



HAL
open science

Décryptage de la fonction de la voie de signalisation nétrine-1 dans les cellules souches pluripotentes

Noémie Combémoré

► **To cite this version:**

Noémie Combémoré. Décryptage de la fonction de la voie de signalisation nétrine-1 dans les cellules souches pluripotentes. Biologie cellulaire. Université Claude Bernard - Lyon I, 2022. Français. NNT : 2022LYO10206 . tel-04390207

HAL Id: tel-04390207

<https://theses.hal.science/tel-04390207v1>

Submitted on 12 Jan 2024

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.



**THESE de DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1**

**Ecole Doctorale ED340
Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire**

Discipline : Biologie

Soutenue publiquement le 13/12/2022, par :
Noémie Combémoré

**Décryptage de la fonction de la voie de
signalisation nétrine-1 dans les cellules
souches pluripotentes**

Devant le jury composé de :

Acloque, Hervé
De Vos, John
Aksoy, Irène
Bernet, Agnès
Boeuf, Hélène

CR, INRAE, Paris
PUPH, Université de Montpellier, Montpellier
CR, SBRI, Lyon
PU, UCBL1, Lyon
DR, Biotis, Bordeaux

Rapporteur
Rapporteur & Président
Examinatrice
Examinatrice
Examinatrice

Lavial, Fabrice

DR, CRCL, Lyon

Directeur de thèse

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier les membres de mon jury : le Dr Hervé Acloque, le Dr Irène Aksoy, le Pr Agnès Bernet, le Dr Hélène Bœuf et le Pr John De Vos, pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Je remercie particulièrement le Dr Hervé Acloque et le Pr John De Vos pour le temps accordé à la lecture approfondie et à l'appréciation critique de ce manuscrit. J'adresse également mes remerciements les plus sincères aux membres de mon comité de suivi de thèse, le Dr Alain Chédotal et le Dr Pierre Savatier, pour avoir pris le temps de me guider et de me conseiller au cours de mon parcours. Je remercie aussi toutes les personnes qui ont collaboré à mon projet, de près ou de loin, et notamment les équipes de Pierre Savatier, Claire Chazaud, et Julien Sage ainsi que le personnel de la plateforme de cytométrie (où j'ai passé beaucoup de temps) : Priscillia, Agathe et Thibault.

Un grand merci à Fabrice pour m'avoir accueillie dans ton laboratoire. Du master à la thèse, du 2^{ème} au 5^{ème} étage du Cheney A, de jeune CR à DR, de l'équipe de 5 personnes à celle de 10, ces presque six années ensemble m'ont énormément appris. Tout n'a pas toujours été facile, mais malgré les difficultés je suis très reconnaissante d'avoir pu travailler et évoluer à tes côtés. Merci encore pour ton temps, tes conseils, tes enseignements, et toutes les discussions qu'on a pu avoir, scientifiques ou non.

Je remercie l'ensemble des membres de l'équipe Laval, actuels et anciens, pour tous les bons moments passés à vos côtés. Le déjeuner, faire le stock, les heures passées en culture, tous ces instants de bonne humeur ne seraient pas les mêmes sans vous ! Merci en particulier à Giacomo, Pauline, et Xavier, qui ont continué à prendre de mes nouvelles et à m'encourager même après leur départ. Merci à Aurélia, pour tes innombrables conseils et aide technique. Merci de nous mater tous et de faire en sorte que le labo soit toujours dans un état acceptable ! Merci aussi d'avoir relu mon manuscrit. Encore bravo pour tes concours et ton papier cette année, le début de nouvelles grandes choses ;) Merci à Maëva, pour ta bonne humeur, ta patience infinie et pour l'élan d'organisation que tu impulses au labo ! Merci de gérer pour nous tous les aspects administratifs et techniques, ton aide est précieuse et très appréciée. Merci à Élodie pour toute ton aide, tu as toujours été disponible et prête à me conseiller, que ce soit pour mon projet de thèse ou d'avenir. Merci à Hubert également pour tous tes conseils, tu m'as beaucoup soutenue notamment ces derniers temps et je t'en suis reconnaissante ! Merci pour tout Debora, c'était un plaisir de travailler avec toi sur le projet Nétrine. Je sais que je le laisse entre de bonnes mains ! Merci aussi pour le sandwich que tu m'avais fait, je ne l'oublierai jamais haha. Pour finir, merci à mes deux rayons de soleil, Aneta et Emma. Ma thèse n'aurait pas été la même sans votre présence quotidienne ! Un énorme merci pour vos encouragements, votre soutien, les services rendus et les sorties pour

décompresser après le labo. Je me sens moins vieille grâce à vous :p Bon courage pour vos thèses respectives, notre trio me manquera beaucoup...

Un grand merci également à tous les membres des autres équipes de l'étage : les Ichim, dont certains sont là depuis presque aussi longtemps que moi, et resteront bien après (n'est-ce pas Kévin), les Ablain, ainsi qu'aux autres collègues du CRCL. Merci en particulier à Déborah et Kévin, qui ont été présents quasiment du début à la fin de ma thèse, et avec qui j'ai partagé énormément, les moments drôles comme les décourageants. Merci aussi à Clara, Kathy, Catherine, Serena, Victoria, et Amira, je vous connais depuis moins longtemps mais c'était un plaisir de déjeuner avec vous tous les midis ou presque ! Un merci également à Paulette pour tous tes conseils et ton soutien.

Au club Boa : merci à tous pour les messages qui me faisaient sourire, les débats interminables qui font que tu as 87 messages non lus, les Skypéros, les soirées Top Chef, les vacances et les Nouvel An ! Depuis l'ENS jusqu'à la thèse, j'ai tellement de chance d'avoir gardé des amis comme vous. Merci du fond du cœur pour les recettes de cuisine et tous les repas partagés (sauf le canard aux lentilles), les vacances avec ou sans piscine, et plus sérieusement de toujours être là pour répondre à mes questions, me soutenir et m'encourager. Emma, merci de toujours prendre de mes nouvelles et de partager des recettes de cookies, tu es ma prof (de prépa) préférée ! Merci à Louis pour tous les Cascada, Bass Hunter et Runaway, de Lyon à Yakushima en passant par Cuzco. Estelle, ma prof (d'agreg) préférée, merci pour les karaokés et les voyages avec Titine. Mathieu, merci pour tes pains d'épices et ton enthousiasme permanent, grâce à toi on voit la vie en roux ;) Merci à Théo pour ton grand sourire qui me met toujours de bonne humeur, les jeux et les bières partagées, bon courage pour la thèse toi qui en as encore pour un moment ! Merci à Paul de m'en apprendre toujours plus sur les maquettes, les peintures de figurines, et de partager mon amour pour le Japon. Vincent, toi qui as subi cette dernière année avec moi, si près mais si loin, bon courage pour la (vraiment cette fois) dernière ligne droite ! Merci pour les fous rire et les pancakes. Merci enfin à Victor d'avoir été un super colocataire, un partenaire d'anniversaire/Galas/WEI/fête de la musique/(insérer ici le nom de n'importe quelle aventure). Merci de toujours me motiver pour organiser des super voyages, regarder des supers films (on ne retiendra pas les deux échecs), prendre des supers photos d'étoiles, et d'être là pour avoir des discussions plus profondes de temps à autre.

Merci aussi aux autres amis de l'ENS, notamment à Agnès, Charline, Janelle, Nathalie, Loïc et Arnaud avec qui j'ai partagé les TP et les cours, à Victor H, pour toutes les soirées et à Étienne, pour nos nombreuses sessions photo. Merci à Yann, mon Bibi, avec qui j'ai commencé mon parcours de scientifique et voyagé aux quatre coins du monde.

Un grand merci aux pompoms, au club Bouli et en particulier à mes acolytes de raclettes/brunchs/pique-nique, bungalow de WEI, et concerts : Tess Bouli, K-yoncé, Lezlaï et Dr DJ Soso. Tess, merci pour tes super chorés, tes anecdotes d'Allemagne, les journées piscine et tes soirées d'anniversaire mémorables. Kévin, merci de partager avec moi les dernières nouvelles de Taylor et Dua Lipa, et les concerts à la bougie suivis de beaucoup trop de shots

de limoncello. Merci à Leslie de toujours volontiers me corriger mes textes en anglais, de m'accompagner au Lyon Street Food Festival ou en zone de guerre (#fortdeFeyzin) et de mettre du fun dans mes stories Instagram. Sophie, merci pour les banoffee pies, nos duos de danse sur Eastside et Fix You, et tous les mercredis soir à la MJC !

Merci justement aux copines de la MJC, venir danser tous les mercredi soir à 21h ce n'est pas évident mais on l'a fait, y compris pendant le confinement ! Merci en particulier à Claire avec qui j'ai partagé ces 4 années, et merci Émilie pour toutes les chorégraphies, les exercices et les spectacles.

Merci au club d'aïkido de m'avoir si rapidement intégrée à votre groupe, et de m'avoir réconfortée quand le moral n'était pas au rendez-vous. Merci en particulier à Sam, Alexis, Antoine, Lionel et Vincent, toujours partants pour organiser un apéro.

Un énorme merci à mon groupe Booktok : Louise, Claire E, Chloé, Emma, Paula, Clotilde, Claire R, pour les 9 lectures communes et tous les dimanches matin à discuter de nos personnages favoris.

Merci à Elena, ma Tic (ou ma Tac), pour tous les Factory et les soirées d'Halloween en passant par le voyage à Copenhague, sans oublier tous nos bons moments à la fac. Merci aussi de partager mon goût pour les séries romantiques de la BBC !

Je souhaite bien sûr remercier ma famille, qui ne comprend pas toujours tout ce que je fais mais ne renonce jamais à essayer, et me le redemande régulièrement. Merci pour votre soutien infini.

Merci à Maman et Alain, pour m'avoir sans cesse encouragée et avoir cru en moi. Merci à Karine, ma petite sœur adorée, que je vais rejoindre en Angleterre sous peu pour aller voir encore plus de comédies musicales ;))

Merci à Papa et Dominique, pour votre soutien sans faille. Merci aussi à Alexandre et Coline, avec qui j'ai toujours partagé de supers vacances, à jouer à la DS, à soupirer et attendre les parents qui prenaient quinze mille photos.

Merci à Claude, Nicole, Rudy, Alex et à l'ensemble des familles Bunel et Majourel, qui m'ont intégrée à leur famille ! Merci pour les vacances au Ménial et à Cros, c'est toujours un plaisir de passer du temps avec vous tous.

Enfin, merci à Félix pour ces 8 années, dont 4 (3) en thèse. Merci de toujours m'encourager, de me donner la force de me relever à chaque fois que je tombe, de me faire rire, de me faire la cuisine, de m'initier à tes loisirs exotiques. Que ce soit avec ou sans piscine, en Islande, au Japon, en Espagne, au Pérou, en Bolivie, en Angleterre, en Suisse, à Lyon, Bordeaux, Strasbourg ou à Tours, je t'aime.

Résumé

Les cellules souches embryonnaires (CSE) de souris constituent un modèle remarquablement utile pour l'étude *in vitro* de la pluripotence et du développement. Elles présentent deux propriétés caractéristiques : elles sont capables de s'auto-renouveler et de se différencier en chacun des trois lignages de l'embryon. Plusieurs intermédiaires de la pluripotence ont récemment été capturés *in vitro* et identifiés *in vivo*, avec chacun leurs propriétés moléculaires et fonctionnelles. Ainsi, la pluripotence n'est pas l'état unique défini par le passé, mais plutôt un continuum dynamique de configurations cellulaires variées.

La Nétrine-1 (Ntn1) est une protéine sécrétée similaire à la laminine qui a été découverte comme facteur de guidage axonal durant le développement du système nerveux. Récemment, notre laboratoire a montré que Ntn1 améliore l'efficacité de la reprogrammation et régule le maintien de la pluripotence (Ozmadenci et al., 2015). Durant ma thèse, j'ai exploré en détail la fonction et la dynamique de la voie de signalisation Ntn1 dans les CSE murines.

Dans un premier temps, nous avons montré que la Ntn1 et ses récepteurs Unc5b et Néogénine (Neo1) étaient d'importants régulateurs positifs de la pluripotence naïve (Huyghe et al., 2020). Ensemble, ils inhibent la voie de signalisation MAPK et activent la voie WNT. Nous avons également découvert que cette voie de signalisation jouait un rôle dans l'homéostasie du compartiment pluripotent du blastocyste *in vivo*.

Dans un second temps, nous avons utilisé le système CRISPR-Cas9 pour établir par knock-in un rapporteur fluorescent tricolore pour l'expression endogène de Ntn1, Neo1 et Unc5b. Nous avons tout d'abord démontré que la culture de CSE était hétérogène pour leur expression, et que des populations exprimant différents niveaux de Ntn1, Neo1 et Unc5b coexistaient. La caractérisation poussée des sous-populations a révélé que ces cellules possédaient des propriétés fonctionnelles et des profils d'expression protéiques différents. Par la suite, nous avons découvert que la variabilité de l'expression de Ntn1 et Neo1, mais pas d'Unc5b, était étroitement liée au cycle cellulaire. La mise au point d'un crible shARN nous a permis d'identifier Cycline B1 et E2F4 comme régulateurs de leur expression. Enfin, nous avons montré que l'expression renforcée de Ntn1 contribuait à l'augmentation de la clonogénicité des cellules durant la phase S.

Ces résultats mettent donc ainsi en évidence pour la première fois la régulation par le cycle cellulaire de l'expression du ligand et des récepteurs d'une voie de signalisation, modulant ainsi potentiellement la sensibilité des cellules aux signaux de différenciation grâce à l'action de la voie Nétrine sur la pluripotence des CSE.

Abstract

Mouse embryonic stem (mESC) cells are an incredibly useful model to study pluripotency and development *in vitro*. They present two characteristic properties, the ability to self-renew and to differentiate into all three germ layers of the embryo. Multiple intermediates of pluripotency harboring different molecular and functional properties have been described *in vivo* and can be captured *in vitro*. Thus, pluripotency is not the unique state it was once thought to be but rather a continuum of dynamic cellular configurations.

Netrin-1 (Ntn1) is a secreted laminin-like protein that was first discovered as a guidance molecule for axon growth during the development of the nervous system. Recently, our lab described that Ntn1 improved the efficiency of reprogramming and regulated pluripotency maintenance (Ozmadenci et al., 2015). During my PhD, I explored in depth the function and dynamic of the Ntn1 signalling pathway in mESC.

Firstly, we demonstrated that Ntn1 and its two receptors Neogenin (Neo1) and Unc5b were important positive regulators of naive pluripotency (Huyghe et al., 2020). Together, they inhibit the MAPK signalling pathway and activate the WNT pathway. We also showed that this signalling pathway had a role in the homeostasis of the pluripotent compartment of the blastocyst *in vivo*.

Secondly, to dissect such a dynamic and the regulation of this pathway in pluripotent cells, we established a tricolor fluorescent knock-in reporter mESC line for the endogenous expression of Ntn1, Neo1 or Unc5b using the CRISPR-Cas9 technique. We first demonstrated that the mESC culture was heterogeneous and that different subpopulations of cells expressing or not Ntn1, Neo1 and Unc5b coexist in culture. We further characterized these subpopulations and reported that they differ at the functional and proteic levels. Next, we discovered that the variability of the expression of Ntn1 and Neo1, but not of Unc5b, was tightly linked to the cell cycle. We performed a small-scale shRNA screen to find the cell cycle regulators of their expression and identified Cyclin B1 and E2F4 as such. Finally, we showed that strong Ntn1 expression during the S phase of the cell cycle contributes to the increased clonogenicity of those cells.

Altogether, these results highlight for the first time how a critical signalling pathway is regulated by the cell cycle in pluripotent cells, potentially modulating the sensitivity to differentiation cues thanks to the positive role of the Ntn1 pathway on mESC pluripotency.

Liste des abréviations

Note pour le lecteur : La convention d'écriture pour les gènes, ARN et protéines chez la souris est la suivante (d'après le Comité International sur la Nomenclature Génétique Standardisée chez la souris) : les gènes et ARN doivent être écrits en minuscules et en italique (ex. *Ntn1*) et les protéines en majuscules (ex. NTN1).

