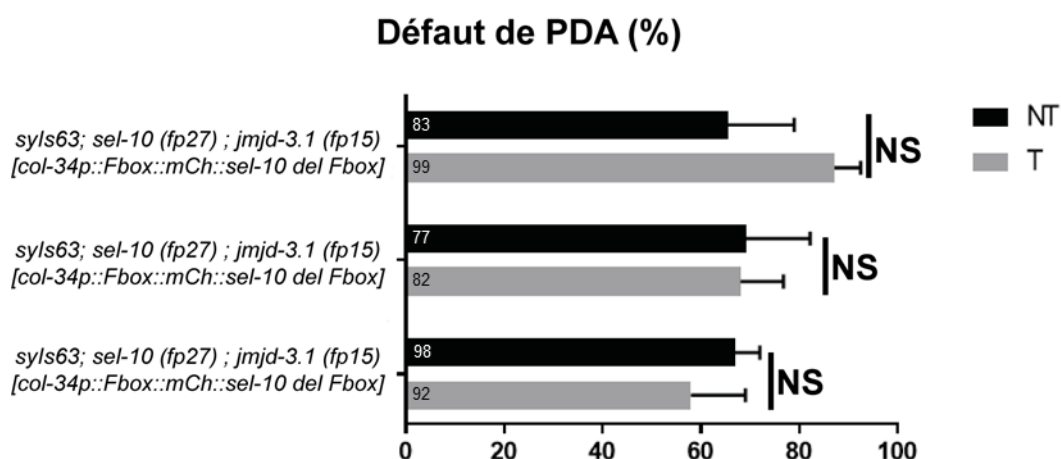


Figure 31 : expérience de sauvetage de phénotype. Les trois souches correspondent à trois lignées indépendantes. N=3. T : transgénique. NT : non Transgénique. NS : non significatif par test t de Student. IS1667 : lignée 1. IS1668 : lignée 2. IS1669 : lignée 3. L'expérience a été réalisée à 20°C.

Cloner le domaine Fbox en position C-terminale de la protéine de fusion mCh::SEL-10 ADNc ΔFbox n'est pas suffisant pour sauver le phénotype de défaut de PDA au sein du double mutant. Ceci indique que la position de ce domaine au sein de la protéine SEL-10 est importante pour l'activité de SEL-10 lors de la transdifférenciation.

Ces résultats précédents, n'éliminent pas complètement la possibilité que la protéine SEL-10ΔFbox n'est pas conformée de manière suffisamment correcte pour permettre la reconnaissance de protéines cibles. C'est pour cela que, dans une autre tentative pour mieux caractériser la fonction du domaine Fbox, j'ai muté ponctuellement un acide aminé conservé de ce domaine. Je me suis appuyée sur la littérature sur les homologues de SEL-10 pour choisir quels résidus muter.

```
>TR:Q3TS95_MOUSE Q3TS95 Putative uncharacterized protein (Fragment)
OS=Mus musculus PE=2 SV=1 Length = 285

Query: 1  I P V E L G M K I L H N L T G Y D L L K V A Q V S K N W K L I S E I D K I W K S L 41
          I P      M + I L   L   Y  L L +   A Q V + K N W  + +   D + W +   L
Sbjct: 5  L P S V P M M E I L S Y L D A Y S L L Q A A Q V N K N W N E L A S S D V L W R K L 45

Consensus/60%  L P . - I l p p I l  p p L s s . b c b b  p h p p V s + . . .  p a + s l l s p p . . s h b b p p
```

Figure 32 : comparaison de la séquence d'Acides aminés composant le domaine Fbox entre différentes espèces. L'alignement permettant l'obtention de la séquence consensus a été réalisé grâce au site internet SMART, comparant 181 protéines contenant un domaine Fbox, dans différents organismes (voir Annexe). Ici est montré un exemple de comparaison entre le domaine Fbox de la protéine SEL-10 en haut (query) et une protéine non caractérisée chez la souris en bas (sbjct).

Sur les conseils d'un spécialiste en protéines (Shashi Suman, post doctorant au laboratoire de Michel Labouesse) j'ai décidé de muter la proline conservée au sein du domaine Fbox en alanine. La proline est un acide aminé particulièrement important pour la structure tridimensionnelle d'une protéine (Doss et al., 2012) . La changer pour une alanine est supposé altérer la structure de ce domaine sans compromettre la structure composée de répétition de domaines WD40.

J'ai réalisé le plasmide [*col-34p::mCh::sel-10 P127->A*] par PCR à partir du plasmide pSj9032 [*col-34p::mCh::sel-10 ADNc*]. Ce plasmide a été injecté au sein du double mutant *syIs63 ; sel-10(fp27) ; jmjd-3.1(fp15)* afin de réaliser une expérience de sauvetage de phénotype se basant sur le même principe que précédemment.

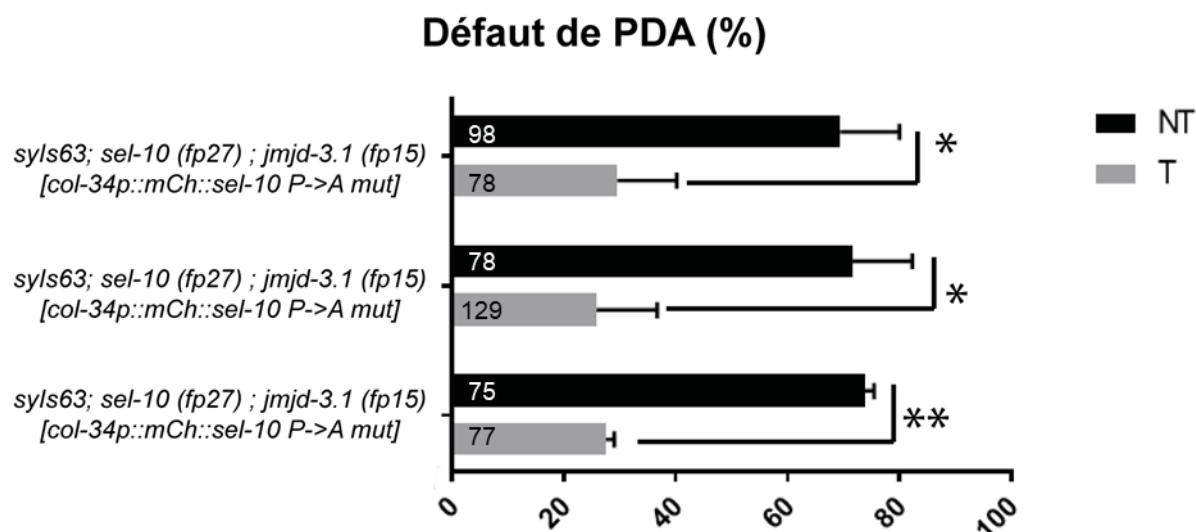


Figure 33 : expérience de sauvetage de phénotype. Les trois souches correspondent à trois lignées indépendantes. N=3. T : transgénique. NT : non Transgénique. * : $p < 0,05$. ** : $p < 0,01$ par test t de Student. L'expérience a été réalisée à 20°C.

La mutation de la proline conservée au sein du domaine Fbox en alanine ne semble pas altérer la fonction de la protéine SEL-10, et permet de sauver le phénotype de défaut de PDA au sein du double mutant *sel-10 ; jmjd-3.1*.

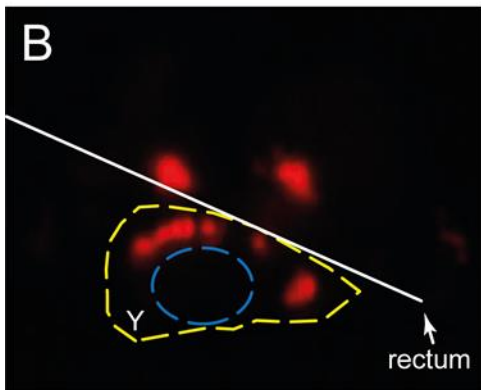
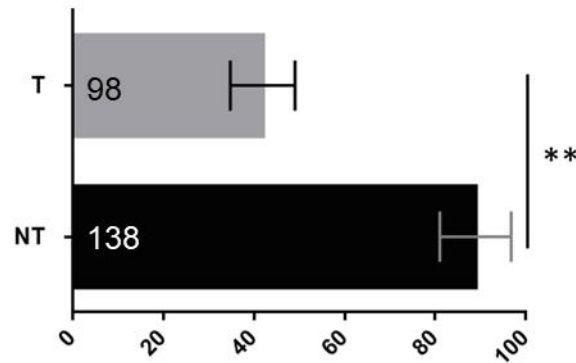
Il est possible de conclure de cette expérience que le domaine Fbox n'est soit pas nécessaire pour garantir la fonction de SEL-10 au sein de la transdifférenciation, soit la mutation de la Proline en alanine n'est pas suffisante pour compromettre la fonction du domaine Fbox.

1.2.3. La protéine SEL-10 est-elle localisée et active dans un compartiment subcellulaire spécifique ?

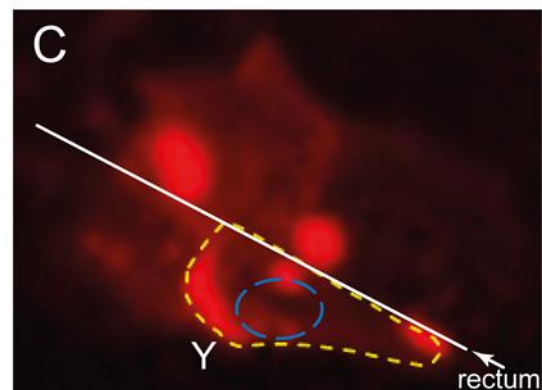
Il est connu que la localisation subcellulaire de l'homologue humain FBW7 modifie sa fonction au sein de la cellule (Hoeck et al., 2010; Jandke et al., 2011; Takeishi and Nakayama, 2014). Une observation similaire n'a pas été rapportée avec la protéine SEL-10. Ainsi, vérifier si la fonction de SEL-10 est dépendante de sa localisation subcellulaire nous a paru intéressant. C'est pour cette raison que j'ai créé deux plasmides différents. Tous deux issus du plasmide fonctionnel : *col-34p::mCh::SEL-10*. Le premier a été réalisé en utilisant le domaine PH (Pleckstrine Homologie) qui permet une localisation de la protéine fusionnée vers la membrane plasmidique. Ce domaine PH d'environ 100 acides aminés reconnaît les lipides phosphoinositide (Kang et al., 2017). Ces derniers étant plus nombreux au niveau de la membrane plasmique, la protéine de fusion devrait y être localisée (Kang et al., 2017).

A

Défaut de PDA (%) dans la lignée 3
syIs63 ; sel-10 (fp27) ; jmjd-3.1 (fp15)
[col-34p::PH::mCherry::sel-10ADNc::unc-54 3'UTR]



col-34p::mch::sel-10 ADNc



col-34p::PH::mch::sel-10 ADNc

Figure 34 : étude de la protéine de fusion PH ::Mcherry ::SEL-10. **A)** expérience de sauvetage de phénotype. Trois lignées indépendantes ont été obtenues, une représentative est montrée sur cette figure. N=3. T : transgénique. NT : non Transgénique. **: $p < 0,01$. L'expérience a été réalisée à 20°C. **B)** observation au microscope confocal de la protéine de fusion mCH::SEL-10. **C)** observation au microscope confocal d'une lignée exprimant PH::mCH::SEL-10 au sein es cellules rectales. La ligne en pointillé jaune montre la membrane plasmidique de la cellule Y. La ligne en pointillé bleue représente la limite du noyau de la cellule Y. La ligne blanche indique le rectum.

L'expression de la protéine de fusion PH::mCh::SEL-10 est suffisante pour permettre un sauvetage de phénotype du double mutant *sel-10 ; jmjd-3.1*. On peut également constater que la présence du domaine PH n'est pas suffisante pour permettre une localisation de la protéine au niveau de la membrane plasmidique et qu'elle semble induire une déstabilisation de la localisation de la protéine. En effet, SEL-10 n'est plus strictement cytoplasmique, mais également nucléaire lorsqu'elle est fusionnée au domaine PH.

En complément à cette expérience, une localisation nucléaire a été tentée. Afin d'obtenir ce résultat, deux séquences NLS ont été clonées en amont de la séquence mCherry, donnant ainsi le plasmide 2NLS::mCh::sel-10 ADNc que j'ai pu injecter et observer avec l'aide de Aleksandra Chudinova, stagiaire de master 1 au laboratoire. Cependant, à notre surprise, l'injection de ce construit était toxique pour les vers. Nous avons pu obtenir 3 lignées en injectant une faible concentration de plasmide, mais ces dernières avaient un très faible taux de transmission et n'ont pas pu être conservées. Les vers qui avaient pu être observés avant la perte des lignées ne permettaient pas de voir de fluorescence au sein des cellules rectales. De plus, ce construit ne sauvait pas le phénotype de forts défauts de transdifférenciation des mutants *sel-10(ok1632) ; jmjd-3.1(fp15)*.

1.3. Analyse du complexe SCF : quels sont les partenaires de SEL-10 ?

Le complexe SCF est le complexe d'ubiquitination auquel appartient SEL-10. Il est important lors de la différenciation de la vulve (Grant and Greenwald, 1997), ou chez les mammifères lors de la différenciation neuronale (Hoeck et al., 2010). De plus, des expériences préliminaires effectuées par Steven Zuryn suggéraient que la culline 3 pourrait jouer un rôle positif lors de la transdifférenciation. Nous avons donc privilégié l'hypothèse que SEL-10 agit au sein d'un complexe SCF ciblant des facteurs pour la dégradation. Un complexe SCF comprend une protéine SKR, une protéine CULIN, une protéine RBX et une protéine ubiquitine ligase E2 (voir fig. 13 intro). Chaque complexe comprenant un ensemble CULIN-SKR-E3-E2 spécifique semble avoir une fonction particulière. Ainsi, il nous a semblé important d'examiner si des membres du complexe SCF, et lesquels, jouent un rôle lors de la transdifférenciation. La mise en évidence des partenaires CULINE et SKR nous permettrait de préciser les modalités de l'action de SEL-10 lors de la transdifférenciation.

1.3.1. Quel est le SKR agissant avec SEL-10 ?

Il existe 21 protéines SKR présentes chez *C. elegans*, composants importants du complexe SCF. Cette protéine fait le lien entre l'ubiquitine ligase E3 et la protéine culline. Pour identifier laquelle ou lesquelles pourraient interagir avec *sel-10* lors de la transdifférenciation, nous avons décidé d'inhiber l'expression de ces dernières au sein d'un mutant *jmjd-3.1* et d'observer si une augmentation du défaut de PDA, mimant au moins

partiellement la synergie existante entre *sel-10* et *jmjd-3.1*, est obtenue. Il est cependant à noter que la probabilité que les différentes protéines SKR agissent de manière redondante est forte (Kipreos, 2005).

J'ai donc synthétisé et injecté à tour de rôle les RNAi des différents SKR au sein du mutant *rrf-3(pk1426) ; syIs63 ; jmjd-3.1(fp15)*. A chaque expérience d'injection, j'ai testé entre 3 et 4 SKR ainsi que le contrôle *dpy-8* RNAi. Comme expliqué dans le chapitre précédent, l'injection d'ARN double brin ciblant les messagers *dpy-8* sert à la fois de contrôle positif de l'expérience d'ARNi, par l'observation du phénotype Dpy ainsi induit, et de contrôle négatif, car *dpy-8* n'étant pas impliqué dans la transdifférenciation de Y en PDA, son inhibition par ARNi ne devrait pas avoir d'effet sur le défaut de PDA des mutants *jmjd-3.1(fp15)*. De plus, la diminution de l'expression de ce dernier gène n'influence pas le taux de transdifférenciation, ce qui en fait un bon contrôle pour vérifier l'efficacité de l'expérimentateur pour injecter de manière efficace un ARN interférent.

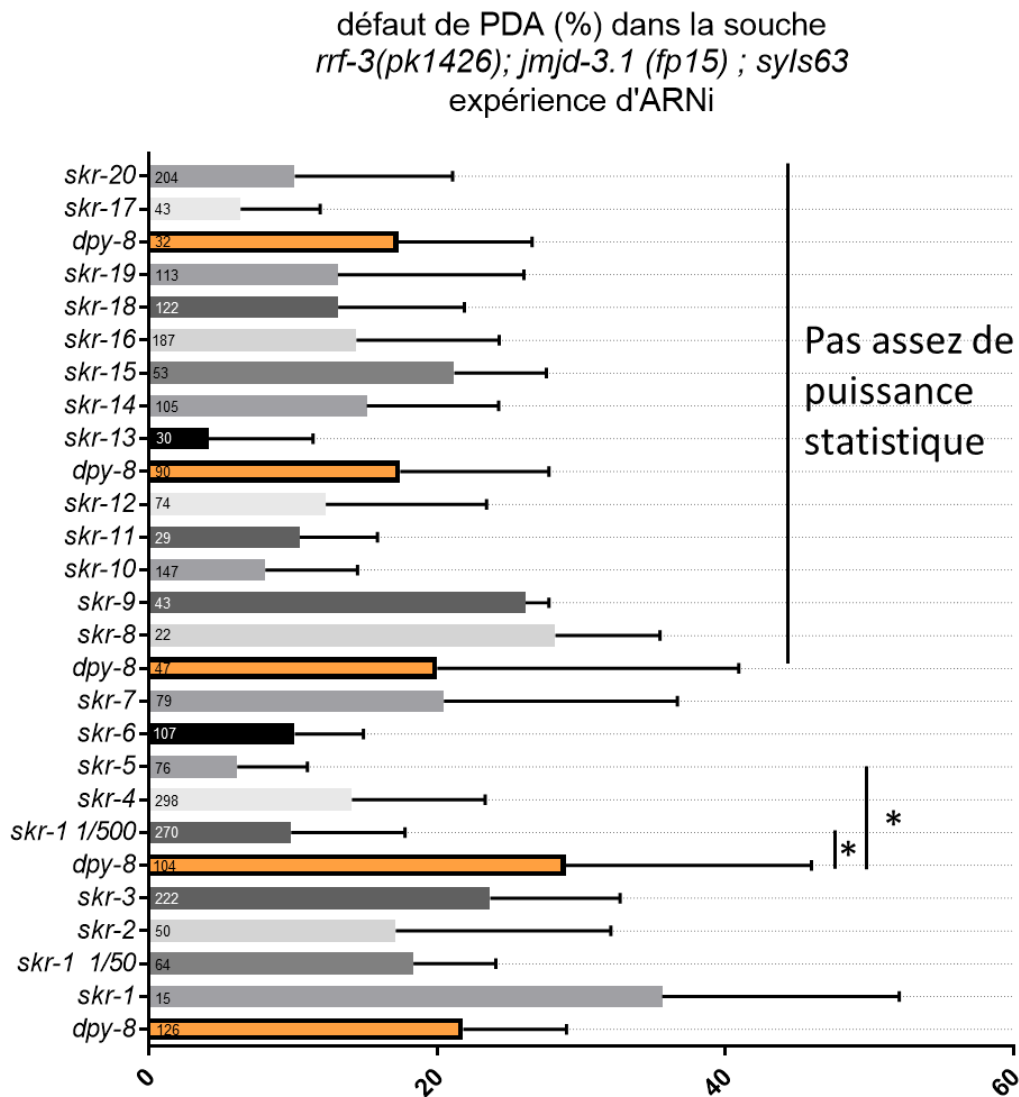


Figure 35 : expérience d'ARN interférant. Test des différents SKRs. Les ARN interférant ont été injectés dans une souche *rrf-3(pk1426); syls63 ; jmjd-3.1(fp15)*. L'ARN interférant *dpy-8* a été utilisé comme contrôle. Une dizaine de vers sont injectés par ARNi ce qui permet d'observer indépendamment les progénitures de chacune de ses boîtes, permettant d'obtenir des barres d'erreur. Pour les injections où la progéniture est inférieure à 10 vers, les boîtes ont été regroupées ensemble. Les tests statistiques ont été réalisés en comparant au contrôle *dpy-8* de l'expérience en question par un test ANOVA à un facteur. * : $\alpha < 0,05$. De SKR-8 à 20, le test statistique de l'ANOVA ne permet pas de conclure. De SKR-1 à SKR-8 tous les différences observables ne sont pas significatives, à l'exception de SKR-1 dilué 1/500 et SKR-5.

On constate qu'il n'y a aucun ARNi augmentant le défaut de transdifférenciation de manière significative par rapport à celui du contrôle *dpy-8*. La synergie existante entre *sel-10* et *jmjd-3.1* n'est pas reproduite au sein de ce crible d'ARNi. En revanche, il est surprenant de constater que deux ARNi (*skr-1* et *skr-5*) présentent une diminution significative du défaut de *jmjd-3.1*. Il est intéressant de noter que SKR-1 appartient à cette

dernière catégorie et présente une différence significative avec le contrôle *dpy-8*. Ce SKR est celui décrit dans la littérature pour interagir avec SEL-10 ou même FBW7 avec son homologue SKR-1, conservé au sein de l'évolution. C'est également un des SKR les plus impliqués dans la dégradation de protéines cibles. Ainsi les résultats obtenus suggèrent que de nombreux SKRs, peut-être au sein de complexes SCF potentiellement redondants, agissent de façon antagoniste à la transdifférenciation, possiblement en envoyant vers la machinerie de dégradation des facteurs impliqués dans ce processus.

SKR-5 est impliqué dans la dégradation de protéines par le protéasome. SKR-5 est notamment impliqué dans la longévité et la gestion du stress oxydatif (Liu et al., 2011). Son action est probablement redondante avec d'autres SKR.

1.4. La cible de SEL-10 est-elle dégradée par le protéasome ?

1.4.1. ARN interférant *rpn-10* et *pbs-5* : test de deux sous-unités du protéasome

Connaitre la cible de SEL-10 passe par connaitre son devenir. Si la protéine en question est dégradée par le protéasome comme la littérature le suggère, alors l'approche *in silico* utilisée pour identifier la cible de SEL-10 est valide. Dans le cas contraire, cette dernière devrait être revue pour aborder le problème différemment. C'est pourquoi il était important de tester quelle était l'importance du protéasome au sein de la transdifférenciation d'Y en PDA. En parallèle des expériences cherchant à mettre en évidence la cible de SEL-10, nous avons testé l'hypothèse selon laquelle la cible de SEL-10 est dégradée par le protéasome.

Le protéasome est impliqué dans énormément de processus différents. Mais tester son implication au sein du mutant simple *jmjd-3.1* permet de vérifier s'il agit de manière similaire à *sel-10*. Le protéasome a été testé dans un premier temps par ARN interférence. En effet, le protéasome est un constituant essentiel des cellules, et son invalidation étant létale, une inactivation partielle par RNAi permet d'examiner un rôle potentiel. Deux sous-unités ont été testées : *pbs-5* et *rpn-10*.

Le corps du protéasome (19S) est responsable de la dégradation des protéines. Elle est formée de deux anneaux de 7 sous-unités, dont *pbs-5*.

Une diminution de l'expression de cette sous-unité a déjà été utilisée pour permettre la mise en évidence de la cible d'ubiquitine ligase, grâce à la présence d' « escapers » (Papaevgeniou and Chondrogianni, 2014).

rpn-10 est une sous-unité du protéasome 26S. Ce dernier est responsable de la reconnaissance et de la dégradation spécifique des protéines ubiquitinées. Ce gène est conservé au sein de l'évolution et est essentiel au sein de la quasi-totalité des organismes modèles à l'exception de la levure *Saccharomycète cerevisiae* et de *C. elegans*. Chez le ver, comme chez la levure, *rpn-10* n'est pas essentielle pour la survie de l'organisme et les mutants nuls sont viables (Finley et al., 2012; Papaevgeniou and Chondrogianni, 2014). Il a été postulé que *rpn-10* joue un rôle accessoire (et possiblement redondant) lors du développement du ver. Chez l'humain, la protéine RPN-10 est sensée reconnaître la chaîne de polyubiquitine K48. Bien que le mutant soit viable chez le ver, la perte de *rpn-10* n'est pas sans conséquences. Il a déjà été démontré que la perte de cette protéine entraîne une augmentation de protéines ubiquitinées au sein des cellules, un effet qui semble ubiquitaire (Keith et al., 2016), et que *rpn-10* jouait un rôle essentiel dans le processus de détermination du sexe chez *C. elegans* (Shimada et al., 2006).

L'interférence à ARN a été réalisée pour les deux gènes par injection dans le double mutant *rrf-3(pk1426) ; syIs63 ; jmjd-3.1 (fp15)*. Si le protéasome est impliqué dans la dégradation de la protéine cible de SEL-10, alors le défaut de PDA provoqué par la mutation *jmjd-3.1(fp15)* devrait être augmenté. Si le défaut de transdifférenciation reste inchangé, alors la fonction de SEL-10 pourrait être indépendante de l'activité du protéasome. Le contrôle *dpy-8* a été réalisé comme lors des précédentes expériences d'ARNi.

**Défaut de PDA (%) dans la souche
rrf-3 (pk1426) ; syls63 ; jmjd-3.1 (fp15)
expérience d'ARNi**

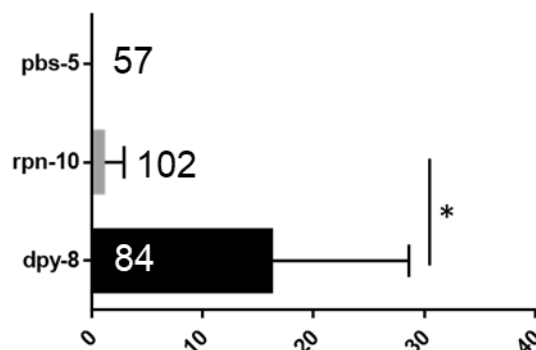


Figure 36 : Expérience d'ARNi afin de mettre en évidence le rôle du protéasome au sein de la transdifférenciation d'Y en PDA au sein du simple mutant *jmjd-3.1*. Cette expérience a été réalisée deux fois. Un test de Mc Nemar a été réalisé en se basant sur les données de présences et d'absence de PDA (pas sur la moyenne de défaut de PDA). * : $p < 0,05$. Sur 57 vers scorés aucun défaut de PDA n'est observé après ARNi de *pbs-5*.

L'injection de l'ARN double brin *pbs-5* entraîne une suppression totale du défaut de PDA du mutant *jmjd-3.1*. Seuls 57 vers ont pu être observés, car une grande partie des vers présentaient une létalité embryonnaire et larvaire indiquant que l'ARNi a fonctionné car le gène *pbs-5* est essentiel pour assurer la fonction du protéasome et donc la survie de l'individu.

L'ARNi contre *rpn-10* permet également une suppression du défaut de PDA des mutants *jmjd-3.1*, suggérant un effet global négatif du protéasome sur la transdifférenciation de PDA. Bien que le défaut observé ne soit pas intégralement supprimé, il est significativement diminué par rapport aux 16% de défaut de PDA observés chez *rrf-3 ; jmjd-3.1 (fp15)*. Ces résultats sont réminiscents de ceux obtenus lors du mini crible RNAi avec les gènes SKR : SEL-10 ne semble pas fonctionner dans une cascade SCF-protéasome, et ces derniers ont une activité qui antagonise la transdifférenciation.

1.4.2. Mutant *rpn-10*

Afin de confirmer ces résultats, grâce à l'existence d'un mutant *rpn-10* viable, des croisements entre *rpn-10(ok1865)* et *sel-10 / jmjd-3.1 / sel-10 ; jmjd-3.1* ont été réalisés. L'allèle *ok1865* est considéré comme nul. Il s'agit d'une délétion importante au sein du gène *rpn-10* impliquant la formation d'un codon stop prématuré.

Seule la souche triple mutante *rpn-10 (ok1865) ; syIs63 ; sel-10 (ok1632) ; jmjd-3.1 (fp15)* n'a pas pu être obtenue, celle-ci étant létale.

Les différentes souches obtenues et observées ont été les suivantes :

- *rpn-10 (ok1865) ; syIs63*
- *rpn-10 (ok1865) ; syIs63 ; sel-10 (ok1632)*
- *rpn-10 (ok1865) ; syIs63 ; jmjd-3.1 (fp15)*

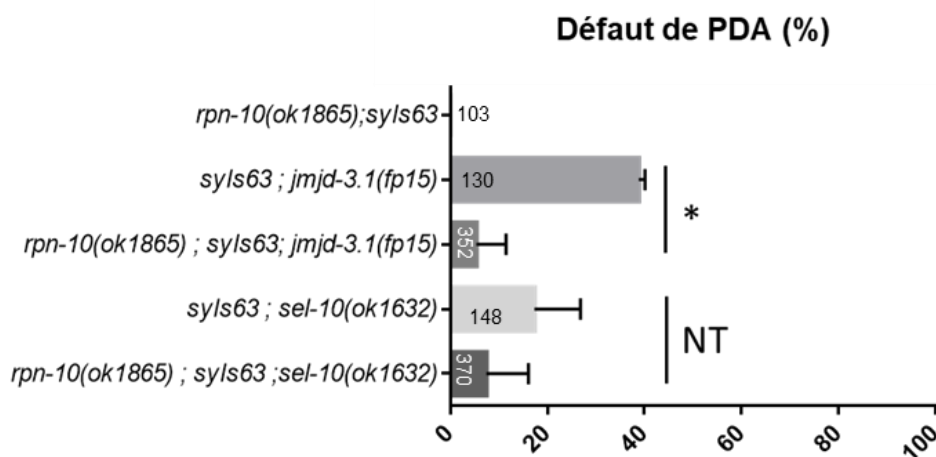


Figure 37 : étude de l'impact de l'absence de *rpn-10* au sein des mutants *sel-10* et *jmjd-3.1*. * : $p < 0,05$. NT : le test statistique n'est pas assez puissant pour conclure, la puissance du test statistique est insuffisante pour conclure avec certitude. $n > 90$ le simple mutant *rpn-10 (ok1865) ; syIs63* ne présente pas de défaut de PDA.

On observe que le mutant *rpn-10 (ok1865)* seul ne présente pas de défaut de PDA: tous les animaux mutants sont capables de former un normal, par transdifférenciation.

L'absence de *rpn-10* entraîne une tendance à la diminution du défaut de PDA au sein du mutant *sel-10 (ok1632)*. Cette dernière n'est cependant pas significative et les

résultats du test statistique manquent de puissance pour assurer avec certitude qu'il n'y a pas de différence significative.

Le double mutant *rpn-10 ; jmjd-3.1* présente une diminution significative du défaut de PDA par rapport au simple mutant *jmjd-3.1*. Ce fait confirme l'effet de suppression du défaut de PDA au sein du mutant *jmjd-3.1* observé lors de l'expérience d'ARN interférant ciblant *rpn-10*.

Ce fait est surprenant car supprimer un phénotype en supprimant le protéasome n'a pas été observé dans la littérature. Le protéasome est essentiel pour la dégradation rapide de protéines. Ainsi, le protéasome devrait avoir une place essentielle dans un processus impliqué dans le changement d'identité et dans lequel l'expression trop longue de certains facteurs de transcription inhibe la transdifférenciation.

Pour tester l'effet de *rpn-10* sur le double mutant, *sel-10 ; jmjd-3.1*, j'ai réalisé une injection d'ARNi, diminuant l'expression de *rpn-10* au sein de la souche *rpf-3(pk1426) ; syIs63 ; sel-10(fp27) ; jmjd-3.1(fp15)*.

**Défaut de PDA (%) dans la souche
rpf-3 (pk1426) ; syIs63 ; sel-10 (ok1632) ; jmjd-3.1 (fp15)
expérience d'ARNi**

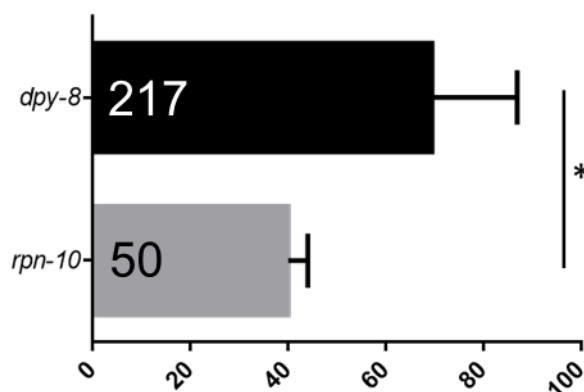


Figure 38 : injection d'ARNi ciblant *rpn-10* et *dpy-8* au sein du triple mutant *rpf-3(pk1426) ; syIs63 ; sel-10(ok1632) ; jmjd-3.1 (fp15)*. ** p valeur <0.01. test de McNemar. N=2

La diminution de l'expression de *rpn-10* implique une diminution importante du défaut de transdifférenciation. La synergie existante entre *sel-10* et *jmjd-3.1* est diminuée

mais le défaut reste supérieur à celui de *jmjd-3.1*. Ce fait n'est pas surprenant car l'ARNi est moins efficace que la mutation nulle.

Ces résultats présentent un rôle surprenant du protéasome, qui serait inhibiteur de la transdifférenciation et non essentielle à cette dernière.

2. SEL-10 est-elle impliquée dans le processus de résistance de la transdifférenciation ?

Steven Zuryn avait démontré précédemment que *jmjd-3.1* et *wdr-5.1* étaient impliqués dans la robustesse de la transdifférenciation, c'est-à-dire sa résistance aux conditions de stress (Zuryn et al., 2014). Les conditions de stress utilisées étaient liées à une température trop élevée, un stress oxydant ou de dommage à l'ADN (exposition aux UV). La synergie qui lie *sel-10* et les deux autres gènes dans le processus d'efficacité de la transdifférenciation pourrait également supposer un rôle de la protéine SEL-10 dans la robustesse. Il est donc possible que l'activité de SEL-10 impacte également ce processus de résistance.

Plusieurs conditions de stress ont été testées pour observer la modification du défaut de Td dans les mutants *sel-10*, et les doubles mutants entre *sel-10* et *jmjd-3.1* et *wdr-5*.

2.1. Les mutants étudiés sont-ils impliqués dans la résistance au stress de température ?

Dans un premier temps, l'effet d'une température stressante pour les vers a été testée sur les différents génotypes suivants :

- *syIs63*
- *syIs63 ; sel-10 (ok1632)*
- *syIs63 ; jmjd-3.1 (fp15)*
- *syIs63 ; sel-10 (ok1632) ; jmjd-3.1 (fp15)*

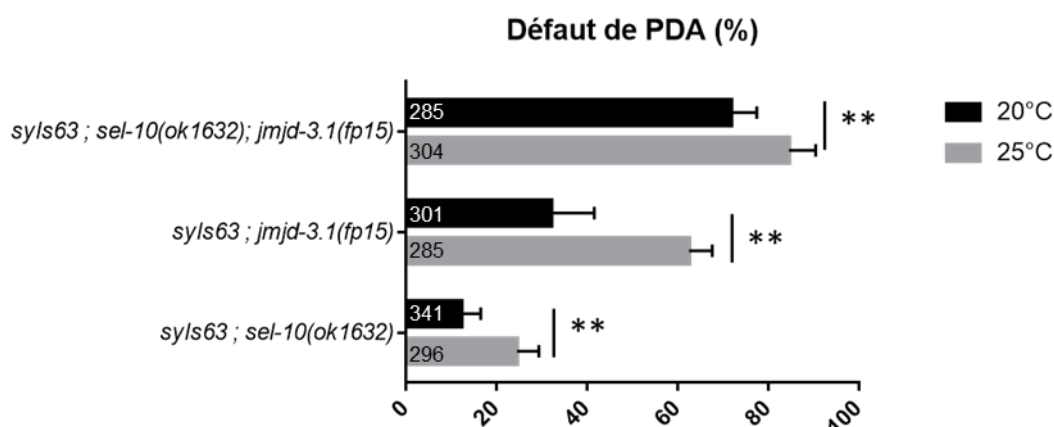


Figure 39 : étude de l'impact de la température sur le défaut de PDA au sein des différents mutants d'intérêt. Dans le cas d'un stress de température modéré (25°C). * : p valeur <0.05. **p valeur <0.001. N=3. La souche *syIs63* ne présente aucun défaut à 20°C ou à 25°C.

On constate qu'au sein des deux simples mutants *sel-10* et *jmjd-3.1*, le défaut de PDA observé à 25°C est significativement différent du défaut à 20°C. Il y a une augmentation certaine du défaut de PDA dans des conditions de stress de température.

Le contrôle sauvage (*syIs63*) ne présente pas de défaut de PDA, y compris à 25°C. Ceci montre que la transdifférenciation est naturellement robuste à ce stress ; et le fait que le défaut de PDA augmente, en condition de stress, dans les mutants *sel-10* et *jmjd-3.1* indique que ces gènes sont impliqués dans cette robustesse.

2.2. Les mutants étudiés sont-ils impliqués dans la résistance au stress lié à l'absence de nourriture ?

Le ver est capable de résister à l'absence de nourriture quand cette absence survient au début de la vie du ver. Il entre alors en stade L1 diapause qui est un état du ver où son métabolisme est modifié et la cuticule renforcée pour permettre au ver de survivre dans des conditions défavorables. Cet état peut se prolonger pendant plus de sept jours après lesquels le ver entrera en stade dauer. Au cours de ce stade, la transdifférenciation a lieu. Un stress lié à un manque de nourriture implique un déficit métabolique pour les cellules (Paek et al., 2012). Le procédé d'autophagie sert à la dégradation des protéines et des métabolites cellulaires. Il est notamment impliqué dans la longévité du ver et dans sa survie dans des condition de privation de nourriture.

Sarah Becker, post doctorante au sein de notre laboratoire, a testé l'implication de l'absence de nourriture pendant 7 jours, provoquant un arrêt en stade L1, avant de laisser les vers reprendre leur développement en les déplaçant sur des boîtes avec nourriture.

Sarah Becker a également testé ce stress ajouté à celui de stress de température. Les deux stress sont différents pour la biologie de la cellule.