2i+LIF :	Deux inhibiteurs + LIF
A2b :	Adenosin 2b receptor
ADN :	Acide DéoxyRiboNucléique
AKT1 :	AKT serine/threonine kinase 1
AMPc :	Adénosine monophosphate cyclique
AP :	Phosphatase alcaline
APC :	Anaphase-promoting complex
APC/C :	APC/Cyclosome
App :	Amyloid precursor protein
ARN :	Acide RiboNucléique
ATPase :	Adénosine triphosphatase
ATR :	ATM and Rad3-related
A β :	Amyloid β
BMP :	Bone morphogenetic protein
BMP4 :	Bone Morphogenetic Protein 4
CCN(A-B-C-D-E) :	Cycline (A-B-C-D-E)
CDB :	Cassures double brin
CDC20 :	Cell division cycle 20
CDK :	Cyclin-dependent kinase
CDT1 :	Chromatin licensing and DNA replication factor 1, CDC10-dependent transcript 1
CDX2 :	Caudal type homeobox 2
CE :	Carcinome embryonnaire
CGP :	Cellules germinales primordiales

CKI :	CDK inhibitors
c-MYC :	Myelocytomatosis oncogene
CSC :	Cellules souches cancéreuses
CSE :	Cellules souches embryonnaires
CSEh :	Cellules souches embryonnaires humaines
CSEF :	Cellules souches en état fondamental
CSEpi :	Cellules souches épiblastiques
CSEpiL :	CSEpi-like
CSF :	Cellules souches formatives
CSH :	Cellules souches embryonnaires humaines
CSP :	Cellules souches pluripotentes
CSR :	Cellules souches rosettes
DB :	DCC binding
DCC :	Deleted in Colorectal Cancer
DD :	Death Domain
Dnmt :	DNA methyltransferase
DSCAM :	Down syndrom cell adhesion molecule
Dsh :	Dishevelled
E :	Jour embryonnaire
E2F :	<i>E2</i> promoter binding factor
EGF :	Epidermal growth factor
EP :	Endoderme primitif
EPI :	Épiblaste
ERK :	Extracellular signal-regulated kinase
ESRRB :	Estrogen related receptor beta
FAK :	Focal adhesion kinase
FGF5 :	Fibroblast growth factor 5
FIV :	Fécondation <i>in vitro</i>
Frz :	Frizzled
G :	Gap/growth
GATA4 :	GATA binding protein 4
GATA6 :	GATA binding protein 6
GMNN :	Geminin
GMPc :	Guanosine monophosphate cyclique
GPI :	Glycosylphosphatidylinositol
HES1 :	Hes family bHLH transcription factor 1

HEX :	Hematopoietically expressed homeobox
HMG :	High-mobility group
HOXD1 :	Homeobox D1
Ig :	Immunoglobuline
iPS :	souche pluripotente induite (Cellule)
JAK :	Janus kinase
KB :	Kilobase
KLF4 :	Kruppel-like factor 4
KLF5 :	Kruppel-like factor 5
KO :	Knock-out
LIF :	Leukemia Inhibitory Factor
LIFR :	LIF récepteur
M :	Mitose
MAPK :	Mitogen-activated protein kinase
MCI :	Masse cellulaire interne
MPS1 :	Protein monopolar spindle 1
mTOR :	Mammalian target of rapamycin
NANOG :	Nanog Homeobox
NCK1 :	Non catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1
NEO1 :	Néogénine
NTN :	Nétrine
NuRD :	Désacétylation et de remodelage nucléosomique
N-WASP :	Neuronal Wiskott-Aldrich syndrom protein
OCT4 :	Octamer-binding transcription factor 4
OTX2 :	Orthodenticle homeobox 2
PAK1 :	p21-activating kinase 1
PAX7 :	Paired box 7
PCP :	Polarité cellulaire planaire
PCR :	Polymerase Chain Reaction
PDK1 :	Pi3k-dependent kinase-1
PI3K :	Phosphatidylinositol-3-OH kinase
PIP2 :	Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate
PIP3 :	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
pRB :	Retinoblastoma protein
PRC :	Polycomb-repressive complex
RGMA :	Repulsive Guidance Molecule a

RNA-seq :	Séquençage ARN
S :	Synthèse
shARN :	Small hairpin ARN
SHH :	Sonic Hedgehog
SNC :	Système nerveux central
SOX2 :	SRY (sex determining region Y)-box 2
STAT :	Signal Transducers and Activators of Transcription
TBX3 :	Transcription T-box 3
TE :	Trophectoderme
TEM :	Transition épithélio-mésenchymateuse
TGFβ :	Transforming Growth Factor beta
TNF :	Tumor Necrosis Factor
UNC :	Uncoordinated
UPA :	Unc-Pidd-Ankyrins
ZGA :	Activation du génome zygotique
ZU-5 :	Zona Occludens-1/Unc-5 homology domain

Table des matières

Remerciements	3
Résumé	6
Abstract	7
Liste des abréviations	8
Introduction.....	16
Chapitre 1 : Le développement embryonnaire précoce	17
I- De la fécondation au blastocyste	17
<i>La fécondation, le stade deux cellules et la morula</i>	17
<i>Le blastocyste préimplantatoire</i>	19
II- L'implantation et la période post-implantatoire	20
<i>La boîte noire de la période d'implantation</i>	20
<i>Les étapes de l'implantation</i>	20
<i>L'œuf cylindrique</i>	21
III- L'indispensable étude du développement embryonnaire	21
<i>Médecine de la reproduction</i>	21
<i>Médecine régénérative</i>	22
<i>Oncologie</i>	24
<i>L'embryon murin comme modèle de développement humain</i>	26
Chapitre 2 : La pluripotence dans l'embryon de souris.....	28
I- Historique de la pluripotence	28
<i>Culture d'embryons préimplantatoires</i>	28
<i>Culture de cellules de carcinomes embryonnaires</i>	28
<i>Formation d'embryons chimères</i>	29
<i>Dérivation des cellules souches embryonnaires de souris</i>	29
<i>Différenciation in vitro des cellules et des embryons</i>	30
<i>Dérivation des cellules souches épiblastiques de souris</i>	30
II- Les techniques permettant de déterminer la compétence pluripotente	31
<i>Tests in vitro : test de formation de colonies, formation de corps embryoïdes</i>	31
<i>Tests in vivo : formation de tératomes et de chimères, complémentation tétraploïde</i> ...	32

III-	Les différents états de pluripotence <i>in vitro</i>	33
	<i>Pluripotence et hétérogénéité</i>	33
	<i>Les états de pluripotence naïve et amorcée</i>	34
	<i>La pluripotence induite</i>	36
	<i>La pluripotence formative et les états intermédiaires</i>	36
IV-	La régulation de la pluripotence au niveau moléculaire	38
	<i>La voie LIF</i>	39
	<i>La voie BMP</i>	40
	<i>La voie WNT</i>	41
	<i>La voie MAPK</i>	43
	<i>La voie Activine/Nodal</i>	44
V-	La régulation de la pluripotence au niveau génétique.....	45
	<i>Les trois facteurs clés du réseau de pluripotence : NANOG, OCT4, SOX2</i>	46
	<i>Les autres facteurs de transcription impliqués dans la pluripotence</i>	47
	<i>La régulation épigénétique de la pluripotence</i>	47
Chapitre 3 : Le cycle cellulaire		49
I-	Les différentes phases du cycle cellulaire	49
	<i>La phase G0/G1</i>	49
	<i>La phase S</i>	51
	<i>La phase G2</i>	52
	<i>La phase M</i>	52
II-	Les acteurs du cycle cellulaire	53
	<i>Les cyclines et cyclines-dépendantes kinases</i>	53
	<i>Les protéines de poche : pRB, p107 et p130</i>	56
	<i>Les facteurs de transcription E2F</i>	57
	<i>Le système Fucci</i>	57
III-	Les particularités du cycle cellulaire dans les cellules souches	59
	<i>Les principales différences avec le cycle cellulaire des cellules somatiques</i>	59
	<i>Les liens complexes entre cycle cellulaire et réseau de pluripotence</i>	60
	<i>Les différences du cycle cellulaire entre les différents états de pluripotence</i>	62
Chapitre 4 : La voie de signalisation Nétrine		64
I-	La famille Nétrine	64
	<i>Historique</i>	64

<i>Les différents membres de la famille et leur structure</i>	64
II- <i>Les récepteurs de la voie de signalisation Nétrine</i>	66
<i>Les récepteurs DCC et NEO1</i>	66
<i>Le récepteur UNC5B</i>	69
<i>Les autres récepteurs de la famille Nétrine</i>	70
III- <i>Rôles de la voie Nétrine</i>	72
<i>La voie Nétrine dans le développement du système nerveux</i>	72
<i>La voie Nétrine dans l'organogenèse</i>	73
<i>La voie Nétrine dans le cancer</i>	74
<i>La voie Nétrine dans les cellules souches</i>	75
Résultats	77
<i>Les questions biologiques restées sans réponse</i>	78
I - <i>Rôle de la signalisation NTN1/NEO1/UNC5B dans la pluripotence naïve</i>	80
II - <i>Modulation de la pluripotence au cours du cycle cellulaire via le contrôle de l'expression de Ntn1 et Neo1</i>	81
<i>Introduction</i>	82
<i>NTN1, NEO1 et UNC5B sont exprimés de manière hétérogène dans la population de CSE</i>	83
<i>NTN1, NEO1 et UNC5B sont exprimés dynamiquement dans la population de CSE</i>	86
<i>L'expression de NTN1, NEO1 et UNC5B délimite des sous-populations de CSE présentant des propriétés distinctes</i>	88
<i>NTN1, NEO1 et UNC5B sont exprimés différemment en fonction de la configuration pluripotente de la population</i>	91
<i>L'expression de NTN1 et NEO1 est contrôlée par le cycle cellulaire</i>	93
<i>Les différentes sous-populations exprimant ou non Ntn1/Neo1 présentent des variations transcriptomiques importantes</i>	95
<i>L'expression de Ntn1 et Neo1 est dynamique et régulée par des acteurs du cycle cellulaire</i>	98
<i>L'axe de signalisation NTN1/NEO1 contribue à la résistance des CSE aux signaux de différenciation en phases S, G2 et M</i>	101
Discussion	105
<i>L'hétérogénéité dans les CSE</i>	105
<i>Régulation d'une voie de signalisation par le cycle cellulaire</i>	107
<i>Rôle de Ntn1 dans la reprogrammation</i>	109
<i>Mécanistique de la régulation et de la signalisation de la voie Nétrine</i>	109

<i>Généralisation du rôle de Ntn1, Neo1 et Unc5b au cours du développement</i>	111
Matériel et méthodes	112
Bibliographie	116
ANNEXES.....	162

Introduction

Chapitre 1 : Le développement embryonnaire précoce

La formation d'un corps complet, fonctionnel et intègre, implique de nombreuses étapes cruciales. Chacune de ces étapes doit avoir lieu de manière ordonnée et complète pour permettre le bon déroulement du développement. L'étude du développement est importante en tant que telle, mais également pour mieux comprendre de nombreux autres processus qui en partagent certaines caractéristiques. La période du développement embryonnaire précoce étant fortement conservée entre l'humain et la souris, il est intéressant et pertinent d'utiliser ce modèle animal pour l'étudier. Au cours du développement, le potentiel des cellules va peu à peu être restreint par des étapes de différenciation successives. Les cellules sont initialement totipotentes, c'est-à-dire qu'elles sont capables de donner naissance à un organisme entier ainsi qu'aux annexes embryonnaires et aux cellules germinales. Elles passent ensuite à un stade où elles sont pluripotentes, et peuvent donner tous les types cellulaires de l'embryon. Par la suite, elles vont devenir multipotentes et ne plus donner naissance qu'à quelques variétés cellulaires, avant de devenir unipotente et de ne pouvoir se différencier qu'en un seul type cellulaire.

Ma thèse consiste à utiliser comme modèle d'étude les cellules souches pluripotentes de souris afin d'étudier *in vitro* le développement embryonnaire péri-implantatoire. Ici, je vais donc introduire les stades précoces du développement chez la souris, allant de la fécondation de l'œuf à la gastrulation en passant par l'implantation. Je vais ensuite discuter les différents domaines qui bénéficient des avancées en recherche développementale et expliquer pourquoi il est nécessaire de s'appuyer sur le modèle murin pour ces études.

I- De la fécondation au blastocyste

Les différentes étapes préimplantatoires vont permettre de passer de l'embryon fécondé (le zygote), composé d'une seule cellule, à un blastocyste qui contient les cellules donnant naissance aux multiples tissus nécessaires au bon développement de l'individu ainsi qu'aux annexes extra-embryonnaires comme le placenta (Posfai, Tam, et Rossant 2014).

La fécondation, le stade deux cellules et la morula

Le développement commence par la fusion du spermatozoïde avec l'ovule, formant ainsi le zygote (Figure 1). La première étape importante suivant la fécondation est la première division de l'œuf. Cette division, qui repose sur les acteurs ARN et protéines transmis par la mère

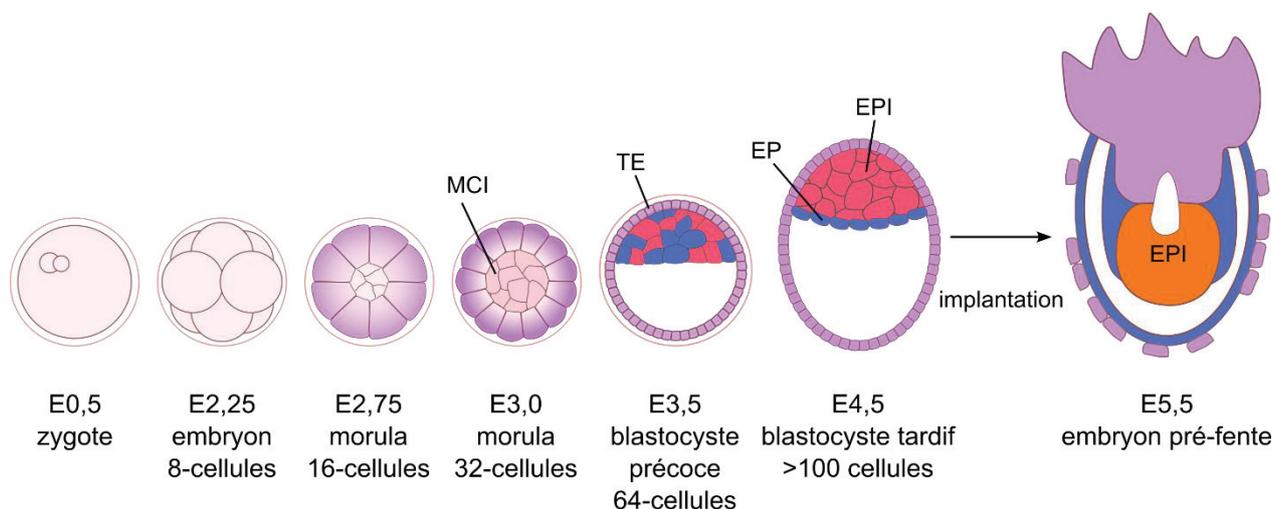


Figure 1 : Développement de l'embryon murin, du zygote à l'implantation.

Les deux ségrégations de lignage sont représentées, donnant lieu d'une part à la MCI (masse cellulaire interne, en rose) et au TE (trophectoderme, en violet), et d'autre part à l'EP (endoderme primitif, en bleu) et à l'EPI (épiblaste, en rouge puis orange). (Adapté de Posfai, Tam, et Rossant 2014).

(Bachvarova 1985), va entraîner la formation d'un embryon dit deux-cellules. L'embryon de souris va alors activer pour la première fois son génome, et produire ses propres ARN et protéines : on parle d'activation du génome zygotique (ZGA) (Aoki, Worrada, et Schultz 1997). Après deux nouvelles divisions, l'embryon qui comprend alors 8 cellules va se polariser et se compacter grâce à un renforcement des contacts intercellulaires (Ziomek et Johnson 1980).

La communauté a longtemps pensé que ces divisions symétriques généraient deux cellules filles identiques. Cependant, de récentes études analysant des données sur des cellules uniques ont montré que le destin des blastomères (le nom donné aux cellules issues des premières divisions de l'embryon) est orienté dès le stade 2 cellules (Biase, Cao, et Zhong 2014; J. Shi et al. 2015). À partir du stade 8 cellules, d'après l'hypothèse de la polarisation (Johnson et Ziomek 1981), les divisions qui se succèdent vont être asymétriques et créer deux cellules filles qui comprennent des informations différentes. Les cellules polaires, situées à la surface de l'embryon, vont donner naissance au trophectoderme (TE), tissu précurseur des annexes embryonnaires telles que le placenta, alors que les cellules apolaires situées à l'intérieur composent la masse cellulaire interne (MCI), qui comprend les cellules qui constitueront l'embryon. Cette hypothèse simple a depuis été complexifiée par de nouvelles études qui ont montré que bien que les cellules internes soient effectivement prônes à devenir la MCI, la réalité est bien plus dynamique que cela, et que les cellules se repositionnent dans l'embryon au cours des multiples divisions suivant le stade 8-cellules (Anani et al. 2014; McDole et al. 2011).

À la fin du troisième jour du développement de la souris (E3), l'embryon appelé alors morula comporte 32 cellules, réparties en deux lignages : le TE situé à l'extérieur de l'embryon, et la MCI, qui exprime le marqueur OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4)(Figure 2).

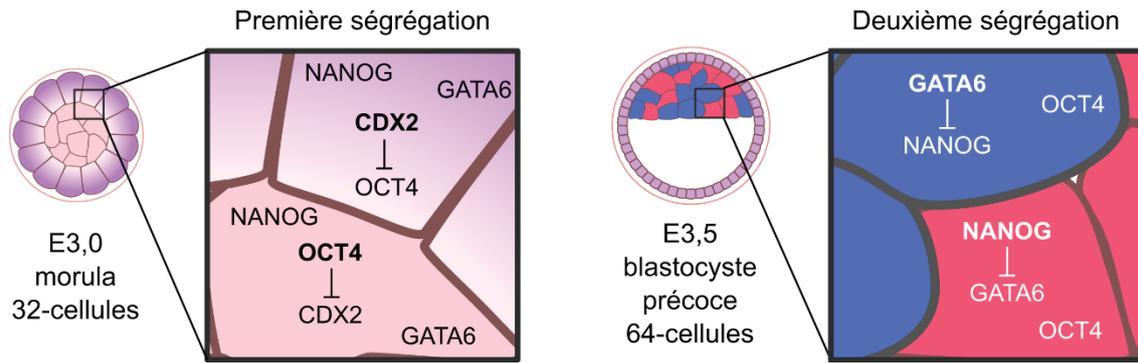


Figure 2 : Première et deuxième ségrégation de lignages dans l'embryon murin.

Ces ségrégations génèrent respectivement la MCI et le TE, et l'EP et l'EPI. L'expression de CDX2 et OCT4 s'excluent mutuellement peu à peu, CDX2 devenant restreinte aux cellules extérieures du TE, et OCT4 aux cellules intérieures de la MCI. Dans les cellules de la MCI, l'expression de GATA6 et NANOG en poivre et sel provoque peu à peu une ségrégation mutuelle et une spécification des deux compartiments. (Adapté de Posfai, Tam, et Rossant 2014).

Le blastocyste préimplantatoire

Une fois la morula formée, les divisions cellulaires se poursuivent et permettent la formation d'un épithélium par les cellules extérieures. Grâce à la présence d'ATPases (Adénosine triphosphatases) Na^+/K^+ ainsi que d'aquaporines, des canaux d'ions et d'eau se forment et aboutissent à la création d'une cavité remplie de fluide appelée blastocèle (Wiley 1984). L'apparition de cette cavité marque le changement de dénomination de l'embryon, qui est alors renommé blastocyste précoce, autour du jour E3,5. Ce stade marque également le moment où l'expression du marqueur du TE CDX2 (Caudal type homeobox 2) est restreinte exclusivement aux cellules de ce dernier (Strumpf et al. 2005), alors que les cellules de la MCI expriment OCT4.

Le blastocyste précoce va se transformer en blastocyste tardif (E4,5) à la suite de la spécification des cellules de la MCI en deux lignages, l'endoderme primitif (EP) et l'épiblaste (EPI). Ces derniers vont en premier lieu être physiquement mélangés avant de se regrouper et se ségréger. Les marqueurs NANOG (Nanog homeobox protein) et GATA6 (GATA binding protein 6) sont d'abord exprimés de manière générale dans toutes les cellules de la MCI, avant de s'exclure mutuellement autour du stade 64-cellules et d'adopter une distribution dite en « poivre et sel » (Chazaud et al. 2006). Ces cellules vont alors se séparer et former d'une part l'EP, adjacent au blastocèle et caractérisé par l'expression des marqueurs OCT4 et GATA6 et d'autre part l'EPI, qui est constitué de cellules exprimant OCT4 et NANOG (Dietrich et Hiiragi 2007) (Figure 2). Cette ségrégation s'effectue par divers mécanismes et implique de la migration cellulaire active, de l'induction positionnelle et de la mort cellulaire programmée (Plusa et al. 2008). Après cette étape, le blastocyste est prêt pour l'implantation.

II- L'implantation et la période post-implantatoire

La boîte noire de la période d'implantation

La période de l'implantation est un moment crucial pour le succès de la gestation. En effet, environ 75% des grossesses qui n'aboutissent pas sont dues à un échec de l'implantation (Wilcox et al. 1988). Elle nécessite une interaction complexe entre les cellules de l'embryon et le tissu utérin maternel, l'endomètre. L'embryon ainsi que l'endomètre subissent lors de cette période d'importants changements moléculaires et morphologiques, qui sont soigneusement coordonnés dans le temps. La fenêtre de réceptivité de la paroi utérine est par exemple déterminée par des signaux hormonaux comme les œstrogènes (Ma et al. 2003). De nombreuses contraintes, d'ordre principalement technique chez la souris, ont longtemps empêché une étude poussée de ces changements, et engendré l'appellation de « boîte noire du développement » pour cette étape (Macklon, Geraedts, et Fauser 2002). L'émergence récente de nouveaux modèles *in vitro* tels que les cellules souches rosettes et l'affinement de modèles existants grâce à des systèmes de culture en 3D (Bedzhov et Zernicka-Goetz 2014; Neagu et al. 2020) vont permettre de décortiquer les mécanismes moléculaires de cette transition.

Les étapes de l'implantation

Préalablement à l'implantation elle-même, le blastocyste doit éclore et s'extraire de la zone pellucide, une enveloppe glycoprotéique qui l'entoure. Une digestion enzymatique par des cystéines protéases crée un trou dans la zone pellucide, par lequel le blastocyste sort (Carlson 2019). L'implantation se fait en trois étapes successives : apposition, adhésion et invasion. Les cellules du trophoblaste mural commencent par entrer en contact avec les cellules épithéliales de l'endomètre, débutant le processus d'implantation. L'endomètre maternel subit en parallèle de nombreux changements afin de permettre à l'embryon d'adhérer, et d'éviter une réaction du système immunitaire à ces cellules étrangères (Erlebacher 2013). Enfin, le TE envahit le tissu maternel, provoquant la décidualisation des cellules de l'utérus qui vont se différencier et amener à l'enfouissement de l'embryon dans la paroi utérine (Schlafke et Enders 1975). Dans l'embryon, les cellules de l'épiblaste vont se polariser et s'organiser en rosette par contraction d'un réseau d'actine-myosine à leur pôle apical. Une cavité, appelée lumière, va alors se former par un processus indépendant de l'apoptose (Bedzhov et Zernicka-Goetz 2014). Une récente étude a montré que l'initiation et l'expansion de la lumière dépendaient en fait de trois différents mécanismes qui interagissent entre eux de manière complexe. Transport de fluides, division cellulaire et réorganisation des molécules adhésives régulent ainsi cette étape indispensable du développement embryonnaire (Y. S. Kim et al. 2021).

L'œuf cylindrique

Dès le stade E5, appelé le stade de l'œuf cylindrique, les cellules du TE polaire (adjacent à la MCI) ont formé l'endoderme extra-embryonnaire et le cône extra-placentaire. Ce tissu, voisin de l'épiblaste, contient les cellules souches trophoblastiques, qui formeront plus tard le placenta (Cross 2000). L'endoderme extra-embryonnaire a formé une cavité similaire à celle de l'épiblaste par un mécanisme de repliement des cellules apicales polarisées situées à l'extrémité de l'embryon (Figure 2) (Christodoulou et al. 2018). En se rejoignant, les deux lumières vont former ensemble la cavité pro-amniotique (Y. S. Kim et Bedzhov 2022). Au stade E5,5, la membrane basale séparant le trophoblaste et l'épiblaste est dissoute par des mécanismes inconnus, menant au contact entre ces deux tissus. La rosette de l'épiblaste se transforme alors en épithélium en forme de coupe (Bedzhov et Zernicka-Goetz 2014; Christodoulou et al. 2018). Le développement se poursuit alors avec la formation du mésoderme et des cellules germinales primordiales (CGP), l'agrandissement de la cavité pro-amniotique, et plus tard la gastrulation qui commence autour du stade E6,5. La gastrulation va permettre, grâce à une migration des cellules, la mise en place définitive des feuillettes embryonnaires.

III- L'indispensable étude du développement embryonnaire

Le développement embryonnaire précoce est une période captivante de la formation d'un individu. Il existe de nombreux domaines qui bénéficient de connaissances poussées sur l'embryon, ses différentes cellules et les mécanismes moléculaires complexes supportant cet ensemble délicat. Bien que de nombreux modèles soient utilisés pour la recherche sur le développement et la pluripotence, le modèle murin reste un des premiers choix pour élucider leurs mystères.

Médecine de la reproduction

Comprendre ce qui fait qu'un embryon se développe normalement est essentiel pour comprendre les pathologies liées entre autres à la fertilité et à la grossesse.

En France, un couple sur huit rencontre des problèmes à concevoir un enfant. La fécondation *in vitro* (FIV) permet de pallier ce problème en offrant la possibilité de réaliser toutes les étapes préimplantatoires en laboratoire. Une étape critique de ce protocole est la culture des embryons, dont la qualité doit être optimale afin qu'ils conservent leur viabilité et leur capacité à s'implanter. Le nombre d'analyses possibles pour définir cette qualité étant très limité, le principal critère actuel est la morphologie des embryons (Racowsky et al. 2003). La prédiction du succès de l'implantation et de la grossesse reste cependant très hasardeuse, malgré l'apparition récente de nouvelles technologies telles que l'intelligence artificielle (Zaninovic et Rosenwaks 2020). Actuellement, le transfert des embryons à la mère se fait soit

au jour 3 post-fécondation soit au jour 5, au stade blastocyste. Les embryons évalués au jour 5 étant plus matures et plus proches du stade où ils sont prêts à s'implanter, leur réussite est également plus élevée. Cependant, la culture des embryons sur une plus longue durée tout en maintenant leur viabilité présente un défi technique important. L'amélioration du processus de FIV repose donc sur une excellente compréhension du développement préimplantatoire et des conditions de culture des blastocystes.

La période de l'implantation est donc un aspect de la reproduction pour laquelle l'étude du développement embryonnaire est indispensable, pas seulement pour la FIV mais également pour les grossesses traditionnelles. En effet, le nombre de fausses couches dans le monde est estimé à 23 millions par an, un chiffre élevé qui s'explique par le fait que les causes en sont encore mal connues (Quenby et al. 2021). Une partie des fausses couches est notamment due aux échecs d'implantation de l'embryon dans la paroi utérine, ou aux avortements spontanés causés par des anomalies congénitales. Longtemps complètement impossible chez l'humain, l'étude de la période d'implantation grâce à de récents modèles *in vitro* dérivés de cellules souches (Bedzhov et Zernicka-Goetz 2014; Neagu et al. 2020) permettra sûrement de nouveaux progrès dans la compréhension des phénomènes liés à ces échecs. De plus, plusieurs études ont montré l'existence de liens étroits entre le développement précoce de l'embryon et les malformations congénitales (Ferrer-Vaquer et Hadjantonakis 2013; Stevenson et al. 1986), renforçant la nécessité d'étudier de manière approfondie le développement embryonnaire pour mieux comprendre et prévenir ou traiter ces pathologies.

Médecine régénérative

Les cellules souches embryonnaires (CSE) sont capables de se différencier en chacune des cellules issues des trois lignages embryonnaires. L'organisme adulte n'en possède pas mais contient des cellules souches adultes, dites multipotentes, qui ne peuvent donner qu'une poignée de types cellulaires et possèdent donc un caractère souche limité. Quelque part entre l'embryon et l'adulte, les cellules perdent donc ce potentiel et subissent une restriction de leur capacité pluripotente.

Dans les années 50, un scientifique nommé Conrad Waddington présente un modèle où, en accord avec cela, le développement se fait le long d'un chemin descendant entouré de monts et vallées. La cellule souche indifférenciée suit alors ce chemin pour devenir différenciée sans pouvoir revenir en arrière (Waddington et Kacser 1957). Près de 70 ans plus tard, ce modèle reste pertinent, avec quelques différences cependant (Figure 3).

Premièrement, une amélioration des connaissances sur le processus de différenciation a permis de mettre en évidence l'existence de phénomènes de transdifférenciation *in vivo* et *in vitro*. La transdifférenciation est le passage d'une cellule somatique complètement différenciée d'un lignage à une cellule somatique différenciée d'un autre lignage sans repasser par un état souche ou de progéniteur. Dès 1987, Robert Davis et ses collègues démontrent ainsi que l'expression d'un seul facteur suffit à transformer des fibroblastes en myoblastes (Davis, Weintraub, et Lassar 1987). Plusieurs expériences quelques années plus tard ont

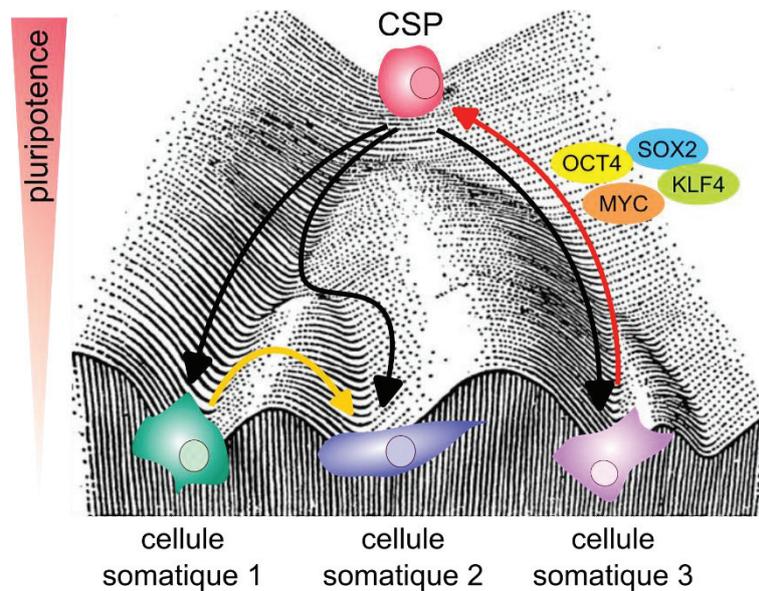


Figure 3 : Version revisitée du paysage de Waddington.

La cellule souche pluripotente (CSP) se différencie (flèches noires) le long d'un des chemins afin de devenir un des types de cellules somatiques, et ce faisant perd peu à peu sa compétence pluripotente. Les cellules somatiques peuvent se transdifférencier (flèche jaune) afin de devenir un autre type de cellule somatique sous certaines conditions. Elles peuvent également être reprogrammées à l'aide des facteurs OCT4, SOX2, KLF4 et MYC afin de redevenir pluripotentes (flèche rouge). (Adapté de Puisieux et al., 2018 et Waddington et Kacser 1957)

confirmé que ce processus de transdifférenciation est rapide, efficace, non limité aux fibroblastes, et que l'expression d'un seul facteur peut être suffisant à le déclencher (Kulesa, Frampton, et Graf 1995; Vierbuchen et al. 2010 ; Xie et al. 2004). Ces facteurs uniques, dit gènes clés de conversion, seraient principalement des facteurs exprimés durant le développement embryonnaire et permettraient de guider les cellules vers un destin de différenciation spécifique (Thowfeequ, Myatt, et Tosh 2007). La transdifférenciation peut également avoir lieu hors du cadre expérimental, *in vivo*, avec la régénération de tissus à la suite d'un dommage subi. La transdifférenciation des cellules étoilées hépatiques en myofibroblastes dans le foie suite à une inflammation chronique est par exemple un des événements centraux dans la progression de la cirrhose du foie (Tsukamoto et al. 2006).