Le résultat de l'ensemble de ces deux expériences est présenté dans la figure suivante :

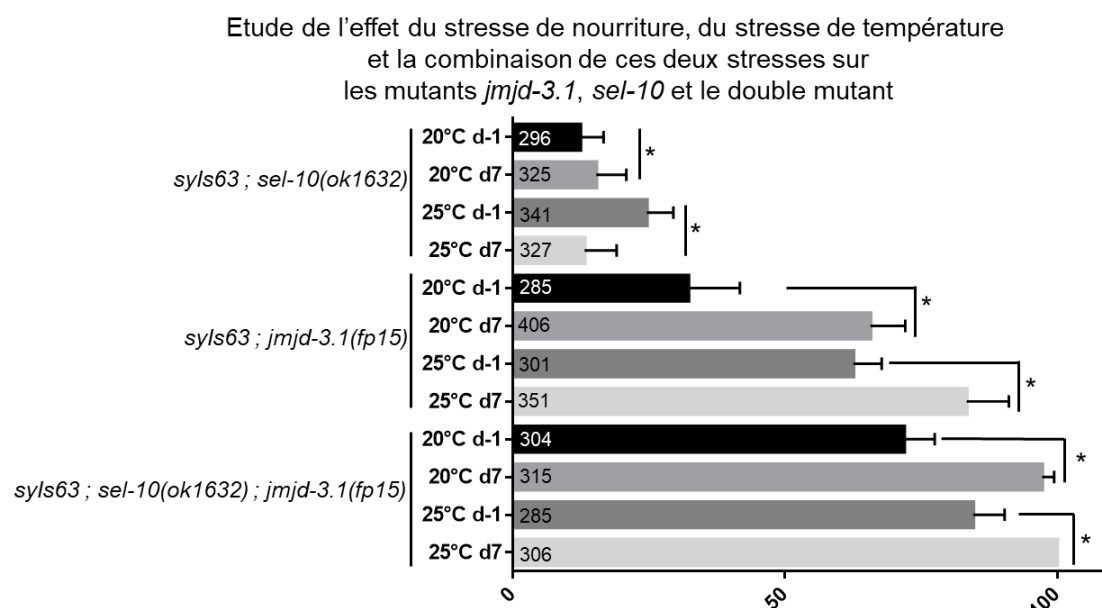


Figure 40 : étude des stress environnementaux « absence de nourriture » et « température » sur la transdifférenciation (% de défaut de PDA) au sein des mutants *sel-10* (IS1678), *jmjd-3.1* (IS658) et le double mutant *sel-10 ; jmjd-3.1* (IS1710). Le stress d'absence de nourriture correspond à une privation de 7 jours (d-7) et s'oppose aux données d-1 qui sont les échantillons ayant toujours eu de la nourriture. L'expérience de privation de nourriture a été réalisée dans deux conditions de températures : condition normale à 20°C et condition de stress modéré de température à 25°C. Un test t a été réalisé pour comparer les différentes conditions, entre les conditions d-1 et d-7. N=3

Une augmentation du défaut de PDA est observable dans toutes les conditions de stress. L'absence de nourriture induit un stress pour la cellule Y qui nécessite la présence de *jmjd-3.1* et *sel-10* pour permettre la transdifférenciation. Comme observé précédemment, la température induit un stress pour lequel *sel-10* et *jmjd-3.1* sont également nécessaires pour garantir la robustesse de la transdifférenciation. Les effets des deux stress cumulés s'additionnent au sein de *jmjd-3.1* et du double mutant *sel-10 ; jmjd-3.1*. Ceci indique que les deux stress induisent deux réponses cellulaires différentes et que *sel-10* et *jmjd-3.1* sont impliqués dans ces deux voies de manière indépendante.

Pour *sel-10*, le défaut de transdifférenciation induit par les deux stress ne se comporte pas de la même façon.

3. Quel est l'impact des modificatrices d'histones et l'ubiquitine ligase E3 SEL-10 sur la transcription de gènes ?

Grâce aux travaux précédents, nous savons que WDR-5.1 et JMJD-3.1 agissent de manière cellule autonome (Zuryn et al., 2014), et SEL-10 aussi (chapitre 1). Ces différentes protéines agissent dans des voies cellulaires qui n'ont à priori rien en commun. Mais la synergie qui existe entre SEL-10 et les deux autres protéines liées à l'épigénétique montre que ce lien existe.

Connaître sur quel processus cellulaire les protéines WDR-5.1, SEL-10 et JMJD-3.1 impactent la transdifférenciation est un problème clé pour l'étude de leur fonction. Etant donné les résultats déjà obtenus dans le laboratoire, et montrant que WDR-5.1 et JMJD-3.1, qui sont impliqués dans la modification de résidus Lys de l'histone 3, fonctionnent en s'associant aux facteurs de transcription essentiels à la transdifférenciation (Zuryn et al., 2014), nous faisons l'hypothèse que ces protéines impactent la transcription de gènes associés aux différentes étapes du processus. Une hypothèse pour expliquer la synergie observée lorsque le gène *sel-10* et soit *wdr-5.1* ou *jmjd-3.1* sont mutés, est de postuler que l'activité de *sel-10* impacte le même processus, à savoir la transcription. Cette hypothèse est renforcée par nos résultats suggérant que les mutants *sel-10* sont eux aussi sensibles aux stress environnementaux (chapitre 2).

Nous avons vu qu'en conditions favorables de croissance, les animaux portant une mutation nulle dans un des gènes codant pour une protéine modificatrice d'histones présentent un faible défaut de PDA. Ceci suggère que leur rôle au sein de la transdifférenciation en (conditions favorables) n'est pas absolument critique, mais plutôt lié à l'efficacité du processus. Ainsi, ces facteurs pourraient assurer le maintien de l'expression des gènes au-dessus d'un certain niveau ou seuil minimal, assurant le changement d'identité dans 100% des cas. On peut également supposer que cette expression est stabilisée en présence des marques épigénétiques adéquates.

Pour caractériser le rôle de ces facteurs impliqués dans l'efficacité de la transdifférenciation, il faut savoir si la transcription de gènes est touchée directement par l'absence de ces facteurs. Mais également savoir si cette action sur la transcription est spécifique, ciblant quelques gènes particuliers, ou s'il y a une action globale sur les gènes impliqués dans la transdifférenciation.

Mesurer la transcription d'un gène se fait en quantifiant le nombre d'ARNm qui sont présents dans une cellule (ici la cellule Y ou PDA). Depuis 2012, le « single molecular Fluorescent *in situ* Hybridation » (smFISH) a été mis au point sur *C. elegans* par l'équipe de Oudenaarden (A., 2012).

Cette technique de smFISH permet la quantification des molécules d'un ARN messenger cible. Cette technique, plus amplement décrite dans la partie matériel et méthode, se base sur un ensemble de sondes fluorescentes s'hybridant à un ARNm spécifique. Cet ensemble de signaux fluorescents localisés sur une seule molécule d'ARNm permet de visualiser cette dernière. Sur l'image de microscopie, on considère qu'un point de fluorescence (aussi appelé « spot ») correspond à une molécule d'ARNm. L'analyse des images est donc la clé de la quantification, et le travail sur une cellule unique nécessite une localisation aussi précise que possible de cette dernière. Pour résoudre ce problème, nous avons décidé de marquer la membrane des cellules rectales avec une protéine fluorescente. Pour cela, la protéine de fusion PH::GFP a été exprimée sous contrôle spécifique du promoteur des cellules rectales *col-34p*. Ce construit forme un « array » avec le plasmide contenant le facteur de co-injection (un « array » est l'ensemble des plasmides transmis dans les vers) a été injecté et l'épisome formé dans les lignées transgéniques obtenues a ensuite été intégré par rayon X, permettant ainsi l'obtention de l'allèle *fpIs101 [col-34p::ph::gfp::unc-54 3'UTR]*, que j'ai situé sur le chromosome X par cartographie génétique.

Il faut néanmoins pour cela pouvoir visualiser les différentes cellules, un aspect rendu quasiment impossible par simple visualisation en lumière transmise après fixation des vers.

Le domaine protéique PH assure la conservation de la GFP après fixation des vers, au contraire d'une GFP cytoplasmique qui est quasi complètement « lavée » et éliminée de la cellule Y lors des lavages liés à la technique du smFISH. Il adresse la protéine à la membrane, permettant de délimiter les bords de la cellule lors de l'analyse d'image et le comptage des points de fluorescence.

L'effet des différents mutants sur la transcription a donc été questionné en réalisant des smFISH. Cependant, le défaut de transdifférenciation induit par les mutants simples *sel-10*, *jmjd-3.1* et *wdr-5.1* est relativement faible, rendant potentiellement difficile de quantifier une différence d'expression des gènes entre les mutants et le contrôle. Pour pallier à ce potentiel problème, nous avons utilisé à notre avantage le fait que ces gènes sont impliqués dans la robustesse de la transdifférenciation. Le stress entraîne une augmentation du défaut de transdifférenciation au sein des trois mutants étudiés. Ce défaut pourrait être dû au fait que la machinerie de transcription est probablement mobilisée/désorganisée pour subvenir aux changements provoqués par le stress aux dépens du mécanisme de changement d'identité (expression de protéines HSP : Heat Shock Protéines, ...). Néanmoins, les modifications épigénétiques permettraient d'assurer l'efficacité et la robustesse de la transcription des gènes impliqués dans la transdifférenciation même en cas de stress.

En absence de ces facteurs, l'efficacité de la transcription, soit globale soit spécifique à certains gènes de la transdifférenciation, serait perturbée, ce qui conduirait à un défaut. Dans ce cas, nous imaginons que le niveau d'expression de ces gènes clés tomberait en dessous d'un niveau seuil nécessaire pour permettre le changement d'identité. C'est pour cette raison que les expériences de smFISH ont été menées dans des conditions de stress de température, dans la mesure du possible.

3.1. Quel est le rôle de complexes modifiant les histones WDR-5.1 ou SEL-10 sur la transcription de gènes impliqués dans l'initiation de la dédifférenciation ?

La transdifférenciation se déroule en deux étapes : la dédifférenciation et la redifférenciation. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'initiation du processus. Précédemment dans le laboratoire, nous avons montré que *wdr-5.1* agit lors de l'initiation de la Td (Zuryn et al., 2014), et c'est également à cette étape que la synergie avec *sel-10* est observée. L'impact de WDR-5.1 et de l'ubiquitine ligase E3 SEL-10 ont été testés sur l'expression de trois gènes impliqués dans l'initiation du processus de transdifférenciation et ce par la technique de smFISH (A., 2012) : *ceh-6*, *sox-2* et *hlh-16*.

L'implication de ces trois gènes dans l'initiation de la transdifférenciation a été mise en évidence dans notre laboratoire.

ceh-6 est un facteur de transcription POU homéobox essentiel à la transdifférenciation. Il est exprimé dans toutes les cellules rectales, mais également dans les neurones de la tête et ceux de la corde ventrale. Cette famille de gènes est essentielle pour le développement, et la perte de ce gène présente une malformation rectale lors de l'embryogénèse (probablement absence de la naissance Y) (Arnaud Ahier, unpublished, (Burglin and Ruvkun, 2001; Kagias et al., 2012).

sox-2 est également un facteur de transcription conservé au sein de l'évolution animale. Ce gène est exprimé dans de nombreux types cellulaires, y compris les cellules neuronales et rectales. Son expression disparaît une fois que la dédifférenciation débute.

hlh-16 est un facteur de transcription exprimé dans des neurones de la tête. C'est le seul facteur connu qui est exprimé exclusivement dans Y parmi les cellules rectales et son expression disparaît lorsque que la dédifférenciation débute (M.C.Morin&Jarriault, non publié).

La modificatrice d'histone JMJD-3.1 n'est pas impliquée dans cette étape de la transdifférenciation c'est pourquoi son impact sur ces gènes n'est pas testé.

3.1.1. Expression de *ceh-6* au sein des mutants *wdr-5.1* et *sel-10*

Afin d'éviter les problèmes de létalité embryonnaire liés au mutant *wdr-5.1*, les vers ont été transférés dans des conditions de stress de température à 25°C lors de la fin du stade embryonnaire.

L'expérience a été réalisée lors du début de la dédifférenciation, qui a lieu entre la fin du stade larvaire L1 et le début du L2. Nous avons réalisé cette expérience dans des conditions de stress de température, à 25°C, afin d'obtenir une pénétrance du défaut permettant l'analyse : en effet, les mutants *wdr-5.1* présentent en moyenne 13% de défaut, et les mutants *sel-10* 12% à 20°C contre respectivement 28% et 24% (données non montrées, Steven Zuryn et moi-même). Afin d'éviter les problèmes de létalité liés au mutant *wdr-5.1*, les vers ont été transférés à 20°C à la fin du stade embryonnaire.

Expression de *ceh-6* dans la souche contrôle et les mutants *sel-10* et *wdr-5* dans les cellules B (contrôle interne) et Y

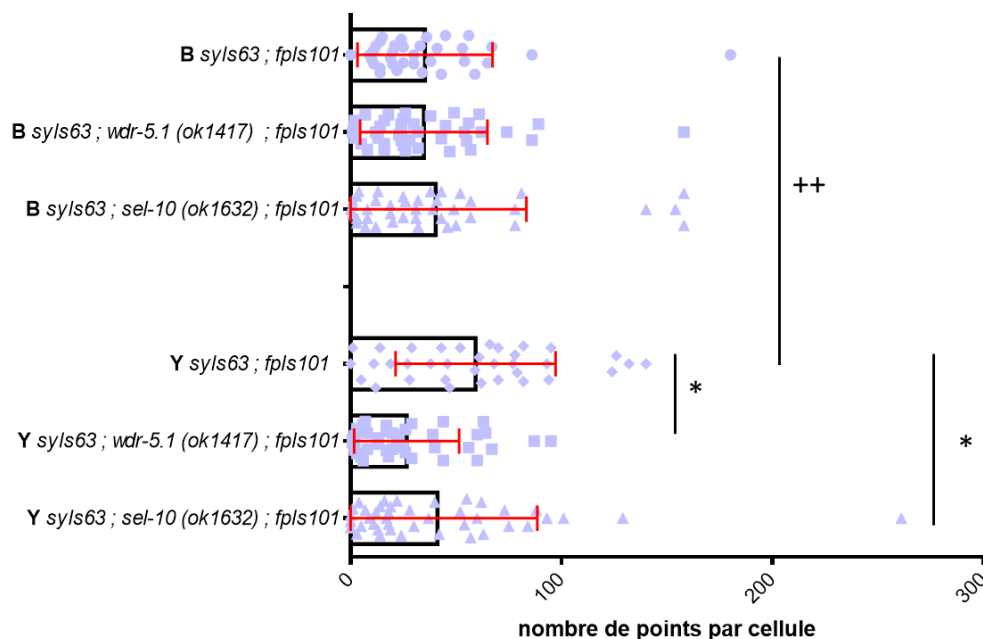


Figure 41 : impact des mutants *sel-10* et *wdr-5.1* sur l'expression de *ceh-6* comparée entre la souche contrôle *syIs63 ; fpls101* et les mutants *wdr-5.1* et *sel-10*. * : $\alpha < 0.05$ en test ANOVA. ++ p valeur < 0.01 dans le test t de Student. Toutes les comparaisons ont été testées statistiquement. L'absence d'indication signifie une absence de différence significative. B : cellule rectale contrôle. Y : cellule rectale d'intérêt. *syIs63 ; fpls101* n=35. *syIs63 ; wdr-5.1(ok1417) ; fpls101* n=41. *syIs63 ; sel-10(ok1632) ; fpls101* n=42. Les barres du graphique sont une représentation du nombre moyen de points par cellule et par génotype.

On constate une diminution de l'expression de *ceh-6* spécifique à la cellule Y dans les animaux mutants pour *sel-10* ou *wdr-5.1*. Le nombre d'ARNm quantifié dans la cellule Y au sein de ces deux mutants est significativement différent de la quantité mesurée au sein de la souche contrôle. Ce qui implique que *wdr-5.1*, comme *sel-10*, ont un rôle positif sur l'expression de *ceh-6*.

On constate également que la quantité totale d'ARNm au sein de la souche sauvage contrôle *syIs63 ; fpls101* est différente de manière significative entre la cellule B et la cellule Y : Il y a plus d'ARNm de *ceh-6* dans la cellule Y dans cette souche contrôle. On constate donc que les deux cellules ne présentent pas le même niveau d'expression et le fait que les mutants ne modifient pas l'expression de *ceh-6* au sein de cette cellule B indique que le rôle de *sel-10* et *wdr-5.1* sur l'expression de *ceh-6* est spécifique à la cellule Y.

Les deux gènes *sel-10* et *wdr-5.1* ont donc un rôle positif dans la régulation de l'expression de *ceh-6*.

3.1.2. Expression de *sox-2* au sein des mutants *wdr-5.1* et *sel-10*

L'expérience de quantification des ARNm de *sox-2* par smFISH a été réalisée à 25°C en transférant les vers à cette température de stress à la fin de l'embryogénèse.

Le gène *sox-2* est également impliqué dans l'initiation de la transdifférenciation. Il est essentiel à la formation de PDA et à la capacité de Y à pouvoir effacer son identité rectale. Il est exprimé dans cette cellule dès la naissance de cette dernière jusqu'à l'initiation de la dédifférenciation.

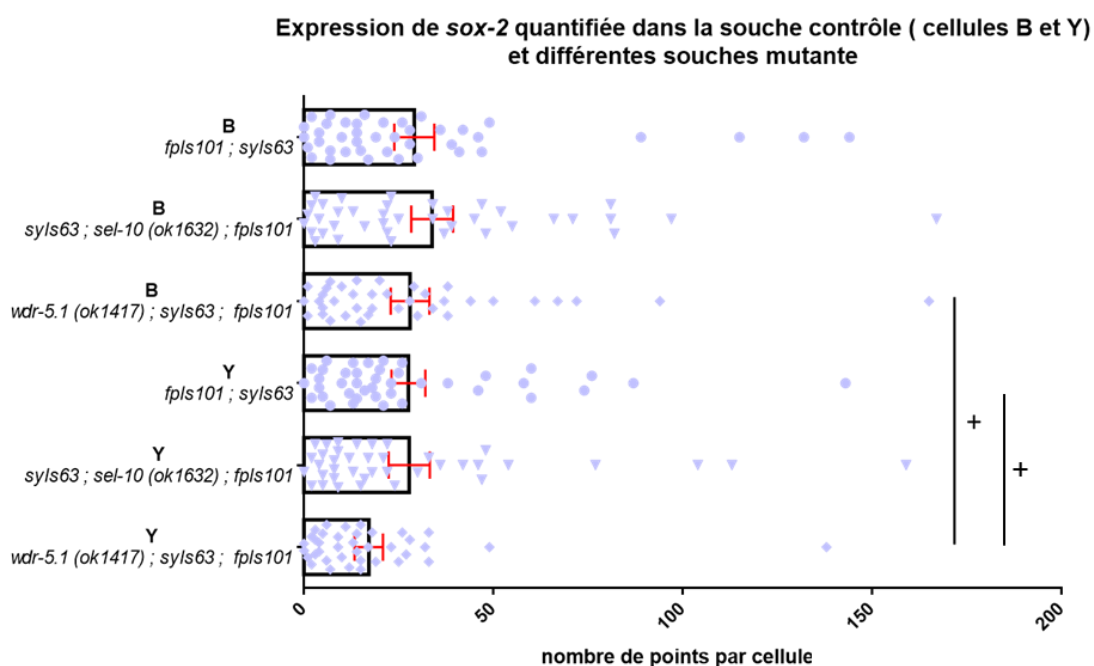


Figure 42 : étude de l'impact des mutants *sel-10* et *wdr-5.1* sur l'expression de *sox-2* au sein des cellules Y et B. + : p valeur <0.05 par test t de Student. Toutes les comparaisons ont été testées statistiquement. L'absence d'indication signifie qu'il n'y a pas de différence significative entre les deux valeurs testées. n >30. *syIs63 ; fpIs101* n= 41. *syIs63 ; wdr-5.1(ok1417) ; fpIs101* n=38. *syIs63 ; sel-10 (ok1632) ; fpIs101* n=39. Les barres du graphique sont une représentation du nombre moyen de points par cellule et par génotype.

On constate qu'il n'y a pas de différence significative de l'expression de *sox-2* entre la souche contrôle *syIs63 ; fpIs101* et le mutant *sel-10*. On observe cependant que l'expression de *sox-2* diminue spécifiquement dans la cellule Y, dans le mutant *wdr-5.1*. De plus, il y a une diminution significative de la quantité d'ARNm présente dans la cellule B par rapport à la cellule Y dans le mutant *wdr-5.1*, accentuant la potentielle implication de cette mutation sur l'expression de *sox-2*.

Ce qui implique que *wdr-5.1* a un rôle positif dans la régulation de l'expression de *sox-2* et que cette dernière est spécifique de la cellule Y.

3.1.3. Expression de *hlh-16* au sein des mutants *wdr-5.1* et *sel-10*

Comme précédemment, cette expérience a été réalisée en transférant les vers en fin d'embryogénèse à 25°C afin d'induire un léger stress de température, augmentant potentiellement l'effet de la perte de *wdr-5.1* sur l'expression des gènes. L'expression de *hlh-16* est spécifique à la cellule Y (au sein des cellules rectales) et est présente pendant l'embryogénèse et le stade larvaire L1.

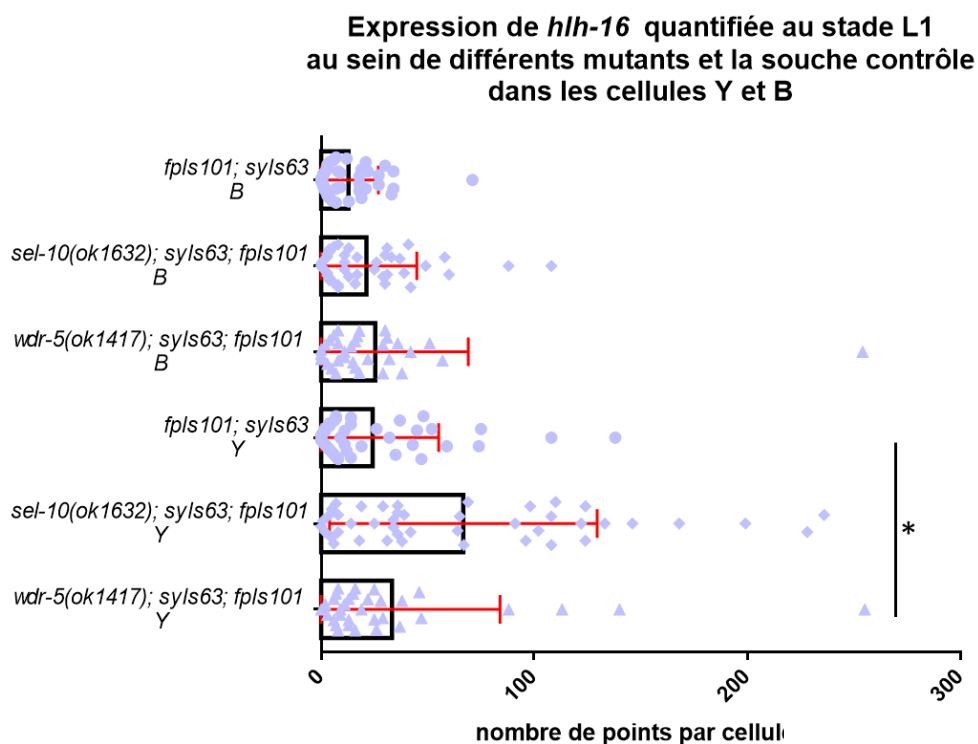


Figure 43 : étude de l'impact des mutants *sel-10* et *wdr-5.1* sur l'expression de *hlh-16* au sein des cellules Y et B. * : $\alpha < 0.05$ test d'ANOVA. Toutes les comparaisons ont été testées statistiquement. L'absence d'indication signifie qu'il n'y a pas de différence significative entre les deux valeurs testées. *syIs63 ; fpls101* n=41. *syIs63 ; wdr-5.1(ok1417) ; fpls101* n=33. *syIs63 ; sel-10(ok1632) ; fpls101* n=44. Les barres du graphique sont une représentation du nombre moyen de points par cellule et par génotype.

On constate que l'expression de *hlh-16* n'est pas significativement modifiée par la mutation de *sel-10*. A l'inverse, la mutation de *wdr-5.1* diminue de manière significative l'expression de *hlh-16*.

Ce résultat implique que *wdr-5.1* a un rôle positif dans la régulation de l'expression de *hlh-16*.

3.2. Quel est l'impact de complexes modifiant les histones ou de SEL-10 sur la transcription de gènes impliqués dans la redifférenciation ?

Lors de la redifférenciation, la cellule dédifférenciée Y.0 devient neuronale. Des processus similaires à la neurogénèse s'expriment et permettent la formation du motoneurone. Dans cette partie, nous nous sommes intéressées à quatre gènes impliqués soit dans la neurogénèse (ou exprimé de manière précoce lors de la redifférenciation), soit dans l'identité neuronale terminale.

Dans la première catégorie, il y a *cog-1* et *unc-3*.

Dans la seconde, il y a *unc-33* et *rimb-1*.

Ces quatre gènes seront décrits individuellement dans les parties qui leurs sont dédiées ci-après.

L'étude de l'expression de ces quatre gènes dans les différents mutants *sel-10*, *wdr-5.1* et *jmjd-3.1* est importante pour comprendre à quel point la redifférenciation est impactée ou non par ces différents mutants.

3.2.1. Expression de *cog-1*

Le gène *cog-1* est le marqueur utilisé pour attester de la présence de PDA, et donc du mécanisme de transdifférenciation. Il est exprimé très tôt lors l'étape de redifférenciation sans être essentiel au processus et permet de suivre visuellement (par fluorescence) le déroulement du processus. C'est donc un excellent contrôle de la transdifférenciation et du smFISH, car ce dernier a été réalisé dans des souches qui comportaient toutes *syIs63 ; fpIs101*. *syIs63* est le rapporteur de *cog-1* ce qui permet de suivre la transdifférenciation et de localiser la cellule PDA. Dans un premier temps, j'ai donc vérifié que la présence de *syIs63 [cog-1p::cog-1::gfp]* ne saturerait pas la quantification des ARNm de *cog-1*. *syIs63* surexprime l'ARNm de *cog-1*, ce qui pourrait limiter la quantification de l'expression endogène de *cog-1*, biaisant potentiellement la quantification de cet l'ARNm.

Expression de *cog-1* quantifiée au stade L3 avec et sans *syIs63*

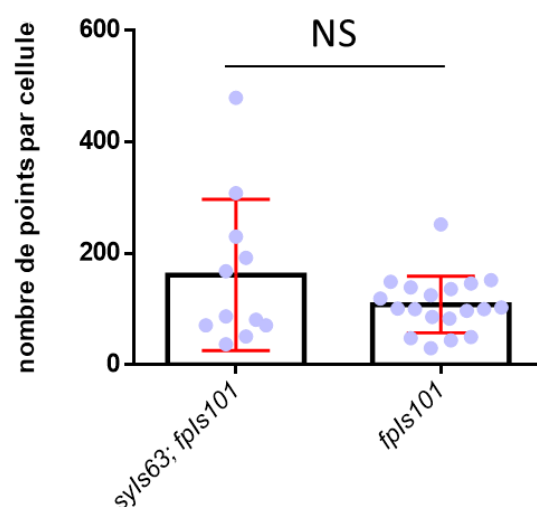


Figure 44 : étude de l'impact de *syIs63* sur *cog-1*. smFISH utilisant la sonde *cog-1* afin de déterminer la potentielle différence d'expression induite par la présence du transgène *syIs63*. NS : non significatif. n=15

On constate que la quantité d'ARNm (nombre de points comptés par ordinateur) dans chacune des souches, qui est importante, ne diffère pas de manière significative entre les deux souches. Ce qui permet de conclure que l'utilisation de *syIs63* ne gênera pas la quantification des ARNm de *cog-1* au sein des différentes souches. Ce qui est important pour permettre le suivi de la redifférenciation et la localisation de la cellule PDA.

3.2.1.1. Expression de *cog-1* au cours du temps dans l'individu sauvage

Mesurer l'expression de *cog-1* au cours du temps permettra de comprendre comment se comporte l'expression d'un gène du début de la redifférenciation (stade L2) jusqu'à l'âge adulte. L'expression de *cog-1* a déjà été observée au niveau protéique grâce à *syIs63* dont on peut observer l'expression de la protéine de fusion COG-1::GFP. Observer le taux d'ARNm de *cog-1* à différents moments de la redifférenciation permettra de comprendre comment les différents mutants étudiés influencent la transcription.

J'ai réalisé 5 smFISH à différents moments de la transdifférenciation afin de contrôler le motif d'expression de *cog-1* au cours du temps. Un lors de la dédifférenciation de la cellule Y en Y.0, trois lors de la redifférenciation de Y.0 en PDA (début milieu et fin) et un en stade larvaire L4, afin d'observer la stabilité de l'expression de *cog-1* au cours du

temps au sein de l'individu sauvage. Ceci permettra ensuite de comparer l'expression de *cog-1* au cours du temps avec les différents mutants.

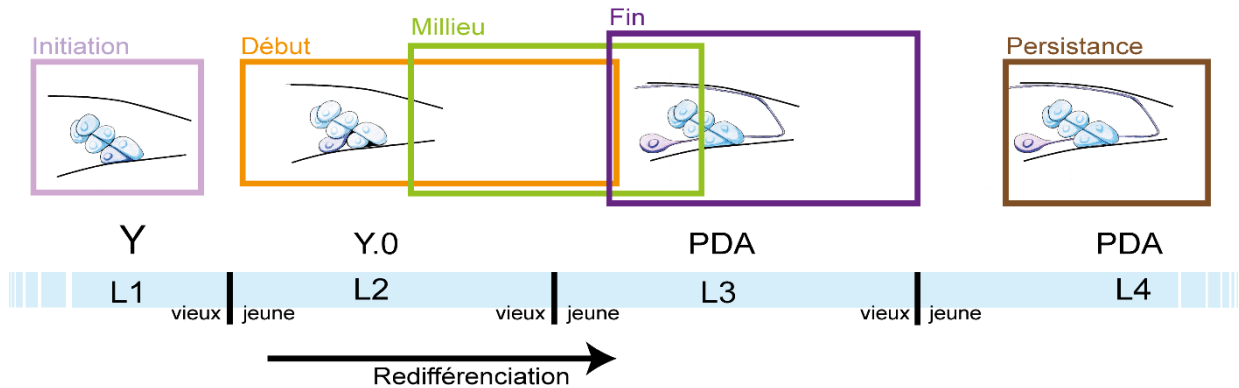


Figure 45 : représentation schématique de l'expérience de smFISH à différents moments du développement. L'initiation de la transdifférenciation, le début, le milieu et la fin de la redifférenciation puis la persistance de l'expression de *cog-1*. Le milieu de redifférenciation correspond à l'ensemble de modifications morphologiques du corps cellulaire à un axone formé.

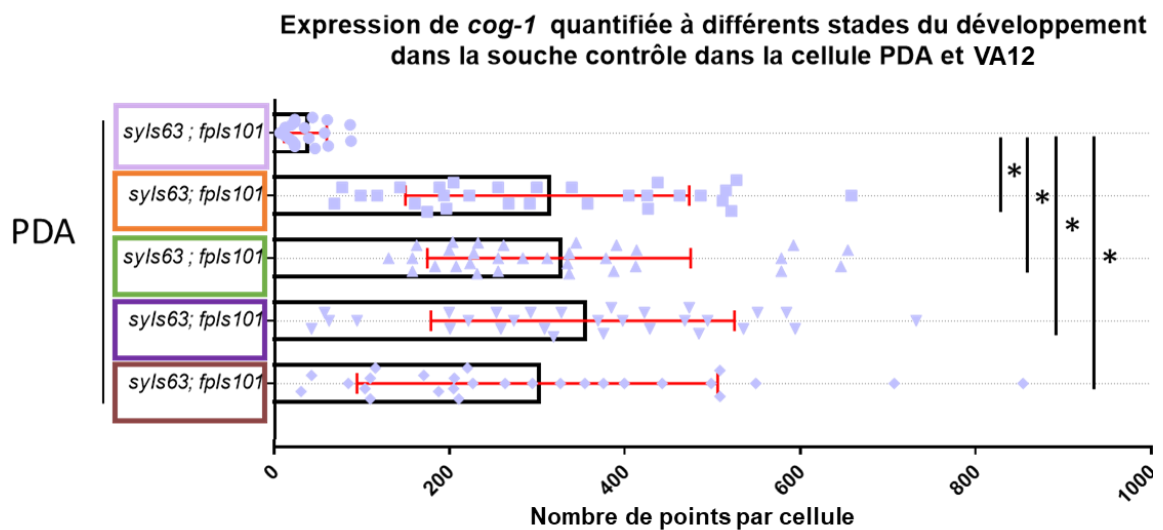


Figure 46 : étude de l'expression de *cog-1* au cours de la transdifférenciation dans la cellule PDA. Chaque couleur correspond à un stade et une étape de la transdifférenciation et correspond au graphique de la figure précédente. Rose : initiation de la transdifférenciation/dédifférenciation. Orange : début de la redifférenciation. Vert : milieu de la redifférenciation. Violet : fin de la redifférenciation. Marron : stade larvaire L4 étude de la persistance de l'expression de *cog-1*. * : $\alpha < 0.05$ test d'ANOVA.

On observe que lors de la dédifférenciation (stade larvaire L1), il n'y a pas d'expression importante de *cog-1*, en accord avec les observations initiales du laboratoire (Richard et al). Mais dès le début de la redifférenciation, l'expression augmente et est stabilisée. Elle ne varie plus au cours du temps.

3.2.1.2. Comparaison de l'expression de *cog-1* dans le mutant *jmjd-3.1* et l'individu sauvage au cours du temps

4 smFISH ont été réalisés à différents moments de la redifférenciation pour quantifier le niveau d'expression du gène *cog-1* au sein du mutant *jmjd-3.1*. On sait que la quantité de protéine COG-1::GFP (visible grâce à *syIs63*) est diminuée au sein de la cellule PDA dans ce mutant, en comparaison au WT : une absence totale de GFP est observée dans les vers caractérisés comme ayant un défaut de transdifférenciation. Un phénotype alternatif existe et présente une faible présence de fluorescence en comparaison à l'individu contrôle *syIs63*.

On cherche à savoir si ces diminutions totales et partielles de fluorescence peuvent être modulées au niveau des ARNm. Afin de caractériser l'effet de la perte de l'expression de *jmjd-3.1*, la quantité d'ARNm de *cog-1* a été mesurée au sein de la cellule Y qui ne présente pas d'absence de protéine de fusion COG-1::GFP. Les smFISH ont été réalisés en même temps que chez les individus sauvages montrés précédemment. L'expression de *cog-1* ARNm est quasiment nulle au stage L1 chez l'individu sauvage. C'est pourquoi ce stade n'a pas été testé chez le mutant *jmjd-3.1*.

Expression de *cog-1* quantifiée à différents stades du développement dans la souche *jmjd-3.1(fp15)* dans la cellule PDA

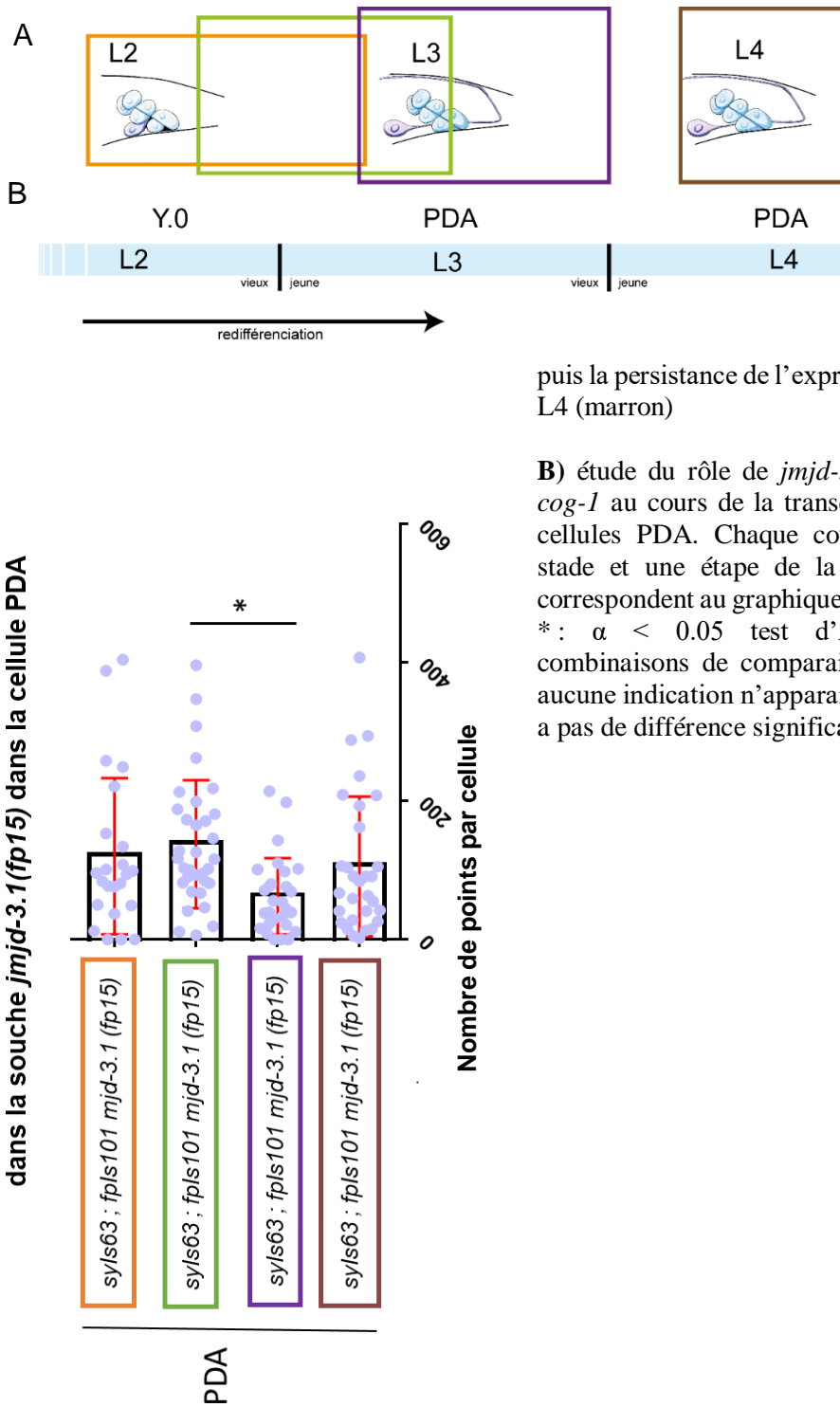


Figure 47 : A) représentation schématique de l'expérience de smFISH à différents moments du développement : e début (orange), le milieu (vert et la fin (violet) de la redifférenciation

puis la persistance de l'expression de *cog-1* au stade L4 (marron)

B) étude du rôle de *jmjd-3.1* sur l'expression de *cog-1* au cours de la transdifférenciation dans les cellules PDA. Chaque couleur correspond à un stade et une étape de la transdifférenciation et correspondent au graphique de la figure précédente. *: $\alpha < 0.05$ test d'ANOVA. Toutes les combinaisons de comparaison ont été testées. Si aucune indication n'apparaît, cela signifie qu'il n'y a pas de différence significative.

Au sein de PDA, l'expression de *cog-1* ne varie pas au cours du temps. Seule la fin de la redifférenciation présente une différence significative avec la quantité d'ARNm mesurée lors du milieu de la redifférenciation. Cependant, au stade larvaire L4, la quantité d'ARNm de *cog-1* n'est pas différente de celle mesurée lors du début et du milieu de la redifférenciation, indiquant que la valeur obtenue à la fin de la redifférenciation est particulière.

Le graphique suivant présente les différences observées au sein de l'expression *cog-1* dans la cellule PDA entre le mutant *jmjd-3.1* et la souche contrôle *syIs63 ; fpIs101*.

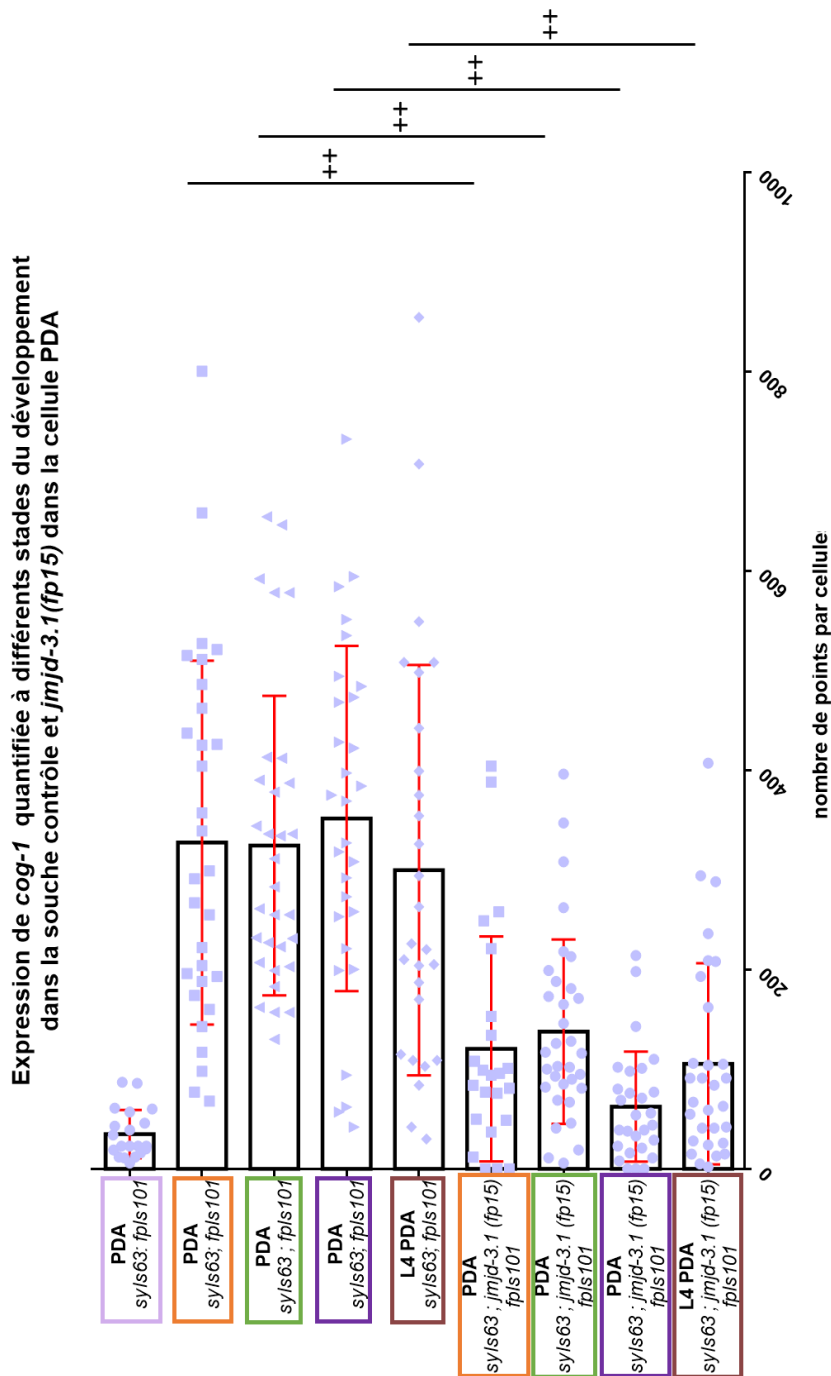


Figure 48 : étude du rôle de *jmid-3.1* sur l'expression de *cog-1* au cours de la transdifférenciation dans les cellules PDA. Chaque couleur correspond à un stade et une étape de la transdifférenciation et correspond au graphique de la figure précédente. Orange : début de la redifférenciation. Vert : milieu de la redifférenciation. Violet : fin de la redifférenciation. Marron : stade larvaire L4 étude de la persistance de l'expression de *cog-1*. + : p valeur < 0.05 du test t de Student. ++ : p valeur < 0.01 du test t de Student. Seules les comparaisons entre les vers des souches contrôle et mutante ont été testées.

On constate que le mutant *jmid-3.1* présente une différence significative de l'expression de *cog-1* au sein de la cellule Y par rapport à l'individu contrôle. Il s'agit d'une diminution d'un facteur deux qui est provoquée par la mutation *jmid-3.1* impliquant une action positive de *jmid-3.1* sur l'expression de *cog-1*.

3.2.1.3. Expression de *cog-1* au sein du mutant *sel-10*

SEL-10 est une ubiquitine ligase E3. Elle agit donc de manière directe sur les protéines. Il peut donc paraître surprenant de tester l'effet de la mutation de *sel-10* sur la transcription de *cog-1*. Cependant, la synergie observée entre *sel-10* et *jmjd-3.1*, et la sensibilité de ces deux mutants au stress, laissent supposer que la potentielle cible de SEL-10 est liée à l'expression des gènes, notamment leur inhibition, et que ces deux processus cellulaires ont des cibles et action communes. D'autant que, même si je n'ai obtenu aucune preuve que la cible de SEL-10 était dégradée, la littérature décrit SEL-10 comme étant exclusivement impliquée dans la dégradation de protéines par le protéasome.

Le défaut de PDA observable dans le simple mutant *sel-10* est faible mais il est augmenté dans des conditions de stress de température. C'est pour cette raison que le smFISH a été réalisé à 25°C.

L'expression de *cog-1* a été quantifiée au sein du mutant *sel-10* et des vers sauvages lors de deux smFISH en début et en milieu de redifférenciation. L'expression de *cog-1* ne variant pas au cours du temps, deux valeurs devraient suffire pour conclure sur l'effet de *sel-10* sur l'expression de *cog-1*.

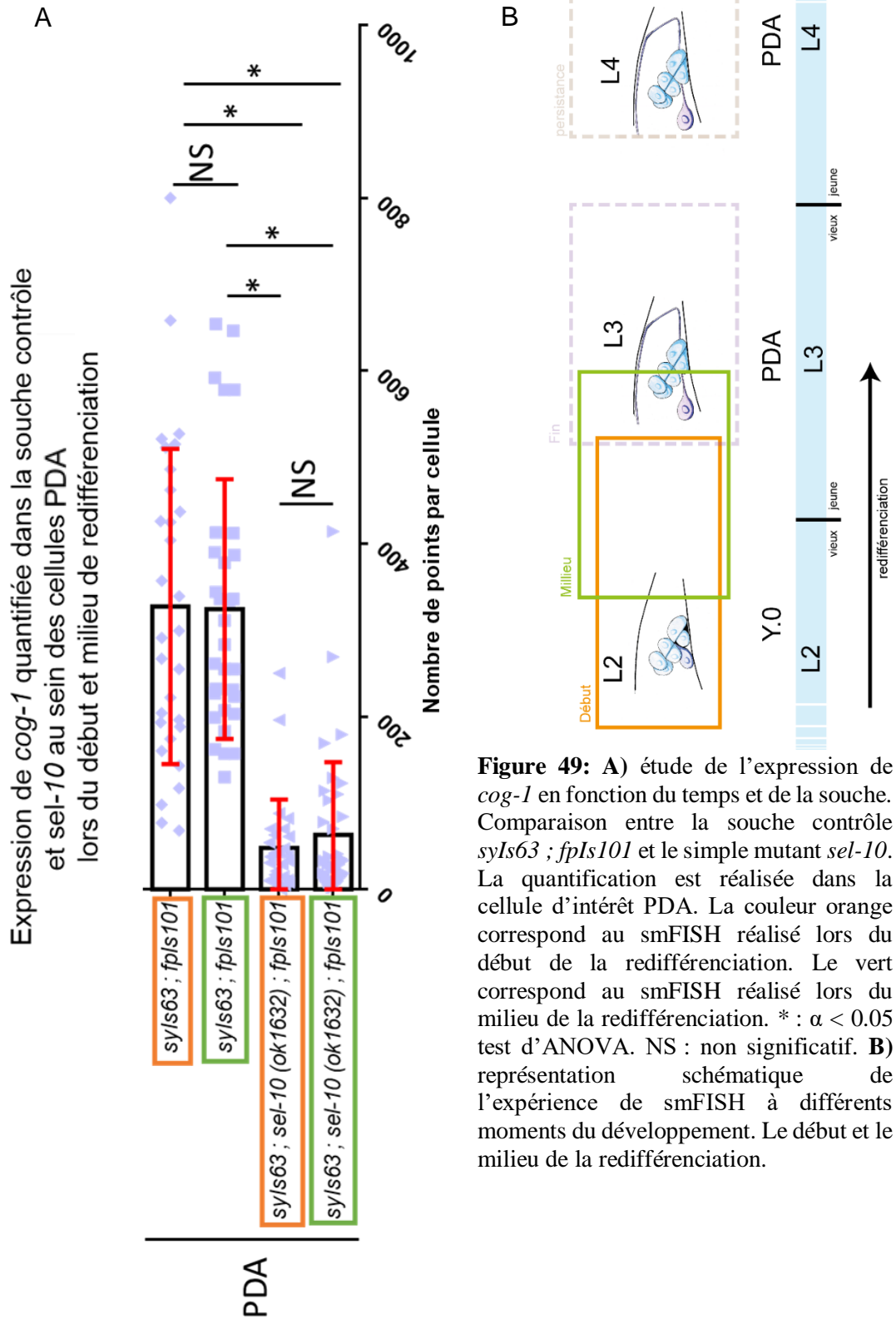


Figure 49: **A)** étude de l’expression de *cog-1* en fonction du temps et de la souche. Comparaison entre la souche contrôle *syIs63 ; fpls101* et le simple mutant *sel-10*. La quantification est réalisée dans la cellule d’intérêt PDA. La couleur orange correspond au smFISH réalisé lors du début de la redifférenciation. Le vert correspond au smFISH réalisé lors du milieu de la redifférenciation. * : $\alpha < 0.05$ test d’ANOVA. NS : non significatif. **B)** représentation schématique de l’expérience de smFISH à différents moments du développement. Le début et le milieu de la redifférenciation.

Au cours du temps, l'expression de *cog-1* est stable au sein de la souche contrôle et de la souche mutante pour *sel-10*. En comparant l'expression de *cog-1* entre ces deux souches, on constate qu'il y a une importante diminution (4 fois inférieure) de l'expression de *cog-1* au sein du mutant *sel-10* en comparaison à l'individu contrôle dans la cellule PDA. Cette diminution est importante surtout si elle est comparée au pourcentage de défaut de PDA observé (environ 30%).

On peut donc conclure que *sel-10* induit une diminution globale de l'expression de *cog-1* mais est significativement plus importante dans la cellule PDA.

3.2.1.4. Expression de *cog-1* au sein du double mutant *sel-10 ; jmjd-3.1*

La quantité d'ARNm a été observée au sein du double mutant *sel-10 ; jmjd-3.1* lors de deux smFISH au début et à la fin de la redifférenciation.

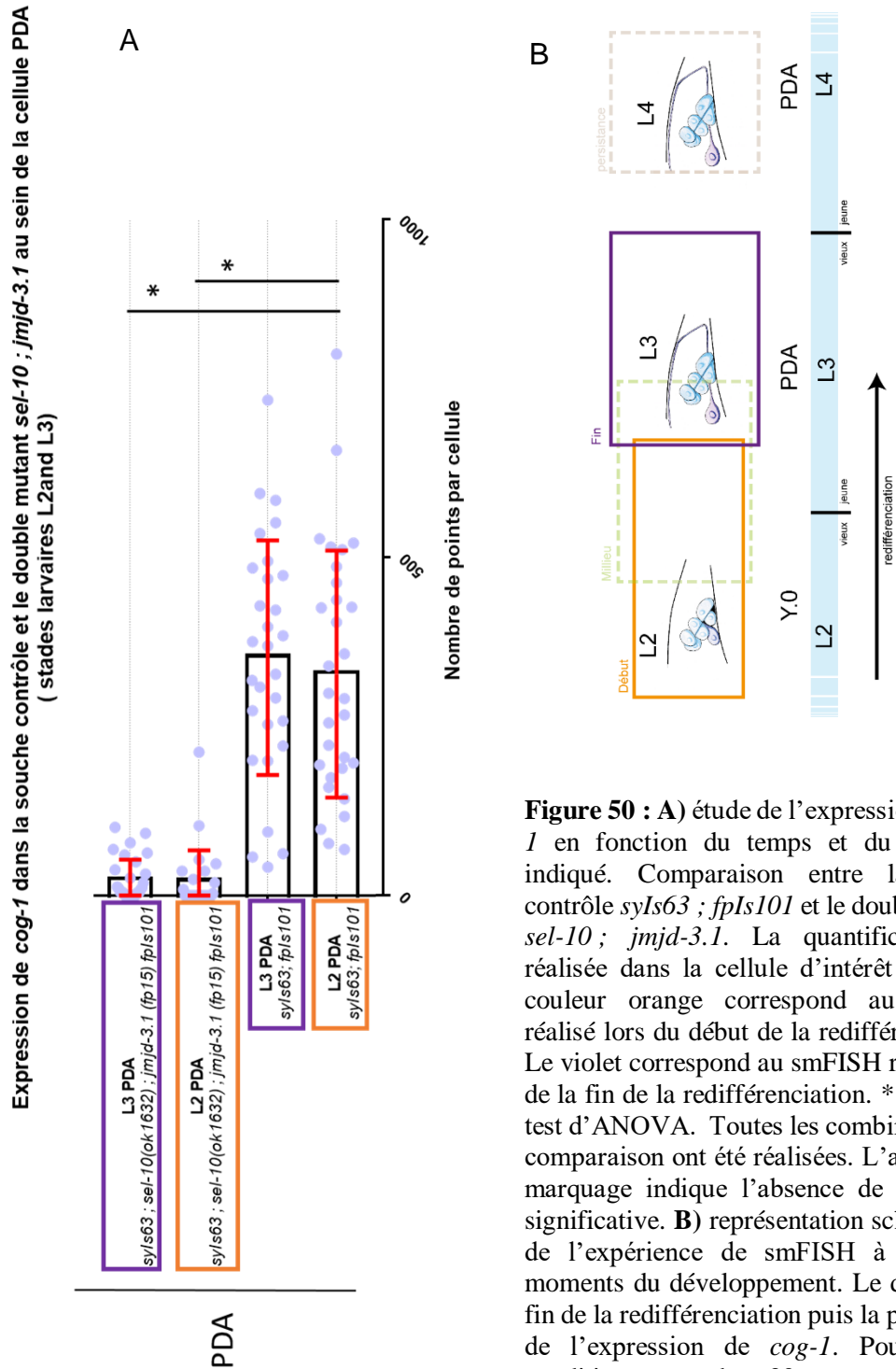


Figure 50 : **A)** étude de l'expression de *cog-1* en fonction du temps et du génotype indiqué. Comparaison entre la souche contrôlée *syIs63 ; fpIs101* et le double mutant *sel-10 ; jmjd-3.1*. La quantification est réalisée dans la cellule d'intérêt PDA. La couleur orange correspond au smFISH réalisé lors du début de la redifférenciation. Le violet correspond au smFISH réalisé lors de la fin de la redifférenciation. * : $\alpha < 0.05$ test d'ANOVA. Toutes les combinaisons de comparaison ont été réalisées. L'absence de marquage indique l'absence de différence significative. **B)** représentation schématique de l'expérience de smFISH à différents moments du développement. Le début et la fin de la redifférenciation puis la persistance de l'expression de *cog-1*. Pour chaque condition et souches, 30 vers ou plus ont été analysés.

On observe une forte diminution (d'un facteur 17) de l'expression de *cog-1* au sein du double mutant *sel-10 ; jmjd-3.1* en comparaison à la souche contrôle.

Cette observation est cohérente avec l'importante absence de PDA. En effet, la présence de PDA est observée par la protéines de fusion COG-1::GFP. Il est donc logique que la quantité d'ARNm de *cog-1* soit fortement diminuée dans ce mutant.

3.2.1.5. Expression de *cog-1* au sein du mutant *wdr-5.1*

Mesurer la quantité d'ARNm au sein du mutant *wdr-5.1* a été difficile car ce mutant présente de sévères troubles de développement à 25°C. Cette condition de stress implique une forte létalité embryonnaire et larvaire. Parmi les vers qui survivent, la synchronicité de la population est détruite, rendant impossible une étude précise de la redifférenciation au-delà du stade de début de redifférenciation (étape physiquement visible). C'est pour cette raison que deux smFISH ont été réalisés. Le premier à 25°C avait été effectué pour tester le début de la redifférenciation (même expérience que celle réalisée avec les autres mutants) et un autre à 20°C pour tester la fin de la redifférenciation.

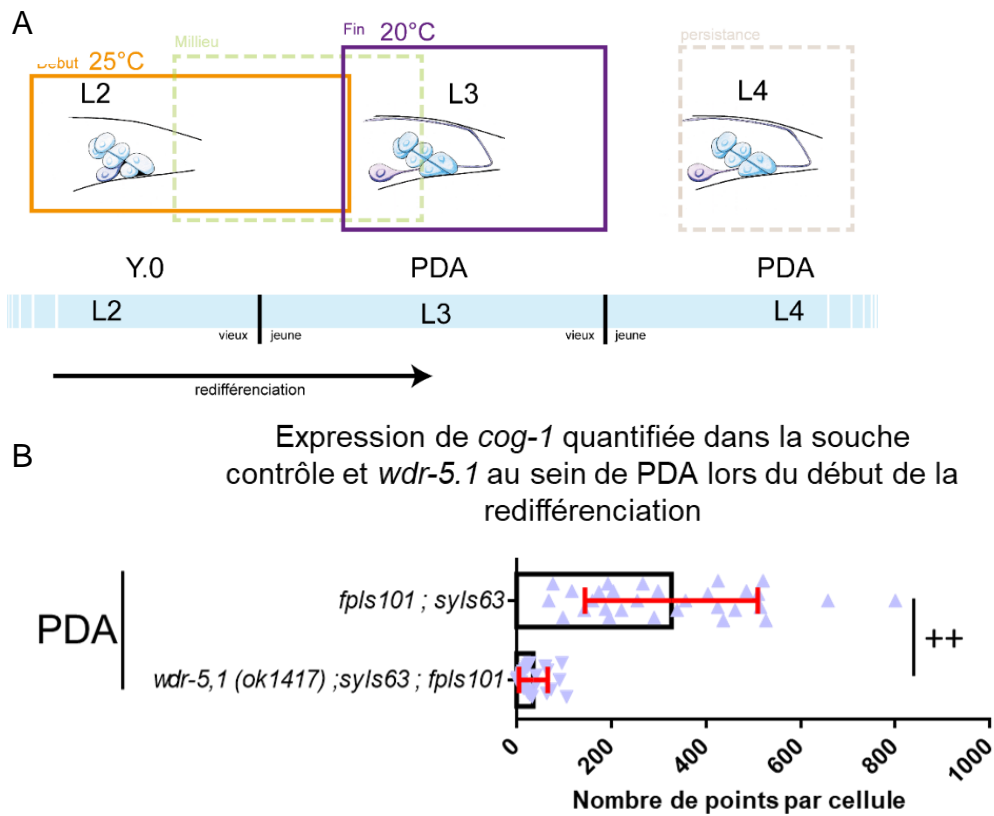


Figure 51 : A) représentation schématique de l'expérience de smFISH à différents moments du développement. Le début et la fin de la redifférenciation.

B) étude de l'expression de *cog-1* à 25°C lors du début de la redifférenciation (cadre jaune). Comparaison entre la souche contrôle sauvage (n=30) et le simple mutant *wdr-5.1*(dans le fond *syIs63 ; fpls101*) (n=26) permettant de vérifier l'étape de transdifférenciation et de visualiser les contours de la cellule Y.1). La quantification est réalisée dans la cellule d'intérêt PDA. ++ : p valeur<0.01 du test t de Student. NS : non significatif.

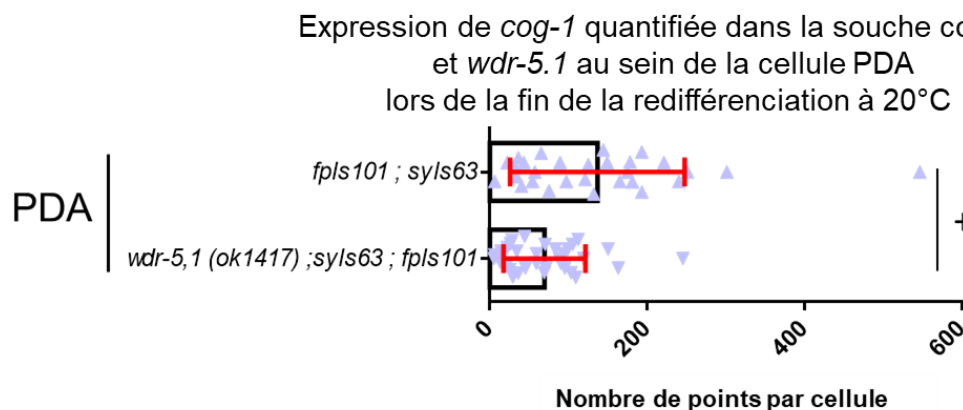


Figure 52 : étude de l'expression de *cog-1* à 20°C lors de la fin de la redifférenciation. Comparaison entre la souche contrôle sauvage (n=30) et le simple mutant *wdr-5.1* (dans le fond *syIs63 ; fpls101*) (n=30) permettant de vérifier l'étape de transdifférenciation et de visualiser les contours de la cellule Y.1). La quantification est réalisée dans la cellule d'intérêt PDA. + : p valeur <0.05 du test t de Student. NS : non significatif.

On observe une diminution significative de la quantité d'ARNm de *cog-1* au sein du mutant en comparaison à l'individu sauvage. Dans la cellule PDA, que ce soit à 20°C (diminution d'un facteur 2) lors de la fin de la redifférenciation ou à 25°C (diminution d'un facteur 9). *wdr-5.1* est donc impliqué positivement dans l'expression de *cog-1*.

Comme ces deux expériences n'ont pas été réalisées dans les mêmes conditions, nous n'avons pas pu analyser l'évolution de la quantité des transcrits *cog-1* dans le mutant *wdr-5.1* au cours de la redifférenciation. Cependant, il est intéressant de savoir que l'expression de *cog-1* est significativement diminuée à 20°C dans le mutant *wdr-5.1* (figure 52), alors que celui-ci présente une faible pénétrance de défaut à cette température. Ce fait indiquerait que *wdr-5.1* est plus impliqué dans l'expression de *cog-1* dans des conditions de stress. Ce fait est cohérent avec les observations sur son rôle au sein de la robustesse.

3.1.2.6. Expression comparée de *cog-1* au sein des différents mutants étudiés

Le smFISH réalisé au début de la redifférenciation a été effectué sur toutes les souches à l'exception de la souche *wdr-5.1(ok1417) ; syIs63 ; sel-10(ok1632) ; fpls101*.

Il est donc possible de comparer l'effet de chaque mutation sur la transcription de *cog-1*. Les valeurs présentées dans le graphique suivant sont les mêmes que celles présentées à propos des mutants individuels. Il s'agit de la même expérience.

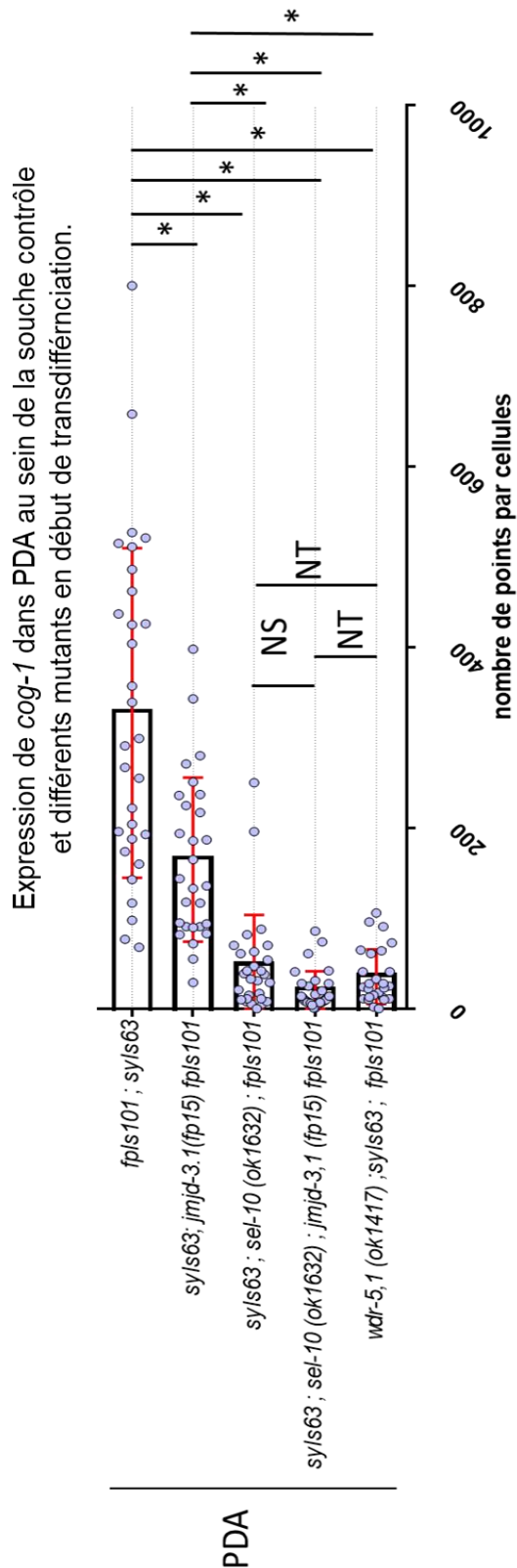


Figure 53 : étude de l'expression de *cog-1* parmi tous les mutants étudiés et la souche contrôle *syIs63 ; fpIs101* au sein des cellules PDA. Ce smFISH a été réalisé pendant le début de la redifférenciation (qui correspond au cadre orange de la figure 46). * : $\alpha < 0.05$ test d'ANOVA. Toutes les comparaisons ont été testées. L'absence d'indication signifie qu'aucune différence significative n'a pu être mise en évidence. Pour chaque souches, 30 vers ou plus ont été analysés.

On constate que les diminutions de l'expression de *cog-1* observées au sein des mutants *jmjd-3.1* et *wdr-5.1* ne sont pas les mêmes. *wdr-5.1* présente une diminution de la quantité d'ARNm de *cog-1* plus forte que celle observée dans le mutant *jmjd-3.1*. Ce qui pourrait indiquer que *wdr-5.1* est plus important pour garantir l'expression de *cog-1* au cours de la redifférenciation. Cependant, il est aussi à noter que ce mutant présente de sévères troubles physiologiques à 25°C (léthalité, stérilité) qui pourraient également être à l'origine de la forte diminution observée.

Bien que l'expression de *cog-1* semble plus faible dans le double mutant *sel-10 ; jmjd-3.1* par rapport au simple mutant *sel-10*, cette différence n'est pas statistiquement significative. Cependant, le double mutant semble tendre vers une diminution significative par rapport au simple mutant *sel-10*.

3.2.2. Expression de *unc-3*

Le gène *unc-3* est essentiel pour l'étape de redifférenciation. Son expression est nécessaire dès le début de la redifférenciation (Richard et al., 2011). Steven Zuryn a montré que la protéine UNC-3 interagit physiquement avec JMJD-3.1 (Zuryn et al., 2014). L'étude par smFISH de l'expression de *unc-3* au sein des différents mutants permettra de savoir si ces derniers agissent en amont ou en aval de ce gène.

3.2.2.1. Expression de *unc-3* au sein de l'individu sauvage

La quantification de l'expression de *unc-3* a été réalisée au sein du WT à différents moments de la redifférenciation comme défini plus haut (fig.54A). Cette étude permet de connaître le comportement normal de l'expression de *unc-3* avant d'observer l'effet de l'inactivation de nos gènes d'intérêt sur celle-ci. Les deux expériences ont été réalisées dans des conditions de stress de température modéré (25°C) car les mutants seront également testés dans ces conditions (à l'exception de *wdr-5.1*).

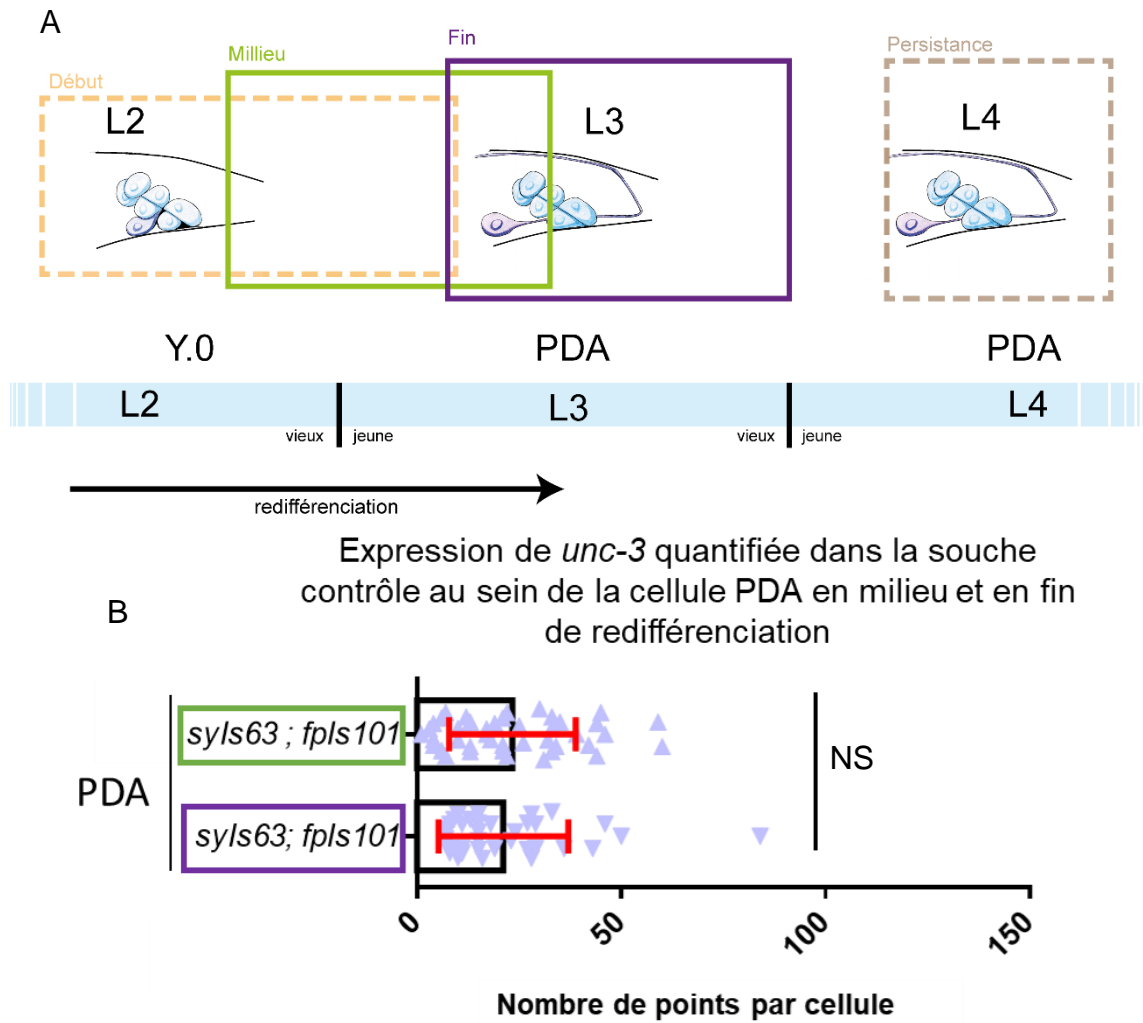


Figure 54 : **A)** représentation schématique de l’expérience de smFISH à différents moments du développement : début (cadre orange), milieu (vert), fin (violet) de la redifférenciation puis persistance de l’expression de *unc-3* (marron). **B)** étude de l’expression de *unc-3* à 25°C lors du milieu (cadre vert) (n= 43) et de la fin (cadre violet) (n=35) de la redifférenciation au sein de la souche sauvage contrôle *syls63 ; fpls101*. La quantification de l’ARNm de *unc-3* est réalisée dans la cellule d’intérêt PDA. NS : non significatif.

L’expression de *unc-3* semble diminuer au cours du temps. En revanche, aucune différence significative n’est observable pour l’expression de *unc-3* au sein de la cellule au cours du temps ; indiquant que, comme pour *cog-1*, son expression semble stable au cours du temps.

3.2.2.2. Expression de *unc-3* au sein du double mutant *sel-10 ; jmjd-3.1*

Le double mutant a été testé dans les mêmes conditions que les expériences précédemment décrites.

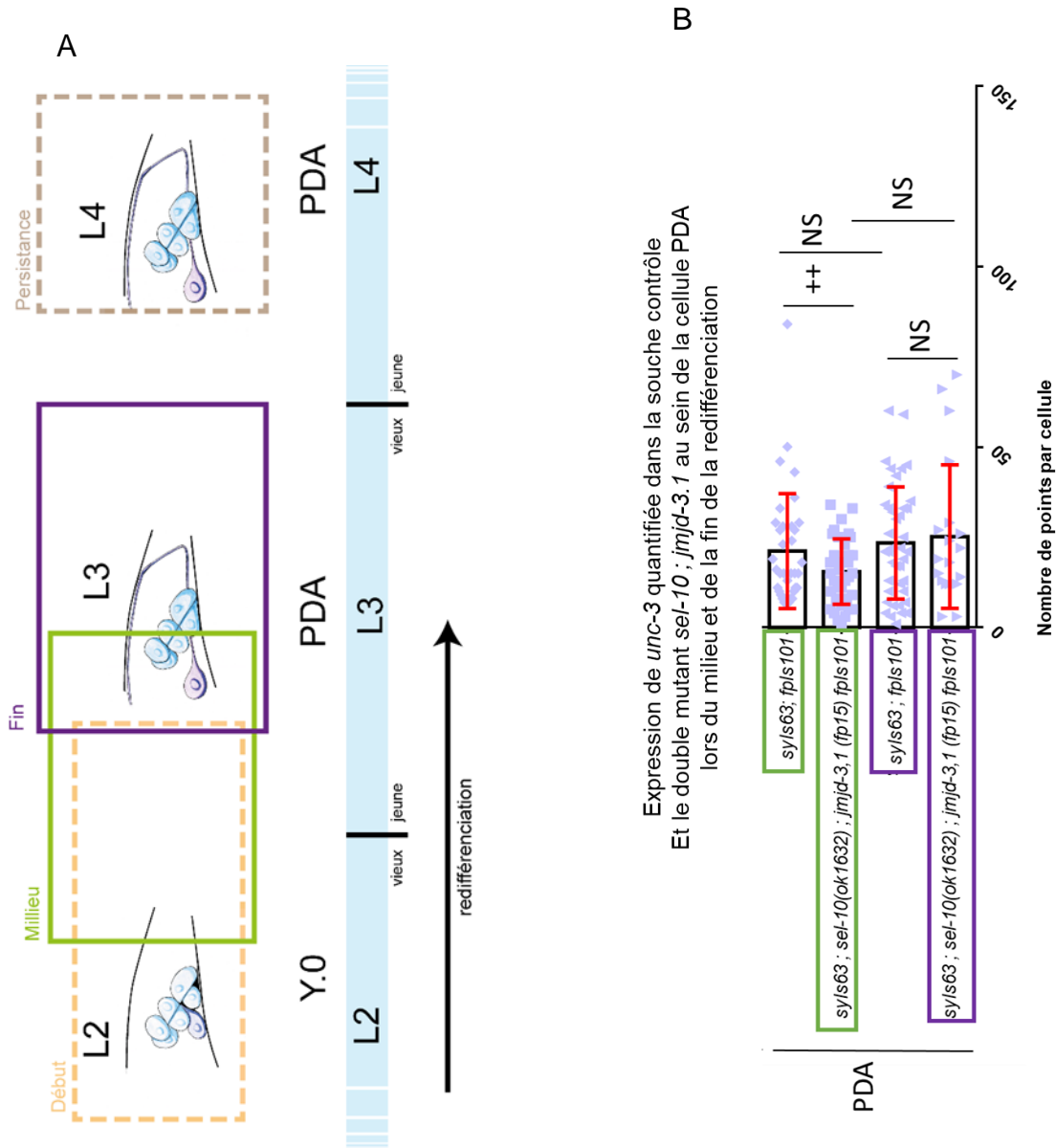


Figure 55 : A) représentation schématique de l'expérience de smFISH à différents moments du développement début (cadre orange), milieu (vert), fin (violet) de la redifférenciation puis persistance de l'expression de l'état neuronal (marron).

B) étude de l'expression de *unc-3* à 25°C lors du milieu (cadre vert) et de la fin (cadre violet) de la redifférenciation au sein de la souche contrôle *syIs63 ; fpIs101* et du double mutant *sel-10 ; jmjd-3.1*. La quantification de l'ARNm de *unc-3* est réalisée dans la cellule d'intérêt PDA. ++ : p valeur < 0.01 du test t de Student. NS : non significatif. Pour chaque conditions et souches, 30 vers ou plus ont été analysés.

On observe qu'il n'y a pas de différence significative de quantité d'ARNm entre les PDA chez le double mutant par rapport à la souche contrôle lors de la fin de la redifférenciation. Mais une légère diminution peut être observée au sein du double mutant lors du milieu de la redifférenciation. Cela peut supposer que dans ce mutant, l'expression de *unc-3* pourrait être plus lente que dans le contrôle. Cependant, cette différence est trop minime pour être observable en comparant l'expression de *unc-3* entre les deux moments observés.

3.2.2.3. Comparaison de l'expression de *unc-3* au sein des différents mutants

Tous les résultats précédemment montrés peuvent être compilés pour permettre une comparaison entre les différents mutants de manière indépendante.

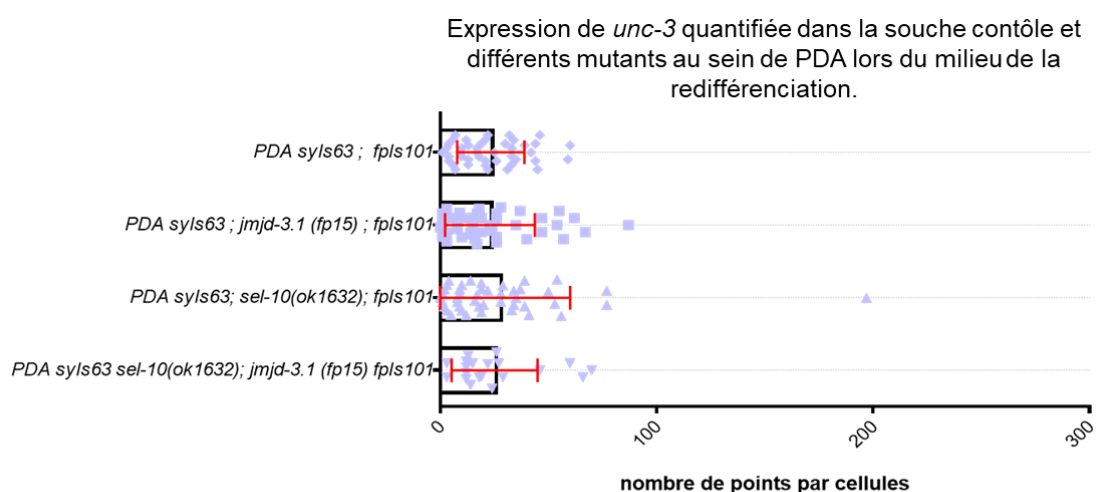


Figure 56 : étude de l'expression de *unc-3* à 25°C lors du milieu de la redifférenciation (cadre vert fig 56 A) au sein de la souche contrôle *syIs63 ; fpls101* et des différents mutants à l'exception du mutant *wdr-5.1*. La quantification de l'ARNm de *unc-3* est réalisée dans la cellule d'intérêt PDA. L'absence d'indication indique une absence de différence significative.