Comprendre pourquoi et comment exactement se fait la transdifférenciation, ainsi que ses liens avec le développement embryonnaire, pourrait donc améliorer notre compréhension de nombreuses pathologies où la régénération donne lieu à des effets indésirables, ainsi que de faire émerger des thérapies qui convertiraient des cellules voisines en cellules d'intérêt.

Deuxièmement, une découverte de Kazutoshi Takahashi et Shinya Yamanaka a révolutionné le domaine en 2006 en montrant que la différenciation est en fait réversible et que ceci est réalisable de manière relativement simple. En effet, ils ont montré que l'expression de quatre facteurs de transcription *Pou5f1* (appelé Oct4 dans sa forme protéique), *Sox2* (SRY (sex

determining region Y)-box 2,) *Klf4* (Kruppel-like factor 4) et *c-Myc* (Myelocytomatosis oncogene) suffisait à reprogrammer une cellule somatique en cellule souche pluripotente induite (iPS), qui sera capable comme les CSE de donner naissance à chacun des trois lignages embryonnaires, endoderme, ectoderme et mésoderme (Takahashi et Yamanaka 2006). Ce processus, peu efficace, génère cependant parfois des cellules partiellement reprogrammées qui vont se différencier de manière défailante. De nombreux efforts se concentrent donc actuellement sur l'amélioration de la reprogrammation pour générer des cellules iPS de meilleure qualité et augmenter le pourcentage de cellules qui auront subi une reprogrammation complète. En effet, les cellules iPS patient-spécifiques permettraient de nombreuses thérapies cellulaires sans risque de rejet immunologique (Yamanaka 2010; Trounson et DeWitt 2016). Grâce à ces améliorations, les premières applications en médecine régénérative des iPS commencent à apparaître. La première preuve de concept qu'une telle utilisation des iPS est possible a été publiée en 2007 par l'équipe de Rudolf Jaenisch. Des souris humanisées modèles pour la drépanocytose ont pu être traitées grâce à la greffe de cellules iPS où le gène humain de l'hémoglobine en cause a été corrigé. Ces cellules iPS ont été obtenues par la reprogrammation de cellules de peau de ces mêmes souris (Hanna et al. 2007). De nombreuses autres thérapies cellulaires utilisant des cellules souches pluripotentes sont en développement et ont atteint la phase d'essais cliniques depuis, notamment dans les domaines de la réparation de la moelle épinière (Priest et al. 2015), des maladies neurodégénératives (Grealish et al., 2014 ; Reddington et al., 2014), des pathologies causant des pertes de la vue (Garcia et al. 2015), du diabète de type 1 (Schulz et al. 2012) et des maladies cardiaques (Menasché et al. 2015). Il existe également quelques exemples de dédifférenciation spontanée déclenchée dans un contexte de blessure, comme dans cette étude où il a été montré grâce à l'imagerie de follicules pileux en haute résolution spatiale et temporelle que le follicule pileux est capable de régénérer sa niche de cellules souches (Rompolas et al. 2012). Ces exemples restent cependant méconnus et peu caractérisés.

Les principales limites de ces thérapies cellulaires restent leur complexité, leur coût et leur sûreté, des points qui peuvent être améliorés grâce à une étude plus poussée de la fonctionnalité et de la faisabilité de ces procédés, et notamment des conditions de culture ainsi que des caractéristiques des cellules souches pluripotentes (Trounson et DeWitt 2016).

Oncologie

De nombreux parallèles avec le développement peuvent être réalisés en oncologie, soulignant l'importance de l'étude de ce champ de recherche pour lutter contre les cancers, qui sont responsables de plus de 150 000 morts par an en France (Defossez et al. 2019). Premièrement, les tumeurs peuvent être originaires de cellules souches, peu différenciées ; deuxièmement, la réactivation de programmes développementaux est cruciale pour l'évolution des cancers ; enfin, certaines cellules dites cellules souches cancéreuses (CSC) partagent de nombreuses propriétés avec les cellules souches embryonnaires.

La complexité des études sur le cancer vient en partie de l'hétérogénéité des tumeurs. En effet, un même signal oncogénique sur différentes cellules peut donner des tumeurs avec des caractéristiques complètement différentes (Visvader 2011). De manière un peu différente, le rallumage de programmes embryonnaires éteints peut également mener à une variabilité intratumorale plus importante. Ainsi, une étude dans le cancer du sein a révélé que le signal oncogénique induisant l'expression d'une forme mutée $\text{Pik3ca}^{\text{H1047R}}$ réactive un programme multipotent dans des cellules normalement restreintes à un programme unipotent, et prépare le terrain pour une plus grande hétérogénéité tumorale, et ce dès les premiers stades de transformation (Van Keymeulen et al. 2015).

En outre, il est de plus en plus clair que certaines tumeurs ont pour cellule d'origine une cellule peu différenciée, et que leur formation requiert une moindre accumulation de mutations génétiques grâce à leur versatilité initiale déjà établie (Puisieux et al. 2018). En effet, des études génomiques ont montré que les cancers présentant le moins de mutations génétiques sont les cancers pédiatriques, indiquant ainsi que les tissus jeunes et dynamiques sont à risque de subir une transformation oncogénique rapide (Vogelstein et al. 2013). Par ailleurs, les cellules souches possèdent la capacité de s'auto-renouveler indéfiniment et ont donc la longévité nécessaire à l'accumulation des mutations responsables de la transformation en cellule cancéreuse (Reya et al. 2001). De multiples travaux sur des cancers tels que la leucémie lymphoïde ou myéloïde chronique ont montré que les cellules $\text{CD34}^+\text{CD38}^-$, une population enrichie en cellules souches hématopoïétiques, présentaient un grand nombre de réarrangements chromosomiques caractéristiques des leucémies, indiquant un rôle probable de cellules initiatrices de ce type de cancers (George et al. 2001; Mauro et Druker 2001).

D'autre part, la progression de certains cancers est due à la dérégulation de certains programmes embryonnaires. Par exemple, la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) a une grande importance pour la gastrulation dans l'embryon mais permet aux cellules cancéreuses de passer d'un phénotype épithélial polaire de cellules différenciées à un phénotype de cellules plastiques et motiles, avec une expression de marqueurs caractéristiques de cellules mésenchymateuses (Puisieux et al. 2018; Thiery 2002). La réactivation du programme de la TEM est donc directement liée à la capacité des cellules cancéreuses à former des métastases (des tumeurs secondaires disséminées), qui sont la première cause de mortalité des patients (Lambert, Pattabiraman, et Weinberg 2017).

De la même manière, de nombreuses voies de signalisation et facteurs de transcriptions impliqués dans le développement embryonnaire sont responsables de la transformation oncogénique (Patra 2020; Wei et al. 2016). Ainsi, l'expression de SOX2 dans les cellules cancéreuses du pancréas est associée à leur prolifération accrue et à la réexpression de gènes mésenchymateux (Herreros-Villanueva et al. 2013). Un autre exemple est celui de la voie WNT (Wingless/Integrated), une voie de signalisation très importante au cours du développement pour la prolifération, le maintien des cellules souches et la différenciation, qui a également un rôle prédominant dans le développement de certains cancers (Duchartre, Kim, et Kahn 2016; Roel Nusse et Clevers 2017; Steinhart et Angers 2018). Sa dérégulation notamment dans les cellules souches adultes de l'intestin entraîne très rapidement leur transformation en cellules cancéreuses (Barker et al. 2009).

L'étude du processus de reprogrammation, très lié au développement et aux cellules souches, nous a également permis de mieux comprendre le processus de tumorigenèse. En effet, ils partagent de nombreux points communs : leur initiation dépend d'une perte d'identité cellulaire, suivie de l'acquisition d'une nouvelle identité, en passant par la réactivation de programmes développementaux (Puisieux et al. 2018; Huyghe et al. 2022). Tout comme lors de la tumorigenèse, le processus de reprogrammation est contrôlé et restreint par des barrières telles que la mort cellulaire et la sénescence (Marión et al. 2009; Y. Li et al. 2013), et dépend de l'expression de la télomérase (Marión et al. 2017). Par ailleurs, d'importants remodelages de la chromatine ont lieu lors de ces deux processus, donnant lieu à un paysage épigénétique complètement différent de celui de la cellule initiale.

L'embryon murin comme modèle de développement humain

Pendant plus de 50 ans, l'embryon de souris a été utilisé comme modèle du développement embryonnaire humain. En effet, les multiples contraintes éthiques et techniques ont fortement limité l'étude de cette période chez l'Homme, et notamment des étapes autour de l'implantation qui sont complexes et très importantes. La faible accessibilité des embryons d'origine humaine participe aussi à contraindre l'étude de cette période.

L'emploi de la souris comme modèle du développement humain est justifié par la grande similarité évolutive entre les deux processus, et notamment la conservation des gènes orchestrant ces programmes (Molè, Weberling, et Zernicka-Goetz 2020). De plus, la bonne connaissance du génome de la souris, les différentes techniques développées pour y introduire des mutations de manière contrôlée et la facilité d'emploi de cet organisme modèle sont autant d'arguments qui ont participé à ce choix.

Cependant, il existe des limites à ce modèle, puisque certains événements cruciaux du développement diffèrent entre la souris et l'Homme. Ainsi, l'activation du génome zygotique, qui a lieu au stade 1 à 2 cellules chez la souris, a lieu au stade 4 à 8 cellules chez l'humain (Braude, Bolton, et Moore 1988). L'implantation a également lieu de manière plus tardive chez l'Homme que chez la souris, autour du jour E6-7 plutôt que E4-4,5 (Hertig, Rock, et Adams 1956; Lindenberg et al. 1989). Ces différences sont dues à des variations dans les programmes moléculaires mis en place (Dvash, Ben-Yosef, et Eiges 2006).

Malheureusement, les connaissances sur la culture et les particularités des cellules humaines sont actuellement insuffisantes pour soutenir à elles seules l'effort de recherche sur le développement embryonnaire. En effet, il est par exemple difficile d'obtenir des cellules souches embryonnaires humaines (CSH) complètement équivalentes aux cellules souches murines dites « naïves », dérivant du blastocyste préimplantatoire. De plus, certaines cellules différenciées à partir de CSH, comme les cellules du foie n'expriment pas les marqueurs transcriptionnels caractéristiques des cellules adultes du foie (Lavon, Yanuka, et Benvenisty 2004). Il est en outre impossible de tester la fonctionnalité de ces cellules différenciées de CSH sans transplantation *in vivo*, ce qui est impossible chez l'humain. Des alternatives telles que les « blastoïdes » ont récemment été développées, soit par des approches poussées de culture

en 3D de CSH (Yu et al. 2021), soit par reprogrammation de fibroblastes en structures 3D comprenant une masse cellulaire interne, une cavité similaire au blastocèle et une couche extérieure de cellules ressemblant au TE (X. Liu et al. 2021). Cependant, ces modèles présentent des limites importantes, comme notamment le fait qu'ils ne proviennent pas d'un œuf fertilisé ainsi que leur faible efficacité de production.

L'utilisation de cellules murines permet donc de pallier ces difficultés bien qu'on puisse espérer la disparition progressive de leur emploi dans un futur relativement proche, grâce aux nouveaux modèles conçus chaque jour.

Chapitre 2 : La pluripotence dans l'embryon de souris

Au cours des différentes étapes du développement murin, les cellules constituant l'embryon vont passer par différents états, chacun caractérisé par des marqueurs et des capacités spécifiques (J. Wu et Izpisua Belmonte 2015; Weinberger et al. 2016). La multitude, l'interconvertibilité et les similitudes entre ces états rend leur étude complexe et parfois controversée. Dans ce chapitre, je ferai d'abord un historique de la pluripotence *in vitro*, avant de commenter les techniques permettant de connaître la compétence pluripotente des cellules, de détailler les différents types de pluripotence qui ont pu être capturés *in vitro*, et enfin d'expliquer les différentes voies moléculaires et génétiques régulant la pluripotence.

I- Historique de la pluripotence

L'étude de la pluripotence des mammifères est un domaine qui est né au milieu du XX^{ème} siècle, et est donc relativement récent. En partant des embryons de souris non implantés et à partir de connaissances sur les échinodermes et amphibiens datant de la fin du XIX^{ème} siècle, les chercheurs ont pu déterminer les bases de la culture de cellules souches, ce qui a mené plus tard à la découverte de techniques révolutionnaires pour la médecine.

Culture d'embryons préimplantatoires

Dans les années 50, plusieurs chercheurs décrivent la récolte d'embryons de souris non implantés et leur mise en culture *in vitro* (Hertig, Rock, et Adams 1956; Whitten 1956). Leurs expériences d'observation permettent notamment la mise au point d'un milieu standard pour la culture de ces embryons, l'addition d'acide aminés non essentiels étant une des clés pour que les embryons survivent et continuent à se développer (Ho et al. 1995). Grâce à ce milieu, l'embryon peut se développer jusqu'au stade E4,5. Une fois cette étape de mise en culture maîtrisée, des techniques de perturbation de l'expression des gènes ont pu être mises au point, étendant de manière significative notre compréhension des mécanismes génétiques contrôlant le développement embryonnaire précoce et notamment la division des rôles entre les ARN maternels et fœtaux (Svoboda et al. 2000; Wianny et Zernicka-Goetz 2000).

Culture de cellules de carcinomes embryonnaires

Quelques années plus tard, en 1954, Stevens et Little décrivent l'apparition de tératocarcinomes, des tumeurs rares constituées de multiples types cellulaires et comprenant

des tissus aussi bien embryonnaires que formés intégralement (tels que cheveux et os), dans les testicules de souris consanguines de souche 129 (Stevens et Little 1954). Ces tératocarcinomes peuvent être propagés et conservés par transplantation durant plusieurs générations s'ils contiennent de multiples cellules indifférenciées, démontrant ainsi la capacité de ces cellules à s'auto-renouveler. La capacité d'une cellule unique à reformer un tératocarcinome entier avec tous les lignages cellulaires a plus tard été démontrée (Kleinsmith et Pierce 1964). Par la suite, la notion de tératome apparaîtra, avec la même capacité à former des grossiers faites de cellules provenant de différents lignages, mais de manière non maligne (Gail R. Martin et Evans 1974; Isaacs 2004).

Formation d'embryons chimères

Vers les années 1970, de nombreuses lignées monoclonales de carcinome embryonnaire (CE) sont dérivées des tératocarcinomes, avec une grande hétérogénéité (Evans 1972; Kahan et Ephrussi 1970; Rosenthal, Wishnow, et Sato 1970). En effet, toutes sont capables de proliférer indéfiniment, et peuvent former des structures 3D de différenciation, appelés corps embryoïdes, lorsqu'elles sont cultivées en conditions non adhérentes (G. R. Martin et Evans 1975). En revanche, certaines de ces lignées présentent de nombreuses anomalies chromosomiques (G. R. Martin 1980), et un certain nombre est capable de contribuer au développement lorsqu'elles sont injectées dans un embryon étranger, formant ainsi ce qu'on appelle des chimères, des organismes compris de cellules issues de deux lignages génétiques différents (Tarkowski 1961; Brinster 1974; Mintz et Illmensee 1975; Rossant et Papaioannou 1985). Cette capacité à former des chimères, décrite plus en détails dans la partie II de ce chapitre, est l'un des principaux critères qui permet de mesurer la compétence pluripotente des cellules.

Dérivation des cellules souches embryonnaires de souris

Ces découvertes successives ont permis en 1981 la dérivation des CSE de souris et leur culture *in vitro* à partir d'embryons de souris, sans passer par la formation d'un tératocarcinome *in vivo*. Deux équipes ont de manière indépendante réalisé l'expérience en utilisant des méthodes différentes. Evans et Kaufman ont dérivé des lignées de CSE pluripotentes à partir d'embryons entiers de souris de souche 129 dont le développement a été arrêté afin de leur permettre de croître un peu plus (Evans et Kaufman 1981). Un peu plus tard dans l'année, Gail Martin parviendra à en dériver également à partir de la MCI isolée d'embryons au stade blastocyste tardif. Cette technique implique de mettre la MCI en culture en milieu conditionné par des cellules CE et sur un tapis de fibroblastes inactivés (G. R. Martin 1981). Ces lignées de CSE ont un caryotype normal, sont capables de se différencier, de former des tératomes *in vivo*, et de contribuer entre autres à la lignée germinale lorsqu'elles sont injectées dans des embryons (Bradley et al. 1984). Grâce à ces cellules, la pluripotence et son contrôle ont enfin pu être disséqués au niveau moléculaire et cellulaire.

Différenciation in vitro des cellules et des embryons

Le pendant évident de l'étude de la pluripotence des CSE est l'étude de leur différenciation. Ces deux facettes du développement embryonnaires doivent être soigneusement contrôlées afin que la bascule de l'un vers l'autre se fasse de manière appropriée. Les chercheurs ont eu recours à de nombreuses méthodes afin d'étudier la différenciation ; seuls quelques exemples seront abordés ici.

La formation des corps embryoïdes est la première approche historiquement utilisée pour l'étude de la différenciation. En effet, la mise en culture de CSE en suspension en l'absence de facteurs conservant la pluripotence provoque la formation d'agrégats en 3D qui vont spontanément se différencier, de la même façon que les cellules dérivées de tératocarcinomes (G. R. Martin et Evans 1975; G. R. Martin 1981; Evans et Kaufman 1981). Ces corps embryoïdes ont longtemps été utilisés comme modèles du développement embryonnaire précoce car ils en reprennent plusieurs caractéristiques : ils sont composés de cellules présentant des marqueurs de différenciation précoces des trois lignages embryonnaires, comportent des adhésions cellules-cellules, forment une lumière au centre et présentent une rupture de symétrie (Pekkanen-Mattila et al. 2010; Brickman et Serup 2017). Ces corps embryoïdes peuvent également aller plus loin dans la différenciation et être convertis en progéniteurs neuronaux, en mésendoderme ou encore en cardiomyocytes (Guan et al. 2001; Kubo et al. 2004; Boheler et al. 2002). De nombreuses techniques ont récemment été élaborées pour améliorer leur développement, notamment en prenant mieux en compte les forces mécaniques, qui jouent un grand rôle dans l'organisation des tissus *in vivo* (Campàs 2016; Zeevaert et al. 2020). Ce modèle présente toutefois de nombreuses limites, comme son hétérogénéité et la difficulté à maîtriser la temporalité des événements du développement. Leur organisation est également clairement déficiente comparée au blastocyste avec ses trois lignages bien distincts (Bedzhov et Zernicka-Goetz 2014).

Le développement de la culture *in vitro* des embryons a mené à la découverte dans les années 70 de leur capacité à endurer une morphogenèse *in vitro* similaire à celle qui a lieu post-implantation *in vivo*. Les premières études reposaient sur une mise en culture de l'embryon sur un substrat de collagène (Y.-C. Hsu 1971; 1972), mais une grande variété de supports possibles ont depuis été mis en évidence (Jenkinson et Wilson 1970; Salomon et Sherman 1975; Bedzhov et al. 2014). Grâce à ces études, la morphologie de l'embryon post-implantation a pu être mieux étudiée. En revanche, ce système n'est pas parfait : l'embryon s'aplatit et sa structure est donc différente, la durée de la morphogenèse est allongée par rapport à ce qui a pu être observé *in vivo*, et une certaine hétérogénéité temporelle en particulier est observée parmi les blastocystes cultivés (Bedzhov et al. 2014).

Dérivation des cellules souches épiblastiques de souris

En 2007, un nouveau type de cellules souches pluripotente est découvert. Les cellules souches épiblastiques (CSEpi) peuvent être dérivées à partir de l'épiblaste post-implantation isolé de

blastocystes au jour embryonnaire E5,5-5,75 (Brons et al. 2007; Tesar et al. 2007). Elles possèdent une morphologie distincte de celle des CSE et forment des colonies compactes et plates, similaires aux CSH. De plus, elles ne peuvent pas être passées en les séparant de manière unicellulaire et doivent être maintenues en culture dans un milieu défini chimiquement. Les cellules CSEpi peuvent être dérivées à partir des CSE, en revanche l'inverse est possible uniquement en reprogrammant les cellules de manière génétique, et très peu efficacement (G. Guo et al. 2009; Gillich et al. 2012; Illich et al. 2016).

À la différence des CSE et bien qu'exprimant des marqueurs caractéristiques de la pluripotence tels que OCT4, NANOG et SSEA1, les CSEpi sont déjà prédisposées à la différenciation et expriment certains marqueurs précoces des feuilletés embryonnaires. Les CSEpi sont capables de former des tératomes comprenant des cellules des trois lignages ainsi que des corps embryoides, et donc de se différencier efficacement que ce soit *in vivo* ou *in vitro*. En revanche, les CSEpi ne contribuent que pauvrement à la formation de chimères de blastocystes pré-implantatoires, et ont perdu la capacité à former des CGP (Brons et al. 2007; Joo et al. 2014).

L'étude des CSEpi a permis d'approfondir notre connaissance des mécanismes moléculaires et des voies de signalisation régulant la pluripotence post-implantation.

II- Les techniques permettant de déterminer la compétence pluripotente

La pluripotence étant une capacité qui peut être présente dans de nombreux types cellulaires différents (CSE, CE, iPS), comment déterminer si une cellule est bien pluripotente ? De nombreux tests ont été élaborés dans cette optique, et permettent de contrôler ces aptitudes spécifiques aux cellules souches pluripotentes.

Tests in vitro : test de formation de colonies, formation de corps embryoides

Comme discuté au préalable, la pluripotence est caractérisée par deux propriétés clés : la capacité des cellules à s'auto-renouveler et la capacité à se différencier en chacun des trois feuilletés embryonnaires.

Cette capacité à s'auto-renouveler peut être évaluée *in vitro* grâce au test AP (phosphatase alcaline), aussi appelé test de clonogénicité ou test de formation de colonies. Les cellules souches pluripotentes (CSP) étant capables de s'auto-renouveler dans des conditions difficiles à faible densité, on peut utiliser ce test pour mesurer cette compétence au niveau de la cellule unique. Il consiste à ensemercer les cellules isolées à très faible densité (50 à 100 cellules/cm² environ), à les laisser former des colonies pendant environ une semaine, avant d'utiliser un marqueur de pluripotence, telle que leur activité enzymatique phosphatase alcaline ou un rapporteur endogène afin de quantifier les colonies pluripotentes. La phosphatase alcaline a été décrite dans plusieurs études comme étant un bon marqueur de l'état indifférencié des

CSP (Pease et al. 1990; Palmqvist et al. 2005; O'Connor et al. 2008). Le nombre total de colonies ainsi que leur nombre relatif en état indifférencié, différencié et mixte permet d'avoir une idée de la qualité de l'auto-renouvellement de la population. Ce test peut également être employé en combinaison avec d'autres approches, pour étudier la stabilité de l'état pluripotent et la capacité des cellules à en sortir, par exemple en ensemençant les cellules dans un milieu les poussant à se différencier (Betschinger et al. 2013; Cirera-Salinas et al. 2017; Huyghe et al. 2020).

La formation des corps embryoides, déjà abordée dans la partie « Différenciation *in vitro* des embryons et des cellules » est un des tests de référence pour mesurer *in vitro* la capacité des CSP à se différencier. Les cellules sont ensemençées en conditions non-adhérentes à faible densité et en l'absence de signal promouvant de manière active la pluripotence. Elles vont ainsi s'auto-assembler et s'organiser en sphères dont la couche extérieure va se différencier en endoderme primitif (EP) (G. R. Martin et Evans 1975; Capo-chichi et al. 2005). Des marqueurs des trois lignages embryonnaires vont pouvoir être détectés en moins d'une semaine après le début de la différenciation (Pekkanen-Mattila et al. 2010; Ozmadenci et al. 2015). Ces structures sont cependant artificielles, et la pleine évaluation des capacités des cellules à se différencier nécessite donc des expérimentations *in vivo* supplémentaires.

Tests in vivo : formation de tératomes et de chimères, complémentation tétraploïde

De même que les tests *in vitro*, les tests *in vivo* visent à démontrer et mesurer la qualité de la pluripotence des CSP, soit leur capacité à s'auto-renouveler et à former des cellules issues des trois lignages embryonnaires.

Un des tests *in vivo* les plus probants pour déterminer la compétence pluripotente des cellules est leur capacité à former des tératomes. Décrits précédemment, les tératomes sont des tumeurs non malignes composées de cellules différenciées issues des trois lignages embryonnaires, et comprenant parfois des structures entières (dent, cheveux) (Kleinsmith et Pierce 1964). L'injection de CSP dans des souris immunodéprimés dans un des quatre sites utilisés (intramusculaire, sous-cutané, testicule et capsule rénale) conduit à la formation d'une masse en quatre à douze semaines, qui devra être caractérisée histologiquement (Wesselschmidt 2011). Cette analyse est qualitative, et ne permet pas de caractériser une cellule unique mais plutôt une population. De plus, cette technique est controversée car les cellules transplantées sont exposées à un environnement non physiologique (Buta et al. 2013). En dépit de cela, elle reste utilisée notamment pour évaluer le potentiel tumorigénique d'une population de cellules souches et s'assurer de la sûreté des traitements élaborés en médecine régénérative.

Un autre test clé pour appréhender la pluripotence des cellules est le test de formation de chimères, décrit pour la première fois avec les CSE à la fin des années 80 (Beddington et Robertson 1989; Nagy et al. 1990). Les cellules sont injectées dans la MCI d'embryons hôtes de souris de souches ayant des pelages de couleur différente, et leur capacité à coloniser

l'embryon et à participer à son développement est ainsi mesurée. Si les CSP sont de haute qualité, elles vont permettre un développement normal et contribuer fortement à l'embryon en participant à la formation des tissus des trois lignages embryonnaires ainsi qu'à celle de la lignée germinale, mais pas de celle des tissus extra-embryonnaires. La viabilité des embryons ainsi obtenus est également un gage de qualité des CSP utilisées.

Enfin, le test de complémentation tétraploïde consiste à utiliser des embryons tétraploïdes (4n), normalement non viables au-delà du stade E14-E15, et à les injecter ou agréger avec des CSP (Nagy et al. 1990; 1993; X. Zhao et al. 2009). Ces CSP, si elles sont bien pluripotentes vont coloniser l'embryon et en particulier l'entièreté de l'EPI, alors que les cellules 4n vont contribuer au TE et à l'EP, que les CSP sont incapables de former, créant ainsi un embryon chimère viable.

III- Les différents états de pluripotence *in vitro*

La pluripotence est un état hautement dynamique qui évolue au cours du développement pour s'adapter aux exigences des différentes étapes de formation de l'embryon, notamment autour de la période préimplantatoire. Ici, je vais tout d'abord discuter le concept d'hétérogénéité avant d'évoquer les différents types de pluripotence qui ont été décrits au fil du temps, ainsi que leurs caractéristiques.

Pluripotence et hétérogénéité

De manière intrigante, les CSE cultivées en conditions « classiques », comprenant du sérum de veau fœtal (SVF) et du LIF (Leukemia Inhibitory Factor) (condition appelée sérum+LIF dans la suite de ce manuscrit) ne représentent pas une population homogène bien définie. Au contraire, de nombreuses études réalisées à partir de la fin des années 2000 montrent qu'il existe en fait une forte hétérogénéité au sein de cette population. Cette hétérogénéité a d'abord été définie par la fluctuation de l'expression de certains facteurs de transcription comme NANOG, KLF4, STELLA, ESRRB (Estrogen related receptor beta) ou REX1 (Chambers et al. 2007; H. Niwa et al. 2009; Hayashi et al. 2008; van den Berg et al. 2008; Toyooka et al. 2008), mais également de marqueurs de différenciation tels que HEX (Hematopoietically expressed homeobox), HES1 (Hes family bHLH transcription factor 1) et GATA6 (Canham et al. 2010; Kobayashi et al. 2009; Singh et al. 2007). Les cellules exprimant l'un ou l'autre de ces facteurs ne sont pas immobilisées dans leur potentiel pluripotent pour autant, puisque ces variations sont transitoires et réversibles, mais elles présentent un potentiel de différenciation plus ou moins important. En effet, les cellules possédant par exemple un faible niveau de NANOG sont capables de reconstituer entièrement par elles-mêmes une population de CSE pluripotente avec des niveaux de NANOG hétérogènes. Par la suite, les chercheurs ont découvert grâce aux analyses par séquençage ARN de cellules uniques qu'il existait une vraie hétérogénéité globale du transcriptome dans les CSE cultivées en sérum+LIF, et que ces cellules sont en fait dans des états de pluripotence métastables (Kolodziejczyk et al. 2015;

Kumar et al. 2014; Klein et al. 2015). Une de ces études a montré que cette hétérogénéité pouvait être notamment due aux voies de signalisation classiques des CSE cultivées en sérum+LIF, et que d'autres conditions de culture, comme le 2i+LIF (dont je parlerai plus en détail plus tard dans ce manuscrit) pouvaient induire une plus forte homogénéité (Kumar et al. 2014). De la même manière, une étude comparant des CSH et cellules iPS humaines a montré que ces dernières étaient dans un état pluripotent moins stable et plus hétérogène comparées aux CSH (Narsinh et al. 2011).

Il existe deux potentielles explications à cette hétérogénéité et à sa signification *in vivo* (Arias, Nichols, et Schröter 2013). Premièrement, il est possible que cette hétérogénéité reflète l'incapacité des conditions de culture actuelles à capturer *in vitro* un état stable de pluripotence, et que les différences représentent en fait des cellules à différents stades de spécification de lignage. Un exemple appuyant cette hypothèse est celui du gène *Zscan4* qui est exprimé dans l'embryon au stade 2-cellules, et est présent couramment dans un peu moins de 5% des CSE (Zalzman et al. 2010). Deuxièmement, il est possible que cette hétérogénéité existe également chez l'embryon, et qu'elle soit un mécanisme utilisé par la cellule pour explorer son potentiel développemental et répondre aux signaux environnementaux de manière stochastique et non engagée. Ces deux hypothèses ne sont pas totalement exclusives, et des études supplémentaires seront nécessaires afin d'établir la véracité de chacune.

Les causes moléculaires de l'hétérogénéité restent mal déterminées. Dans une certaine mesure, les hétérogénéités d'expression des facteurs de transcription sont probablement interdépendantes. En effet, KLF4 et ESRRB par exemple sont deux cibles directes de NANOG, et leur hétérogénéité pourrait donc être expliquée par celle de NANOG (Festuccia et al. 2012; MacArthur et al. 2012; Torres-Padilla et Chambers 2014). Une autre cause décrite comme expliquant cette hétérogénéité est le cycle cellulaire. Chez l'Homme, il a en effet été montré que le cycle cellulaire est responsable de l'hétérogénéité à travers le contrôle de l'expression de plusieurs facteurs de transcription acteurs de processus développementaux tels que HOXD1 (Homeobox D1), GATA4 et PAX7 (Paired box 7) par exemple (Singh et al. 2013). Cependant, les auteurs de cette étude ne sont pas parvenus à démontrer un lien entre le cycle cellulaire et l'expression de facteurs de pluripotence tels que NANOG et REX1, indiquant ainsi qu'il existe sûrement d'autres mécanismes régulant l'hétérogénéité.

Les états de pluripotence naïve et amorcée

La pluripotence à l'état naïf correspond à celle présente dans l'embryon préimplantatoire, au stade E3,5-4,5. Elle est constitutive des cellules de la MCI du blastocyste, ainsi que des CSE qui en sont dérivées. Tel que discuté précédemment, ces cellules sont capables de s'auto-renouveler et de donner naissance à tous les types cellulaires de l'embryon hormis les annexes embryonnaires.