Cependant, aucun mutant ne présente de différence de l'expression de *unc-3* par rapport à l'expression quantifiée dans les vers contrôle. Ce qui indique que ni *jmjd-3.1*, ni *sel-10* ou le cumul des deux gènes ne sont nécessaires à l'expression normale de *unc-3*.

3.2.2.4. Expression de *unc-3* au sein du mutant *wdr-5.1* à 20°C

L'expérience de quantification de l'expression de *unc-3* sur les deux mutants *wdr-5.1* et *sel-10 ; wdr-5.1* a été réalisée à 20°C cette fois afin d'assurer la survie des vers.

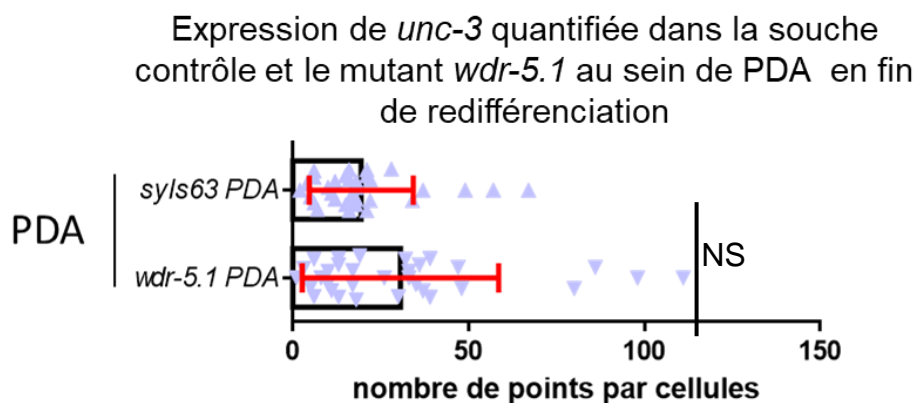


Figure 57 : étude de l'expression de *unc-3* à 20°C lors de la fin de la redifférenciation (cadre violet figure 56A) au sein de la souche contrôle *syIs63 ; fpIs101* (notée *syIs63* sur le graphique) et le simple mutant *wdr-5.1 ; syIs63 ; fpIs101* (noté *wdr-5.1* sur le graphique). La quantification de l'ARNm de *unc-3* est réalisée dans la cellule d'intérêt PDA. NS : non significatif. Test statistique : test t de Student.

On constate qu'il n'y a aucune différence significative entre la souche contrôle et le simple mutant *wdr-5*. Le mutant *wdr-5* n'a donc pas d'influence sur l'expression de *unc-3*. *Wdr-5.1* agit probablement en aval de l'expression de *unc-3*.

3.2.3. Expression de *unc-33*

Le gène *unc-33* est impliqué dans la formation des axones. Il s'agit d'un marqueur de l'identité neuronale qui est exprimé de manière précoce lors de la redifférenciation (Richard et al., 2011). C'est un marqueur exprimé dans tous les neurones (Tsuboi et al., 2005) et il est utilisé comme marqueur de la transdifférenciation pour déterminer si la cellule Y est stoppée lors du début de la redifférenciation (stade Y.1) (Richard et al., 2011).

L'étude de l'expression de ce marqueur permet de vérifier l'identité de la cellule et donc de juger de l'efficacité de l'étape de re-différenciation de la transdifférenciation. Son analyse par smFISH permettra donc de caractériser l'identité de la cellule Y/PDA, au sein des différents mutants.

3.2.3.1. *unc-33* au sein du contrôle et différents mutants.

L'expression de *unc-33* a été quantifiée lors du milieu de la redifférenciation au sein des trois mutants *jmjd-3.1*, *sel-10* et *sel-10 ; jmjd-3.1* ainsi que dans la souche contrôle *syIs63 ; fpIs101*. Cette expression a été quantifiée au sein des cellules PDA dans des conditions de stress de température à 25°C.

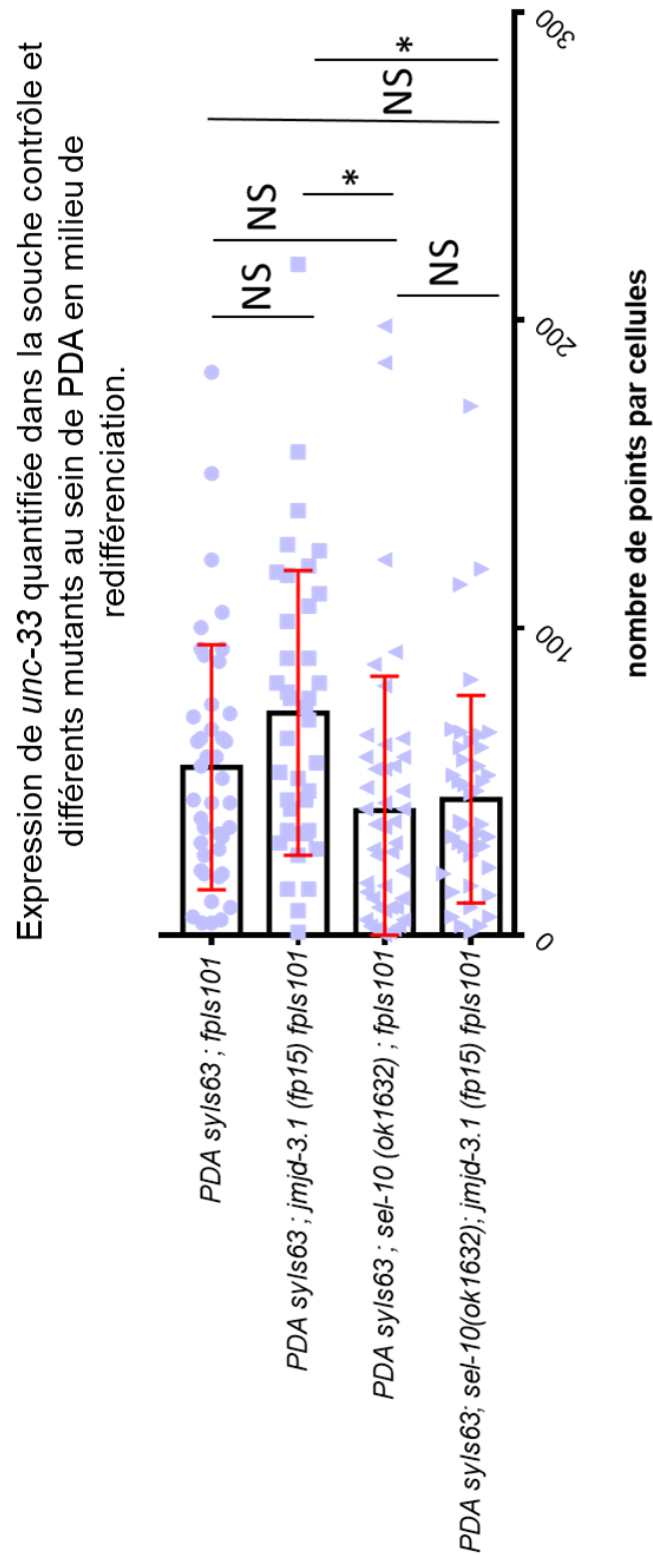


Figure 58 : étude de l'expression de *unc-33* à 25°C lors du milieu de la redifférenciation au sein de la souche contrôle *syIs63 ; fpIs101* et des différents mutants à l'exception du mutant *wdr-5.1*. La quantification de l'ARNm de *unc-33* est réalisée dans la cellule d'intérêt PDA. * : $\alpha < 0.05$ par ANOVA sur les rangs. NS : non significatif. Toutes les combinaisons ont été testées de manière statistique.

On constate qu'il n'y a pas de différence de quantité d'ARNm au sein de PDA entre les différents mutants et la souche contrôle. On peut observer une tendance de l'absence de *jmjd-3.1* à augmenter l'expression de *unc-33* mais celle-ci n'est pas statistiquement significative. Les autres mutants *sel-10* et *sel-10 (ok1632)* ; *jmjd-3.1 (fp15)* n'ont pas d'impact sur la transcription de *unc-33*. Il n'y a pas de différence significative entre l'expression au sein de la souche contrôle et les mutants. Une différence significative est observable entre le simple mutant *jmjd-3.1* et *sel-10* ainsi que et le double mutant *sel-10* ; *jmjd-3.1*, les résultats pour ces deux derniers mutants ne sont pas significativement différents de la souche contrôle. Ce qui indique que la perte de *jmjd-3.1* n'affecte probablement pas ou très peu l'expression de *unc-33*.

Les différents mutants étudiés ne présentent donc pas d'impact sur l'expression de *unc-33*, indiquant que la cellule a dépassé le stade Y.1 de la redifférenciation.

3.2.3.2. Expression de *unc-33* au sein du mutant *wdr-5.1*

Cette expérience a été réalisée à 20°C afin d'assurer la survie des individus.

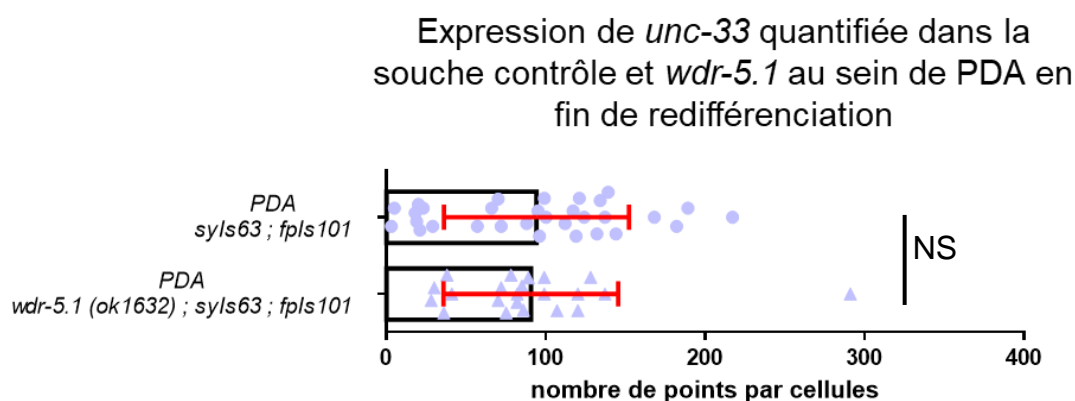


Figure 59 : étude de l'expression de *unc-33* à 20°C lors de la fin de la redifférenciation au sein de la souche contrôle *syIs63 ; fpIs101* (n=20) et le simple mutant *wdr-5.1 ; syIs63 ; fpIs101* (n=20). La quantification de l'ARNm de *unc-33* est réalisée dans la cellule d'intérêt PDA. NS : non significatif. Toutes les combinaisons ont été testées de manière statistique grâce à un test t de Student.

On constate qu'il n'y a pas de différence significative de l'expression de *unc-33* induite par la mutation *wdr-5.1*. PDA présente le même taux d'expression de *unc-33* au sein de la souche contrôle et du mutant. Le gène *wdr-5.1* n'est donc probablement pas impliqué dans l'expression de *unc-33*, indiquant que la cellule Y s'est redifférenciée jusqu'au stade Y.1.

3.2.4. Expression de *rimb-1*

Tout comme *unc-33*, *rimb-1* (anciennement *tag-168*) est considéré comme un gène impliqué dans l'identité terminale de PDA. Il est impliqué dans la formation de synapses et est pan-neuronal. Il s'agit d'un gène exprimé à la fin de la redifférenciation et il a été utilisé comme marqueur de l'identité neuronale de PDA (Richard et al., 2011).

L'étude de l'expression de ce gène permet de confirmer les observations réalisées par l'étude du gène *unc-33*, assurant la robustesse des conclusions pour déterminer l'identité cellulaire de Y/PDA au sein des différents mutants.

3.2.4.1. Comparaison de l'expression de *rimb-1* entre la souche contrôle et les différents mutants

Cette expérience a été réalisée durant le milieu de la redifférenciation sur les souches mutantes *sel-10*, *jmjd-3.1* et le double mutant *sel-10 ; jmjd-3.1* ainsi que la souche contrôle *syIs63 ; fpIs101*. Dans des conditions de stress de température, les vers mutants présentent un défaut plus important qui augmente les chances d'observer un effet sur la transcription du gène étudié, *rimb-1*. Ici aussi, les expériences ont donc été réalisées à 25°C.

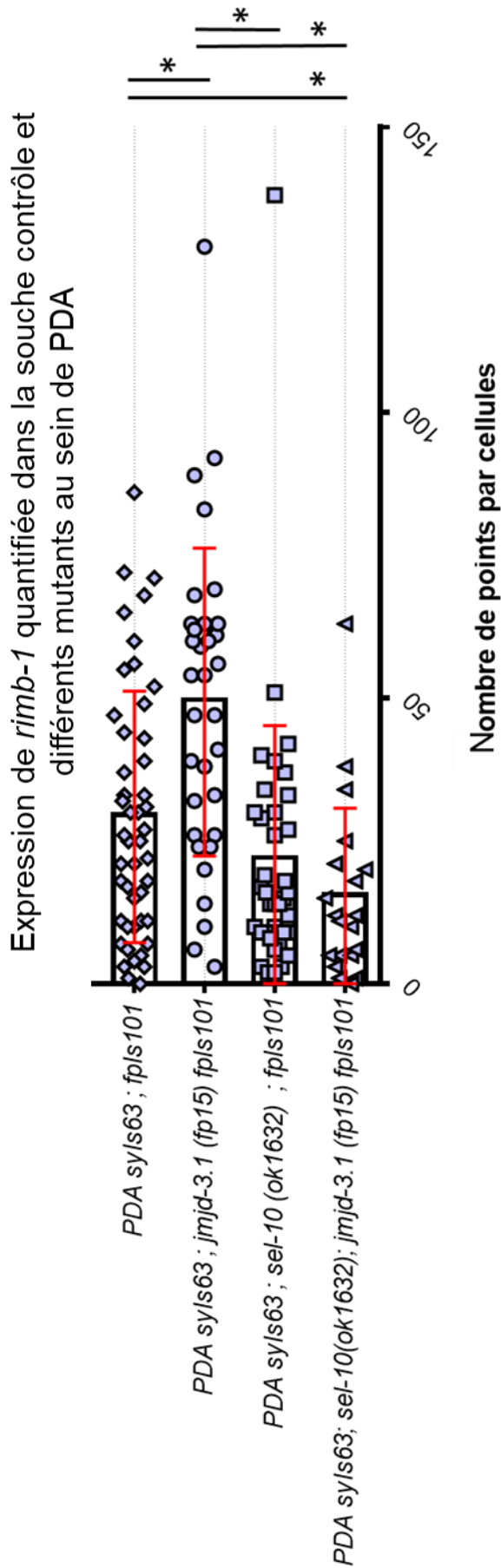


Figure 60 : étude de l'expression de *rimb-1* à 25°C lors du milieu de la redifférenciation au sein de la souche contrôle *syIs63* ; *fpIs101* et des différents mutants à l'exception du mutant *wdr-5.1*. La quantification de l'ARNm de *rimb-1* est réalisée dans la cellule d'intérêt PDA. ++ : p valeur < 0.01 du test t de Student. * : $\alpha < 0.05$ par ANOVA sur les rangs. NS : non significatif. Toutes les combinaisons ont été testées de manière statistique.

On constate que la mutation simple de *sel-10* n'a pas d'effet sur l'expression de *rimb-1* au sein de la cellule PDA. Ce qui indique que *sel-10* n'induit probablement pas de modification de l'expression de *rimb-1*.

La mutation simple de *jmjd-3.1* présente une surprenante augmentation de l'expression de *rimb-1* par rapport à la souche contrôle. Ceci pourrait impliquer que l'effet de la mutation de cette modificatrice d'histone sur l'expression de ce marqueur pan-neuronal est généralisé dans les cellules neuronales. On peut constater que la quantité d'ARNm *rimb-1* dénombrée dans ce mutant est significativement différente de celle présente dans le simple mutant *sel-10* (qui est similaire au niveau d'expression de la souche contrôle) et le double mutant *sel-10 ; jmjd-3.1*.

Ce double mutant *sel-10 ; jmjd-3.1* présente une diminution significative de l'expression de *rimb-1* par rapport à la souche contrôle. Ceci indique que la perte de *sel-10*, qui n'était pas impliquée de prime abord dans l'expression de *rimb-1*, est délétère en absence de *jmjd-3.1*. Alors que le simple mutant *jmjd-3.1* augmente l'expression de *rimb-1*, la double mutation *sel-10 ; jmjd-3.1* provoque donc un effet contraire à celui de *jmjd-3.1* seul.

Ces différentes observations impliquent que la cellule PDA est potentiellement fonctionnelle ou possède une identité terminale neuronale.

4. Récapitulatif des résultats

Tableau VII : résumé des résultats

Expériences	Observation conclusion
Liste des cibles 1.1.1.	3 catégories de gènes, 10 gènes prioritaires, 6 gènes testés par ARNi, dont 2 testés par des mutants génétiques.
<i>jmjd-2</i> 1.1.2.	Aucun rôle sur la synergie entre <i>sel-10</i> et <i>jmjd-3.1</i> . Légère suppression du défaut de PDA induit par la mutation de <i>jmjd-3.1</i>
<i>cec-6</i> 1.1.3.	Obtenu par CRISPR-Cas9, <i>cec-6</i> n'a aucune incidence sur la synergie existante entre <i>sel-10</i> et <i>jmjd-3.1</i> Tendance à une augmentation du défaut de PDA induit par la mutation de <i>sel-10</i> et suppression significative du défaut induit par <i>jmjd-3.1</i>
Domaine Fbox de SEL-10 1.2.1. et 1.2.2.	Le domaine Fbox semble nécessaire pour la fonction de SEL-10 au sein de la transdifférentiation La mutation de l'Aa conservé P127 en A n'est pas suffisante pour la perte de fonction de SEL-10

Expériences	Observation conclusion
Localisation de mCherry::SEL-10 1.2.3.	La protéine SEL-10 semble être fonctionnelle exclusivement dans le cytoplasme. L'ajout d'un domaine PH n'est pas suffisant pour localiser SEL-10 au niveau de la membrane plasmique. L'ajout d'un domaine NLS semble être toxique pour le ver.
SKRs 1.3.1.	Les SKR-1 et SKR-5 suppriment le défaut de PDA induit par la mutation de <i>jmjd-3.1</i> . SKR-1 est supposé agir avec SEL-10 et CUL-1 au sein du complexe SCF.
Protéasome 1.4.	Un ARNi de <i>rpn-10</i> ou <i>pbs-5</i> , les 2 sous unités du protéasome testées, suppriment le défaut induit <i>jmjd-3.1</i> muté. Le mutant <i>rpn-10</i> supprime le défaut induit par <i>jmjd-3.1</i> mais pas celui induit par <i>sel-10</i> . <i>rpn-10</i> est suffisant pour briser partiellement la synergie qui existe entre <i>sel-10</i> et <i>jmjd-3.1</i> .
Stress de température 2.1.	La température induit un stress qui augmente le défaut de PDA au sein des mutants <i>jmjd-3.1</i> , <i>sel-10</i> et le double mutant <i>sel-10 ; jmjd-3.1</i> .
Stress d'absence de nourriture 2.2.	L'absence de nourriture induit une augmentation du défaut de PDA au sein des mutants <i>sel-10</i> , <i>jmjd-3.1</i> et <i>sel-10 ; jmjd-3.1</i> , impliquant un rôle de ces gènes sur la robustesse face au stress d'absence de nourriture.
SmFish – dédifférenciation 3.1.1. 3.1.2. et 3.1.3.	L'expression de <i>ceh-6</i> est diminuée dans les deux mutant <i>wdr-5.1</i> et <i>sel-10</i> . L'expression de <i>sox-2</i> n'est pas modifiée chez les mutants. Une tendance à la diminution de l'expression de <i>sox-2</i> est visible chez le mutant <i>wdr-5.1</i> . L'expression de <i>hlh-16</i> est diminuée dans le mutant <i>wdr-5.1</i> . La mutation de <i>sel-10</i> ne présente pas de modification significative.
smFISH - <i>cog-1</i> Temporalité 3.2.1.1. à 3.2.1.5.	L'expression de <i>cog-1</i> chez le contrôle n'est pas modifiée au cours de la redifférenciation. L'expression de <i>cog-1</i> reste stable après la redifférenciation. Le mutant <i>jmjd-3.1</i> induit une diminution de l'expression de <i>cog-1</i> (apparemment stable au cours du temps, à l'exception de la fin de la redifférenciation).
<i>cog-1</i> 3.2.1.6.	Tous les mutants testés présentent une diminution de l'expression de <i>cog-1</i> dans PDA au cours de la redifférenciation. Le mutant <i>jmjd-3.1</i> présente la plus faible diminution de <i>cog-1</i> à 25°C <i>sel-10</i> et <i>sel-10; jmjd-3.1</i> présentent une forte diminution de l'expression de <i>cog-1</i> . Le mutant <i>wdr-5.1</i> induit une faible diminution de l'expression de <i>cog-1</i> à 20°C et une forte à 25°C. <i>sel-10; jmjd-3.1</i> présente un fort défaut de PDA, alors que la diminution observé dans <i>sel-10</i> induit un faible défaut de PDA.
<i>unc-3</i> 3.2.2.	Les mutants ne modifient pas l'expression de <i>unc-3</i> au sein de la cellule PDA.
<i>unc-33</i> 3.2.3.	L'expression de <i>unc-33</i> a tendance à être augmenter par la mutation de <i>jmjd-3.1</i> . Aucune influence des autres mutants sur <i>unc-33</i> .
<i>rimb-1</i> 3.2.4.	L'expression de <i>rimb-1</i> est augmentée dans le mutant <i>jmjd-3.1</i> . Aucune différence n'est visible au sein du simple mutant <i>sel-10</i> et du double mutant <i>sel-10; jmjd-3.1</i> .

Discussion

Discussion

Mon travail de thèse a consisté en l'étude des mécanismes qui permettent l'invariabilité du changement d'identité cellulaire *in vivo*. La transdifférenciation de la cellule rectale Y en motoneurone PDA est un processus complexe qui implique l'expression et la coordination de plusieurs gènes. Cet ensemble de gènes induit le changement d'identité cellulaire et assure 100% d'efficacité au processus. L'efficacité désigne le pourcentage de PDA apparu au sein d'une population homogène en conditions normales.

Le stress implique des modifications du schéma d'expression des gènes. Ceci modifie potentiellement le pourcentage d'animaux dans lesquels le changement d'identité de Y a lieu. La robustesse correspond au maintien de l'entière efficacité d'un processus cellulaire, ici la transdifférenciation, quel que soient les conditions environnementales. Chez *C. elegans*, le changement d'identité se fait dans 100% des cas, y compris dans des conditions de stress. Ce travail a porté sur l'étude des mécanismes impliqués dans la robustesse et l'efficacité de la transdifférenciation de la cellule Y en PDA chez *C. elegans*.

Ce travail de recherche m'a amenée à étudier le rôle de l'ubiquitine (*sel-10*), des modificatrices d'histones (*jmjd-3.1* et *wdr-5.1*) et le lien qui les unit quant à l'efficacité et la robustesse de la transdifférenciation. Le gène *sel-10*, impliqué dans la robustesse et l'efficacité de la transdifférenciation, agit en synergie avec les modificatrices d'histones *jmjd-3.1* ou *wdr-5*. Ces gènes codent pour des protéines modificatrices d'histones positivement impliquées dans l'expression génique. Comprendre de quelle manière l'ubiquitination et l'épigénétique agissent sur l'expression des gènes impliqués dans la transdifférenciation apportera une meilleure compréhension de l'efficacité du changement d'identité cellulaire. Le modèle sur lequel nos expériences se sont basées correspond à la figure 62, ci-dessous :

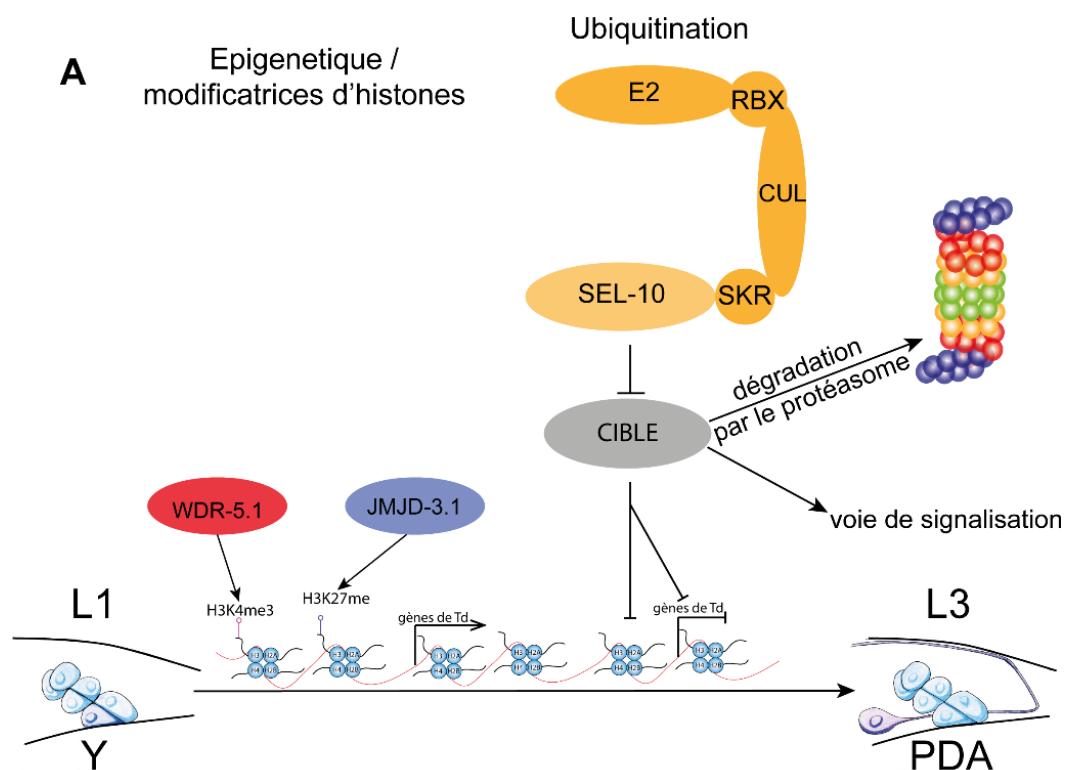


Figure 61 : schéma du modèle de l'action des gènes étudiés sur la transdifférenciation. La transdifférenciation se passe entre les stades larvaires L1 et L3. La cible de SEL-10 peut être dégradée par le protéasome ou impliquée dans une voie de signalisation. Dans ce dernier cas, l'effet de SEL-10 sur sa cible et l'effet de cette dernière sur l'expression peut être modifiée et être une double activation.

1. *sel-10* sa cible, sa fonction et l'implication du protéasome

1.1. La cible de *sel-10* ?

SEL-10 est une protéine ubiquitine ligase E3, elle est impliquée dans la reconnaissance de protéines cibles de l'ubiquitine au sein d'un complexe qui s'appelle le complexe SCF. L'une des grandes difficultés du travail sur l'ubiquitine est de connaître l'identité de sa cible. *sel-10* est impliquée dans l'efficacité et la robustesse de la transdifférenciation d'Y en PDA. C'est-à-dire que la perte de son expression ne provoque pas un fort défaut du changement d'identité ; par contre celui-ci est augmenté si les mutants sont cultivés dans des conditions de stress. C'est pour cette raison que connaître la ou les protéine(s) reconnue(s) par SEL-10 est important pour comprendre son rôle au sein de la transdifférenciation. Plusieurs techniques sont envisageables pour répondre à cette question : par analyse bio-informatique, protéique ou par étude génétique.

Une étude protéique utilisant le western blot consiste à mettre en évidence une différence entre les protéines poly-ubiquitinées au sein du contrôle et du mutant de l'ubiquitine ligase. Ceci peut donner des pistes pour rechercher l'identité des protéines qui ne sont plus ubiquitinées dans le cas du mutant.

Cependant cette technique est difficile à mettre en œuvre chez *C. elegans*, où il faudrait utiliser des extraits d'animaux entiers ; et *sel-10* est impliquée dans de nombreux processus et types cellulaires différents, avec probablement des cibles différentes dans chacun. Il est impossible d'utiliser cette technique de manière cellule spécifique. Il en va de même pour l'identification de protéine interagissant avec SEL-10 par co-immunoprécipitation. L'approche choisie pour ce projet a été de travailler à partir de la liste *in silico* des potentielles cibles de SEL-10 établie par Claire de la Cova. J'ai supposé que la ou les cibles de SEL-10 seraient dégradées par le protéasome comme toutes les autres cibles connues. En analysant la liste de Claire de la Cova, j'ai choisi quelques cibles potentielles à tester en priorité. Dans mon hypothèse de dégradation de la cible de SEL-10, il est attendu que cette protéine ait un rôle antagoniste à celui des modificatrices d'histones permettant la transdifférenciation (à savoir un rôle de répression de l'expression des gènes). J'ai donc sélectionné des gènes codants pour une protéine impliquée dans l'inhibition de l'expression des gènes. J'ai en priorité sélectionné des gènes impliqués dans les modifications épigénétiques, le remodelage de la chromatine, des protéines se liant aux ARN messagers (inhibiteurs de la traduction) et des protéines se liant à l'ADN, connues pour la répression de l'expression de gènes cibles.

Les cibles potentielles pré-sélectionnées ont été testées par ARN interférant au sein de la souche *rrf-3(pk1426)* ; *syIs63* ; *sel-10(ok1632)* ; *jmjd-3.1(fp15)*. Si la cible de *sel-10* n'est pas dégradée, alors la fonction de la cible sur la transdifférenciation pourrait être totalement différente. L'ubiquitine peut être impliquée dans l'activation ou l'inactivation de protéines, au sein de voies de signalisation, dans la dégradation par le protéasome ou par autophagie (Aguilar and Wendland, 2003).

J'ai testé la potentielle implication de *jmjd-2*, qui modifie la queue des histones, et *cec-6*, impliqué dans la condensation de la chromatine.

jmjd-2 est un gène codant pour une protéine modificatrice d'histone, déméthylant les variant H3K36 et H3K9. *jmjd-2* diminue principalement le défaut de PDA observé dans le simple mutant *jmjd-3.1*. On parle alors de suppression du défaut. Cette suppression reste

cependant légère et il n'y a aucune indication quant à un potentiel rôle de SEL-10 dans la dégradation de JMJD-2. On peut supposer que SEL-10 n'a aucun rôle dans la voie de signalisation qui implique JMJD-2 et JMJD-3.1.

J'ai également testé l'implication de *cec-6* au sein de la transdifférenciation dans les mutants *jmjd-3.1* et *sel-10*. La technique d'ARNi permet de vérifier l'effet d'une diminution de l'expression d'un gène sur un phénotype particulier. L'ARNi de *cec-6* diminue le défaut de PDA au sein du double mutant *sel-10 ; jmjd-3.1*. En revanche, le triple mutant *cec-6 ; sel-10 ; jmjd-3.1* ne présente pas le même phénotype de suppression du défaut.

Au vu de ces résultats, plusieurs hypothèses sont possibles. Dans un premier temps, on peut supposer que l'ARNi n'est pas spécifique au gène *cec-6*. Cependant, après re-vérification de la séquence de l'ARN double brin utilisé et comparaison de cette séquence au reste du génome du ver (blastn), il semble peu probable que celui-ci ait une cible aspécifique.

Une deuxième hypothèse se base sur le fait que *cec-6* appartient à un opéron de 3 gènes (selon la base de données wormbase). Il est exprimé avec les gènes *drp-1* et *T12E12.3*. Ce dernier gène n'est pas encore caractérisé. *drp-1* est impliqué dans la membrane externe des mitochondries et est important pour leur scission (Labrousse et al., 1999). On peut supposer que l'un de ces deux gènes a vu son expression diminuée par la technique d'ARNi (Bosher et al., 1999). Dans ce cas, un gène autre que *cec-6* aurait un rôle négatif sur la transdifférenciation. Pour tester cette hypothèse, il faudrait tester les mutants des deux autres gènes présents dans l'opéron avec *cec-6* au sein du double mutant *sel-10 ; jmjd-3.1*. Cette expérience sera à réaliser pour la suite du projet. Si cette hypothèse se confirme, alors l'un des deux autres mutants de l'opéron provoquera une diminution du défaut au sein du triple mutant avec *sel-10* et *jmjd-3.1*.

Une troisième hypothèse conduit à supposer que le codon stop prémature induit une reconnaissance et une dégradation de l'ARNm avant l'épissage de ce dernier. Cette reconnaissance se fait indépendamment de l'épissage chez *D. melanogaster* et *C. elegans* (Blumenthal and Gleason, 2003; Evans and Blumenthal, 2000). Il est possible de tester cette hypothèse en utilisant des mutants des protéines impliquées dans la reconnaissance de ces ARNm qui possèdent un codon stop avant un exon et les envoient vers la dégradation (système smg), ou en réalisant un autre CRISPR-Cas9 sur le gène *cec-6* afin d'induire un décalage du cadre de lecture qui n'induit pas de codon stop prémature (les autres allèles de *cec-6* obtenus présentent tous un codon stop prémature). Il est rare qu'il soit possible

d'induire un décalage du cadre de lecture n'induisant pas d'apparition d'un codon stop prémature, mais j'ai découvert qu'il était possible de le faire avec la séquence du gène *cec-6* en l'analysant par informatique. Il serait donc possible de réaliser une mutagenèse dirigée, assurant l'apparition de cet allèle potentiel.

Le rôle de *cec-6* au sein de la transdifférenciation peut également être étudié en utilisant des outils de bioinformatique. La base de données STRING compile des données et indique les interactions (hypothétiques ou existantes) entre plusieurs protéines. Parmi les interactions prédites avec CEC-6, il y a différents membres du complexe polycomb (*mes-2*, *set-21*, *set-32*, *set-25* et *set-23*). Ces prédictions indiquent que la protéine CEC-6 aurait bel et bien un rôle dans la régulation de l'expression des gènes. Cependant, pour s'en assurer, il faudrait réaliser des expériences d'ARNi ou d'étude génétique pour savoir si les autres gènes ont un rôle similaire au sein de la transdifférenciation.

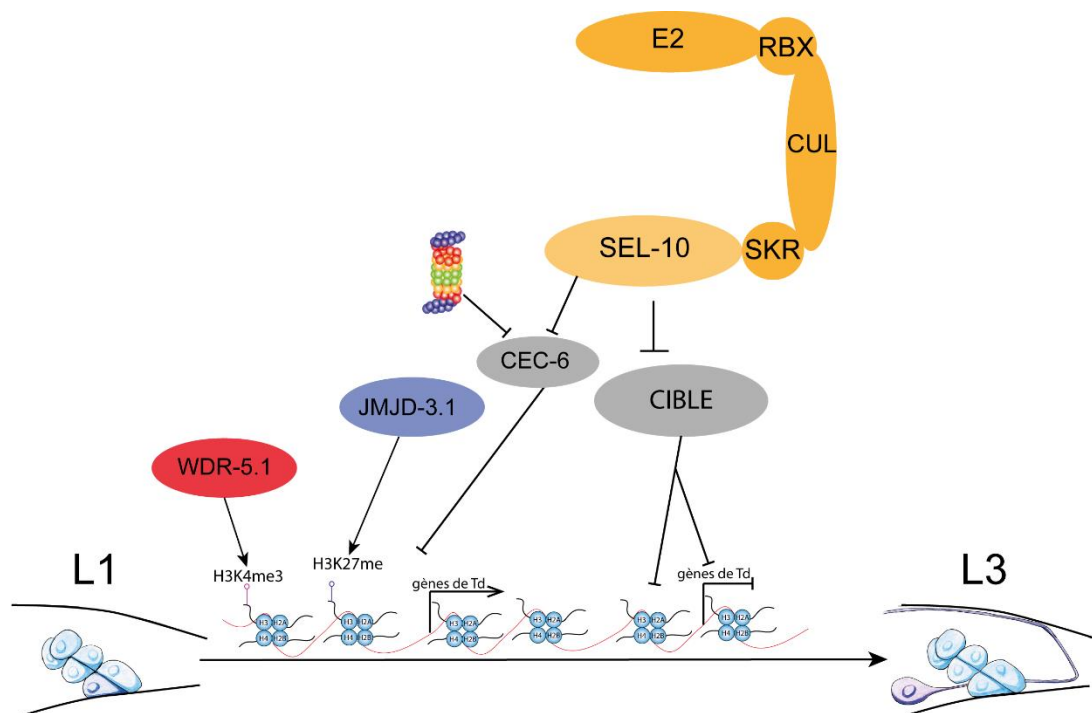


Figure 62 : modèle du rôle supposé de *cec-6* au sein de la transdifférenciation. Dans ce modèle, *cec-6* est dégradé par le protéasome. Et CEC-6 peut être dégradée par SEL-10 mais n'est pas la seule cible de cette ubiquitine ligase E3. Cependant, le doute est encore présent, notamment quant au potentiel rôle de *drp-1* ou *T12E12.3*.

La liste *in silico* des potentielles cibles fournies par Claire de la Cova (de la Cova and Greenwald, 2012) est un bon point de départ pour trouver la cible par crible RNAi. Mais l'utilisation d'ARNi au sein de la souche *rrf-3(pk1426)* ; *syIs63* ; *sel-10(fp27)* ; *jmjd-*

3.1(fp15) rend la tâche difficile. Ce triple mutant est principalement stérile et l'augmentation de l'efficacité des ARNi au sein des vers par la mutation *rrf-3* complique le test des gènes induisant une létalité. Pendant ma thèse, j'ai balancé la mutation du gène *sel-10* en utilisant un chromosome V intégrant *oxTi545 [eft-2p ::H2B ::tomato]*. Cette technique a permis la réalisation de cette expérience (assurant la fertilité) mais pas l'utilisation d'ARNi induisant de la létalité.

Pour remédier à ce problème, deux stratégies utilisant des gènes différents existent et consistent à réaliser une souche permettant des ARNi au sein d'un tissu spécifique.

Dans un cas, l'utilisation de *sid-1 ; eri-1 ; [sid-1 ADNc]* (Devanapally et al., 2015) a été décrite à cette fin. *eri-1* est impliqué dans l'inhibition du processus d'ARNi. La mutation du gène *eri-1* permet d'augmenter l'efficacité des ARNm dans toutes les cellules du ver. En son absence, le processus perdure donc plus longtemps. Chez *C. elegans*, les ARNi sont systémiques, ils passent d'une cellule à l'autre par des canaux : *sid-1* et *sid-2*. *sid-2* est impliqué dans le passage des ARNi dans la gonade alors que *sid-1* est impliqué dans le passage des ARNi dans les cellules somatiques. La technique se base sur le sauvetage du gène *sid-1* de façon tissu-spécifique, autorisant l'action d'ARNi uniquement dans les cellules exprimant *sid-1*.