Comme la MCI, les CSE présentent un haut niveau de transcription global (Efroni et al. 2008), des niveaux faibles globaux de méthylation (Leitch et al. 2013), et les cellules femelles ne

présentent pas encore d'inactivation de leur chromosome X (Wutz et Jaenisch 2000). Les cellules souches naïves n'expriment qu'à de faibles niveaux voire pas du tout les gènes marqueurs de différenciation précoces tels que *Otx2* (Orthodenticle homeobox 2), *Fgf5* (Fibroblast growth factor 5) et *Brachyury* par exemple, contrairement aux cellules de la pluripotence amorcée (Tesar et al. 2007). Cependant, d'un point de vue strictement transcriptionnel, des études de séquençage ARN (RNA-seq) ont montré de manière inattendue que les CSE étaient plus proches de l'embryon au stade E5,5, ce qui pourrait être dû à un décalage lié à la dérivation des CSE ou aux conditions de culture (Bulut-Karslioglu et al. 2016; Boroviak et al. 2015).

La pluripotence amorcée équivaut à l'état de pluripotence des cellules de l'épiblaste de l'embryon post-implantation, au stade E5,5, ainsi que des CSEpi *in vitro*. Comparée à la pluripotence naïve, les cellules de la pluripotence amorcée sont incapables de contribuer à des blastocystes chimères pré-implantation (Rossant, Gardner, et Alexandre 1978; Tesar et al. 2007). Une exception à cela est la très rare (mais interconvertible) sous-population de cellules CSEpi qui maintient à haut niveau l'expression du facteur de pluripotence naïve OCT4. Ces cellules sont capables de contribuer à des blastocystes chimères lorsqu'elles sont sélectionnées (Han et al. 2010). En revanche, les CSEpi forment des tératomes efficacement (Tesar et al. 2007), et sont capables au contraire des CSE de contribuer au développement de blastocystes chimères post-implantation (Y. Huang et al. 2012).

De manière générale, les cellules de la pluripotence amorcée présentent des niveaux de méthylation globaux plus élevés par rapport aux cellules de la pluripotence naïve, notamment au niveau des promoteurs et avec des profils distincts de marques épigénétiques telles que H3K9me3 (Veillard et al. 2014; Tosolini et al. 2018). De plus, l'un des deux chromosomes X des cellules femelles est inactivé lors du passage de la pluripotence naïve à la pluripotence amorcée (Nichols et Smith 2009). Cependant, les attributs épigénétiques clés de la pluripotence et les motifs de liaisons des facteurs de transcription caractéristiques de la pluripotence sont conservés (Tesar et al. 2007). Remarquablement, ces transitions et modifications épigénétiques pourraient être liées à des changements métaboliques (Takehara et al. 2012; Betto et al. 2021). L'activité phosphatase alcaline, décrite plus haut dans ce manuscrit comme marqueur de pluripotence, est présente dans les cellules naïves mais pas dans celles présentant une pluripotence amorcée (Brons et al. 2007).

Un des paramètres importants pour la stabilité des cellules souches est le maintien de leurs télomères grâce à une activité renforcée de l'enzyme télomérase (J. S. Z. Li et Denchi 2018; Marion et al. 2009; Pucci, Gardano, et Harrington 2013). La longueur des télomères des CSEpi (environ 33 kilobases (kb)) est plus courte que celle des CSE, mais plus longue que celle des cellules de tissus différenciés (Kojima et al. 2014).

La pluripotence amorcée est contrôlée par des réseaux de signalisation génétique différents de ceux de la pluripotence naïve. Ces différences seront détaillées dans les parties IV et V du chapitre 2.

La pluripotence induite

Comme évoqué dans le chapitre 1 partie III « Médecine régénérative », il est possible de reprogrammer des cellules différenciées grâce à un cocktail de quatre facteurs de transcription afin de les faire revenir à l'état pluripotent. Ces cellules dites iPS sont donc capables de s'auto-renouveler et de se différencier en chacun des trois lignages embryonnaires (Takahashi et Yamanaka 2006).

Les cellules iPS présentent une pluripotence très semblable à la pluripotence naïve. En effet, elles sont positives au marquage de l'activité phosphatase alcaline (Štefková, Procházková, et Pacherník 2015), présentent un profil de transcription comparable à celui des CSE (Takahashi et Yamanaka 2006), et ont deux chromosomes actifs avec une inactivation aléatoire de l'un des deux au cours de leur différenciation (Maherali et al. 2007). Cependant, les CSE et les cellules iPS pourraient ne pas être totalement équivalentes, notamment à cause de la présence dans les cellules iPS d'une forme de mémoire épigénétique provenant de leur précédente identité (Lowry 2012).

De plus, il a été montré dans plusieurs études qu'une pluripotence équivalente à la pluripotence amorcée pouvait également être induite, soit en utilisant les conditions de cultures des CSEpi soit en partant de souches de souris ne permettant pas la dérivation de CSE (Han et al. 2011; Hanna et al. 2009).

La pluripotence formative et les états intermédiaires

Les deux états de pluripotence décrits précédemment, naïve et amorcée, ne sont que la partie émergée de l'iceberg. Il existe en réalité tout un continuum d'états pluripotents subtilement différents, potentiellement réversibles et plus ou moins interconvertibles qui peuvent être capturés *in vitro* et étudiés (Figure 4). La perte du potentiel souche a lieu aux alentours de la gastrulation, moment où les cellules s'engagent de manière définitive dans l'un des lignages.

C'est ainsi qu'une hypothèse sur l'état de pluripotence dite formative a récemment émergé (Kalkan et Smith 2014; A. Smith 2017). Elle est basée sur le fait que les cellules amorcées étaient déjà prédisposées à la différenciation et orientées préférentiellement vers le mésendoderme (Kurek et al. 2015), et donc qu'il existerait un maillon manquant dans notre connaissance de la chaîne de la pluripotence. Dans ces études, il est proposé que cet état intermédiaire fait le lien entre les états naïf et amorcé. Les cellules subissent en effet un effacement de leur réseau de transcription naïf avant d'activer les réseaux liés aux différents types de différenciation (Kalkan et al. 2017). Cet état métastable où la cellule perd son identité naïve avant d'acquiescer des caractéristiques spécifiques aux différents lignages correspondrait à cet état dit de pluripotence formative, et notamment la capacité d'être dérivées en CGP. Des cellules souches formatives (CSF) présentant ces caractéristiques ont récemment pu être dérivées à partir d'épiblastes d'embryons au stade E5,5, en inhibant la voie WNT et activant modérément les voies MAPK (mitogen-activated protein kinase) et Nodal (Kinoshita et al.

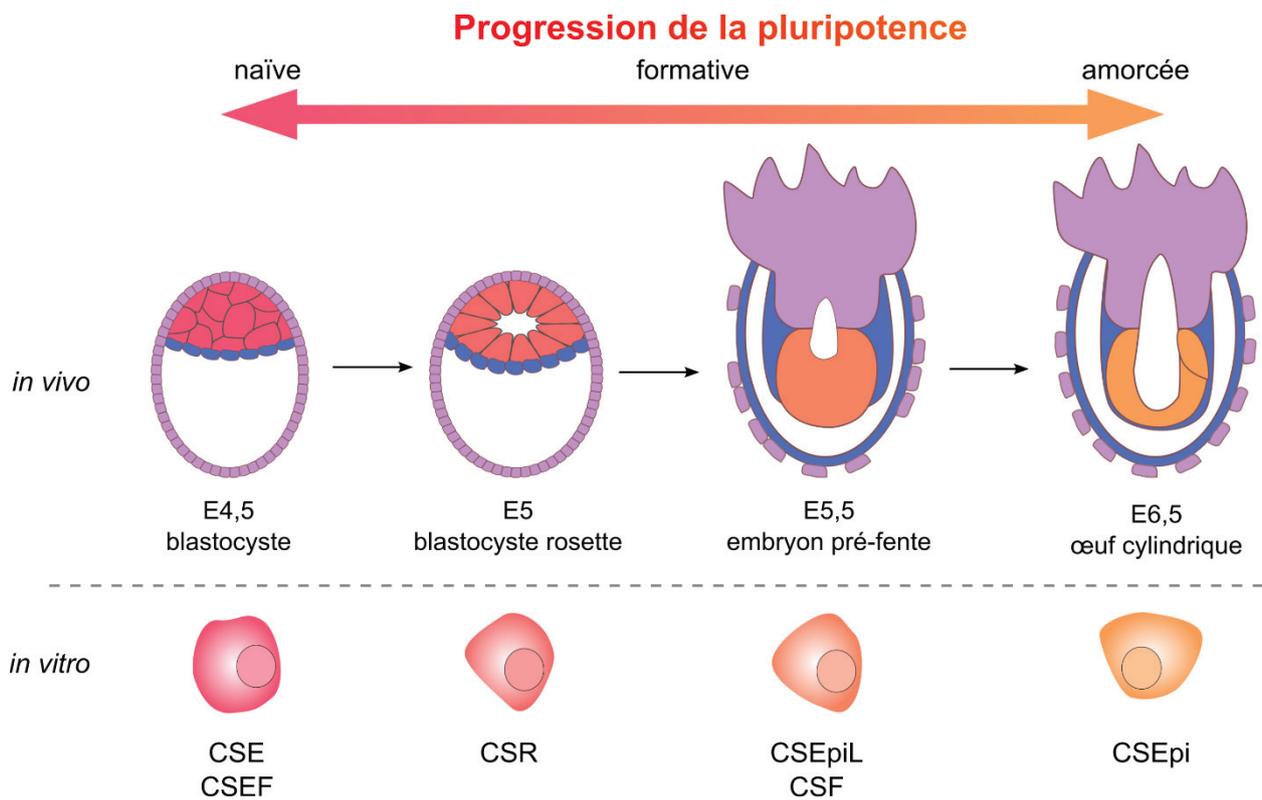


Figure 4 : Le continuum de la pluripotence *in vivo* et *in vitro*.

Représentation des différents états pluripotents capturés *in vitro* ainsi que de leurs équivalents en stades embryonnaires *in vivo*. CSE, cellule souche embryonnaire ; CSEF, cellule souche en état fondamental ; CSR, cellule souche rosette ; CSEpiL, cellule souche Epi-like ; CSF, cellule souche formative ; CSEpi, cellule souche épiblastique.

2020). Les CSEpi-like (CSEpiL), qui présentent également des propriétés similaires à ces cellules de l'état formatif, sont obtenues à partir de CSE cultivées pendant deux jours dans un milieu contenant de l'Activine A et du bFGF (Hayashi et al. 2011).

Un autre état intermédiaire a récemment été décrit (Neagu et al. 2020). Cet état, qui correspond *in vivo* au stade péri-implantatoire où les cellules de l'épiblaste sont organisées en rosettes, est maintenu stable par la double inhibition des voies de signalisation WNT et MAPK, grâce à l'utilisation respectivement des molécules chimiques IWP2 et PD184352. Les cellules, appelées cellules souches rosettes (CSR), présentent à la fois des marqueurs de la pluripotence naïve tels que NANOG et KLF4 et des marqueurs de la pluripotence amorcée comme OTX2. Placées en matrice extracellulaire composite de laminine et collagène, ces cellules sont capables de s'organiser et de reconstituer la structure rosette de l'épiblaste E5-5,75, avec ouverture d'une lumière au centre. Les CSR sont très faiblement positives au test AP, possèdent deux chromosomes X actifs, présentent des niveaux intermédiaires de méthylation, et sont capables de contribuer au développement de blastocystes chimères, confirmant ainsi leurs propriétés intermédiaires entre l'état naïf et amorcé.

Enfin, un dernier état dit de pluripotence fondamentale peut être capturé *in vitro* par une inhibition combinée de GSK3 et MEK *via* deux molécules chimiques, respectivement CHIR99021 (activation de la voie WNT) et PD184352 (inhibition de la voie MAPK) (Ying et al. 2008). Ces conditions de culture sont appelées 2i+LIF, pour deux inhibiteurs+LIF. La découverte de cet état a permis de dériver des CSE de souches de souris auparavant non permissives ainsi que d'autres espèces comme le rat et supprime complètement la différenciation résiduelle qui existe en conditions sérum+LIF (Czechanski et al. 2014; Buehr et al. 2008). L'analyse transcriptomique de ces cellules souches en état fondamental (CSEF) les associe à un état naïf moins avancé que les CSE, proches de la MCI précoce ou de l'épiblaste pré-implantatoire au stade E4,5 (Boroviak et al. 2015 ; Bulut-Karslioglu et al. 2016).

L'étude de ces états intermédiaires apporte l'espoir d'une meilleure compréhension de la transition de pluripotence naïve à amorcée, de la période péri-implantatoire, et des mécanismes les régulant.

IV- La régulation de la pluripotence au niveau moléculaire

Afin de réguler de manière fine, flexible mais robuste la pluripotence, il existe tout un système reposant sur de multiples voies de signalisations complexes avec des rôles plus ou moins

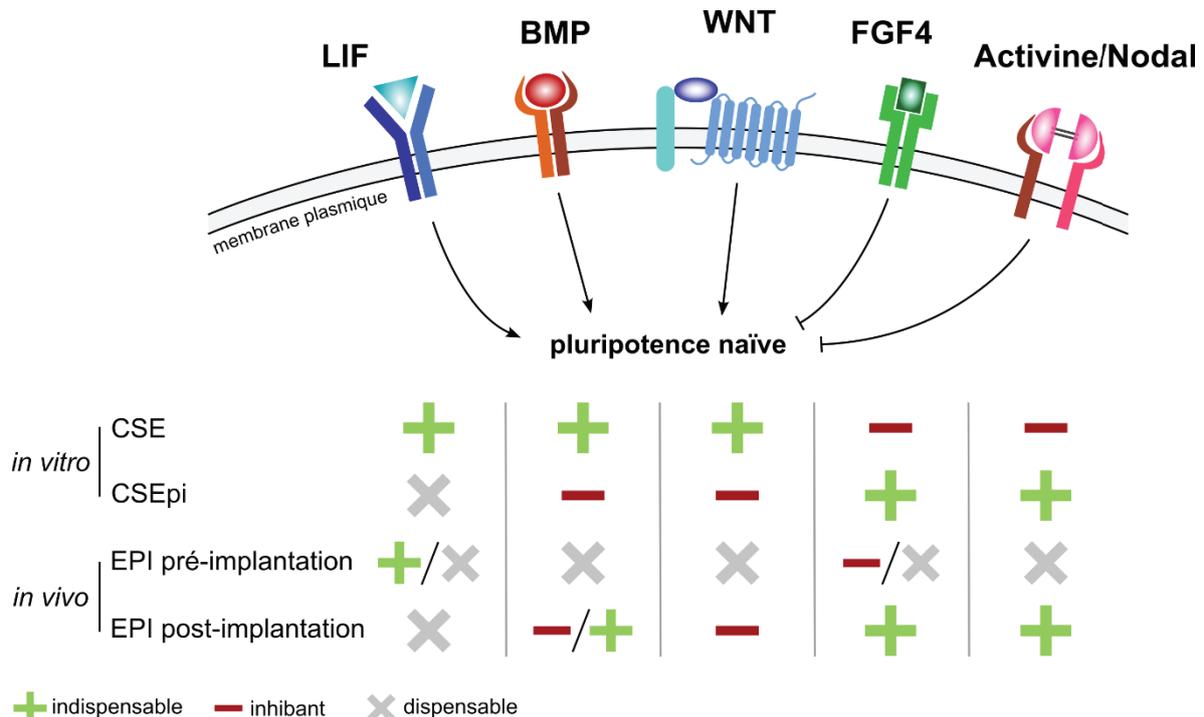


Figure 5 : Les principales voies de signalisation affectant la pluripotence.

Représentation des principales voies de signalisation de la pluripotence (LIF, BMP, WNT, FGF et Activine/Nodal) ainsi que de leur nécessité au maintien de cette dernière *in vivo* et *in vitro*. CSE, cellule souche embryonnaire ; CSEpi, cellule souche épiblastique ; EPI, épiblaste. (Adapté de Posfaj, Tam, et Rossant 2014).

redondants. Ici, je détaillerai les cinq voies identifiées comme jouant un rôle crucial dans la régulation de la pluripotence au niveau moléculaire chez la souris. Les voies WNT, BMP (bone morphogenetic protein) et LIF supportent la pluripotence des cellules naïves tandis que les voies MAPK et Activine/Nodal encouragent leur différenciation. Au contraire, la voie LIF n'est pas requise pour le maintien de la pluripotence amorcée, les voies WNT et BMP la déstabilisent, et les voies MAPK et Activine/Nodal l'entretiennent (Figure 5). Ainsi, les conditions de culture actuelles pour les CSE comprennent du sérum+LIF, alors que les CSEpi sont maintenues en milieu chimiquement défini contenant de l'Activine et du FGF.

La voie LIF

LIF est une protéine sécrétée de la famille Interleukines VI de cytokines. Historiquement, la voie LIF fut la première voie découverte régulant la pluripotence. En effet, dès 1988, des études sur la composition des milieux conditionnés utilisés en culture dévoilent son rôle indispensable dans le maintien de la pluripotence des CSE *in vitro* (A. G. Smith et al. 1988; R. L. Williams et al. 1988). En effet, son absence induit la rapide différenciation des CSE en cellules du mésoderme et de l'endoderme. L'ajout de LIF au milieu de culture permet également de pallier la nécessité d'une culture sur une couche de fibroblastes inactivés. Au contraire, les CSEpi ne sont pas dépendantes du LIF pour maintenir leur pluripotence, et il ne permet d'ailleurs pas de les dériver (Brons et al. 2007).

Le ligand LIF se fixe sur deux récepteurs formant un hétérodimère : le LIFR (LIF récepteur) et le récepteur GP130. Ces signaux activent plusieurs voies de signalisation dans la cellule : JAK (Janus kinase)/STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription), PI3K (phosphatidylinositol-3-OH kinase) et MAPK/ERK (extracellular signal-regulated kinase) (H. Niwa et al. 2009; Onishi et Zandstra 2015; Ohtsuka, Nakai-Futatsugi, et Niwa 2015)(Figure 6).

D'une part, l'activation de JAK par la signalisation LIF provoque la phosphorylation de STAT3, qui va en conséquence être transféré dans le noyau afin d'activer des cibles postérieures, tels que les facteurs de transcription KLF4, KLF5 (kruppel-like factor 5) et TFCEP2L1, qui vont participer à la régulation des trois facteurs clés de la pluripotence, OCT4, SOX2 et NANOG.

D'autre part, la signalisation LIF va activer PI3K, une kinase lipidique qui convertit PIP2 (phosphatidylinositol-4,5-biphosphate) en PIP3 (phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate) (Cantley 2002). PIP3 va recruter à la membrane la sérine/thréonine kinase AKT (AKT serine/threonine kinase 1), qui va être activée par phosphorylation *via* PDK1 (PI3K-dependent kinase-1). AKT va ensuite indirectement activer le facteur de transcription TBX3 (transcription T-box 3), qui a pour cibles les trois facteurs clés de la pluripotence.

Enfin, de manière un peu contre-intuitive, la signalisation LIF induit la voie MAPK, dont j'ai évoqué qu'elle promouvait la différenciation dans les CSE. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'activation de la voie ERK est nécessaire à un faible niveau pour maintenir la prolifération et

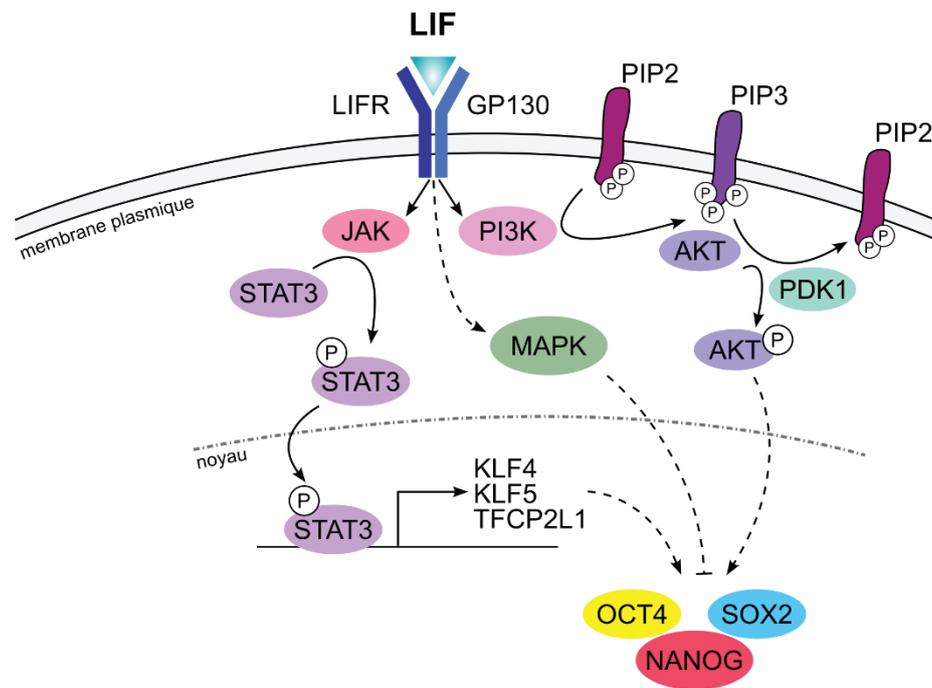


Figure 6 : La voie LIF dans la pluripotence naïve.

La signalisation LIF active les voies PI3K/AKT et JAK/STAT, et mène à la maintenance de la pluripotence naïve.

le bon déroulement du cycle cellulaire, comme l'ont montré des expériences de suppression de son expression (H. Chen et al. 2015; W. Guo et al. 2013).

Il est à noter que les voies de signalisation régulant la pluripotence *in vitro* sont parfois superflues *in vivo* (Figure 5), ce qui indique un décalage entre notre compréhension de la pluripotence en culture et dans l'embryon. Par exemple, les blastocystes issus de souris n'ayant pas de gène *Lif* fonctionnel sont viables pré-implantation, montrant ainsi une divergence avec ce que l'on sait de son rôle *in vitro* (Stewart et al. 1992).

La voie BMP

La protéine BMP4 (Bone Morphogenetic Protein 4) est un facteur de croissance sécrété initialement décrit dans la croissance de l'os et faisant partie de la superfamille du TGFβ (Transforming Growth Factor beta) (Bragdon et al. 2011). Avec une vingtaine de ligands décrits, la famille BMP possède des rôles variés et parfois redondants dans la formation, la maintenance et la réparation d'une pléthore d'organes.

Dans les CSE, un seul récepteur BMP de classe II appelé *BmprII* et trois récepteurs de classe I, ALK2, ALK3 et ALK6 sont exprimés. BMP4 se lie à l'hétérodimère formé par *BMPRII* et l'un des ALK. Cela provoque la phosphorylation par ALK de *BMPRII*, qui va à son tour phosphoryler les protéines SMAD1, 3 et 8. Ces effecteurs vont s'hétérodimériser avec SMAD4 et se relocaliser

au noyau afin de jouer leur rôle de facteur de transcription (Y. Shi et Massagué 2003)(Figure 7).

La délétion du gène BMP4 cause la mort de l'embryon tôt dans le développement, au stade E6.5-9.5. L'embryon ne parvient pas à dépasser le stade de l'œuf cylindre et n'exprime pas de marqueur du mésoderme (Winnier et al. 1995). La voie BMP joue également un rôle important dans la prolifération de l'épiblaste post-implantation et la gastrulation (Beppu et al. 2000; Mishina et al. 1995). En revanche, aucun rôle fondamental de la voie BMP n'a été mis en évidence dans l'épiblaste pré-implantatoire jusqu'à maintenant. De récentes études ont cependant montré que la voie BMP est active dans l'embryon pré-implantatoire et joue un rôle dans le clivage cellulaire au stade morula (Reyes de Mochel et al. 2015) ainsi que dans le développement des lignages extra-embryonnaires (Graham et al. 2014).

In vitro, il a été montré qu'en absence de sérum, la voie BMP en collaboration avec l'activation de la voie LIF suffit à maintenir la pluripotence des CSE, et participe à inhiber la voie MAPK (Ying et al. 2003; Z. Li et al. 2012). Les CSEpi exposées à du BMP4 se différencient en TE, montrant ainsi que la voie BMP déstabilise la pluripotence de ces cellules (Brons et al. 2007).

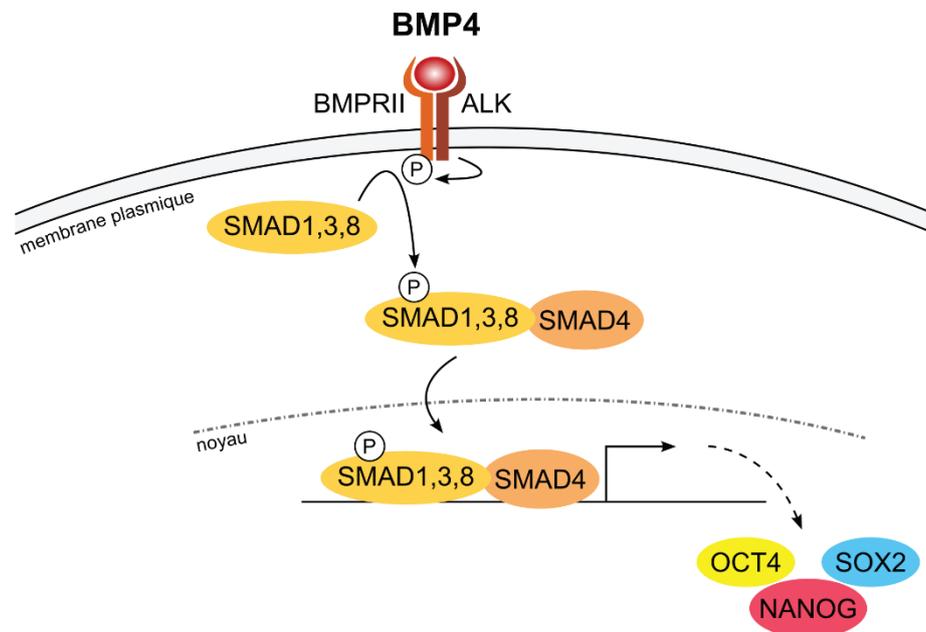


Figure 7 : La voie BMP dans la pluripotence naïve.

L'activation de cette voie mène à la suppression de la différenciation neuronale. En combinaison avec le LIF, elle maintient la pluripotence naïve dans les CSE.

La voie WNT

La voie WNT est une voie historiquement décrite chez la drosophile dans les années 80 (Nüsslein-Volhard et Wieschaus 1980), qui a une importance immense dans le développement

(R. Nusse et Varmus 1982; Clevers 2006; Wiese, Nusse, et van Amerongen 2018). Chez les mammifères, WNT est une grande famille de protéines sécrétées avec une vingtaine de membres divisés en douze sous-familles, qui possèdent des rôles physiologiques très divers allant de la migration cellulaire à la mise en place des patrons des axes corporels et reposant sur la communication intercellulaire cellule-cellule ou à courte distance (Steinhart et Angers 2018; Y. Yang 2012; Duchartre, Kim, et Kahn 2016).

Il existe trois principales voies de signalisation médiées par WNT : la voie dite canonique *via* β -caténine, la voie non canonique de polarité cellulaire planaire (PCP), et la voie non canonique WNT/ Ca^{2+} (Y. Yang 2012). La voie canonique étant la mieux étudiée et décrite comme celle contrôlant la prolifération et la différenciation, je vais ici me focaliser sur la description de celle-ci.

La protéine WNT est synthétisée, palmitoylée par la protéine Porcupine avant d'être transportée par Wntless et sécrétée (Hofmann 2000; Bartscherer et al. 2006). Elle va ensuite venir se fixer sur un hétérodimère des récepteurs Frizzled (Frz) et LRP5/6 (Tamai et al. 2000). En l'absence de signalisation WNT, le principal effecteur de la voie, la β -caténine est phosphorylée par un complexe de destruction cytoplasmique constitué d'Axine, APC, CK1 et Gsk3 α/β avant d'être dégradée par le complexe constitué de l'E3-ubiquitine ligase β -TRCP associé à la protéine SCF (Stamos et Weis 2013)(Figure 8). Ainsi, la β -caténine néo-synthétisée est détruite en permanence (Amit et al. 2002; C. Liu et al. 2002). L'activation de la voie WNT provoque le recrutement à la membrane plasmique de Dishevelled (DSH), qui à son tour va recruter l'Axine, et ainsi déstabiliser le complexe de destruction (Cong et Varmus 2004). À la suite de cela, GSK3 va être phosphorylée par LRP5/6 et dégradée, laissant ainsi la β -caténine libre de se relocaliser dans le noyau et de co-activer la transcription avec les facteurs liant l'ADN de la famille TCF/LEF (van de Wetering et al. 1997).

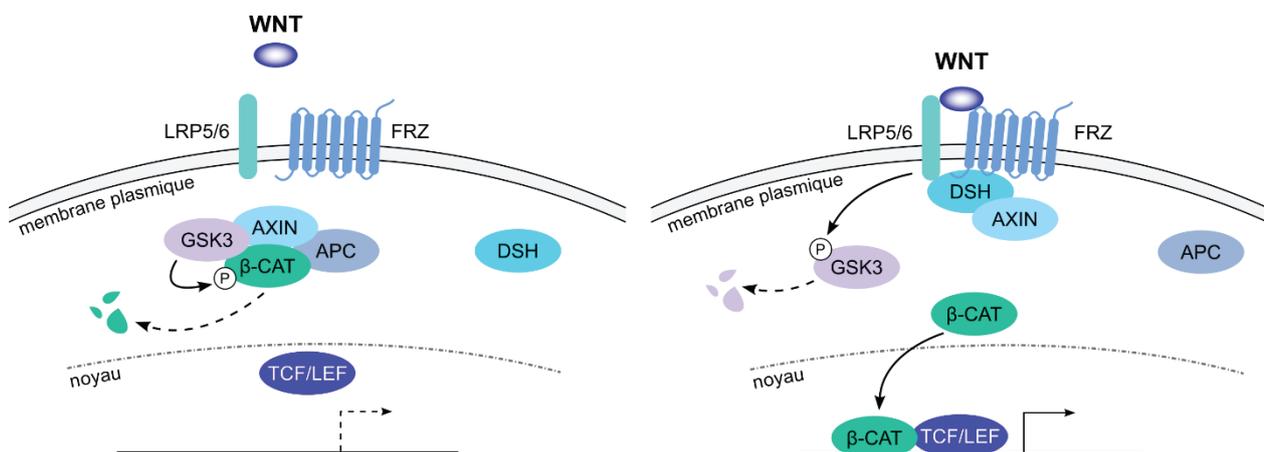


Figure 8 : La voie WNT dans la pluripotence naïve.

En l'absence du ligand (panel de gauche), la β -caténine est dégradée en permanence par le complexe de destruction. Lorsque WNT se lie à ses récepteurs, la dégradation de GSK3 est induite, la β -caténine est stabilisée et se relocalise dans le noyau pour jouer son rôle de facteur de transcription.

Dans la pluripotence, la voie WNT joue un double rôle puisqu'elle participe à la maintenance de la pluripotence naïve des CSE (Kielman et al. 2002; Anton, Kestler, et Kühl 2007; Miyabayashi et al. 2007; Sato et al. 2004) tout en les protégeant de la transition vers la pluripotence amorcée des CSEpi (ten Berge et al. 2011). *In vivo*, elle est en particulier indispensable pour l'induction de la gastrulation, mais il est possible qu'elle possède également un rôle secondaire dans la prolifération des cellules de la MCI (Haegel et al. 1995; Biechele, Cox, et Rossant 2011).

La voie MAPK

La voie FGF/MAPK, activée par le ligand FGF, est une des voies fondamentales pour le développement embryonnaire précoce. En effet, les embryons dont l'expression de FGF4 est supprimée meurent immédiatement après l'implantation, et leur MCI est sévèrement impactée (Feldman et al. 1995).