J'ai essayé de réaliser la souche *eri-1(mg366) syIs63 ; sid-1(qt2) sel-10(fp27) ; jmjd-3.1(fp15) ; [col-34p::sid-1 ADNc]*. Le but fut d'essayer dans un premier temps d'obtenir le double mutant ; *sid-1 (qt2) sel-10 (fp27)* mais ce dernier ne semblait pas viable. En parallèle la souche *eri-1 (mg366) syIs63 ; sid-1(qt2)* a été testée mais l'ARNi test n'a pas fonctionné.

Une récente étude (Minkina and Hunter, 2017) indique que *sid-1* est exprimé dans la gonade et que sa surexpression par l'utilisation d'un array extra-chromosomique (ou intégré) induit une diminution de l'expression de *sid-1*. Cette diminution limite donc le nombre de canaux transportant les ARN interférant dans la gonade, la rendant insuffisante pour permettre une transmission efficace des ARNi aux gonades, induisant une résistance aux ARNi. Cette étude a été réalisée sur une expérience d'ARNi par ingestion de bactéries, ce qui est moins efficace que par injection. De plus, les auteurs nuancent leurs propos en indiquant que l'effet varie en fonction de l'ARNi ciblé et de la souche bactérienne utilisée.

La deuxième méthode se base sur l'utilisation de la souche *rrf-3(pk1426) ; rde-1(ne219) ; [promoteur spécifique::rde-1 ADNc]* (Chun et al., 2017; Qadota et al., 2007). *rrf-3* est le gène impliqué dans l'augmentation de l'efficacité des ARNi. *rde-1* est un des membres du complexe ARGONAUTE, directement impliqué dans la reconnaissance des ARN doubles brins qui sont à la base de la technique d'ARNi (Wedeles et al., 2013). En absence de ce gène fonctionnel, l'ARNi est impossible. En exprimant de nouveau une version sauvage de *rde-1* sous contrôle d'un promoteur spécifique dans ces mutants, l'ARNi sera restauré dans les cellules ciblées. J'ai obtenu de la part de M. Qadota le plasmide afin de réaliser cette technique dans notre laboratoire mais il est encore nécessaire d'achever la construction des outils nécessaires à cette expérience.

Utiliser la liste des potentielles cibles de SEL-10 induit un biais dans la recherche de la cible et nos choix dépendent de notre hypothèse sur le devenir de cette cible une fois ubiquitinée. La cible réelle pourrait ne pas faire partie de la liste. De plus, les critères utilisés pour sélectionner la (ou les) cible(s) peuvent ne pas être ceux représentatifs du mécanisme réellement impliqué. Un crible ARNi sur la totalité des gènes de *C. elegans* pourrait être envisageable. Mais l'effet de l'ARNi n'est pas toujours fiable. Dans notre expérience, certains ARNi interférant ne présentent pas d'effet alors que le gène testé est impliqué ; ceci est particulièrement vrai dans les cellules rectales. De plus, cette expérience se fait sur le double mutant *sel-10 ; jmjd-3.1* et une diminution du défaut pourrait être liée à une suppression directe de *jmjd-3.1*.

Une méthode non biaisée serait de faire un crible de mutagenèse aléatoire sur le double mutant *sel-10 ; jmjd-3.1*. Cette méthode se base sur le fait que dans 100% des cas, il n'y a pas de PDA, ainsi chaque ver présentant un motoneurone PDA serait nécessairement muté dans un gène impliqué dans la suppression du défaut (soit en agissant sur *sel-10*, soit *jmjd-3.1* ou encore les deux). L'étude de chaque ver présentant un PDA est longue, puisque nécessitant une analyse manuelle de chaque ver au microscope à épifluorescence. Ainsi, l'utilisation de mutations nulles pour *sel-10* et *jmjd-3.1* et assurant un défaut de transdifférenciation total permet de limiter l'apparition de faux positifs. Car la base de cette méthode est de sélectionner les vers possédant un PDA et de réaliser une analyse longue (croisements retours, séquençage haut débit puis clonage). La présence de faux positifs rendrait donc la mise en évidence de nouveaux acteurs de la transdifférenciation longue et coûteuse à mettre en place. De plus, cette technique se base

aussi sur le fait que SEL-10 inhibe la fonction de la protéine cible. Ce n'est que sous cette condition que cette technique peut donner un résultat.

1.2. La fonction de *sel-10* ? Observation du domaine Fbox et de la localisation de SEL-10 au sein de la cellule Y.

Le domaine Fbox est responsable du lien entre SEL-10 et le reste du complexe SCF. Ce complexe est celui qui permet l'ubiquitination de la cible de SEL-10. Le domaine F-box est conservé entre les différentes protéines de cette famille et entre les différentes espèces (animales et végétales). Il s'agit d'un domaine protéique permettant la formation d'un hétérodimère protéique entre la protéine F-box et *skp-1* (appelé SKR-1 chez *C. elegans*). Il y a 326 protéines F-box prédites chez *C. elegans*. Toutes les protéines de cette famille ont un rôle théorique avec l'ubiquitination de protéines. Mais toutes ne possèdent pas de domaine WD40 pour reconnaître la cible à ubiquitiner. Les protéines F-box se divisent donc en trois groupes : Fbxw, Fbxl et Fbxo (Nelson et al., 2013). SEL-10 fait partie des protéines Fbxw car elle possède des domaines WD40. Les protéines Fbxl possèdent des domaines LRR (« leucine rich repeat »). Les protéines appartenant à la dernière catégorie sont les protéines « autres » qui ne possèdent ni domaines WD40 ou LRR (Jin et al., 2004).

Les domaines F-box sont conservés et la délétion ou mutation ponctuelle de proline en alanine peut effectivement changer la fonction protéique de l'ubiquitine ligase E3 (van den Burg et al., 2008).

Pour étudier le domaine Fbox, nous avons utilisé la technique dite de sauvetage de phénotype. Elle permet de modifier assez simplement la séquence d'un gène (sur un plasmide) et de vérifier sa fonction en l'exprimant au sein d'un mutant. Dans le cas du rôle de SEL-10 au sein de la transdifférenciation, l'utilisation du double mutant *sel-10 ; jmjd-3.1* permet une meilleure observation du sauvetage de phénotype car le défaut de PDA y est important. En effet, le défaut de transdifférenciation induit par la mutation de *sel-10* seul ne permet pas d'assurer l'apparition d'un phénotype observable.

L'utilisation d'un épisode ne peut pas complètement sauver un phénotype. Au sein d'un ver transgénique, toutes les cellules ne possèdent pas l'épisode, car il peut être perdu à chaque génération. Ce phénomène est connu et porte le nom de mosaïsme. Ainsi, un ver

peut être observé en tant que ver transgénique (car il exprime le marqueur de co-injection) mais ne possède pas le transgène dans la cellule Y (ne pouvant donc sauver le phénotype). Bien que la protéine SEL-10 soit fusionnée à mCherry, et par conséquent visible dans le rectum (figure 29), c'est la présence du marqueur de co-injection qui fait foi. Car on suppose que les deux plasmides (celui de co-injection et celui d'intérêt) se transmettent ensemble dans le ver. Ainsi, une absence de fluorescence dans les cellules rectales pourrait venir d'une expression insuffisante de la protéine de fusion qui la rend visible. Mais la fonction de cette dernière pourrait être tout de même observable. C'est ce mosaïsme qui empêche un sauvetage total du défaut de *sel-10* au sein du double mutant *sel-10 ; jmjd-3.1*. Cependant, le mosaïsme est trop faible pour empêcher l'observation d'un effet de sauvetage de phénotype si ce dernier doit avoir lieu.

J'ai observé qu'en absence du domaine Fbox, la protéine SEL-10 n'était plus capable de sauver le phénotype des mutants *sel-10 ; jmjd-3.1*. Ceci suggère que le domaine Fbox est essentiel à la fonction de *sel-10* lors de la transdifférenciation. Cela suggère également que l'activité de *sel-10* passe par son interaction avec une protéine SKR. Cependant, il reste théoriquement possible que la délétion du domaine Fbox change la conformation de la protéine SEL-10. J'ai également noté que la délétion de ce domaine n'induit pas la formation d'un phénotype négatif, comme supposé dans les études de Jager et de Wu (Jager et al., 2004; Wu et al., 2001).

Dans ces deux études, la protéine SEL-10 est tronquée et seuls les domaines WD40 persistent. Un test complémentaire pour étudier le potentiel lien entre SEL-10 et SKR-1 via ce domaine Fbox, serait d'exprimer une protéine de fusion SKR-1::SEL-10 Δ Fbox tronquée. Cette dernière devrait être capable de sauver le défaut de transdifférenciation du double mutant *sel-10 ; jmjd-3.1* si le rôle du domaine Fbox est bien essentiel à l'action de SEL-10.

La mutation ponctuelle du domaine Fbox est suffisante pour assurer la fonction de SEL-10 au sein de la transdifférenciation. Ce résultat montre que la mutation de la proline en alanine conservée au sein de la Fbox n'est pas suffisante pour permettre la perte de la fonction de SEL-10. Dans leur étude sur la protéine Fbox ACIF1, Harrold A. van den Burg *et al.*, ont réalisé une mutation ponctuelle P64A qui est similaire à celle réalisé sur SEL-10. Les auteurs ont montré que cette mutation était suffisante pour diminuer la fonction de la protéine (van den Burg et al., 2008). La prochaine étape permettant de réaliser l'analyse de la fonction du domaine Fbox serait de muter le résidu triptophane (W) en alanine (A).

Si cette mutation ponctuelle est toujours insuffisante pour permettre la perte de fonction de SEL-10, alors il serait possible de réaliser un construit au sein duquel les deux mutations seraient présentes simultanément.

L'expérience sur la localisation sub-cellulaire de SEL-10 est importante pour avoir une meilleure compréhension de sa fonction. Plusieurs mécanismes moléculaires peuvent modifier la localisation subcellulaire d'une protéine, notamment la phosphorylation. Mais l'ubiquitination et la dégradation de protéines ne sont pas rares dans le noyau. Cela permet probablement une dégradation plus rapide de certains facteurs cellulaires. Connaître la localisation subcellulaire pourrait donc donner un indice sur la fonction de SEL-10, si cette dernière peut être fonctionnelle dans le noyau. En effet, dans le cas contraire, il serait difficile de conclure en excluant un potentiel rôle de dégradation d'un facteur nucléaire car avant d'être ubiquitinée, une protéine doit être phosphorylée (Hunter, 2007).

L'expérience de localisation semble indiquer que SEL-10 est située dans le cytoplasme. D'après les résultats obtenus, une localisation purement nucléaire est probablement toxique. Notons que j'ai démontré sans ambiguïté que la fusion d'une protéine en C-terminal n'entravait pas la fonction de SEL-10. En parallèle l'utilisation du domaine PH n'est pas suffisante pour modifier la localisation cellulaire de SEL-10 en la concentrant au niveau de la membrane plasmique.

Une stratégie alternative serait de fusionner la protéine SEL-10 à la membrane plasmique en utilisant un domaine transmembranaire. Faire ceci ancrerait la protéine à la membrane, assurant que cette protéine ne soit jamais dans le noyau.

1.3. Le complexe SCF

Le complexe SCF est composé de 5 familles de protéines différentes. Les culines sont les protéines au coeur de la structure du complexe SCF. La famille des culines comporte 6 membres, elles sont la première pièce à laquelle vont se greffer deux protéines : RBX et SKR. Jusqu'à présent les études présentent les culines comme spécifiques à une fonction de l'ubiquitine. Cul-1 a été associée à la dégradation des protéines cibles par le protéasome (Aguilar and Wendland, 2003; Nelson et al., 2013). Mais il est fortement probable qu'une redondance de fonction existe entre les différentes protéines culines. Certaines peuvent être spécifiques à un tissu ou à un processus.

Les protéines RBX possèdent deux membres dans leur famille, la différence de fonction entre les deux protéines est méconnue (Kipreos, 2005).

Il y a 21 protéines dans la famille des SKR. La redondance de fonction entre différentes SKR est très probable, bien que des rôles spécifiques aient été décrits pour certaines (Kipreos, 2005). SKR-1 est la protéine liée à SEL-10 et CUL-1 (Killian et al., 2008; Nelson et al., 2013).

Les ubiquitines ligases E2 et E3, qui sont respectivement responsables de l'ubiquitination et de la reconnaissance spécifique de la protéine à ubiquitiner, représentent plus d'une centaine de protéines chez *C. elegans*.

Les protéines ubiquitine ligase E2 sont nombreuses et sont liées au type d'ubiquitination réalisée. Trouver l'ubiquitine ligase E2 impliquée dans la transdifférenciation avec SEL-10 pourrait se faire en réalisant un crible ARNi sur le mutant sensibilisé *jmjd-3.1*. Une approche intéressante pourrait passer par l'étude d'un mutant obtenu lors du crible de mutagenèse aléatoire et qui présente une mutation dans le gène *wdr-5.1*, mais le défaut de PDA observé dans cette souche est plus fort que celui du mutant nul *wdr-5.1*. Ceci suggère qu'il y a dans le fond génétique de ce mutant un autre gène impacté ; et parmi les gènes potentiellement mutés, il y a *uev-2*, une ubiquitine ligase E2.

1.4. L'implication du protéasome

Le protéasome est le complexe protéique responsable de la dégradation des protéines. Il est composé de deux parties principales et chacune d'elles est composée de sous unités protéiques. Le corps du protéasome est composé de 4 anneaux de 7 protéines. Il s'agit du protéasome 20S, capable de dégrader toutes les protéines, ubiquitinées ou non (Livnat-Levanon et al., 2014). Le protéasome 26S est légèrement différent et est exclusivement impliqué dans la reconnaissance et la dégradation de protéines ubiquitinées. Il est composé du protéasome 19S auquel s'ajoute un autre anneau de 7 protéines et le couvercle du protéasome (Papaevgeniou and Chondrogianni, 2014). Ce rôle de dégradation des protéines implique que le protéasome est indispensable pour la survie de la cellule. Il est nécessaire dans la quasi-totalité des processus cellulaires, et est essentiel pour la régulation de l'expression des gènes, en binôme avec les protéines ubiquitines ligases. Outre cet aspect régulateur, le protéasome est essentiel pour éviter les agglomérations de protéines qui induisent un stress cellulaire auquel seul le processus d'autophagie peut faire

face (Ciechanover and Kwon, 2015). Une fois que les protéines sont agglomérées, il est difficile pour le protéasome de les dégrader, car ce dernier a besoin de les dénaturer avant de cliver les protéines (Ciechanover and Kwon, 2015).

En règle générale, l'inactivation du protéasome est donc délétère pour la cellule. Cependant, dans cette étude, j'ai démontré que les sous-unités *pbs-5* et *rpn-10* sont capables de supprimer le défaut du simple mutant *jmjd-3.1*. Ce qui signifie que la perte partielle de l'activité du protéasome est bénéfique pour le processus de transdifférenciation. A notre grande surprise, le protéasome semble donc ne pas avoir de rôle essentiel pour supprimer l'identité épithéliale au cours de la transdifférenciation, mais un rôle dans l'inhibition de ce changement d'identité.

Il est important de noter ici que les deux ARNi réalisés sur les gènes *rpn-10* et *pbs-5* ont présenté divers phénotypes. La diminution de l'expression de *pbs-5* a induit un fort taux de létalité embryonnaire et de défaut de fertilité. Ces défauts ont été observés mais pas quantifiés. Dans la littérature, ces effets de létalité sont retrouvés (Finley et al., 2012; Papaevgeniou and Chondrogianni, 2014), ce qui confirme la spécificité de l'ARNi de *pbs-5*.

La diminution de *rpn-10* par ARNi semble induire une plus grande fertilité des mutants *jmjd-3.1* et, comme précédemment, ce phénotype n'a pas été quantifié, juste remarqué. De plus amples études seront importantes pour comprendre l'effet de la diminution de ce gène sur le ver. Cependant, la littérature indique que la diminution et l'absence de *rpn-10* provoque une augmentation de la quantité de protéines ubiquitinées (Keith et al., 2016). Une souche permet de visualiser par fluorescence les protéines d'ubiquitine sans entraver la dégradation des protéines auxquelles elles sont liées (Keith et al., 2016). Ceci permet de suivre la quantité de protéines ubiquitinées dans les cellules et ainsi quantifier la capacité du protéasome pour dégrader les protéines ubiquitinées. Dans notre étude, réaliser cette expérience permettrait de quantifier le pourcentage de protéines ubiquitinées qui ne sont plus dégradées en absence de *rpn-10* fonctionnel. Cette analyse permettrait de quantifier l'impact potentiel du protéasome dysfonctionnel au sein de la transdifférenciation. Cela permettra également de savoir si la voie de l'autophagie a pris le relais sur le protéasome pour assurer la fonction de dégradation des protéines, expliquant potentiellement pourquoi la cellule Y parvient à se transdifférencier en absence de *rpn-10* et de *jmjd-3.1*. En effet, en absence de protéasome fonctionnel, une augmentation des protéines ubiquitinées devrait s'apparenter à un stress cellulaire. Le défaut de

transdifférenciation aurait donc dû augmenter dans le double mutant *rpn-10 ; jmjd-3.1* en comparaison au mutant simple *jmjd-3.1*.

Puisque *jmjd-3.1* a un effet positif sur la transdifférenciation et que *rpn-10* supprime le défaut du mutant de la modificatrice d'histone, on en déduit que le protéasome a un rôle de répresseur de la transdifférenciation. Cet effet ne peut se traduire que par la dégradation, par le protéasome, d'une ou plusieurs protéines qui ont un effet global d'activateur de la transdifférenciation. Lorsque le protéasome est diminué, la protéine n'est pas dégradée (ou moins), ce qui assure la transdifférenciation malgré l'absence de *jmjd-3.1* (figure 63). Cet effet est représentatif de l'action du protéasome au sein de la transdifférenciation car l'inhibition de *pbs-5* induit un effet similaire.

L'hypothèse la plus probable serait que la protéine ayant cette fonction d'activateur de la transcription, et dégradée par le protéasome, est un facteur de transcription. Ce dernier aurait pour rôle d'induire l'expression d'un gène, et est suffisant pour le faire même sans le soutien d'une modification d'histone (King and Klose, 2017). Chez *C. elegans*, l'identité cellulaire est très fortement contrôlée. Très peu de cellules changent d'identité, ce qui se traduit par une probable régulation précise des facteurs de transcription impliqués dans le changement d'identité (Becker and Jarriault, 2016).

Cette hypothèse est résumée dans la figure suivante :

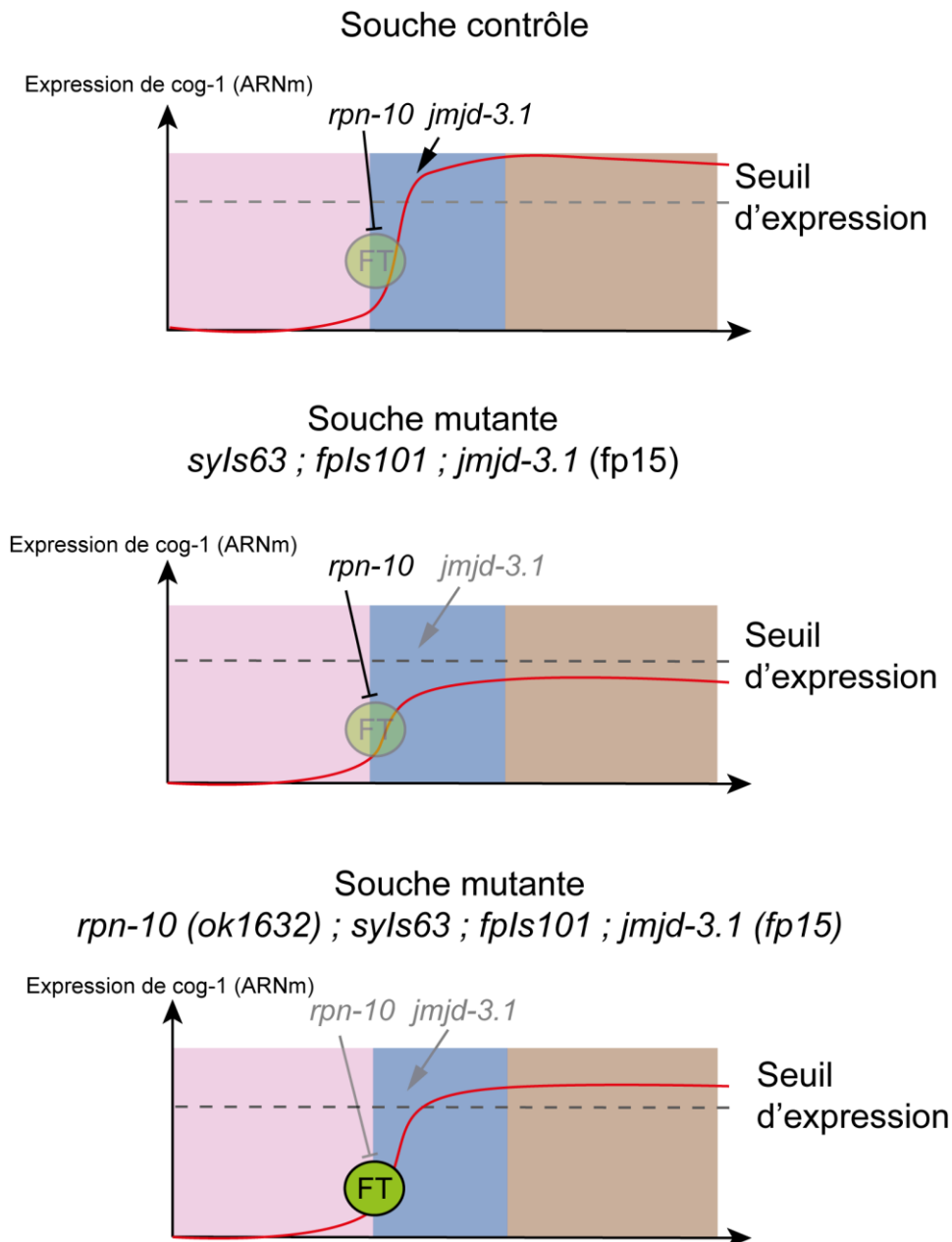


Figure 63 : schéma de l'hypothèse expliquant comment l'inhibition du protéasome induit un sauvetage de phénotype de *jmjd-3.1*. En rose est représentée la phase de l'initiation de la transdifférenciation. En bleu la redifférenciation et en marron la persistance de l'identité de PDA. La courbe rouge représente de taux d'expression de *cog-1* au cours de la transdifférenciation. FT : facteur de transcription. Il est inhibé par le protéasome (*rpn-10*) alors que *jmjd-3.1* assure le maintien de l'expression de *cog-1* au-dessus d'un certain niveau. Il s'agit du seuil d'expression hypothétique au-dessus duquel l'expression de COG-1::GFP est visible dans 100% des vers.

Les courbes représentant le niveau d'expression de *cog-1* dans les conditions contrôles et simple mutantes *jmjd-3.1* sont issues des conclusions obtenues grâce au smFISH et ne seront discutées que plus tard. Cependant, la courbe représentant l'expression de *cog-1* au sein du double mutant *rpn-10 ; jmjd-3.1* est hypothétique. Il faudrait réaliser

une expérience de smFISH sur les souches *rpn-10* simple mutant et sur le double mutant pour vérifier cette hypothèse.

Non seulement le nombre de vers présentant une absence de PDA est moindre dans le double mutant *rpn-10 ; jmjd-3.1* (grâce à la suppression du défaut de *jmjd-3.1*), mais le nombre de PDA mal formés ou présentant peu de protéines COG-1::GFP est également diminué. Ces indications sont en faveur de l'hypothèse présentée ci-dessus.

Le double mutant *rpn-10 ; sel-10* présente une légère tendance à la diminution du défaut de SEL-10. Cependant, parmi les différents phénotypes observés, la présence de deux PDA, dans un très faible pourcentage (1-2%) des vers, est intéressante. Ce phénotype a déjà été précédemment observé au sein du laboratoire (Thomas Daniele, en cours de révision) dans le mutant *lin-12(gf)* (gain de fonction). C'est-à-dire que lorsque *lin-12/NOTCH* est exprimé de manière constitutive, la future cellule DA9 se détourne de son destin cellulaire pour devenir un PDA surnuméraire.

SEL-10 est impliquée dans la reconnaissance et la dégradation de LIN-12/NOTCH (partie intra cellulaire) lors de la formation de la vulve chez le ver, mais la mutation simple de *sel-10* ne permet pas d'observer l'effet d'une transcription trop longue de *lin-12*. Je n'ai jamais observé de phénotype « deux PDA » dans le simple mutant *sel-10*. La mutation de *rpn-10* est donc nécessaire pour permettre l'apparition de ce phénotype. Ceci indique qu'une autre protéine aurait ce rôle de régulation au sein de la transdifférenciation. Cependant, la mutation simple de *rpn-10* ne permet pas d'observer deux PDA, ce qui indique que les deux gènes sont partiellement impliqués dans la formation d'un PDA surnuméraire et par conséquent la potentielle régulation de *lin-12/NOCTH*.

Le triple mutant *rpn-10 ; sel-10 ; jmjd-3.1* est léthal. Ainsi, aucune observation n'a pu être réalisée. Mais par ARNi, le défaut de PDA diminue indiquant que la diminution de *rpn-10* au sein du double mutant est suffisante pour supprimer partiellement le défaut de transdifférenciation.

2. La robustesse du processus de transdifférenciation

La robustesse du processus avait été mise en évidence précédemment au sein du laboratoire. Steven Zuryn a notamment mis en évidence le rôle de *jmjd-3.1* et *wdr-5.1* pour assurer la robustesse du mécanisme (Zuryn et al., 2014).

J'ai donc voulu étudier quelle était l'implication de *sel-10* dans la robustesse de la transdifférenciation. J'ai testé le stress lié à la température et celui lié à l'absence de nourriture, avec Sarah Becker.

Le stress de température induit une déstabilisation de la forme des protéines, qui perdent leur conformation. De cette dernière dépend leur fonction, mais également la santé de la cellule. Les protéines instables ont tendance à s'agglomérer, rendant impossible leur dégradation par le protéasome. Le mécanisme de l'autophagie prend alors le relais pour permettre la dégradation de ces agglomérats (Ciechanover and Kwon, 2015). Le mécanisme d'autophagie est également essentiel pour la survie du ver en condition d'absence de nourriture.

Un stress modéré de température est suffisant pour obtenir une information sur le potentiel rôle d'un gène dans la robustesse de la Td (Zuryn et al., 2014). L'augmentation du défaut de PDA est observée, à la fois dans les mutants *sel-10* et *jmjd-3.1* ainsi que dans le double mutant *sel-10 ; jmjd-3.1*.

L'absence de nourriture induit également une augmentation du défaut de PDA dans les trois mutants *sel-10*, *jmjd-3.1* et *sel-10 ; jmjd-3.1*. Cette augmentation traduit un rôle de *sel-10* et *jmjd-3.1* dans la robustesse de la Td face à la suppression de nourriture. Ceci implique un rôle positif de ces deux gènes sur la robustesse du processus.

Sarah Becker a également testé l'effet des deux stress cumulés. De manière surprenante, le simple mutant *jmjd-3.1* et le double mutant *sel-10 ; jmjd-3.1* présentent une augmentation du défaut de PDA, traduisant leur implication dans la robustesse du processus.

Cette observation indique que les voies de réponse au stress de température (mTor, p53, hsp, ... (Yoshihara et al., 2013)) et celle de réponse à l'absence de nourriture (voie de l'insuline, mTor, ... (Vander Haar et al., 2007)) activent deux voies différentes et ces voies impliquent toutes deux l'activité de *jmjd-3.1* pour assurer la robustesse du processus.

Mais le simple mutant *sel-10* ne présente pas d'augmentation du défaut de PDA entre la condition normale et la condition de double stress. Alors que séparément, ces deux stress augmentent le défaut de PDA au sein du mutant *sel-10*, démontrant son implication dans la réponse aux stress et la robustesse de la transdifférenciation. Il est à remarquer que FBW7/SEL-10 est impliquée dans la dégradation de p53 et mTor (Akhoondi et al., 2007; Crusio et al., 2010).

Ceci indique qu'une potentielle voie alternative s'est activée dans cette condition et a été capable de limiter le rôle de *sel-10* au sein de la robustesse de la transdifférenciation dans la condition de stress double. Cependant, cette voie n'est pas activée ou suffisante pour supprimer l'augmentation du défaut de PDA dans le double mutant *sel-10 ; jmjd-3.1*. De plus cette suppression n'est pas visible dans le simple mutant *jmjd-3.1* ce qui semble indiquer que la modificatrice d'histone est probablement impliquée dans l'activation de cette voie.

3. Etude de l'expression des gènes impliqués dans l'initiation du processus de transdifférenciation

Les gènes *sel-10* et *wdr-5.1* sont tous deux des gènes de classe III. Ils sont donc à la fois impliqués dans l'initiation de la transdifférenciation et dans la redifférenciation. De plus, ces deux gènes présentent une synergie qui augmente le défaut de PDA dans les doubles mutants lors de l'initiation de la transdifférenciation. Ce fait indique qu'ils agissent sur une cible ou un processus commun et que ce dernier est impliqué dans le début du changement d'identité cellulaire. Puisque *wdr-5.1* est impliqué dans la modification d'histones et donc l'expression des gènes, nous avons voulu savoir comment la mutation de *wdr-5.1* agissait sur 3 gènes tout particulièrement importants pour l'initiation de la transdifférenciation et l'identité épithéliale : *sox-2*, *ceh-6* et *hlh-16*.

Les deux premiers gènes sont exprimés dans les six cellules rectales et la mutation du gène *sox-2* ou du gène *ceh-6* induit un fort défaut de PDA (Kagias et al., 2012). Ces

gènes sont donc essentiels pour assurer la plasticité de la cellule Y lors de la transdifférenciation. Le gène *hlh-16* est le seul gène exprimé uniquement dans la cellule Y lors du stade larvaire L1 (MC. Morin & S.Jarriault non publié). Il s'agit d'un facteur de transcription qui est également présent dans certaines cellules neuronales de la tête du ver.

Ces gènes ont été choisis car ils étaient déjà connus au sein du laboratoire. Leurs effets sur la transdifférenciation ont déjà été quantifiés. Ces deux gènes sont conservés au sein de l'évolution (Kagias et al., 2012) ce qui permettra de potentiellement transposer les résultats obtenus à d'autres modèles d'étude, ou au moins proposer des expériences qui permettraient de vérifier si les mécanismes liés à la régulation de leur expression sont conservés.

Lors de cette expérience, le niveau d'expression de ces trois gènes (*ceh-6*, *sox-2* et *hlh-16*) a été testée sur les deux simples mutants *sel-10* et *wdr-5.1*. En effet, les simples mutants sont suffisants pour comprendre le rôle des mutants sur l'expression de ces gènes, le double mutant présente une forte létalité à 25°C, ne permettant pas de faire cette étude avec ce mutant. Plusieurs critères sont recherchés dans cette expérience. Dans un premier temps : démontrer que la mutation de *wdr-5.1* est effectivement impliquée dans l'expression des gènes. Dans un deuxième temps, savoir si *sel-10* joue un rôle au niveau de l'expression des gènes ou si son action se situe exclusivement à un autre niveau. Dans un troisième et dernier temps, nous voulions également savoir si ces deux gènes agissent de manière générale sur l'expression des gènes, ou si leur action est restreinte à l'expression de quelques gènes spécifiques. L'approche du smFISH a été réalisée car cette méthode est déjà en place sur le modèle de *C. elegans*, assurant de bonnes conditions pour la mettre en place au sein de notre laboratoire. Elle permet une quantification précise de la quantité d'ARN messager au niveau d'une cellule unique. Bien que cette technique ne puisse être réalisée que sur du matériel biologique fixé, le modèle du ver permet une synchronisation de la population qui permet de limiter ce défaut.

Les expériences réalisées démontrent que *wdr-5.1* est impliqué dans l'expression de *ceh-6* et *hlh-16*. Il ne semble pas agir de manière significative sur l'expression de *sox-2*. Cependant une tendance à la diminution de son expression est visible. Ce qui démontre que *wdr-5.1* est effectivement impliqué dans l'expression des gènes. Ce résultat corréle à des résultats précédents obtenus par S. Zuryn, où l'expression dans Y d'une forme mutée de la lysine 4 de l'histone H3 entraînait des défauts de transdifférenciation (Zuryn et al.,

2014). Dans son étude, S. Zuryn montre que le défaut de PDA visible au sein de *wdr-5.1* a lieu en partie lors de la dédifférenciation et c'est ce type de défaut qui est fortement augmenté au sein du double mutant *wdr-5.1 ; sel-10*. On peut supposer que l'action de *wdr-5.1* est globale sur les principaux gènes impliqués dans la fin de l'initiation et la dédifférenciation. Cependant, le smFISH sur *sox-2* devrait être reproduit afin de confirmer ces résultats.

D'après les résultats obtenus, le gène *sel-10* semble uniquement impacter l'expression de *ceh-6*. La mutation de l'ubiquitine ligase induit une diminution de l'expression de ce gène. Ce dernier étant essentiel pour l'initiation du processus, cela pourrait expliquer l'important défaut de classe I observé dans le double mutant *wdr-5.1 ; sel-10*. Cependant, seule l'expérience de smFISH sur cette souche permettrait d'assurer avec certitude que la diminution de formation de PDA est due à la répression de ce gène.

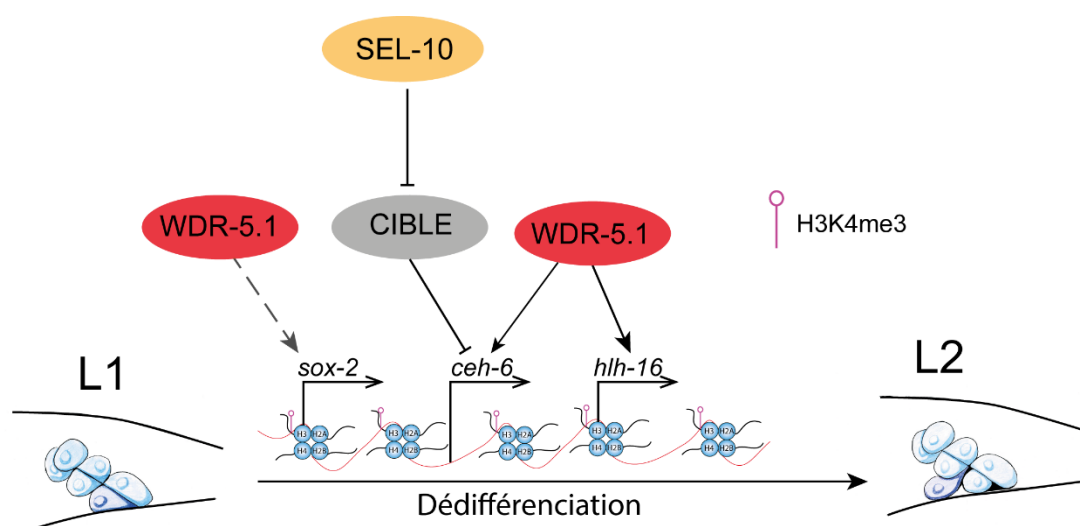


Figure 64 : schéma récapitulatif de l'action de *sel-10* et *wdr-5.1* sur l'expression des gènes étudiés lors de la dédifférenciation (*ceh-6*, *sox-2* et *hhl-16*). La flèche en pointillé indique que le gène montre une tendance positive sur l'expression de ce gène. Les flèches pleines montre que le gène a une action positive sur l'expression du gène alors que la barre indique une action négative sur l'élément indiqué. L'absence d'indication signifie que le gène n'a pas d'action connu sur l'expression.

Pour conclure, cette expérience semble indiquer que l'expression de *wdr-5* est essentielle pour l'expression générale des gènes impliqués dans le début de la transdifférenciation, alors que *sel-10* semble présenter une action plus spécifique.

4. Etude de l'expression des gènes impliqués dans la redifférenciation

Un smFISH a de nouveau été effectué afin de mettre en évidence le potentiel effet des mutations de modificatrices d'histones et de l'ubiquitine ligase E3 SEL-10 sur l'expression de gènes spécifiques lors de la redifférenciation.

4 gènes ont principalement été étudiés : *cog-1*, *unc-3*, *unc-33* et *rimb-1*.

cog-1 est le marqueur actuellement utilisé au sein de notre laboratoire. Il n'est pas directement impliqué dans la transdifférenciation, mais son expression est fortement diminuée lorsque celle d'autres gènes impliqués dans la transdifférenciation ou l'identité neuronale est modifiée de manière anormale.

unc-3 est l'un des seuls gènes essentiels à la redifférenciation. UNC-3 est un facteur de transcription impliqué dans un certain nombre de processus cellulaires et essentiellement pour la différenciation en neurone. Dans son étude, Steven Zuryn propose que UNC-3 et JMJD-3.1, qui interagissent physiquement, forment un complexe assurant l'expression des gènes en aval de UNC-3 (Wang et al., 2015; Zuryn et al., 2014). Ce facteur de transcription induit l'identité motoneurone chez *C. elegans*. En son absence, environ 80% de la population présente un défaut de PDA (la cellule Y étant bloquée alors dans l'étape « Y.1 », qui ressemblerait à une cellule neural précoce, type progéniteur). De plus, d'autres motoneurones tels que VA12 sont également touchés (Wang et al., 2015).

Les gènes *rimb-1* et *unc-33* ont été testés en tant que contrôles de l'identité neuronale. Ils sont tous deux impliqués dans les dernières étapes de la neurogénèse de motoneurones. *unc-33* est cependant nécessaire de manière précoce, juste après *cog-1*. Il est exprimé tout au long de la redifférenciation, et persistant. *rimb-1* est quant à lui un marqueur terminal de l'identité neuronale.

Plusieurs problématiques ont été abordées lors de cette étude sur l'étape de redifférenciation. Dans un premier temps, l'expression de *cog-1* a été observée au cours du temps afin de connaître le schéma d'expression de ce gène au cours de la redifférenciation, dans la souche contrôle et le mutant *jmjd-3.1*. Ces deux souches sont celles qui ont été le plus étudiées, car connaître l'effet de l'absence de JMJD-3.1 sur l'expression de gènes au cours du temps est essentiel pour comprendre comment l'épigénétique impacte la

transdifférenciation. Cette étude n'a pas été réalisée sur *wdr-5.1* car ce mutant présente d'important troubles de fécondité et de létalité, rendant difficile la réalisation de plusieurs smFISH synchronisés en parallèle. De plus, l'étude de Steven Zuryn indique que ces deux modificatrices d'histones ont des fonctions similaires sur le changement d'identité cellulaire.

Les résultats sur l'expression de *cog-1* au cours du temps indique qu'elle est initiée lors du début de la redifférenciation, puis reste stable tout au long du processus et au cours de la vie du ver (testé jusqu'à la fin du stade larvaire L4).

Le motif d'expression de *cog-1* dans le mutant *jmjd-3.1* permettra de comprendre comment cette dernière agit sur la transdifférenciation. Il est important de comprendre comment l'absence de certaines marques épigénétiques influe sur la régulation de l'expression des gènes cibles. Car mettre en évidence le rôle de modificatrices d'histones permet de comprendre leur implication sur l'identité cellulaire et la plasticité cellulaire. Différentes hypothèses sont envisageables pour expliquer la pénétrance du mutant *jmjd-3.1* et l'effet de ce gène sur la transdifférenciation.

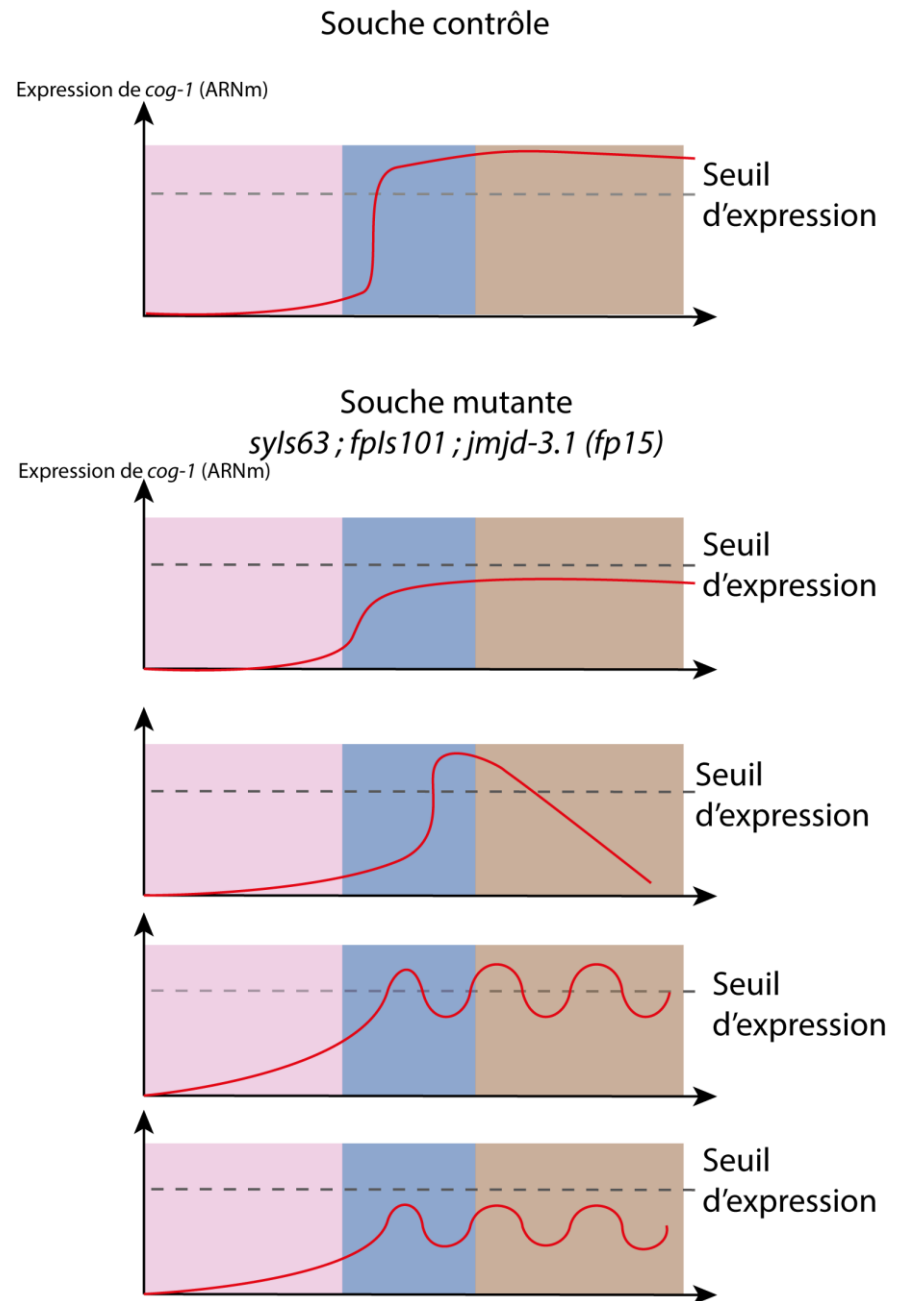


Figure 65 : schéma des hypothèses concernant le motif de l'expression de *cog-1* au sein du mutant *jmjd-3.1*. En rose est représentée la phase de l'initiation de la transdifférenciation. En bleu, la redifférenciation et en marron la persistance de l'identité de PDA. La courbe rouge représente de taux d'expression de *cog-1* au cours de la transdifférenciation. Le seuil d'expression correspond à l'expression hypothétique au-delà de laquelle la transdifférenciation a lieu dans 100% des vers, en prenant l'expression du gène *cog-1* comme modèle. Car la transdifférenciation est observée par le biais de l'expression COG-1::GFP. Les différents graphiques représentent les différentes hypothèses expliquant le défaut de PDA observé dans les mutants *jmjd-3.1*: une expression stable, mais faible, une expression instable au cours du temps, une expression variable ou une expression variable et faible.

Dans le mutant simple *jmjd-3.1* j'ai observé une expression de *cog-1* diminuée en comparaison de la souche contrôle. Cette expression reste relativement stable lors du

processus et ensuite, la seule variation observée à lieu pendant la fin de la redifférenciation. Il est néanmoins possible que la diminution observée lors de la quantification au stade L3 soit aberrante. Cette dernière hypothèse est envisageable car le marquage a pu être biaisé par un faible nombre de vers, la sonde ne pénétrant pas correctement dans le corps des vers qui restent partiellement collés à la paroi du tube.

L'expression de *cog-1* est-elle plus variable dans le mutant *jmjd-3.1* ?

L'hypothèse concernant la variation de l'expression de *cog-1* peut être envisageable, mais la fenêtre de synchronicité des vers est probablement trop grande pour avoir une valeur aussi précise. Dans le cas d'une telle hypothèse, on s'attendrait à avoir une multitude de valeurs s'étalant sur une plus large fourchette que celle observée chez les individus contrôle. Ces deux éléments mis ensemble nous permettent de supposer que l'expression de *cog-1* dans le simple mutant *jmjd-3.1* est probablement stable. Pour le confirmer, il faudrait répéter l'expérience de smFISH lors de la fin de la redifférenciation.

Les mutants, *sel-10* et *wdr-5.1*, ainsi que le double mutant *sel-10 ; jmjd-3.1* présentent une forte diminution de l'expression de *cog-1* à 25° C à tous les instants de la transdifférenciation testés. Pour confirmer cette hypothèse avec certitude, il faudrait réaliser le smFISH à d'autres moments du processus. A 20°C, la mutation du gène *wdr-5.1* semble entrainer une diminution de l'expression de *cog-1* plus faible qu'à 25°C, ce qui corrèle avec la pénétrance croissante du défaut de PDA dans les mutants *wdr-5.1* à 25°C.

Cette diminution de l'expression observée dans le simple mutant *sel-10* est plus inattendue, considérant le défaut de PDA observé dans ces conditions de stress. Il y a en règle générale une corrélation entre le niveau d'expression en ARNm (transcription) et de protéines (traduction). Ici, le niveau d'ARNm est très bas, similaire à celui du double mutant *sel-10 ; jmjd-3.1*, alors que ce dernier présente un défaut de PDA (protéine COG-1::GFP) de 90%. En revanche, le simple mutant *sel-10* ne présente que 30% de défaut de PDA. Cette différence entre la quantité d'ARNm observée et de protéine peut s'expliquer par une action inattendue au niveau de la traduction de ces ARNm qu'il resterait à investiguer.

Ces conclusions peuvent être résumées par le schéma suivant :

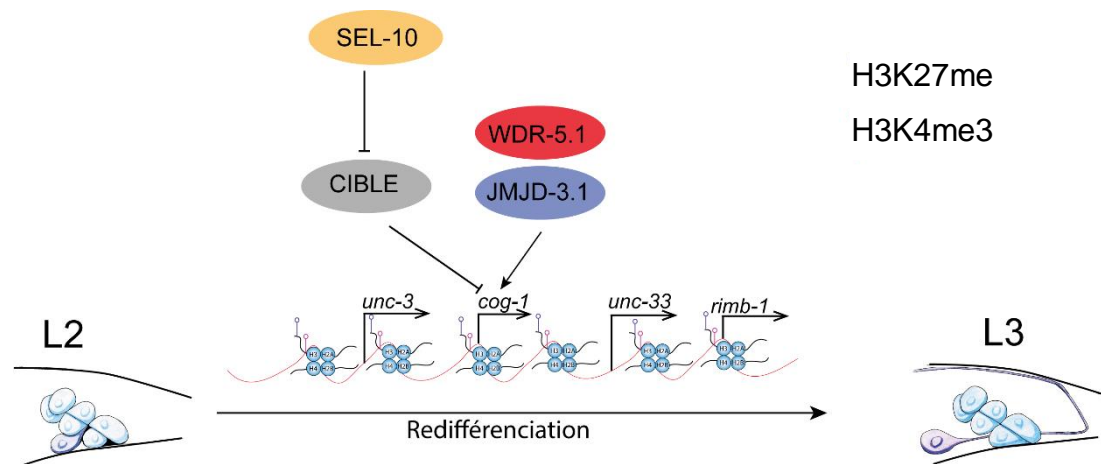


Figure 66 : schéma du rôle des différents gènes étudiés sur l'expression de *cog-1* lors de la redifférenciation.

L'expression des gènes *unc-3* et *unc-33* n'est pas modifiée, dans les mutants *sel-10*, *jmjd-3.1* ou *wdr-5.1*. La double mutation *sel-10 ; jmjd-3.1* est également sans effet sur l'expression des gènes *unc-3* et *unc-33*. Le fait que l'expression de *unc-3* ne soit pas modifiée indique que ce gène est en amont des autres dans la voie menant au changement d'identité. Une autre hypothèse serait que les gènes étudiés (*sel-10*, *jmjd-3.1* et *wdr-5.1*) appartiennent à une voie de signalisation parallèle. Cependant, l'hypothèse avancée dans l'étude de Steven Zuryn (Zuryn et al., 2014) est que JMJD-3.1 forme un complexe avec UNC-3. Cette hypothèse est issue d'études génétiques et phénotypiques de *unc-3* et *jmjd-3.1* au cours de la transdifférenciation. Ce complexe assurerait la transcription des autres gènes en aval. Les résultats que j'ai obtenus confirment cette hypothèse.

Il est tout de même à noter que la mutation *jmjd-3.1* montre une tendance à augmenter l'expression de *unc-33* lors du milieu de la redifférenciation. Cette tendance ne se retrouve pas dans le double mutant *sel-10 ; jmjd-3.1*, indiquant un rôle plus général de *jmjd-3.1* sur la transcription de différents gènes.

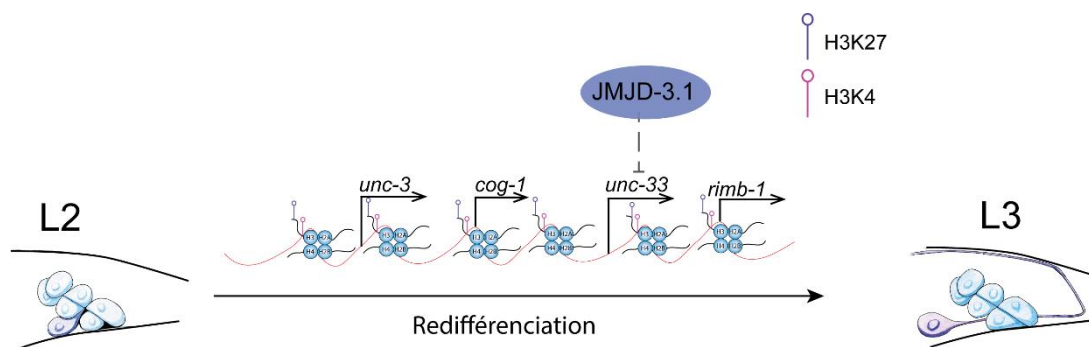


Figure 67 : résumé des conclusions sur l'effet des différents mutants (*sel-10*, *wdr-5.1* et *jmjd-3.1*) sur l'expression de *unc-3* et *unc-33*. Toute absence d'information indique qu'il n'y a pas d'effet des mutants sur ces gènes. Les pointillés indiquent une tendance de l'effet de *jmjd-3.1* sur l'expression de *unc-33*.

Le dernier gène dont l'expression a été testée est *rimb-1*. L'effet des simples mutants *sel-10* et *jmjd-3.1*, ainsi que le double mutant *sel-10 ; jmjd-3.1* ont été étudiés. Seule la mutation simple de *jmjd-3.1* impacte l'expression de *rimb-1* en l'augmentant. Dans le double mutant *sel-10 ; jmjd-3.1* et le simple mutant *sel-10*, l'expression de *rimb-1* est similaire à celle présente dans la souche contrôle *syIs63 ; fpIs101*.

L'augmentation de l'expression de *rimb-1* dans le mutant *jmjd-3.1* indique que cette modificateur d'histone a un rôle négatif sur l'expression de *rimb-1*. On pourrait supposer que l'action de la modificateur n'est pas exclusivement liée à l'expression positive des gènes. Mais aucune preuve dans la littérature ou les précédents résultats ne laisse présager d'un tel effet de *jmjd-3.1* sur la régulation de l'expression des gènes (Zuryn et al., 2014). Cette surprenante augmentation de l'expression de *rimb-1* peut donc laisser supposer que *jmjd-3.1* agit sur d'autres gènes (au moins un) et que ces derniers sont impliqués dans la répression de *rimb-1*. Cependant, démontrer une telle hypothèse reste quelque chose de très compliqué. Les gènes potentiellement impliqués, et dont l'expression serait modifiée, sont inconnus. Il faudrait mettre en place une expérience permettant de tester l'expression spécifique de plusieurs gènes, voir du génome entier afin de démontrer cette hypothèse. Une telle étude du transcriptome au sein de la cellule entière serait difficile et le smFISH ne peut être réalisé que sur des gènes ciblés. Or, les gènes impliqués dans la répression de la transdifférenciation sont difficiles à mettre en évidence. Le crible de mutagenèse aléatoire précédemment réalisé au laboratoire ne peut mettre en évidence que des gènes ayant un rôle positif dans la transdifférenciation. Le but de ce test était de mettre en évidence des mutants présentant une absence de PDA.

Le mutant *wdr-5.1* n'a pas encore été testé pour connaître le rôle de ce gène sur l'expression de *rimb-1*. Cette analyse est en cours et indiquera si *wdr-5.1* a un effet similaire à celui de *jmjd-3.1*. Cette expérience permettra de savoir si le rôle des protéines liées à l'épigénétique, au sein de la transdifférenciation, induisent le même motif d'expression de *rimb-1*. Cette information sera importante pour conclure sur l'identité terminale de la cellule Y/PDA dans ces mutants.

L'action de *jmjd-3.1* et *sel-10* sur l'expression de *rimb-1* a été schématisée dans la figure suivante :

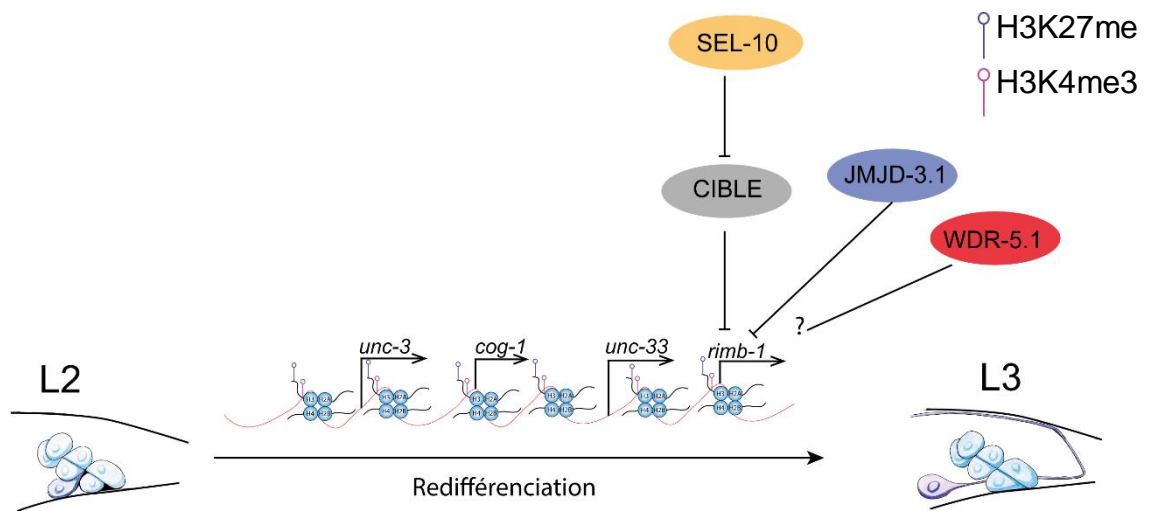


Figure 68 : résumé des conclusions sur l'effet des différents mutants (*sel-10*, *wdr-5.1* et *jmjd-3.1*) sur l'expression du gène *rimb-1*. Le point d'interrogation indique que le gène *wdr-5.1* n'a pas été testé pour ce gène.

Ainsi, l'effet des gènes sur la redifférenciation peut être résumé comme dans la figure suivante :

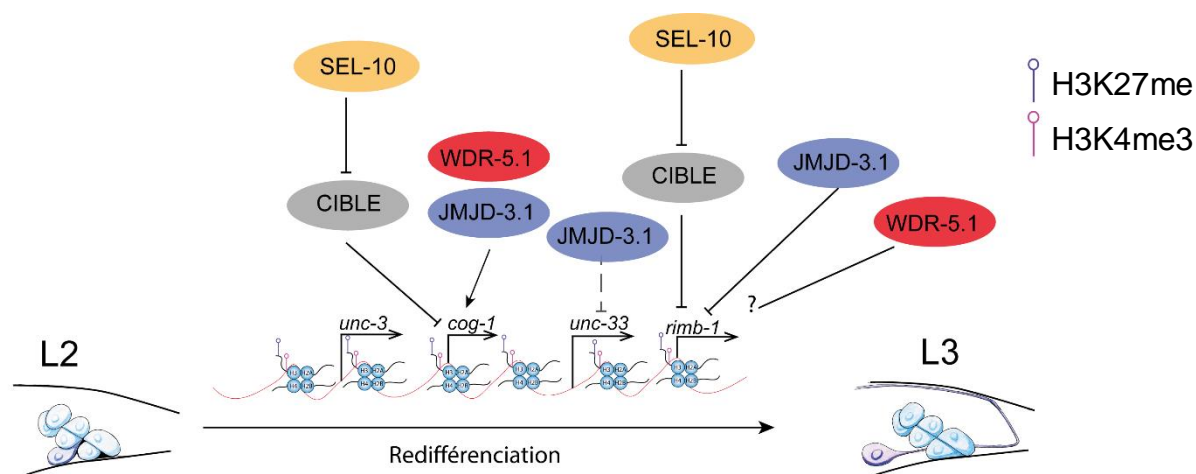


Figure 69 : résumé des effets de *sel-10*, *jmjd-3.1* et *wdr-5.1* sur la redifférenciation et tout particulièrement sur l'expression de *unc-3*, *cog-1*, *unc-33* et *rimb-1*. L'absence d'indication signifie que les gènes testés ne présentent pas d'effet sur la transcription. Le point d'interrogation indique que l'expérience n'a pas encore été faite, résultat à venir. Les pointillés indiquent une tendance à un effet, ici, *jmjd-3.1* a une tendance pour l'inhibition du gène *unc-33*.

La présence ou l'absence de PDA a, pendant toute cette étude, été déterminée en utilisant le marqueur *syIs63 [cog-1p::cog-1::gfp]*, en se basant sur l'observation de la fluorescence. L'expression de *cog-1* est un marqueur sensible des perturbations de l'identité de PDA et donc des gènes impliqués dans la transdifférenciation. L'expression de *rimb-1* et *unc-33* dans les mutants testés permet de mettre en évidence que la neurogénèse et la transdifférenciation se sont poursuivies malgré la diminution ou l'absence de *cog-1*. Ce qui avait déjà été établi auparavant, et c'est pour cette raison que le crible de mutagenèse a été réalisé en utilisant ce marqueur (Jarriault et al., 2008). Ce qui indique que dans les quantifications d'absence de PDA, le motoneurone était probablement juste invisible car *cog-1* était inhibé dans les souches mutantes.

Au cours de ma thèse, des observations ont pu confirmer cette hypothèse. Lors des expériences de sauvetage de phénotype, exprimant la protéine de fusion mCherry::SEL-10, l'expression de cette protéine persistait dans PDA dans quelques rares cas, et permettait de le visualiser alors qu'il n'exprimait pas de GFP.

De prime abord, on pourrait supposer que l'action de *jmjd-3.1*, *wdr-5.1* et *sel-10* n'a pas de réel effet sur la transdifférenciation et l'identité neuronale. Cependant, même si *rimb-1* et *unc-33* semblent être exprimés, aucune indication n'est donnée sur la réelle fonction de PDA et par conséquent son identité terminale. De plus, le fait que l'expression de *cog-1* soit diminuée dans tous les mutants et que l'expression de *rimb-1* soit augmentée

dans le simple mutant *jmjd-3.1* indique que même si cette identité terminale était correcte, l'effet de ces gènes a un impact sur le transcriptome lors de la redifférenciation.

Tester la fonction de PDA est donc une des étapes potentiellement clé pour conclure sur l'identité de la cellule au sein des différents mutants. Nous savons que PDA est probablement un motoneurone de par sa structure (Jarriault et al., 2008) et certains gènes qu'il exprime (Richard et al., 2011). Cependant la fonction d'un neurone peut être testée sans connaître la fonction précise de ce dernier. Le patch clamp permet de vérifier la fonctionnalité d'un neurone en s'assurant que son profil d'activité électrique est cohérent avec celui d'un neurone fonctionnel (Richmond and Jorgensen, 1999). La cartographie de l'axone est également une piste potentielle pour savoir si le neurone est fonctionnel. Ce point est particulièrement intéressant lorsque l'on sait qu'une certaine proportion des vers mutants *sel-10* ou *jmjd-3.1* observés présentent un axone aberrant (deux axones, axone dirigé antérieurement, axone faisant des boucles dans la queue du ver).

De plus, lors de l'initiation de la transdifférenciation, un effet de *sel-10* et *wdr-5.1* a été mis en évidence sur l'expression de *ceh-6*. *hlh-16* est également diminué dans le mutant *wdr-5.1*.

Au cours de cette étude, j'ai mis en évidence un rôle de suppresseur du défaut du mutant *jmjd-3.1*. Il est possible de regrouper tous les résultats obtenus sur la figure suivante :

Conclusions générales et perspectives

Au cours de ce projet, j'ai étudié le rôle de l'ubiquitination et son lien avec l'épigénétique au sein d'un événement de transdifférenciation naturel.

J'ai pris la suite de l'étude préliminaire effectuée par Steven Zuryn, sur l'ubiquitine ligase E3, SEL-10. J'ai cherché à caractériser son rôle au sein de la transdifférenciation via sa fonction moléculaire, sa potentielle implication sur la robustesse de l'évènement et pour finir son rôle sur la transcription de gènes choisis.

J'ai étudié la potentielle implication du domaine Fbox de la protéine SEL-10 au cours de la transdifférenciation. J'ai montré l'importance de ce domaine pour la fonctionnalité de SEL-10. En effet, la délétion de ce domaine tue l'activité de la protéine. De plus, la fonction de SEL-10 est vraisemblablement cytoplasmique.

En étudiant les différents SKR, j'ai mis en évidence qu'une diminution de l'expression des SKR-1 et SKR-5 supprimait le défaut de PDA induit par la mutation de *jmjd-3.1*. Ces résultats ont mis en évidence un potentiel rôle de la voie de dégradation des protéines dans la suppression du défaut. L'inhibition du protéasome a confirmé l'implication du système ub-protéasome au sein de la Td. La voie de dégradation des protéines a un rôle d'inhibiteur du changement de l'identité cellulaire. Mon hypothèse est que la voie de dégradation ubiquitine-protéasome est impliquée dans la régulation de facteurs de transcription ayant un rôle majoritairement positif sur la transdifférenciation. De plus amples études seront nécessaires pour comprendre les interactions exactes du protéasome et confirmer ou infirmer mon hypothèse. En parallèle, le rôle de *wdr-5.1* semble être d'assurer l'expression de nombreux facteurs de transcription importants pour permettre l'étape de dédifférenciation et celui de *jmjd-3.1* d'assurer l'expression des gènes cibles de ces derniers facteurs de transcription.

Mes résultats sur l'effet des stress de température et de famine ont démontré que SEL-10 est impliquée dans l'efficacité et la robustesse du processus de transdifférenciation. Cette sensibilité des mutants *sel-10* au stress est également retrouvée dans les mutants *wdr-5.1* et *jmjd-3.1*. Cela m'a amené à examiner si *sel-10* pouvait impacter tout ou partie du programme d'expression des différentes étapes de la transdifférenciation. J'ai donc étudié l'impact de l'ubiquitine ligase SEL-10 et des modificatrices d'histones *wdr-5.1* et *jmjd-3.1* sur l'expression des gènes impliqués (ou témoins) de la dédifférenciation et de la

redifférenciation. D'après mes résultats, *wdr-5.1* semble avoir un rôle sur l'ensemble des gènes impliqués dans la dédifférenciation. En revanche, *wdr-5.1* semble avoir une action plus spécifique lors de la redifférenciation, en agissant seulement sur *cog-1* parmi les gènes testés. De la même manière, *jmjd-3.1* semble avoir une action ciblée lors de la redifférenciation, puisque, de tous les gènes testés, seule l'expression de *cog-1* est impactée négativement par son absence. Cependant, le rôle inhibiteur (direct ou indirect) de *jmjd-3.1* sur l'expression de *rimb-1* suggère que cette modificateur d'histone a un rôle plus large, et peut-être en partie indirect, conduisant à l'augmentation comme à la diminution de l'expression de marqueurs lors de la redifférenciation. De plus, l'étude du double mutant *sel-10 ; jmjd-3.1* sur l'expression de *rimb-1* suggère une relation épistatique, signifiant que ces deux gènes agiraient dans la même voie de signalisation et que *sel-10* agit en amont de *jmjd-3.1*. Enfin, d'après nos résultats, *sel-10* semble avoir un effet favorable à l'expression d'au moins un facteur clé de la dédifférenciation, *sox-2*, alors que cet effet favorable sur l'expression de *cog-1* est observé tout au long de la transdifférenciation. *sel-10* a donc plusieurs rôles, et étape-spécifique, et général, lors de la transdifférenciation.

L'utilisation de *cog-1* a permis de mettre en évidence une synergie entre la voie de l'ubiquitine et celle de l'épigénétique. Le marqueur *cog-1* n'est pas impliqué dans la transdifférenciation, mais s'est avéré être un marqueur très fin de l'identité finale de PDA. Afin de pouvoir déterminer s'il existe des étapes intermédiaires entre l'acquisition d'une morphologie neurale, avec axone, et l'identité de sous-type spécifique PDA, il serait intéressant d'utiliser une combinaison de plusieurs marqueurs (par exemple, actuellement en notre possession, *exp-1*, *cog-1* ou *unc-3*). Notons qu'aucune indication n'est connue sur la fonction du neurone. Le gène *cog-1* pourrait être impliqué dans la fonction de PDA et non pas dans l'acquisition de sa morphologie ou son identité finale.

La synergie entre la voie de l'ubiquitine et l'épigénétique n'avait jamais été mise en évidence auparavant. Alors qu'indépendamment ces deux voies sont connues pour être impliquées dans le maintien et ou le changement de l'identité cellulaire (Akhoondi et al., 2007; Burchfield et al., 2015; Diaz and de Herreros, 2016; Tokunaga et al., 2016; Welcker et al., 2004), c'est ensemble que leurs effets semblent les plus importants. Si cette synergie est mise en évidence dans des modèles cellulaires de reprogrammation, alors cette

découverte pourrait être une avancée majeure dans l'amélioration de l'efficacité des reprogrammations induites.

Enfin, cette découverte pourrait également avoir un effet crucial pour l'étude et la compréhension de certaines tumeurs. En effet, FBW7 est d'une part connue comme suppresseur de tumeur, et d'autre part les nouvelles thérapies ciblent de plus en plus les protéines de l'épigénétique.

Comprendre en profondeur le lien qui unit ces deux voies moléculaires passera par l'identification des gènes ciblés par les protéines liées aux modifications d'histones et le lien qui peut exister entre ces gènes et la voie de l'ubiquitination. Plusieurs techniques seraient envisageables pour répondre à une telle question et la plus appropriée et innovante serait l'utilisation du DamID (Askjaer et al., 2014). L'étude de ces cibles permettrait à la fois de mettre en évidence des gènes potentiellement impliqués dans de nouvelles voies moléculaires, responsable de l'identité cellulaire, son maintien et ou sa plasticité. Ceci permettra de faire le lien entre le protéasome (et la voie de dégradation des protéines), l'ubiquitine (SEL-10) et l'épigénétique.

Références

- A., J.N.a.v.O. (2012). Single molecule fluorescent in situ hybridization (smFISH) of *C. elegans* worms and embryos*. *WormBook ed. The C. elegans Research Community*.
- Abad, M., Mosteiro, L., Pantoja, C., Canamero, M., Rayon, T., Ors, I., Grana, O., Megias, D., Dominguez, O., Martinez, D., *et al.* (2013). Reprogramming in vivo produces teratomas and iPS cells with totipotency features. *Nature* *502*, 340-345.
- Aguilar, R.C., and Wendland, B. (2003). Ubiquitin: not just for proteasomes anymore. *Current opinion in cell biology* *15*, 184-190.
- Akhoondi, S., Sun, D., von der Lehr, N., Apostolidou, S., Klotz, K., Maljukova, A., Cepeda, D., Fiegl, H., Dafou, D., Marth, C., *et al.* (2007). FBXW7/hCDC4 is a general tumor suppressor in human cancer. *Cancer research* *67*, 9006-9012.
- Ang, Y.S., Tsai, S.Y., Lee, D.F., Monk, J., Su, J., Ratnakumar, K., Ding, J., Ge, Y., Darr, H., Chang, B., *et al.* (2011). Wdr5 mediates self-renewal and reprogramming via the embryonic stem cell core transcriptional network. *Cell* *145*, 183-197.
- Arribere, J.A., Bell, R.T., Fu, B.X., Artiles, K.L., Hartman, P.S., and Fire, A.Z. (2014). Efficient marker-free recovery of custom genetic modifications with CRISPR/Cas9 in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* *198*, 837-846.
- Askjaer, P., Ercan, S., and Meister, P. (2014). Modern techniques for the analysis of chromatin and nuclear organization in *C. elegans*. *WormBook*, 1-35.
- Bannister, A.J., and Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell research* *21*, 381-395.
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D.A., and Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* *315*, 1709-1712.
- Batty, J.A., Lima, J.A., Jr., and Kunadian, V. (2016). Direct cellular reprogramming for cardiac repair and regeneration. *European journal of heart failure* *18*, 145-156.
- Becker, S.F., and Jarriault, S. (2016). Natural and induced direct reprogramming: mechanisms, concepts and general principles-from the worm to vertebrates. *Current opinion in genetics & development* *40*, 154-163.
- Bhattacharya, S., Zhang, Q., and Andersen, M.E. (2011). A deterministic map of Waddington's epigenetic landscape for cell fate specification. *BMC Syst Biol* *5*, 85.
- Bielskiene, K., Bagdoniene, L., Mozuraitiene, J., Kazbariene, B., and Janulionis, E. (2015). E3 ubiquitin ligases as drug targets and prognostic biomarkers in melanoma. *Medicina* *51*, 1-9.
- Biswas, D., and Jiang, P. (2016). Chemically Induced Reprogramming of Somatic Cells to Pluripotent Stem Cells and Neural Cells. *Int J Mol Sci* *17*, 226.
- Black, J.C., Allen, A., Van Rechem, C., Forbes, E., Longworth, M., Tschop, K., Rinehart, C., Quiton, J., Walsh, R., Smallwood, A., *et al.* (2010). Conserved antagonism between JMJD2A/KDM4A and HP1gamma during cell cycle progression. *Molecular cell* *40*, 736-748.
- Blumenthal, T., and Gleason, K.S. (2003). *Caenorhabditis elegans* operons: form and function. *Nat Rev Genet* *4*, 112-120.
- Bosher, J.M., Dufourcq, P., Sookhareea, S., and Labouesse, M. (1999). RNA interference can target pre-mRNA: consequences for gene expression in a *Caenorhabditis elegans* operon. *Genetics* *153*, 1245-1256.
- Brault, J., Vaganay, G., Le Roy, A., Lenormand, J.L., Cortes, S., and Stasia, M.J. (2017). Therapeutic effects of proteoliposomes on X-linked chronic granulomatous disease: proof of concept using macrophages differentiated from patient-specific induced pluripotent stem cells. *International journal of nanomedicine* *12*, 2161-2177.
- Brockes, J.P. (1997). Amphibian limb regeneration: rebuilding a complex structure. *Science* *276*, 81-87.
- Burchfield, J.S., Li, Q., Wang, H.Y., and Wang, R.F. (2015). JMJD3 as an epigenetic regulator in development and disease. *The international journal of biochemistry & cell biology* *67*, 148-157.

- Burglin, T.R., and Ruvkun, G. (2001). Regulation of ectodermal and excretory function by the *C. elegans* POU homeobox gene *ceh-6*. *Development* 128, 779-790.
- Call, M.K., Grogg, M.W., and Tsonis, P.A. (2005). Eye on regeneration. *Anatomical record Part B, New anatomist* 287, 42-48.
- Cecere, G., Hoersch, S., Jensen, M.B., Dixit, S., and Grishok, A. (2013). The ZFP-1(AF10)/DOT-1 complex opposes H2B ubiquitination to reduce Pol II transcription. *Molecular cell* 50, 894-907.
- Chan, S.S., and Kyba, M. (2013). What is a Master Regulator? *Journal of stem cell research & therapy* 3.
- Chang, S., Johnston, R.J., Jr., and Hobert, O. (2003). A transcriptional regulatory cascade that controls left/right asymmetry in chemosensory neurons of *C. elegans*. *Genes & development* 17, 2123-2137.
- Chen, X., Tolkovsky, A.M., and Herbert, J. (2011). Cell origin and culture history determine successful integration of neural precursor transplants into the dentate gyrus of the adult rat. *PLoS One* 6, e17072.
- Chen, Y., Yang, Z., Zhao, Z.A., and Shen, Z. (2017). Direct reprogramming of fibroblasts into cardiomyocytes. *Stem cell research & therapy* 8, 118.
- Choi, H.W., Kim, J.S., Hong, Y.J., Song, H., Seo, H.G., and Do, J.T. (2015). In vivo reprogrammed pluripotent stem cells from teratomas share analogous properties with their in vitro counterparts. *Sci Rep* 5, 13559.
- Christoforou, N., Chakraborty, S., Kirkton, R.D., Adler, A.F., Addis, R.C., and Leong, K.W. (2017). Core Transcription Factors, MicroRNAs, and Small Molecules Drive Transdifferentiation of Human Fibroblasts Towards The Cardiac Cell Lineage. *Sci Rep* 7, 40285.
- Chun, H., Sharma, A.K., Lee, J., Chan, J., Jia, S., and Kim, B.E. (2017). The Intestinal Copper Exporter CUA-1 Is Required for Systemic Copper Homeostasis in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of biological chemistry* 292, 1-14.
- Ciechanover, A., and Kwon, Y.T. (2015). Degradation of misfolded proteins in neurodegenerative diseases: therapeutic targets and strategies. *Experimental & molecular medicine* 47, e147.
- Ciosk, R., DePalma, M., and Priess, J.R. (2006). Translational regulators maintain totipotency in the *Caenorhabditis elegans* germline. *Science* 311, 851-853.
- Consortium, C.e.D.M. (2012). large-scale screening for targeted knockouts in the *Caenorhabditis elegans* genome. *G3* 2, 1415-1425.
- Crusio, K.M., King, B., Reavie, L.B., and Aifantis, I. (2010). The ubiquitous nature of cancer: the role of the SCF(Fbw7) complex in development and transformation. *Oncogene* 29, 4865-4873.
- Darwin, K.H. (2009). Prokaryotic ubiquitin-like protein (Pup), proteasomes and pathogenesis. *Nature reviews Microbiology* 7, 485-491.
- Davis, R.L., Weintraub, H., and Lassar, A.B. (1987). Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 51, 987-1000.
- de la Cova, C., and Greenwald, I. (2012). SEL-10/Fbw7-dependent negative feedback regulation of LIN-45/Braf signaling in *C. elegans* via a conserved phosphodegron. *Genes & development* 26, 2524-2535.
- Devanapally, S., Ravikumar, S., and Jose, A.M. (2015). Double-stranded RNA made in *C. elegans* neurons can enter the germline and cause transgenerational gene silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 2133-2138.
- Diaz, V.M., and de Herreros, A.G. (2016). F-box proteins: Keeping the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in check. *Seminars in cancer biology* 36, 71-79.
- Ding, M., Chao, D., Wang, G., and Shen, K. (2007). Spatial regulation of an E3 ubiquitin ligase directs selective synapse elimination. *Science* 317, 947-951.
- Dorfman, M., Gomes, J.E., O'Rourke, S., and Bowerman, B. (2009). Using RNA interference to identify specific modifiers of a temperature-sensitive, embryonic-lethal mutation in the *Caenorhabditis elegans* ubiquitin-like Nedd8 protein modification pathway E1-activating gene *rfl-1*. *Genetics* 182, 1035-1049.
- Doss, C.G., Rajith, B., Garwasis, N., Mathew, P.R., Raju, A.S., Apoorva, K., William, D., Sadhana, N.R., Himani, T., and Dike, I.P. (2012). Screening of mutations affecting

- protein stability and dynamics of FGFR1-A simulation analysis. *Applied & translational genomics 1*, 37-43.
- Doudna, J.A., and Charpentier, E. (2014). Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science 346*, 1258096.
- Efroni, I., Ip, P.L., Nawy, T., Mello, A., and Birnbaum, K.D. (2015). Quantification of cell identity from single-cell gene expression profiles. *Genome Biol 16*, 9.
- Egger, B., Ladurner, P., Nimeth, K., Gschwentner, R., and Rieger, R. (2006). The regeneration capacity of the flatworm *Macrostomum lignano*--on repeated regeneration, rejuvenation, and the minimal size needed for regeneration. *Development genes and evolution 216*, 565-577.
- Eisenhoffer, G.T., Kang, H., and Sanchez Alvarado, A. (2008). Molecular analysis of stem cells and their descendants during cell turnover and regeneration in the planarian *Schmidtea mediterranea*. *Cell Stem Cell 3*, 327-339.
- Evans, D., and Blumenthal, T. (2000). trans splicing of polycistronic *Caenorhabditis elegans* pre-mRNAs: analysis of the SL2 RNA. *Molecular and cellular biology 20*, 6659-6667.
- Farboud, B., and Meyer, B.J. (2015). Dramatic enhancement of genome editing by CRISPR/Cas9 through improved guide RNA design. *Genetics 199*, 959-971.
- Fay, D. (2006). Genetic mapping and manipulation: Chapter 3-Three-point mapping with genetic markers. *WormBook*, ed The *C. elegans* Research Community.
- Finley, D., Ulrich, H.D., Sommer, T., and Kaiser, P. (2012). The ubiquitin-proteasome system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics 192*, 319-360.
- Fukushige, T., and Krause, M. (2005). The myogenic potency of HLH-1 reveals widespread developmental plasticity in early *C. elegans* embryos. *Development 132*, 1795-1805.
- Gao, F., Liu, X., Wu, X.P., Wang, X.L., Gong, D., Lu, H., Xia, Y., Song, Y., Wang, J., Du, J., *et al.* (2012). Differential DNA methylation in discrete developmental stages of the parasitic nematode *Trichinella spiralis*. *Genome Biol 13*, R100.
- Gomez Limia, C.E., Devalle, S., Reis, M., Sochacki, J., Carneiro, M., Madeiro da Costa, R., D'Andrea, M., Padilha, T., Zalberg, I.R., Solza, C., *et al.* (2017). Generation and characterization of a human induced pluripotent stem (iPS) cell line derived from an acute myeloid leukemia patient evolving from primary myelofibrosis carrying the CALR 52bp deletion and the ASXL1 p.R693X mutation. *Stem cell research 24*, 16-20.
- Graf, T. (2011). Historical origins of transdifferentiation and reprogramming. *Cell Stem Cell 9*, 504-516.
- Grant, B., and Greenwald, I. (1997). Structure, function, and expression of SEL-1, a negative regulator of LIN-12 and GLP-1 in *C. elegans*. *Development 124*, 637-644.
- Greer, E.L., Blanco, M.A., Gu, L., Sendinc, E., Liu, J., Aristizabal-Corrales, D., Hsu, C.H., Aravind, L., He, C., and Shi, Y. (2015). DNA Methylation on N6-Adenine in *C. elegans*. *Cell 161*, 868-878.
- Guo, Z., Zhang, L., Wu, Z., Chen, Y., Wang, F., and Chen, G. (2014). In vivo direct reprogramming of reactive glial cells into functional neurons after brain injury and in an Alzheimer's disease model. *Cell Stem Cell 14*, 188-202.
- Gurdon, J.B., Elsdale, T.R., and Fischberg, M. (1958). Sexually mature individuals of *Xenopus laevis* from the transplantation of single somatic nuclei. *Nature 182*, 64-65.
- Habener, J.F., and Stanojevic, V. (2012). alpha-cell role in beta-cell generation and regeneration. *Islets 4*, 188-198.
- Hanna, J.H., Saha, K., and Jaenisch, R. (2010). Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell 143*, 508-525.
- Hanson, C., Arnarsson, A., Hardarson, T., Lindgard, A., Daneshvarnaeini, M., Ellerstrom, C., Bruun, A., and Stenevi, U. (2017). Transplanting embryonic stem cells onto damaged human corneal endothelium. *World journal of stem cells 9*, 127-132.
- Hobert, O. (2010). Neurogenesis in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *WormBook*, 1-24.
- Hobert, O. (2016). A map of terminal regulators of neuronal identity in *Caenorhabditis elegans*. *Wiley interdisciplinary reviews Developmental biology 5*, 474-498.

- Hoeck, J.D., Jandke, A., Blake, S.M., Nye, E., Spencer-Dene, B., Brandner, S., and Behrens, A. (2010). Fbw7 controls neural stem cell differentiation and progenitor apoptosis via Notch and c-Jun. *Nature neuroscience* *13*, 1365-1372.
- Horner, M.A., Quintin, S., Domeier, M.E., Kimble, J., Labouesse, M., and Mango, S.E. (1998). pha-4, an HNF-3 homolog, specifies pharyngeal organ identity in *Caenorhabditis elegans*. *Genes & development* *12*, 1947-1952.
- Hu, W., Wang, T., Xu, J., and Li, H. (2014). MicroRNA mediates DNA methylation of target genes. *Biochemical and biophysical research communications* *444*, 676-681.
- Hu, Y.Y., Zheng, M.H., Cheng, G., Li, L., Liang, L., Gao, F., Wei, Y.N., Fu, L.A., and Han, H. (2011). Notch signaling contributes to the maintenance of both normal neural stem cells and patient-derived glioma stem cells. *BMC cancer* *11*, 82.
- Hubbard, E.J., Wu, G., Kitajewski, J., and Greenwald, I. (1997). sel-10, a negative regulator of lin-12 activity in *Caenorhabditis elegans*, encodes a member of the CDC4 family of proteins. *Genes & development* *11*, 3182-3193.
- Humbard, M.A., and Maupin-Furlow, J.A. (2013). Prokaryotic proteasomes: nanocompartments of degradation. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* *23*, 321-334.
- Hunter, T. (2007). The age of crosstalk: phosphorylation, ubiquitination, and beyond. *Molecular cell* *28*, 730-738.
- Jager, S., Schwartz, H.T., Horvitz, H.R., and Conrad, B. (2004). The *Caenorhabditis elegans* F-box protein SEL-10 promotes female development and may target FEM-1 and FEM-3 for degradation by the proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 12549-12554.
- Jandke, A., Da Costa, C., Sancho, R., Nye, E., Spencer-Dene, B., and Behrens, A. (2011). The F-box protein Fbw7 is required for cerebellar development. *Developmental biology* *358*, 201-212.
- Jarriault, S., Schwab, Y., and Greenwald, I. (2008). A *Caenorhabditis elegans* model for epithelial-neuronal transdifferentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 3790-3795.
- Jeon, S.J., Fujioka, M., Kim, S.C., and Edge, A.S. (2011). Notch signaling alters sensory or neuronal cell fate specification of inner ear stem cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* *31*, 8351-8358.
- Jin, J., Cardozo, T., Lovering, R.C., Elledge, S.J., Pagano, M., and Harper, J.W. (2004). Systematic analysis and nomenclature of mammalian F-box proteins. *Genes & development* *18*, 2573-2580.
- Jones, D.O., Cowell, I.G., and Singh, P.B. (2000). Mammalian chromodomain proteins: their role in genome organisation and expression. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* *22*, 124-137.
- Jones, P.A., and Taylor, S.M. (1980). Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell* *20*, 85-93.
- Kagias, K., Ahier, A., Fischer, N., and Jarriault, S. (2012). Members of the NODE (Nanog and Oct4-associated deacetylase) complex and SOX-2 promote the initiation of a natural cellular reprogramming event in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* *109*, 6596-6601.
- Kambal, A., Mitchell, G., Cary, W., Gruenloh, W., Jung, Y., Kalomoiris, S., Nacey, C., McGee, J., Lindsey, M., Fury, B., *et al.* (2011). Generation of HIV-1 resistant and functional macrophages from hematopoietic stem cell-derived induced pluripotent stem cells. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* *19*, 584-593.
- Kang, J.K., Kim, O.H., Hur, J., Yu, S.H., Lamichhane, S., Lee, J.W., Ojha, U., Hong, J.H., Lee, C.S., Cha, J.Y., *et al.* (2017). Increased intracellular Ca²⁺ concentrations prevent membrane localization of PH domains through the formation of Ca²⁺-phosphoinositides. *Proc Natl Acad Sci U S A* *114*, 11926-11931.
- Keith, S.A., Maddux, S.K., Zhong, Y., Chinchankar, M.N., Ferguson, A.A., Ghazi, A., and Fisher, A.L. (2016). Graded Proteasome Dysfunction in *Caenorhabditis elegans* Activates an Adaptive Response Involving the Conserved SKN-1 and ELT-2 Transcription Factors and the Autophagy-Lysosome Pathway. *PLoS genetics* *12*, e1005823.

- Killian, D.J., Harvey, E., Johnson, P., Otori, M., Mitani, S., and Xue, D. (2008). SKR-1, a homolog of Skp1 and a member of the SCF(SEL-10) complex, regulates sex-determination and LIN-12/Notch signaling in *C. elegans*. *Developmental biology* *322*, 322-331.
- King, H.W., and Klose, R.J. (2017). The pioneer factor OCT4 requires the chromatin remodeller BRG1 to support gene regulatory element function in mouse embryonic stem cells. *eLife* *6*.
- King, T.J., and Briggs, R. (1955). Changes in the Nuclei of Differentiating Gastrula Cells, as Demonstrated by Nuclear Transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *41*, 321-325.
- Kipreos, E.T. (2005). Ubiquitin-mediated pathways in *C. elegans*. *WormBook*, 1-24.
- Kipreos, E.T., and Pagano, M. (2000). The F-box protein family. *Genome Biol* *1*, REVIEWS3002.
- Krause, M., Fire, A., Harrison, S.W., Priess, J., and Weintraub, H. (1990). CeMyoD accumulation defines the body wall muscle cell fate during *C. elegans* embryogenesis. *Cell* *63*, 907-919.
- Labrousse, A.M., Zappaterra, M.D., Rube, D.A., and van der Blik, A.M. (1999). *C. elegans* dynamin-related protein DRP-1 controls severing of the mitochondrial outer membrane. *Molecular cell* *4*, 815-826.
- Laufer, J.S., Bazzicalupo, P., and Wood, W.B. (1980). Segregation of developmental potential in early embryos of *Caenorhabditis elegans*. *Cell* *19*, 569-577.
- Li, C., and Wang, J. (2013). Quantifying Waddington landscapes and paths of non-adiabatic cell fate decisions for differentiation, reprogramming and transdifferentiation. *J R Soc Interface* *10*, 20130787.
- Li, M., and Izpisua Belmonte, J.C. (2016). Looking to the future following 10 years of induced pluripotent stem cell technologies. *Nature protocols* *11*, 1579-1585.
- Li, Q., Jia, Y., Zhang, J., and Yang, J. (2015). Evaluation of APP695 Transgenic Mice Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Neural Differentiation for Transplantation. *BioMed research international* *2015*, 182418.
- Li, T., and Kelly, W.G. (2011). A role for Set1/MLL-related components in epigenetic regulation of the *Caenorhabditis elegans* germ line. *PLoS genetics* *7*, e1001349.
- Li, T., and Kelly, W.G. (2014). A role for WDR5 in TRA-1/Gli mediated transcriptional control of the sperm/oocyte switch in *C. elegans*. *Nucleic acids research* *42*, 5567-5581.
- Li, W., Herman, R.K., and Shaw, J.E. (1992). Analysis of the *Caenorhabditis elegans* axonal guidance and outgrowth gene *unc-33*. *Genetics* *132*, 675-689.
- Lindvall, O., Kokaia, Z., and Martinez-Serrano, A. (2004). Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders-how to make it work. *Nature medicine* *10 Suppl*, S42-50.
- Liu, G., Rogers, J., Murphy, C.T., and Rongo, C. (2011). EGF signalling activates the ubiquitin proteasome system to modulate *C. elegans* lifespan. *EMBO J* *30*, 2990-3003.
- Livnat-Levanon, N., Kevei, E., Kleifeld, O., Krutauz, D., Segref, A., Rinaldi, T., Erpapazoglou, Z., Cohen, M., Reis, N., Hoppe, T., *et al.* (2014). Reversible 26S proteasome disassembly upon mitochondrial stress. *Cell reports* *7*, 1371-1380.
- Malinowski, A.R., and Fisher, A.G. (2016). Reprogramming of Somatic Cells Towards Pluripotency by Cell Fusion. *Methods in molecular biology* *1480*, 289-299.
- Maupin-Furlow, J.A. (2013). Ubiquitin-like proteins and their roles in archaea. *Trends in microbiology* *21*, 31-38.
- Maury, Y., Come, J., Piskorowski, R.A., Salah-Mohellibi, N., Chevaleyre, V., Peschanski, M., Martinat, C., and Nedelec, S. (2015). Combinatorial analysis of developmental cues efficiently converts human pluripotent stem cells into multiple neuronal subtypes. *Nature biotechnology* *33*, 89-96.
- Minkina, O., and Hunter, C.P. (2017). Stable Heritable Germline Silencing Directs Somatic Silencing at an Endogenous Locus. *Molecular cell* *65*, 659-670 e655.
- Miyazaki, K. (2011). MEGAWHOP cloning: a method of creating random mutagenesis libraries via megaprimer PCR of whole plasmids. *Methods in enzymology* *498*, 399-406.

- Moretti, J., Chastagner, P., Liang, C.C., Cohn, M.A., Israel, A., and Brou, C. (2012). The ubiquitin-specific protease 12 (USP12) is a negative regulator of notch signaling acting on notch receptor trafficking toward degradation. *The Journal of biological chemistry* 287, 29429-29441.
- Moris, N., Pina, C., and Arias, A.M. (2016). Transition states and cell fate decisions in epigenetic landscapes. *Nat Rev Genet* 17, 693-703.
- Nashun, B., Hill, P.W., and Hajkova, P. (2015). Reprogramming of cell fate: epigenetic memory and the erasure of memories past. *EMBO J* 34, 1296-1308.
- Nelson, D.E., Randle, S.J., and Laman, H. (2013). Beyond ubiquitination: the atypical functions of Fbxo7 and other F-box proteins. *Open biology* 3, 130131.
- Paek, J., Lo, J.Y., Narasimhan, S.D., Nguyen, T.N., Glover-Cutter, K., Robida-Stubbs, S., Suzuki, T., Yamamoto, M., Blackwell, T.K., and Curran, S.P. (2012). Mitochondrial SKN-1/Nrf mediates a conserved starvation response. *Cell metabolism* 16, 526-537.
- Palmer, R.E., Inoue, T., Sherwood, D.R., Jiang, L.I., and Sternberg, P.W. (2002). *Caenorhabditis elegans* cog-1 locus encodes GTX/Nkx6.1 homeodomain proteins and regulates multiple aspects of reproductive system development. *Developmental biology* 252, 202-213.
- Papaevgeniou, N., and Chondrogianni, N. (2014). The ubiquitin proteasome system in *Caenorhabditis elegans* and its regulation. *Redox biology* 2, 333-347.
- Patel, T., and Hobert, O. (2017). Coordinated control of terminal differentiation and restriction of cellular plasticity. *eLife* 6.
- Popov, N., Wanzel, M., Madiredjo, M., Zhang, D., Beijersbergen, R., Bernards, R., Moll, R., Elledge, S.J., and Eilers, M. (2007). The ubiquitin-specific protease USP28 is required for MYC stability. *Nature cell biology* 9, 765-774.
- Priess, J.R., and Thomson, J.N. (1987). Cellular interactions in early *C. elegans* embryos. *Cell* 48, 241-250.
- Qadota, H., Inoue, M., Hikita, T., Koppen, M., Hardin, J.D., Amano, M., Moerman, D.G., and Kaibuchi, K. (2007). Establishment of a tissue-specific RNAi system in *C. elegans*. *Gene* 400, 166-173.
- Qian, L., Huang, Y., Spencer, C.I., Foley, A., Vedantham, V., Liu, L., Conway, S.J., Fu, J.D., and Srivastava, D. (2012). In vivo reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes. *Nature* 485, 593-598.
- Qin, H., Zhao, A., and Fu, X. (2017). Small molecules for reprogramming and transdifferentiation. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*.
- Qin, H., Zhao, A., Zhang, C., and Fu, X. (2016). Epigenetic Control of Reprogramming and Transdifferentiation by Histone Modifications. *Stem cell reviews* 12, 708-720.
- Qu, W., Ren, C., Li, Y., Shi, J., Zhang, J., Wang, X., Hang, X., Lu, Y., Zhao, D., and Zhang, C. (2011). Reliability analysis of the Ahringer *Caenorhabditis elegans* RNAi feeding library: a guide for genome-wide screens. *BMC genomics* 12, 170.
- Quintin, S., Michaux, G., McMahon, L., Gansmuller, A., and Labouesse, M. (2001). The *Caenorhabditis elegans* gene *lin-26* can trigger epithelial differentiation without conferring tissue specificity. *Developmental biology* 235, 410-421.
- Raj, A., van den Bogaard, P., Rifkin, S.A., van Oudenaarden, A., and Tyagi, S. (2008). Imaging individual mRNA molecules using multiple singly labeled probes. *Nature methods* 5, 877-879.
- Raven, L., Johnson, Singer (2007). *Biologie*, 7 edn (de Boeck).
- Ribeiro, M.C., Tertoolen, L.G., Guadix, J.A., Bellin, M., Kosmidis, G., D'Aniello, C., Monshouwer-Kloots, J., Goumans, M.J., Wang, Y.L., Feinberg, A.W., *et al.* (2015). Functional maturation of human pluripotent stem cell derived cardiomyocytes in vitro--correlation between contraction force and electrophysiology. *Biomaterials* 51, 138-150.
- Richard, J.P., Zuryn, S., Fischer, N., Pavet, V., Vaucamps, N., and Jarriault, S. (2011). Direct in vivo cellular reprogramming involves transition through discrete, non-pluripotent steps. *Development* 138, 1483-1492.
- Richmond, J.E., and Jorgensen, E.M. (1999). One GABA and two acetylcholine receptors function at the *C. elegans* neuromuscular junction. *Nature neuroscience* 2, 791-797.

- Samson, M., Jow, M.M., Wong, C.C., Fitzpatrick, C., Aslanian, A., Saucedo, I., Estrada, R., Ito, T., Park, S.K., Yates, J.R., 3rd, *et al.* (2014). The specification and global reprogramming of histone epigenetic marks during gamete formation and early embryo development in *C. elegans*. *PLoS genetics* *10*, e1004588.
- Shibata, Y., Takeshita, H., Sasakawa, N., and Sawa, H. (2010). Double bromodomain protein BET-1 and MYST HATs establish and maintain stable cell fates in *C. elegans*. *Development* *137*, 1045-1053.
- Shilatifard, A. (2006). Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression. *Annual review of biochemistry* *75*, 243-269.
- Shimada, M., Kanematsu, K., Tanaka, K., Yokosawa, H., and Kawahara, H. (2006). Proteasomal ubiquitin receptor RPN-10 controls sex determination in *Caenorhabditis elegans*. *Molecular biology of the cell* *17*, 5356-5371.
- Sinagra, G., and Fabris, E. (2016). Direct cellular reprogramming: the hopes and the hurdles. *European journal of heart failure* *18*, 157-159.
- Soufi, A., Donahue, G., and Zaret, K.S. (2012). Facilitators and impediments of the pluripotency reprogramming factors' initial engagement with the genome. *Cell* *151*, 994-1004.
- spemann (1924). On the Induction of Embryonic Anlagen by Implantation of Organizers from a Different Species. *Archiv für Mikroskopische Anatomie und Entwicklungsmechanik* *100*., 599-638.
- Srivastava, D., and DeWitt, N. (2016). In Vivo Cellular Reprogramming: The Next Generation. *Cell* *166*, 1386-1396.
- Stadtfeld, M., and Hochedlinger, K. (2010). Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. *Genes & development* *24*, 2239-2263.
- Svendsen, C.N., Caldwell, M.A., Shen, J., ter Borg, M.G., Rosser, A.E., Tyers, P., Karmioli, S., and Dunnett, S.B. (1997). Long-term survival of human central nervous system progenitor cells transplanted into a rat model of Parkinson's disease. *Experimental neurology* *148*, 135-146.
- Takagi, R., Ishimaru, J., Sugawara, A., Toyoshima, K.E., Ishida, K., Ogawa, M., Sakakibara, K., Asakawa, K., Kashiwakura, A., Oshima, M., *et al.* (2016). Bioengineering a 3D integumentary organ system from iPS cells using an in vivo transplantation model. *Science advances* *2*, e1500887.
- Takagi, Y., Takahashi, J., Saiki, H., Morizane, A., Hayashi, T., Kishi, Y., Fukuda, H., Okamoto, Y., Koyanagi, M., Ideguchi, M., *et al.* (2005). Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cells function in a Parkinson primate model. *The Journal of clinical investigation* *115*, 102-109.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* *131*, 861-872.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* *126*, 663-676.
- Takahashi, Y.H., Westfield, G.H., Oleskie, A.N., Trievel, R.C., Shilatifard, A., and Skiniotis, G. (2011). Structural analysis of the core COMPASS family of histone H3K4 methylases from yeast to human. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, 20526-20531.
- Takeishi, S., and Nakayama, K.I. (2014). Role of Fbxw7 in the maintenance of normal stem cells and cancer-initiating cells. *British journal of cancer* *111*, 1054-1059.
- Taylor, S.M., and Jones, P.A. (1979). Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine. *Cell* *17*, 771-779.
- Taylor, S.M., and Jones, P.A. (1982). Changes in phenotypic expression in embryonic and adult cells treated with 5-azacytidine. *Journal of cellular physiology* *111*, 187-194.
- Teichmann, H.M., and Shen, K. (2011). UNC-6 and UNC-40 promote dendritic growth through PAR-4 in *Caenorhabditis elegans* neurons. *Nature neuroscience* *14*, 165-172.
- Thorel, F., Nepote, V., Avril, I., Kohno, K., Desgraz, R., Chera, S., and Herrera, P.L. (2010). Conversion of adult pancreatic alpha-cells to beta-cells after extreme beta-cell loss. *Nature* *464*, 1149-1154.

- Tokunaga, R., Sakamoto, Y., Nakagawa, S., Miyake, K., Izumi, D., Kosumi, K., Taki, K., Higashi, T., Imamura, Y., Ishimoto, T., *et al.* (2016). The Prognostic Significance of Histone Lysine Demethylase JMJD3/KDM6B in Colorectal Cancer. *Annals of surgical oncology* 23, 678-685.
- Tsuboi, D., Hikita, T., Qadota, H., Amano, M., and Kaibuchi, K. (2005). Regulatory machinery of UNC-33 Ce-CRMP localization in neurites during neuronal development in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of neurochemistry* 95, 1629-1641.
- van den Burg, H.A., Tsitsigiannis, D.I., Rowland, O., Lo, J., Rallapalli, G., Maclean, D., Takken, F.L., and Jones, J.D. (2008). The F-box protein ACRE189/ACIF1 regulates cell death and defense responses activated during pathogen recognition in tobacco and tomato. *The Plant cell* 20, 697-719.
- Vandamme, J., Lettier, G., Sidoli, S., Di Schiavi, E., Norregaard Jensen, O., and Salcini, A.E. (2012). The *C. elegans* H3K27 demethylase UTX-1 is essential for normal development, independent of its enzymatic activity. *PLoS genetics* 8, e1002647.
- Vander Haar, E., Lee, S.I., Bandhakavi, S., Griffin, T.J., and Kim, D.H. (2007). Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nature cell biology* 9, 316-323.
- Vella, M.C.a.S., F.J. (2005). *C. elegans* microRNAs. *WormBook ed. The C. elegans Research Community, WormBook*.
- Waddington, C.H. (1939). An introduction to modern genetics. . Macmillan, New York.
- Waddington, C.H. (1942). The epigenotype. 1942. *Int J Epidemiol* 41, 10-13.
- Waddington, C.H. (1957). The strategy of the genes. London and New York: Routledge.
- Wainwright, E.N., and Scaffidi, P. (2017). Epigenetics and Cancer Stem Cells: Unleashing, Hijacking, and Restricting Cellular Plasticity. *Trends in cancer* 3, 372-386.
- Wang, H., Liu, J., Gharib, S., Chai, C.M., Schwarz, E.M., Pokala, N., and Sternberg, P.W. (2017). cGAL, a temperature-robust GAL4-UAS system for *Caenorhabditis elegans*. *Nature methods* 14, 145-148.
- Wang, J., Chitturi, J., Ge, Q., Laskova, V., Wang, W., Li, X., Ding, M., Zhen, M., and Huang, X. (2015). The *C. elegans* COE transcription factor UNC-3 activates lineage-specific apoptosis and affects neurite growth in the RID lineage. *Development* 142, 1447-1457.
- Wedeles, C.J., Wu, M.Z., and Claycomb, J.M. (2013). A multitasking Argonaute: exploring the many facets of *C. elegans* CSR-1. *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology* 21, 573-586.
- Welcker, M., Orian, A., Grim, J.E., Eisenman, R.N., and Clurman, B.E. (2004). A nucleolar isoform of the Fbw7 ubiquitin ligase regulates c-Myc and cell size. *Current biology : CB* 14, 1852-1857.
- Wen, S., Li, H., and Liu, J. (2009). Dynamic signaling for neural stem cell fate determination. *Cell adhesion & migration* 3, 107-117.
- Williams, K., Christensen, J., Rappsilber, J., Nielsen, A.L., Johansen, J.V., and Helin, K. (2014). The histone lysine demethylase JMJD3/KDM6B is recruited to p53 bound promoters and enhancer elements in a p53 dependent manner. *PLoS One* 9, e96545.
- Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J., and Campbell, K.H. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385, 810-813.
- Wu, G., Lyapina, S., Das, I., Li, J., Gurney, M., Pauley, A., Chui, I., Deshaies, R.J., and Kitajewski, J. (2001). SEL-10 is an inhibitor of notch signaling that targets notch for ubiquitin-mediated protein degradation. *Molecular and cellular biology* 21, 7403-7415.
- Wu, T.P., Wang, T., Seetin, M.G., Lai, Y., Zhu, S., Lin, K., Liu, Y., Byrum, S.D., Mackintosh, S.G., Zhong, M., *et al.* (2016). DNA methylation on N(6)-adenine in mammalian embryonic stem cells. *Nature* 532, 329-333.
- Xu, L., Zhang, K., and Wang, J. (2014). Exploring the mechanisms of differentiation, dedifferentiation, reprogramming and transdifferentiation. *PLoS One* 9, e105216.
- Yoshihara, T., Naito, H., Kakigi, R., Ichinoseki-Sekine, N., Ogura, Y., Sugiura, T., and Katamoto, S. (2013). Heat stress activates the Akt/mTOR signalling pathway in rat skeletal muscle. *Acta physiologica* 207, 416-426.

- Zeng, Z.L., Lin, X.L., Tan, L.L., Liu, Y.M., Qu, K., and Wang, Z. (2017). MicroRNAs: Important Regulators of Induced Pluripotent Stem Cell Generation and Differentiation. *Stem cell reviews*.
- Zhou, J., Shen, B., Zhang, W., Wang, J., Yang, J., Chen, L., Zhang, N., Zhu, K., Xu, J., Hu, B., *et al.* (2014). One-step generation of different immunodeficient mice with multiple gene modifications by CRISPR/Cas9 mediated genome engineering. *The international journal of biochemistry & cell biology* 46, 49-55.
- Zhu, J., Fukushige, T., McGhee, J.D., and Rothman, J.H. (1998). Reprogramming of early embryonic blastomeres into endodermal progenitors by a *Caenorhabditis elegans* GATA factor. *Genes & development* 12, 3809-3814.
- Zuryn, S., Ahier, A., Portoso, M., White, E.R., Morin, M.C., Margueron, R., and Jarriault, S. (2014). Transdifferentiation. Sequential histone-modifying activities determine the robustness of transdifferentiation. *Science* 345, 826-829.
- Zuryn, S., Daniele, T., and Jarriault, S. (2012). Direct cellular reprogramming in *Caenorhabditis elegans*: facts, models, and promises for regenerative medicine. *Wiley interdisciplinary reviews Developmental biology* 1, 138-152.
- Zuryn, S., and Jarriault, S. (2013). Deep sequencing strategies for mapping and identifying mutations from genetic screens. *Worm* 2, e25081.
- Zuryn, S., Le Gras, S., Jamet, K., and Jarriault, S. (2010). A strategy for direct mapping and identification of mutations by whole-genome sequencing. *Genetics* 186, 427-430.

Annexes

Annexes

1. Les sondes du smFISH

Tableau regroupant des séquences des sondes utilisées pour le smFISH au cours de la redifférenciation de Y.0 en PDA.

<i>unc-3</i> probes	<i>cog-1</i> probes	<i>unc-33</i> probes	<i>rimb-1</i> probes
agtttcggatcaagtggga	atggtagaggggagattgtt	gttcaatatccgtcatatcc	cagatggttgggaacgagg
ttagcggagctgtcaaac	acatgattaggtcatctgg	aatccgaatcgaagtctggc	aagggcgcgaaaaacgcgag
atagaagttcatctggccag	cgattctcgacgtcctgtc	aaacgtctcttctcgcttct	agcgtttccccacaataaaa
tctcatctttfacagacggt	afactgtaggtggaggagtg	aagctttcgggtagctttg	tgaatccggaactctctcta
ttcgacgtgtcagatgattg	ccttctctcgagcaacaaa	caatatctggaccgggaagc	tcgaacgggaatgatggtg
aatgagctcgtgcatgattga	agtcacctcactggaactg	ttcatttcttgagcttcag	agtgatccggagaggagaag
tacggagattgttggggg	ctgatcatcatcattgctgc	ttttctccactttcgatt	gtttcgtgtcttgatctc
tacggtcgtacagtccaatg	aagaagttgccgacggactc	aagaagagccattgtcgtcg	catgaaactagggcgctacg
gatagtgtatcccatttctg	tgaagctggcggaaaaatga	gaaggatgaccttttggga	aaltgctctaacggttccat
gcggattccattctgaaaca	cacttccgacgaggaaggac	atttctgtactatctccgt	taatggatatcctctacca
ggaactatcagtagccgaa	ataatctgtgtggtgactg	aaaatcgacatttcaccgcc	cttcatttctatggctatt
cgtatgtgatagcctgttta	accattggccataagctgag	tcgcatcgtcattgacaatt	tggataccatcggacatac
ctccggattttatctgtgc	agaagtatgcctgaagacc	ttggggcgacgtttgaata	gaaggtttagaccgtgtag
tgacttcgtgtgagaagc	gctgtttaactgggactgta	cctgaggtagacatcgatt	cgfactgataccgatagat
tcgttctgattccacaact	gtgttactcgttcatcatt	tcacgacggaagaatcggt	tccaacactgctttaggatg
aataactggatcgtgggtg	agagctcggcttacgttttc	gattgcagatttacaccag	tcgacacatctcaactgg
acagtttgggtgcatttca	gttgttgagcaggtgaaag	ccgaacgactcaacgatgg	cggtatccaggagactagaa
gacaacctgaaacgtctca	ttggggagagtgatggaagg	ttgattttcaccgcctaa	accaaaatcagatgcgactgc
cgatacagcagatgagcac	gagagttgattgagtgctg	cacgagattccagacttttc	ttgagcaatattttcccg
gtccatgtttgagttgtg	ttctgcatgttcagggagt	gtaatcggcacagaaagtgc	tttcgtttcgtcgaactg
tgcatatcagatgactcgg	gtgaatgtgggtctgctttg	cgacatttctgctcacaga	acacgtgtcacgttggaa
ctggaaactgaagatggcagc	cagctgatagatctgatggc	attccttctgtttcacgag	cgattgatttccgatttgcg
cacttgggaaaagtgccttg	acttggtttgctcgaacttc	gacaccgtcgagcacaac	tatcgacgagtggaatcga
cttcgaaaaagtttccccg	tgactctcgtcatgttaag	tcaaggagcttatcgtctgt	gagcgtttgtgttgttgat
tgctgtgcaaaagcaact	gtttggaaccacacttaa	ccgttttacgtgctcaaga	gtgacattggcatgtacat
ataagttggactgactctcc	ttcttgcgccattttgtacg	atcgcgacgatcgactgtt	cgcataactgtcggttgat
tggggttctctactataag	cacgtttgaccagtgcatg	agcttcagcatcttttctc	atgccaccgatcaaaagt
ggttcggtagagtataata	cagtgagcaaggagactgt	agtacacagactccgctaac	ccgagcaaatattgaagtgc
agcttctgtagactgtgaa	attccagcgtgagaatgg	tggaatcggacaggaagcc	tggtttgcggacagaaga
ttgatccttggaaagcgc	gggagaggtgagaacgttaa	agagagtctgctgacgagac	tgtagtactcgcacatttgc
ccgtgatgttctgtgtac	aatacactcgttgaaggga	cgatgcaatctcagcgtgag	tagctattttccatttccag
gtgataataggactcagcg	attgcaacaaattggggga	ccgacgcaaatctcaatcc	ctattaaccgttggagctga
agcatagtcagaagtgcgt	tttctaagggttcagga	agtggaacatccgtcagatg	caccgacactcatctgaatc

atctgggagatgtgtgagtg	gacggaagaaggtcatgatt	tcgaaagtgctccgatcatc	gccgtatagtaaacaacgc
gcagaagaaagtgcaggtgg	gggtgttgattcaggtaa	cgatgctccggactacaac	cattcgattcggtgacatt
tcggataggacgtttgtag	gagagatcatggcatctgtg	ttctgcgcatggcaaaatc	ccgtgatagaatccgtcaat
gcaccaaatgtggcaaaacc	agggagtttggtttgtat	cgaaacgcatcgcacgatt	gcataatcgaactcctcga
ggttcagcaaatggattca	attgggcatggttaacgg	tgaacatttcgcagcgttc	cggtatggagggtcatatgg
aagacagacgggacgacgac		cccaattacgagatcagcg	catttgcgtgtcatctgat
agtgtggagcatttctaga		tcgtacatcgaatttcctg	ccataccaccattcatatac
gcccactattttgattaa		tctcattctgataggcaat	cagcttgagaggtcattgag
cgagcgcgaagacaaatga		gagaatttggcagagacgc	gcctggaatcgtagtaaac
ttgcatgagttctctgttc		ccaaccatactgaagagat	acctgacggaatgatagct
acatcttatgtgggacgaca		ggtttttgtgttgagga	agggaagtggacgggactag
ttgcttttgaaggtgtca		aattcttgggtgaccgttt	aagtagattgtgaggggct
tattagaggggtgtggtgat		ttactttggtgcatttcca	tttctcatcatttgcgtgtg
ggggttgataaatgggggtga		ccgcaaaatcgatggaaga	cgctggtttgtgatgattga
ttcacttattcacggcacac		agctttcgggctacaaaac	gtactagttttcgagcgtt

total: 48 sondes

total: 38 sondes

total: 48 sondes

total: 48 sondes

2. L'analyse du domaine F-box, comparaison entre le domaine F-box de différents domaines

Alignement SMART du domaine F-box en utilisant l'outil de bio-informatique smart. La première ligne du tableau correspond au domaine F-box de la protéines SEL-10. La légende des couleurs est disponible ci-dessous.

Séquence du domaine F-Box de la protéines SEL-10 :

LPVELGMKILHNLTYDILLKVAQVSKNWKLISEIDKIWKSL

Family alignment for the FBOX domain, CHROMA format

QUERY	LPVELGMKIL	HNLTYDILL	KVAQVSK---	NWKLISEID-	-KIWKSL
O80980/1-41	LPWELIEEIL	SRVPP-KSLV	RFRTVSK---	QWNALFDDK-	-TFINNH
CC4_CANAL/1-41	VPFEVTKIIL	SYLDY-KTLL	SVAQVCK---	KWFDIINN-	-DTWIKL
SCOB_EMENI/1-41	LPPEIAFKIIL	CYLDY-TSLC	KASQVSR---	GWRALADDD-	-VVWHRM
O17849/1-41	MPLAVLHNIIL	DHVKP-IDRL	IVRKVSR---	RFRTVDDH-	-DPGFKA
Q94251/1-41	LPEELLLKVF	SFLPD-KSLL	ACSSVSY---	RFNQISNSH-	-EVWKEL
MT30_YEAST/1-41	LPQELSLKIIL	SYLDC-QSLC	NATRVCR---	KWQKLADDD-	-RVWYHM
O44804/1-41	MSMEVLGKIV	ENLDP-FNRL	SVRKVCR---	KLRDAIDST-	-DPGFKT
O44891/1-41	LPDLDVADLVL	EKLEP-MDRL	RSRKVCR---	SLRTAIDKF-	-AIRFDY

O17196/1-41 MPLNVINEVL NHDDL-IDLI ALMKVSR--- NFERRAVQNM- -KVCVIE
 E1356176/1-41 LPDHVLRIM EKVEP-SDRL SVRKVNR--- NLRQLIDEM- -DPGFRS
 YDJ5_SCHPO/1-41 LPVEISFRIL SFIDA-RSLC QAAQVSK--- HWKELADDD- -VIWHRM
 G3800917/1-41 MPLALVNQIL EKQDP-EDLL ASRKVCQ--- KLRTAVDKF- -GIHFNA
 G3800926/1-41 MPINIVDQVL EKLEP-MDRL KIRKVCN--- NLRTCVDRF- -GIHFNY
 Q09397/1-41 IPDEITEQIF SNLKK-KDLL SAMLVCH--- RYFGIGHKS- -RNWIIT
 E1347541/1-41 MPLDIHKMV ENVKP-IDRL SLRKVCR--- NFREIVNDK- -DPGFKR
 O62239/1-41 IPIEVFEKIL DKLEP-IDLL IFRKVSF--- NLRRFLENR- -NFGIKE
 Q13309/1-41 LPDELLLGIF SCLCL-PELL KVSQVCK--- RWYRLASDE- -SLWQTL
 Q17716/1-41 LPPEIITKIT NKQDP-IDRL IARRVSR--- KIRAITDYQ- -VFQIST
 E1348251/1-41 MPNRVLHEIM DNVPD-INRL VLRKVCN--- KLRNFLDNR- -DPCFKH
 Q94381/1-41 LPISTIANQVL EKQGP-VEIL TCRKVCN--- NLRTAIDKL- -GTHFNK
 O17195/1-41 MPLHVINEIL DHMEI-IDLM VLMKVSF--- NFRSVVRNM- -KVLINW
 O16739/1-41 MPLHMINEIL NHVNI-FDLL SLMKTSR--- SFQEVQDK- -KLYIDS
 Q18223/1-43 LPLKVLNQIF QYDPL-KDLR SAMLTCH--- SWNNALSME SDIWQYL
 E1349224/1-41 LPTVVDEVL RKLGP-IDRI IARKVSR--- KFRATIEAT- -CRFKEI
 Q18058/1-41 MPEVIHNLV DYVPD-INIL VIRKVCN--- KLRNVLDGD- -PKFKDV
 YKK7_CAEEL/1-41 LPKEVLLKVF SFLDT-KALC RSAQVCR--- SWSILALDG- -SNWQRV
 G3800916/1-41 LPTEIHHVIV EKMQS-IDRL RARKVCR--- SLRSVANKF- -GLRFDH
 Q21112/1-41 MPEILEDIF QRFPV-KNKG RCSQVCR--- QWQRGFNSK- -LSWRKF
 YJ09_YEAST/1-41 LPDELMQEVF SHLPQ-PDRL QLCLVNK--- RLNKIATKL- -LYRRIY
 YMI8_YEAST/1-41 LPPEILINIF SHIDE-KDLF TLQELST--- HFRNLIHDE- -ELWKNL
 O45428/1-41 LPIEIMEEVL EKQMP-EERF VVRKVSF--- QFCLLIDSK- -ANGLKN
 Q94382/1-41 LPIKIANEIL EKLEP-VELL ISRKVCN--- SLRSVIDEN- -VHFNKI
 O45336/1-41 LPADVINEIL KKQTP-IDKL TLRKVCN--- FRDITDSK- -AYGFKI
 O17054/1-41 MPEILTEVV NKLEP-INRL VLQKVSF--- KLREFVNM- -NPGIAF
 O62474/1-41 LPIEVINTIS SFSMP-MERL TLRKVSF--- NLRTLIDSE- -PFCFOR
 POP1_SCHPO/1-41 FPAEITNLVL THIDA-RSLC AVSQVSH--- HWYKLVSSN- -EELWKS
 Q22727/1-41 LPNELISQVM KNQDP-QNRL TLRKVSF--- KLKDGIDMC- -GFKSIT
 O17198/1-41 MPLNVVSEIL AHENN-IESL VLMKVSF--- NFERRAVQNS- -KVEINR
 O18044/1-41 MPINVIQKIV GYVDS-IDTL ALMKVSR--- KFRKIAQKS- -DVRIED
 O62239_1/1-41 LPPKILKMFV EKLES-IDRL KIRKVSF--- LLRSVISON- -YIGFKE
 O17597/1-41 LPIELVGEVL NKQDP-IDRL IAWKVSS--- KFQKILMVM- -EPGFKE
 O74991/1-41 LPREVLLCIL QQDNF-KSIV QCMQVCK--- HWRDCIKKE- -PSLFCC
 POP2_SCHPO/1-41 LPFSIVQSIL LNLDI-HSFL SCRQVSP--- TWNRILDVH- -TSYWKH
 Q94386/1-41 LPEKVLNEIL SKLEP-KHRL VVRKVCN--- ILRRLVSFE- -VIDFKI
 O04488/1-40 LPHEVVECIL ERIDA-DPLL RFKAVSK--- QWKSTIES- -PFFQRR
 Q94387/1-41 MPMDIIQEVV EKQLP-VDRL VVRKVTR--- NFRIAIDHH- -GICLEE
 O62239_2/1-41 LPEKLLHKIV DKLKN-KNRL IVRKVSF--- KMREVIDTH- -NPGFKT
 O17344/1-41 LPDKVLRDIF QYQSP-KQIN QVGLVCK--- RWRVTSQNP- -LLWKFV
 O80777/1-40 LPYDVVEHIL ERQDV-KSLL NCKSVSK--- QWRSTIR-C- -RAFQER
 E1350165/1-41 LPIELIEQIL NNLEA-LERL IARKVSY--- SFRAIDNL- -GPNLKT
 O17201/1-41 MPLNIISEIL AHLDI-MDLL VMKVSF--- NLRVVQAK- -VDVVDV
 3503/1-41 LPFEISLKIF NYLQF-EDII NSLGVSQ--- NWNKILRKS- -TSLWKK
 Q17962/1-41 VPNECFSPIF RRLDK-KSLL NCQLACH--- RFNDLISSD- -SFWIEY
 E1350163/1-41 MPLDIINRIL DKQDP-IFRF SLRRVCR--- NLRNVIDNR- -DPEIEQ
 G3763935/1-40 LP-ELLEEVL LRLPT-KSIL KCRIVSK--- QWRSLLESS- -RFAERH
 G3885997/1-41 MPLDVINVVM GKLEP-MDLL RLRKVCN--- SLKSAVANKF- -GIHFDS
 G3800922/1-41 MPLNIANLVL EKMEI-KDLL KARKVCN--- SLRTAVDKF- -GLRFDQ
 G3860278/1-40 LPWDLVDEIL SRQPA-TSLG RLRFTCK--- RWNALFKD- -PEFITK
 O61800/1-40 LPTEMLTEII KRQNP-INRL ALRKVCN--- ILRKIVDE- -NPGVES
 O76638/1-41 MPIGVANQIL EKLEL-LDLL TSRKVCN--- SLRAAVDKF- -GIDIDF
 O45159/1-41 LPLDTANLVL EKQDP-LDLL ASRKVCQ--- GLRTAIDMH- -GVSFDT
 G3800918/1-41 MPVEIGKLVV KRMKP-VERL VCRKVCN--- SLRTAVDSF- -GIRFNS
 O45285/1-41 LPIEILFKIV ENLNF-LDRL LLRNVSF--- CFRSIAEDH- -VNEVTN
 O01573/1-41 LPPEIKLECM KHEDF-KTRF IMRSVSR--- TERILVDSH- -NFKLDS
 O45652/1-41 MPIKILATIS DYLET-KDRM NLRKVSF--- SLQDFVDYQ- -GSGINS

Q41223/1-41 LPQKLIIDRII ACLEPP-PAFF RSRSVCK--- RWYSLIFST- -TFLELH
 O17199/1-41 MPLNIIDEVL NRMEI-LNLL VLMKVSQ--- NFRKVVQNM- -KMFVDC
 O45335/1-41 LPSDIFNEVL DKLEP-IERL PLRKVSQ--- IFRTAIDNR- -NHGFKE
 O16251/1-41 LFTDVQAMIL DKLENP-IDLF AARAVCR--- DFKDITDNQ- -KSTLKK
 E1347437/1-41 LPDDMLNEIF DHVKP-IELE TIRKVSQ--- RFRDVIIGR- -APGFQK
 Q23467/1-40 MPDLILRKLIF DQYDY-PVLC KMERVCR--- RWTNLIINS- -KFRKEI
 O45333/1-41 IPLDVFDLIL EKLEKP-MELL ISRDVCR--- SLRTAVDRF- -GFGIDE
 O17775/1-41 LPIDILLAIT KQLDT-ETRM IVRKVSP--- AFRDIIIDYQ- -GSGVKT
 E1350172/1-41 MPIGIMPEIL SNVDP-IDRL VLQKVSQ--- GLRQVVKDM- -KWEFDT
 E1346906/1-41 MPQDVVGEIM SKLGL-EEKL KMRKVSQ--- NFRNFMNKL- -SIDVEK
 Q20359/1-41 LPSLEMLRSVF QNVNS-QDIP KLRVVCQ--- MENSVIKEN- -YCYLPR
 A56640/1-41 LPLELSFYLL KWIDP-QTLL TCCLVSK--- QRNKVISAC- -TEVWQT
 WORM|CE19877|F4 MPKDIVGEVM NKLGL-KEKL VMRKVSK--- NLRAYMDNL- -NIGVEK
 CG2F_HUMAN/1-41 LPEDVLFHIL KWLSV-EDIL AVRAVHS--- QLKDLVDNH- -ASVWAC
 O22858/1-41 IVPLELLEDF LRLPL-KSIL KFKTVSR--- QWRSLLESK- -LFVERR
 YOF9_CAEL/1-41 FPIGVMYDVL GHVDP-FERL VLRKVSQ--- NLRDVVQKM- -RCELDA
 O23259/1-40 LPDCLLFKIL LNLEPT-KDVV KLSVLSR--- RWRNVWRY- -VPGFNS
 O45425/1-41 LPAEVINEIT SKLES-FYRF SVRKVNQ--- KLRASIDNQ- -DYGIKT
 O48833/1-40 LPRDLLAEIL SRVPL-ASLR SVRFTCK--- KWNDLSKD- -RSFLKK
 4165136/1-41 GLDHTAENIL SYLDA-KSLC AAELVCK--- EWYRVTSDG- -MLWKKL
 O62045/1-41 MPIELIIEIIL SDIAA-IDRI AVQKVSQ--- GFRDVINRE- -DFGVKR
 4185144/1-41 LPKDVAAEVL SKFPV-TSLR RVRFTCK--- KLNTLSKDM- -SFTRKH
 G3786013/1-41 LPRVLIIEIF FRVPL-KSLR AVRLTCK--- SWNTLSKSR- -SFRKLY
 O02356/1-41 MPLDVMNKIV NTLGF-INSL VLMKVSQ--- KLSGFVKDT- -KFEIDE
 4240169/1-41 LPDHSMVOIF SFLPT-NQLC RCARVCR--- RWYNLAWDP- -RLWRTI
 O45480/1-41 FPIKVVNIIM EKVDP-IERL TIRKVSQ--- KLRILIDQI- -SDLFET
 O22512/1-42 LPDECLFEIL RRLPAGQDRS VCASVSK--- RWLMLLSSI- -CKTEIH
 O44083/1-41 LPVELGMKIL HNLTG-YDLL KVAQVSK--- NWKLISEID- -KIWKSL
 O45287/1-40 MPLEMIIEIIM EHVNL-FDRV ALRNTSQ--- LFRQISDK- -QFGNTA
 O04638/1-41 LPDDLILECI SRVPS-SSIP SLAVVCR--- RWSRLIHS- -YFLHLR
 O18085/1-41 MPLEVANQIL EKLEP-IYQL TSRKVSQ--- CLKTSVDKL- -GTHFYS
 Q83921/1-41 LPLEIWFEIF LYLPI-ADLV VFASVFR--- EFLPLLYST- -AFRRRY
 E1345565/1-41 LPVDVIFHIL DKLPL-IDKN IIRHVN- -NLRRIIDWQ- -QLMYKE
 O17098/1-41 LPLOVAEQVL EKLGV-TDLL ASRKVCR--- GLRSVVDKL- -GLPLNS
 Q08496/1-42 LPIEILPIIF QRFTT-KELV TSLVVCN--- KWRDKILYH- -LDCFQEF
 O22698/1-41 LPEELILSIL ARVSR-LSYR SLSLVCK--- RFHSLTSG- -EIIYFR
 E1350608/1-41 MPLAIVHNIL ENIPP-LERF VIRDVSS--- NLRSLFDYH- -YPVIKK
 Q22071/1-42 LPSELLCHLF TYLPQRQLIT EIPLVCR--- RFNTIINDD- -KFWSRR
 YN51_YEAST/1-41 LPTKVILLIL RTEDF-NTLV TLCQVNS--- RFYNLITNE- -FLFQNV
 O22161/1-41 LPYDTVLQLF TCONY-RDRA SLASTCK--- TWRCLGASS- -CLWTSL
 P90951/1-41 LPESVWDNIL DNLSP-FERV KMRRINH--- KIKNVVDKR- -RKRVLV
 O24660/1-42 FPEVLEHVF SFIQLDKDRN SVSLVCK--- SWYEIERWC- -RRKVFI
 O01606/1-41 LPPELLEKLI EKCDL-ISRC KLRATSS--- TMNHAVSST- -KLFIPS
 E1348251_1/1-41 MPLNIVDTVL DNVKP-IDRL VLRKVSQ--- NLRSLTKAR- -EHGYKE
 E1345482/1-41 IPIEILVKIM NELD-WSRL SMRQVSR--- AFRSIVDEE- -SKMPKS
 E1358420/1-42 IPESILIKIL EKLEL-IDRL VIRKTSK--- KFRITVDNL- -INIKIIR
 O18029/1-41 LPNDVTEHVA KNLENP-RDLI ELSFCSE--- AWFHLISSF- -KTRIKE
 G3935170/1-40 FPQDLFEDVV SRQPM-ATFF QFRAVCR--- KWNALIDS- -DSFSRC
 E1358369/1-41 LPMDALYECF KQLDY-LERM PLRKVCR--- KFKNAVDM- -DPGFKK
 O74854/1-41 LTINIYLKIF TLIST-PDLC NCRLVCR--- KFQQLCDYN- -SIYVKK
 Q19761/1-41 LPEELQKCIF SNLNC-TDFN RLRRVCV--- LFKEYVDAG- -EPMYDK
 559081/1-44 LPQELFDKIV EYLSL-SDYC NLVLVCKRPS SKYNVIFDS- -TNHQHL
 Q05930/1-41 LPPEIWLCS KLVGT-SDLH NLCLINR--- RLYLTITSD- -EIIWKR
 O74381/1-41 LSYDILLEIS TYLDY-KDIV HLSETCK--- SLSYVFDDK- -TIWHRF
 Q83918/1-41 LPTEIWMKIF LKETS-KDIA SFVFAFP--- QFITVIKDS- -YFIQLH
 O64801/1-41 LPNDLVEEIL SRVPI-TSLG AVRSTCK--- RWNGLSKDR- -IVCKGD
 O23563/1-40 LSPDLVGEIL TRVPM-TSLI SVRCTCK--- MWNALSK- -GIFKKA

041072/1-42	LPNDILEKLP	DYLDNYGLV	SLSFV NK ---	TFNTIFSKH-	-MKNKTK
080603/1-41	LVTDILSLVF	KHLSF-TDFA	RAKTVCS---	SWYFASKSS-	-SPRKNH
023101/1-42	LDTDTLSLIL	SCDDPSDIV	RASAVSR---	SWRQFGNLI-	-RILFNY
GRR1_YEAST/1-42	LPSEIHLHLIL	DKLNQKYDIV	KFLT VSK ---	LWAEITV KI -	-LYRPH
Q22842/1-42	LPKALQOIF	ATCSA-TDMT	RCSLV NK ---	QFREVIEDM-	EDERAES
017817/1-41	LPTVVISEVL	NHLKN-IDIC	ILRTTSR---	KIRTI GKLS -	-ARRKQT
045561/1-41	MPLLWVNLIL	EKSEL-IDRM	NSRNV CK ---	SLRQV VDKC -	-AIRCGK
023598/1-42	ICPDLLRSIF	EQLSF-TNLN	RAKLV CR ---	SWNSASRGC-	VPKRNQI
E1346907/1-41	MPRK V WQELC	SKLEP-CDRL	VAKKV TR ---	RFRQT IDEQ -	-DNLFNT
082488/1-40	LPKELVEDIV	SRVPL-HCLR	AMRLT CK ---	NWNALLES-	-QSFKKM
Q04922/1-41	LPNLNLLFRIL	SHEDM-NDLQ	NIGKTCT---	LLRMLANEN-	-IVYRNA
023070/1-41	LPDELLV KVL	SFLPT-KDAV	RTSLLSM---	RWKS L WMWL-	-PKLEYD
080509/1-41	LPLEIISML	ARVPK-RYYP	ILCSV SK ---	NMRS L V R SP-	-EIHKAR
P91364/1-41	LNELVLDYIG	KQNA-KDLL	RLSMANK---	ALRGFFDNE-	-CYWQKL
075426/1-41	FPELVEHII	SFLPV-RDLV	ALGQTCR---	YFHEV CDGE -	-GVW RRI
065662/1-41	LPEEILV NCL	ARIPK-SYYP	KLSLV CK ---	SFCS L ILSM-	-ELYVER
Q20892/1-41	FESHILADV	KYLDI-DDLL	NCKLV CW ---	KWNATIGEN-	-ASELAR
049279/1-41	LPD S LHQIF	SSLPI-RDIM	ICRSV CK ---	FFNQ L LTSQ-	-CFIEII
060053/1-41	FSHETLLHVL	NDLSA-HDLA	ALERV SR ---	SWNSIVRRS-	-SVWHNL
YPI7_CAEL/1-43	LPD T ICQIM	SFLDA-QSLL	NLSQTC S ---	HLRQLCLAHE	DNAGKRD
4191792/1-40	IPIDLIIEIF	LRESV-NSIA	RCRCV SK ---	QWASTLSR--	-PYFTEL
022998/1-42	LPK D LDLIS	KSLESSFDLI	QFRSV CS ---	SWRSAAEPK-	-SPLPTH
YK05_CAEL/1-41	LPD T VHRKIF	EYLN P -WEIF	KLSRIS SK ---	AIHVTILKN-	-KFAVK
049420/1-41	IPFDLVIEIL	TRLPA-KSLM	RFKSV SK ---	LWSSLICSR-	-TF T NRL
G3894159/1-41	LPEDCISNII	SFTSP-RDAC	VAASV SK ---	TFESAVNSD-	-SVWDKF
Q83920/1-41	LPVEIWTMIF	LYLSS-RDIA	AFILCFP---	ELQTVILKK-	-YFRKHF
YSS1_CAEL/1-41	LP A H L VELIL	FNVNS-DSLK	SCEEV ST ---	SWRCALARG-	-QHWK L
G4028547/1-41	LPINLIILIF	REIKP-NFVN	TL S R V CK---	HWKQI DDD	-ELWNKY
049262/1-41	LPDDV L VMIL	ASLST-EDAL	KTSV L ST---	RWKNV W KQV-	-PYLHFD
E1350287/1-41	V P DK I IY E IL	SKAKL-FELF	KIQKV SR ---	GFRSFV NNH	-HVGF KS
023269/1-41	LPDDISSHIL	SFLPT-KEAA	STSV L SK---	KWRYLFAFV-	-PNL D LD
E1344487/1-41	MPEKVWNEIC	AKMEL-CDRF	VARKV SR ---	ILRDKIDQO-	-EFHFNA
022206/1-41	F D L D H V MEIL	MRFPL-TSLT	RFKCV SK ---	QWSSLISSR-	-YFCNLL
065663/1-41	LPHEIVV SCL	ARVSG-SYYP	KLCLV SK ---	QFRS I ILSN-	-EITYKAR
080582/1-41	LPSELAL ECL	VRVPF-QFOS	AMRSV CR ---	SWRSLLSDS-	-SFIQER
064597/1-41	LPEDLQKEIL	LW L SP-KSLV	KFTLV SK ---	KCASIIERGE-	-EFKALY
061758/1-41	LPNDIILCEIL	DKVNA-YQKL	SIRTMSR---	KLCQLIDNH-	-ILKV D K
064598/1-41	LALDMQIEIL	ARLPL-KYLM	RCMCV SK ---	KWASLIRGE-	-DFRSAY
045758/1-41	IPIKIISDIL	ELIEP-IYRH	AIRKV SR ---	SLRAAVDAK-	-TSGIKV
017578/1-41	VTNYLQTMIL	DKENP-IDRF	TAGAV CC ---	SFKSIIDYQ-	-RSNLKK
G4056460/1-41	LPTELK L KIL	EL L PG-VSIG	NMACV CT ---	EMRYLASDN-	-DLW K QK
004197/1-42	TVDDVIEQVM	TYITDPKDRD	SASLV CR ---	RWFKIDSET-	-REHVTM
022232/1-41	LPDELLV HVL	SSLET-KQAA	STSV L SK---	RWRTLFAVR-	-RNLDFD
G4006832/1-41	ICPDVLR CVF	ELLSF-PDLN	RTRS V CS---	SWHSASRHC-	-VPTQ NQ
049647/1-41	LP L D L LNLVF	KRLSF-ANFR	QAKSV CS ---	SWYSASKQS-	-V P K N QI
082216/1-42	LPDELLYQIL	SFLNT-KEAA	LTSIL SK ---	RWRYLIAFV-	SCIEIDD
4204283/1-44	LPVEVIGNIL	SRGGARDVV	IASATCR---	KWREACR KHL	QTL S FNS
080761/1-41	LPEHLLCRIL	SEEST-KDSV	RTSV L SK---	HWRNLWLHV-	-PVLELE
062361/1-40	NP-KL F KLIL	ERIPL-PALF	VLRQV SK ---	QLRQFVDFL-	-NFEINI
081868_1/1-41	LPEEIVVHCL	ARISR-LYYP	TL S L V SK---	SFRS I LSST-	-ELYATR
081805/1-42	LPGELLDHIA	NGLFSKVELL	RFRS I CK---	TFRSAVDS-	-KNFLDH
G3886070/1-41	IPISVIHVIL	DHV K P-VERL	VLQKV SQ ---	KLRSM L LSR-	-NHGF KW
022191/1-40	ISIDLIAEIL	SRVPS-KSVA	RFRCV SK ---	PWASMI RR --	-PYFTEL
G3834311/1-40	LPDHVLHEIL	LK L AT-KDSV	KTSIL ST ---	RWRYLWQR--	-VPGLDL
049565/1-41	IP L DMIPDIL	LR L PA-KSAV	RFRIV SK ---	LWLSITTRP-	-YFIR S F
080993/1-41	LPD S L L TQVIL	SYLPT-IDSV	KTSV L SK---	RWEFLWLRV-	-PVL D LK
WORM CE19091 Y3	MPVEIVRKIL	MEIEP-IERF	PFRRV CS ---	VFRNAIDSL-	-D-WN F K

```

G3834320/1-40  LPDSLLCQVF LNPT-KDVV KTSVLS--- TWGNTWRS-- -VPGLDL
O81414/1-41   LPNDIVLNIL ARVPR-WYHP ILSCVSK--- NLRFLVSS-- -ELKITR
O80670/1-40   LPDLTLDCTL EKESP-SELC AMTSVCS--- ELRDKGSS-- -SYLAPI
O62018/1-41   MPIKILQRIL NEICF-RDKM VLQKVC--- ILRKVPEI- -DAVAHS
O62018_1/1-41 LPVIQIVSDIL DGLTV-LDRM IVRRVSR--- KLEALVDKN- -HHSIKS
G3790747/1-41 LPVLVQKRIF KFLST-RDVF ALSLCFR--- KLAVSVQNC- -KSEQON
O65662_1/1-41 LPDVLILNCL SRIPK-SYYP KLSIVSK--- TFRDLIISI- -DLNHAR
O17098_1/1-40 IC-VIMGKVT QYLDY-KHLO VLRKISR--- AIRQCIDIL- -KPDPKV
Consensus/60% LP.-llppIl ppLss.bcbb phppVs+... pa+sllspp. .shbbpp

```

Total : 181 entrées comparées par SMART.

Tableau de la légende de l'alignement

Explanation of codes used in CHROMA coloured alignments

Group name	Amino acids	Displayed as
Default	X	.
Single	X	
Alanine	A	A
Cysteine	C	C
Aspartic Acid	D	D
Glutamic Acid	E	E
Phenylalanine	F	F
Glycine	G	G
Histidine	H	H
Isoleucine	I	I
Lysine	K	K
Leucine	L	L
Methionine	M	M
Asparagine	N	N
Proline	P	P
Glutamine	Q	Q
Arginine	R	R
Serine	S	S
Threonine	T	T
Valine	V	V
Tryptophan	W	W
Tyrosine	Y	Y
Negative	D,E	-
Ser/Thr	S,T	*
Aliphatic	I,L,V	
Positive	H,K,R	+
Tiny	A,G,S	t
Aromatic	F,H,W,Y	a
Charged	D,E,H,K,R	c
Small	A,C,D,G,N,P,S,T,V	s
Polar	C,D,E,H,K,N,Q,R,S,T	p
Big	E,F,H,I,K,L,M,Q,R,W,Y	b

Hydrophobic

A,C,F,G,H,I,L,M,T,V,W,Y

h

3. Liste des potentielles cibles de SEL-10 intéressantes, classée selon les catégories de fonction de protéine et intérêt au sein de la transdifférenciation

En jaune : catégorie 1 : potentielles cibles d'intérêt avec un rôle connu de répression de l'expression des gènes (le gène *mes-1* avait été testé et écarté par Steven Zuryn)

En vert clair : catégorie 2 : protéines capables de se lier à ARN ou ADN

En bleu : catégorie 3 : protéines avec un domaine permettant une liaison à l'ADN ou aux ARN.

En violet : autres protéines pouvant potentiellement présenter un rôle de répresseur de l'expression génique.

Toutes les autres protéines de la liste de Claire de la Cova ont été écartées car la fonction du gène était inconnu (et aucun domaines protéique prédit pour avoir une potentielle action sur la transdifférenciation) ou ne correspondait pas à un rôle de répresseur de l'expression des gènes.

WormBase Sequence Name	Associate d Gene Name	Description
03 WBGene000166	met-1	histone METHyltransferase-like family member (met-1) [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_491340]
15 WBGene000012	ego-2	Enhancer of Glp-One (glp-1) family member (ego-2) [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_001076622]
73 WBGene000224	bet-1	Temporarily Assigned Gene name family member (tag-332) [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_871879]- recognise acetylated histones
06 WBGene000063	sue-1	SUPpressor of Elongation defect family member (sue-1) [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_492083]
58 WBGene000223	2 Y92H12A.	Protein Y92H12A.2 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9BKW4] - Isoform 2 of E3 ubiquitin-protein ligase NEDD4-like (Human)
82 WBGene000129	jmjd-2	Lysine-specific demethylase 4 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9U297]
79 WBGene000003	cct-4	T-complex protein 1 subunit delta [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P47208] - CCT-4 represses SKN-1-dependent transcription of <i>gst-4</i> ; CCT-4 is expressed in pharynx, pharyngeal gland cells, intestine, renal gland cells, and neurons; CCT-4 is expressed in touch receptor neurons in a MEC-3-dependent fashion
51 WBGene000047	sea-2	Signal Element on Autosome family member (sea-2) [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_494701]

50	WBGene000049	sox-3	SOX (mammalian SRY box) family member (sox-3) [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_510439]
78	WBGene000039	pes-4	Protein PES-4 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q95Y67] pes-4 reporter is expressed in three rectal epithelial cells from the L1 larval stage through adulthood RNA binding protein related identified in promoter trapping exp. But unknown precise role.
75	WBGene000069	zfp-1	Uncharacterized protein F54F2.2, isoform a [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P34447] ZFP-1 plays a role in gene silencing; based on sequence similarity, ZFP-1 is predicted to associate with chromatin.
43	WBGene000151	B0336.3	Protein B0336.3 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q10954] RNA binding protein 26 + negative regulation of phosphatase activity
66	WBGene000003	cbp-1	Protein cbp-1 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P34545] CBP-1 exhibits histone acetyltransferase (HAT) activity in vitro and has a glutamine/asparagine-rich domain; CBP-1 is required during embryogenesis for differentiation of all non-neuronal somatic cell types;
63	WBGene000204	cec-6	C.Elegans Chromodomain protein ; chromatin organization modifier
98	WBGene000132	Y57G11B.6	Transcription repression factor which plays an important role in the establishment of the regional subdivision of the developing brain and in the development of the telencephalon. (in human)
27	WBGene000065	tax-6	abnormal CHEmotaxis family member (tax-6) [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_001021292] calcineurin A that is required for inhibition and adaptation of several sensory neurons and for the normal regulation of egg-laying
10	WBGene000012	egl-46	EGg Laying defective family member (egl-46) [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_504694] transcription factor with similarity to the TFIIA-like zinc-finger nuclear protein expressed dynamically in neurons and inhibit tuch cell fate
39	WBGene000047	scd-1	Suppressor of Constitutive Dauer formation family member (scd-1) [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_741912] several regions that are extremely glutamine may mediate epigenetic changes of stably heritable tertiary conformation.
70	WBGene000206	T22B2.6	Protein T22B2.6 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:O45192] Isoform 2 of BCL-6 corepressor-like protein 1 _ Transcriptional corepressor
40	WBGene000086	F10B5.3	Protein F10B5.3 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q09534] Isoform 1 of Sal-like protein 1 Transcriptional repressor involved in organogenesis (homo sapiens)
73	WBGene000047	sem-4	SEx Muscle abnormal family member (sem-4) [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_491997] - Zinc

		Finger,required for proper development of cells in neuronal, mesodermal, and vulval cell lineages
00	WBGene000031	mab-3 Protein male abnormal 3 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:O18214]_ acting as a transcriptional repressor of ref-1,
51	WBGene000019	hlh-4 Helix-loop-helix protein 4 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P34555] - determination of the neuronal precursors in the peripheral nervous system and the central nervous system. (human)
84	WBGene000079	irx-1 Putative iroquois-class homeodomain protein irx-1 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q93348] - transcriptional regulatory network; remodeling of the GABAergic DD neuron synapses during larval development.
96	WBGene000015	gld-2 Poly(A) RNA polymerase gld-2 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:O17087]
20	WBGene000002	atf-2 ATF (cAMP-dependent transcription factor) family member (atf-2) [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_495861]
49	WBGene000085	din-1 DAF-12 Interacting Protein family member (din-1) [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_496484] - RNA recognition motif (aka RRM, RBD or RNP domain)
04	WBGene000034	mpz-1 Multiple PDZ domain protein family member (mpz-1) [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_001122601]
33	WBGene000030	lin-48 abnormal cell LiNeage family member (lin-48) [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_497759]
30	WBGene000032	mex-5 Zinc finger protein mex-5 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9XUB2] - establish soma germline asymmetry in embryos affects formation of intestinal cells
96	WBGene000067	unc-62 Homeobox protein unc-62 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9N5D6]_ Meis-class homeodomain protein required for posterior embryonic morphogenesis
42	WBGene000070	pbrm-1 PolyBRoMo domain containing family member (pbrm-1) [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_001021008]
72	WBGene000185	lin-42 abnormal cell LiNeage family member (lin-42) [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_001022176]_ regulation of circadian rhythms; during larval development
64	WBGene000047	sel-7 Suppressor/Enhancer of Lin-12 family member (sel-7) [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_510392]_ two predicted PEST sequences; expression in the nuclei, activation of expression
30	WBGene000443	alr-1 AristaLess (Drosophila homeodomain) Related family member (alr-1) [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_509860]_ homeodomain transcription factor (gene expression activator)
48	WBGene000129	dhhc-2 DHHC-types zinc finger transcription factor family member (dhhc-2) [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_493007]
09	WBGene000180	F33D11.1 Protein F33D11.12 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q95X59] - DHHC-types zinc finger protein

00	WBGene000030	lin-11	Protein lin-11 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P20154] - LIM homeodomain transcription factor
59	WBGene000035	ncl-1	B-box type zinc finger protein ncl-1 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P34611] - negatively regulates rRNA and 5S RNA transcription, nucleolus size, and body size
55	WBGene000019	hlh-11	Helix-loop-helix protein 11 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P34474] - transcription régulation
20	WBGene000018	ham-1	HSN Abnormal Migration family member (ham-1) [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_502401] - helix DNA-binding motif; ham-1 is required for the asymmetric divisions of several neuroblasts
67	WBGene000031	mec-3	Mechanosensory protein 3 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P09088] - transcriptional regulators; MEC-3 activity is required for proper differentiation and maturation of the mechanosensory neurons
54	WBGene000019	hlh-10	Helix Loop Helix family member (hlh-10) [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_505401] - transcription factor 21 (human homologue)
47	WBGene000038	blmp-1	Blimp1 (B Lymphocyte-induced Maturation Protein-1) homolog family member (blmp-1) [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_492723] - zinc finger and SET domain-containing protein
39	WBGene000099	ztf-11	Zinc finger Transcription Factor family member (ztf-11) [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_492622]
70	WBGene000139	ZK337.2	Protein ZK337.2 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:O46016] - human : Zinc finger protein 436
74	WBGene000124	atf-6	AT hook Transcription Factor family
31	WBGene000032	mex-6	Zinc finger protein mex-6 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q09436]
88	WBGene000198	R05F9.1	Protein R05F9.1, isoform b [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q21747] - BTB/POZ domain-containing protein 10 (nuclear)
28	WBGene000084	D2085.3	Protein D2085.3 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q18994] - epsilon subunit of translation initiation factor eIF2B
30	WBGene000123	zip-3	bZIP transcription factor family member (zip-3) [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_496919]
60	WBGene000199	ztf-16	Zinc finger Transcription Factor family member (ztf-16) [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_001024851]
80	WBGene000154	C05D10.4	Uncharacterized protein C05D10.4 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q11181] - transcription factors related to STE and is found associated with the C2H2 zinc finger in some proteins.
98	WBGene000035	nhl-2	NHL (ring finger b-box coiled coil) domain containing family member (nhl-2) [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_498026] - regulate the efficacy of microRNA-target interactions and hence, gene

		regulation, during postembryonic development+embryonic polarity
44	WBGene000126	rabx-5 RAB eXchange factor family member (rabx-5) [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_499337]_ protein containing a zinc-finger domain and a Vps9 domain that is the C. elegans ortholog of the Rabex-5 Rab5 guanine-nucleotide exchange factor (GEF)
99	WBGene000112	ikke-1 Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase epsilon subunit homolog 1 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P32742]
77	WBGene000154	attf-4 AT hook Transcription Factor family
69	WBGene000183	F42H10.5 Uncharacterized protein F42H10.5 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P34418]- HAT family dimerisation domain containing protein (interact with DNA)
70	WBGene000015	gei-13 Gex-3-interacting protein 13 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P34478]_ BED finger domain (predicted to be DNA-binding)
45	WBGene000038	odd-1 Zinc finger protein odd-1 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P41995]
12	WBGene000039	pal-1 Homeobox protein pal-1 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P34766]_ PAL-1 binds to an enhancer element in the promoter of hih-1
65	WBGene000015	gei-8 GEX Interacting protein family member (gei-8) [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_498773]_ two myb-like DNA-binding domains co-repressor
43	WBGene000129	bed-2 BED-type zinc finger transcription factor family member (bed-2) [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_499474]
58	WBGene000044	rpn-1 proteasome Regulatory Particle, Non-ATPase-like family member (rpn-1) [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_501064]
70	WBGene000069	zag-1 Zinc finger plus homeodomain, Axon Guidance family member (zag-1) [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_500424]
60	WBGene000220	dmd-9 Protein DMD-9 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q95XU1]_ DM (Doublesex/MAB-3) Domain family : DM domain is a cysteine-rich DNA-binding motif
90	WBGene000029	lin-1 abnormal cell LiNeage family member (lin-1) [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_001023051]_ transcription factor that is a member of the ETS ; general effector of MAP kinase-mediated signaling
40	WBGene000119	T23B5.3 Protein T23B5.3, isoform c [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q3S1J1]_ apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus isoform 3
51	WBGene000197	M03D4.4 Protein M03D4.4, isoform a [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q21494]_ Zinc finger protein 331
23	WBGene000216	Y47D7A.1 Protein Y47D7A.11 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9N3U4]_ cDNA

		FLJ53860, highly similar to DNA-directed RNA polymerase II largest subunit
21	WBGene000005	cky-1 CKY homolog family member (cky-1) [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_001122849]_ AHA-1/CKY-1 complex exhibits sequence-specific DNA binding; when co-expressed in cultured cells ; non-neuronal pharyngeal cells
75	WBGene000067	unc-39 UNCoordinated family member (unc-39) [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_506563]_ neurone :homeodomain transcription factor that belongs to the Six4/5
60	WBGene000067	unc-23 UNCoordinated family member (unc-23) [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_505307]_ functions to negatively regulate proteosomal degradation by the E3 ubiquitin ligase and Hsp70 co-chaperone CHIP required for proper attachment of the anterior body wall musculature to the overlying hypodermis
41	WBGene000014	fkh-9 ForkHead transcription factor family member (fkh-9) [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_001024760]
62	WBGene000048	sma-9 SMALL family member (sma-9) [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_001129936]_ cell fate specification in the postembryonic mesodermal lineage, the M lineage; SMA-9 is widely expressed and localizes to nuclei.
09	WBGene000039	pag-3 PAttern of reporter Gene expression abnormal family member (pag-3) [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_510480]_ C2H2 zinc-finger protein expressed in neurons
38	WBGene000151	B0310.2 Putative zinc finger protein B0310.2 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q10938]
28	WBGene000004	ceh-1 Homeobox protein ceh-1 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P53547]_ NK1 transcription factor-related protein 1 (human homolog)
54	WBGene000041	pqn-72 Prion-like-(Q/N-rich)-domain-bearing protein family member (pqn-72) [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_001122527]
43	WBGene000041	pqn-59 Prion-like-(Q/N-rich)-domain-bearing protein family member (pqn-59) [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_490727]
95	WBGene000022	let-19 Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 13 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q93442]
43	WBGene000032	mig-10 Abnormal cell migration protein 10 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P34400]
85	WBGene000182	smk-1 SMEK (Dictyostelium Suppressor of MEK null) homolog family member (smk-1) [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_001023909]_ the defense response to pathogenic bacteria and increased resistance to oxidative and UV-induced damage affecting the transcription of DAF-16 target genes, such as sod-3, ctl-1, and lys-8; SMK-1 is present in the nucleus of intestinal cells,
31	WBGene000098	F47G9.4 Probable RING finger protein 207 homolog [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q20548]_ cardiac repolarization that depends on multiple environmental and genetic contributors

63	WBGene000018	him-4	High Incidence of Males (increased X chromosome loss) family member (him-4) [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_509635]
22	WBGene000086	F09C8.2	Protein F09C8.2 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:O01299]_ C10orf28
01	WBGene000449	Y41G9A.1	protein nucleotid binding
	0		nucleic acid binding
31	WBGene000041	pqn-44	Prion-like-(Q/N-rich)-domain-bearing protein family member (pqn-44) [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_871825]
15	WBGene000041	pqn-26	Prion-like-(Q/N-rich)-domain-bearing protein family member (pqn-26) [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_492375]
67	WBGene000041	pqn-87	Prion-like-(Q/N-rich)-domain-bearing protein family member (pqn-87) [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_496594]
81	WBGene000014	fog-1	Feminization Of Germline family member (fog-1) [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_001021791]
22	WBGene000036	nhr-23	Nuclear hormone receptor family member nhr-23 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P41828]
37	WBGene000047	scc-1	yeast SCC (mitotic condensin subunit) homolog family member (scc-1) [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_494836]

« Je n'ai pas échoué.
J'ai simplement trouvé 10 000 solutions qui ne fonctionnent pas. »

Thomas Edison

Analyse des mécanismes assurant la robustesse d'un événement de transdifférenciation : rôle de l'ubiquitine ligase E3 SEL-10.

Résumé

Les cellules différenciées peuvent changer de destin cellulaire de manière induite ou naturelle. Afin de comprendre et connaître les acteurs et mécanismes contrôlant les processus de reprogrammation qui sont à la fois responsables du contrôle et du maintien de l'identité cellulaire. Notre laboratoire étudie le changement d'identité (ou transdifférenciation, Td) naturel d'une cellule épithéliale rectale (nommée Y) en motoneurone (nommé PDA) chez *Caenorhabditis elegans*.

Les travaux préliminaires ont montré qu'il existe une synergie entre les modifications d'histone (*jmjd-3.1* et *wdr-5.1*) et l'ubiquitination (*sel-10*). SEL-10 est une ubiquitine ligase E3 possédant un domaine Fbox et une répétition de domaines WD40.

Dans cette étude, nous avons pu mettre en évidence : i) une implication du domaine Fbox, des indications sur la localisation intracellulaire de SEL-10 et un rôle inattendu du protéasome au sein de la Td. ii) un rôle de SEL-10 dans la robustesse de la Td (résistance aux stress environnementaux). iii) *sel-10*, *jmjd-3.1* et *wdr-5.1* agissent sur la transcription de gènes impliqués dans la transdifférenciation. Ce dernier point a été testé par smFISH et a également permis une caractérisation du motif d'expression marqueur de transdifférenciation *cog-1* au cours de la redifférenciation.

J'ai caractérisé l'impact de la synergie entre les modifications d'histone et l'ubiquitination sur la transcription de gènes clés et la robustesse de la transdifférenciation. Si cette synergie est mise en évidence dans des modèles cellulaires de reprogrammation, alors cette découverte pourrait être une avancée majeure dans l'amélioration de l'efficacité des reprogrammations induites.

Abstract (Résumé en anglais)

Differentiated cells can change their cellular fate induced or naturally. One of the main challenges of developmental biology is to understand the mechanisms controlling reprogramming processes that are both responsible for the control and maintenance of cellular identity. Our laboratory is studying the natural change in identity (or transdifferentiation, Td) of a rectal epithelial cell (named Y) and motor neuron (named PDA) in *Caenorhabditis elegans*.

Preliminary work has shown that there is a synergy between histone modifications (*jmjd-3.1* and *wdr-5.1*) and ubiquitination (*sel-10*). SEL-10 is an E3 ubiquitin ligase with a Fbox domain and WD40 repeat domain.

In this study, we highlight: i) the Fbox domain involvement in the Td, indications about the intracellular localization of SEL-10 and an unexpected role of the proteasome within TD. ii) a role of SEL-10 in the robustness of the Td. iii) *sel-10*, *jmjd-3.1* and *wdr-5.1* act on gene transcription in transdifferentiation. This one was tested by smFISH and allowed the characterization of the *cog-1* transdifferentiation marker expression pattern during redifferentiation.

I characterized the impact of the synergy between histone modifications and ubiquitination on gene transcription and the robustness of transdifferentiation. If we demonstrate this synergy in cellular models of reprogramming, then this discovery could be a major increase in the improvement of the efficiency of induced reprogramming.