In vitro, l'inhibition de la voie FGF permet de maintenir les CSE dans un état indifférencié et son activation est nécessaire pour la bonne transition vers différents lignages (Kraushaar et al. 2012; Kunath et al. 2007; Stavridis et al. 2007; Kraushaar, Yamaguchi, et Wang 2010). En revanche, l'addition de β FGF au milieu de culture est indispensable pour la dérivation et le

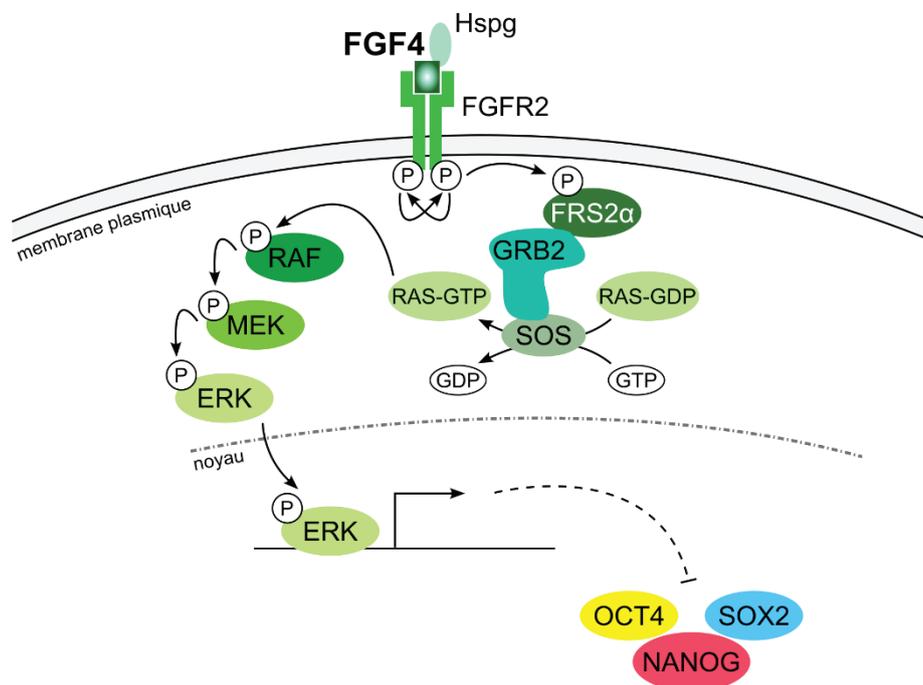


Figure 9 : La voie FGF dans la pluripotence naïve.

L'activation de cette voie de signalisation induit la différenciation. Elle est donc strictement régulée dans les CSE afin d'éviter un engagement inapproprié.

maintien des CSEpi, montrant ainsi la dualité fonctionnelle de cette voie dans des types cellulaires très proches (Brons et al. 2007).

Dans les CSE, le ligand FGF4 se lie au récepteur FGFR2 grâce à des protéoglycanes héparanes sulfates, et provoque son homodimérisation et sa transactivation par phosphorylation (Lin et al. 1999; M. Xie et Li 2019; Goetz et Mohammadi 2013). Le récepteur ainsi activé est capable d'induire quatre voies de signalisation différentes : RAS-MAPK, PI3K-AKT, Plcγ et STAT. La voie prédominante dans les CSE est la voie RAS-MAPK, où FGFR2 phosphoryle la protéine FRS2α (Figure 9). Cette dernière va recruter, *via* la protéine adaptatrice GRB2, le facteur d'échange de guanine nucléotide SOS, qui va transformer la GDPase RAS en GTPase. La GTPase RAS va alors provoquer la phosphorylation en cascade des protéines RAF, MEK et ERK, qui représentent la voie MAPK (W. Zhang et Liu 2002). ERK une fois phosphorylée va se relocaliser au noyau et activer l'expression des facteurs de transcription cibles de la voie MAPK, et inhiber directement l'expression de NANOG (Ornitz et Itoh 2015; Hamilton et Brickman 2014; M. Kang, Garg, et Hadjantonakis 2017). De plus, ERK phosphoryle la sérine 727 de STAT3, bloquant ainsi la voie LIF et préparant les cellules à la différenciation (G. Huang et al. 2014).

La voie Activine/Nodal

Tout comme les BMP, Activine et Nodal sont des membres de la superfamille TGFβ. Ils lient tous deux les mêmes récepteurs et induisent quasiment les mêmes réponses de régulation de la transcription, c'est pourquoi ils seront évoqués ensemble ici.

Nodal est sécrétée sous forme de précurseurs dimérisés, qui sont ensuite clivés par les protéases convertases SPC1 et SPC4 pour donner le ligand actif, qui va s'homodimériser *via* des liaisons disulfures (Pauklin et Vallier 2015). Activine va en revanche se former par homo ou hétérodimérisation de sous-unités Inhibine (βa, βb, βc, βe), également par le biais de liaisons disulfures. Ces ligands se lient à un complexe hétérodimérique formé de deux récepteurs sérine/thréonine kinases, l'un de type I (ALK4 ou ALK7) et l'autre de type II (ACTRIIA ou ACTRIIB) (Papanayotou et Collignon 2014). L'activation de ces récepteurs induit la phosphorylation de SMAD2 ou SMAD3, qui vont se lier à SMAD4 avant de se relocaliser dans le noyau pour exécuter leur fonction de facteurs de transcription (Oshimori et Fuchs 2012)(Figure 10).

Le knock-out (KO) du gène *Nodal*, un des premiers réalisés chez la souris, provoque *in vivo* la différenciation prématurée des cellules de l'EPI en précurseurs neuronaux et la perte de la formation du mésoderme et de l'endoderme (Camus et al. 2006). Nodal possède également un rôle fondamental dans l'établissement des axes de l'embryon : après l'implantation, un gradient de Nodal définit l'axe proximal-distal, qui définira plus tard l'axe antéro-postérieur de l'embryon (Arnold et Robertson 2009). En revanche, aucun rôle majeur pour cette voie avant l'implantation n'a été détecté dans les embryons perte de fonction (Papanayotou et Collignon 2014). De nombreuses études ont montré que la voie Activine/Nodal régule un grand nombre de processus cellulaires variés tels que la progression du cycle cellulaire, la

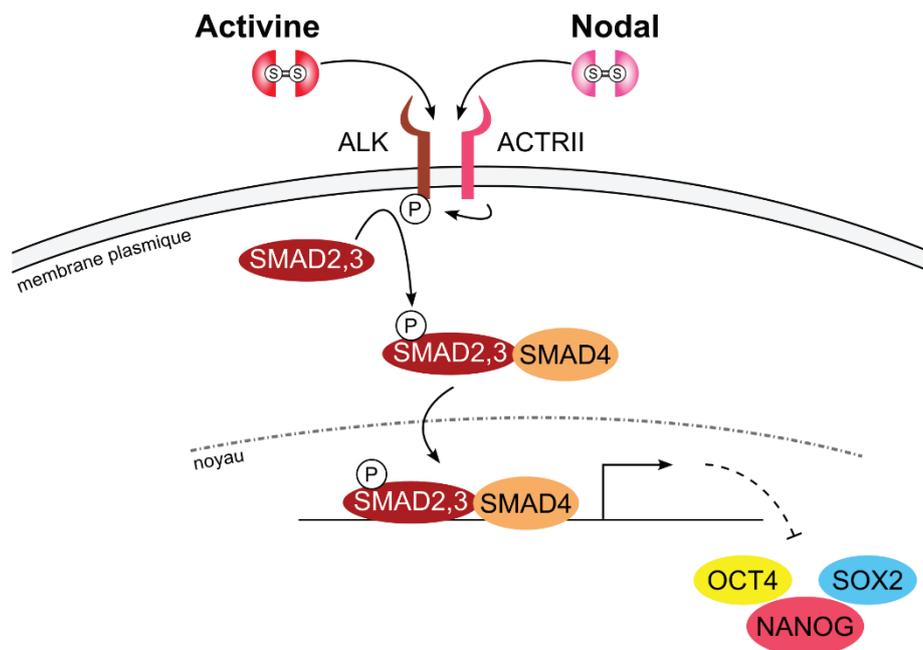


Figure 10 : La voie Activine/Nodal dans la pluripotence naïve.

La voie Activine/Nodal est importante dans le maintien de la pluripotence naïve en absence de LIF uniquement. En revanche, elle est indispensable au maintien de la pluripotence amorcée.

prolifération/différenciation des progéniteurs lors de l'organogenèse et l'homéostasie des tissus de manière générale (Pauklin et Vallier 2015).

Dans les cellules CSEpi, la voie Activine/Nodal participe au maintien de la pluripotence en maintenant l'activité de NANOG et d'OCT4 (Brons et al. 2007; Vallier et al. 2009; K. L. Lee et al. 2011). Au contraire, dans les CSE l'activation de la voie induit la différenciation des cellules vers le mésendoderme, de manière cohérente avec sa fonction putative *in vivo* (K. L. Lee et al. 2011). Cependant, la même étude montre que l'inactivation d'Activine/Nodal réduit l'expression d'OCT4 et allume certains gènes du TE, et d'autres chercheurs ont montré que cette voie semble jouer un rôle fondamental dans la prolifération des CSE (Ogawa et al. 2007). Des études complémentaires semblent donc nécessaires pour comprendre pleinement le rôle d'Activine/Nodal, notamment dans la pluripotence naïve.

V- La régulation de la pluripotence au niveau génétique

La régulation de la pluripotence au niveau du noyau implique toute une batterie de facteurs de transcription et de régulateurs de la chromatine, qui ensemble vont orchestrer la mise en place, le maintien et la sortie maîtrisée de la pluripotence dans les cellules. Contrôlé par les voies de signalisation déjà évoquées, le réseau génétique de pluripotence est coordonné notamment par trois facteurs clés : NANOG, OCT4 et SOX2.

Les trois facteurs clés du réseau de pluripotence : NANOG, OCT4, SOX2

De multiples facteurs sont responsables du bon entretien de la pluripotence, mais trois d'entre eux jouent un rôle absolument capital, et sont ainsi appelés « facteurs clés » du réseau de pluripotence. OCT4, SOX2 et NANOG sont trois facteurs de transcription dont l'absence est dévastatrice pour la pluripotence de la MCI de l'embryon (Avilion et al. 2003; Mitsui et al. 2003; Nichols et al. 1998). Les CSE expriment ces trois facteurs à hauts niveaux, et les CSEpi présentent des niveaux équivalents voire supérieurs pour NANOG et OCT4 (Brons et al. 2007).

OCT4 est une protéine issue du gène *Pou5f1* qui lie l'ADN *via* un motif octamérique, et son patron d'expression est fortement conservé entre la souris et l'homme. Ce facteur de transcription commence à être fortement exprimé dans les blastomères, au stade 8-cellules. À la suite de la cavitation de l'embryon, son expression est ensuite restreinte à la MCI, et décline dans l'endoderme primitif ainsi que dans les cellules du TE. Après l'implantation, OCT4 est exprimé dans l'épiblaste jusqu'à la gastrulation, où il n'est plus exprimé, sauf dans les CGP (Pesce et Schöler 2000). Son niveau d'expression est finement régulé (Patra 2020). En effet, il a été montré qu'une surexpression d'OCT4 induisait un engagement vers le mésendoderme et l'endoderme primitif, tandis que sa suppression cause un engagement progressif vers le TE (H. Niwa, Miyazaki, et Smith 2000).

SOX2 fait partie de la famille de facteurs de transcription Sox, qui lient l'ADN *via* un domaine HMG (high-mobility group) et contrôlent de nombreuses décisions sur le destin de la cellule et sa différenciation (Lefebvre et al. 2007). Il commence à être exprimé dans la morula, et est spécifique à la MCI et à l'épiblaste plus tard dans le développement (Avilion et al. 2003). Il reste cependant exprimé à la suite de la gastrulation et joue un rôle dans l'engagement des cellules vers le neurectoderme (S. Zhao et al. 2004).

NANOG est un facteur de transcription de la famille des Homeobox, nommé d'après la terre mythique Celte de la jeunesse éternelle, Tír na nÓg. Il est fortement exprimé jusqu'au début de l'implantation où il est rapidement réprimé (Chambers et al. 2003). De manière intéressante, la suppression de NANOG dans les CSE n'affecte pas leur capacité à s'auto-renouveler, bien qu'elles soient plus sensibles à la différenciation, et incapable de contribuer à la lignée germinale d'embryons chimères (Chambers et al. 2007).

Ces trois facteurs agissent ensemble ou séparément à plusieurs niveaux. Premièrement, ils se lient aux séquences dites « amplificatrices » des promoteurs de gènes afin de promouvoir la transcription de cibles associées à la pluripotence (Xi Chen et al. 2008; X. Chen, Vega, et Ng 2008). Deuxièmement, les facteurs clés sont capables de s'auto-réguler positivement eux-mêmes et entre eux afin de mettre en place un réseau solide de pluripotence (M. F. Cole et al. 2008; Rodda et al. 2005; L. A. Boyer et al. 2005). Enfin, les facteurs clés maintiennent la pluripotence en recrutant des complexes répresseurs tels que ceux du groupe Polycomb au niveau des séquences régulatrices des gènes de différenciation (Loh et al. 2006; Liang et al. 2008; Bilodeau et al. 2009; Orkin et al. 2008).

Les autres facteurs de transcription impliqués dans la pluripotence

Les facteurs clés NANOG, OCT4 et SOX2 contrôlent et interagissent avec de nombreux autres facteurs de transcriptions impliqués dans le réseau de pluripotence, dits « auxiliaires » car ils ne sont pas indispensables au développement préimplantatoire mais permettent de favoriser l'auto-renouvellement et le maintien de la pluripotence. Entre autres, ESRRB, FOXD3, KLF5, STELLA, PRDM14, KLF4, SALL4, TFCEP2L1 et TBX3 font partie de ces facteurs qui permettent de solidifier le contrôle de la pluripotence (Hackett et Surani 2014).

Dans les conditions classiques de culture des CSE en sérum+LIF, l'expression de ces facteurs auxiliaires oscille et rend ainsi les cellules plus ou moins sensibles aux signaux de différenciation (Chambers et al. 2007; Martello et al. 2012; Toyooka et al. 2008; Yamaji et al. 2013). En revanche, leur expression est homogénéisée en 2i+LIF, dans l'état de pluripotence fondamental évoqué plus haut, en accord avec l'idée d'une pluripotence plus stable dans cet état (Wray, Kalkan, et Smith 2010), et la surexpression de *Tbx3*, *Esrrb*, *Klf2*, *Klf4* ou *Klf5* permet de contourner l'utilisation du LIF (Ema et al. 2008; Hall et al. 2009; H. Niwa et al. 2009; Martello et al. 2012). Les CSEpi possèdent des facteurs auxiliaires partagés avec les CSE mais également des facteurs régulant spécifiquement la pluripotence amorcée comme OTX2 et ZIC2 (Acampora et al. 2016; Acampora, Di Giovannantonio, et Simeone 2013; Matsuda et al. 2017).

La régulation épigénétique de la pluripotence

Comme discuté plus haut, les CSE possèdent un faible niveau de méthylation comparées aux cellules somatiques, indiquant une chromatine ouverte et très accessible. Ceci concorde avec leur haut niveau de transcription, nécessaire pour soutenir leur forte prolifération (Bulut-Karslioglu et al. 2018).

Si le maintien des CSE n'est pas affecté par l'absence des DNA méthyltransférases Dnmt1, Dnmt3a et Dnmt3b et donc par l'absence de méthylation (Tsumura et al. 2006), il s'avère que cette activité est indispensable lors de leur différenciation (Jackson et al. 2004; Panning et Jaenisch 1996). De même, les embryons où l'activité de Dnmt1 ou Dnmt3a/b est abolie ne survivent pas au-delà du stade E11,5 (Lei et al. 1996; Okano et al. 1999).

Il existe trois types d'actions qui régulent l'activité des gènes et donc la pluripotence de manière générale : l'activation de gènes, leur répression ou l'induction d'un état de préparation afin d'être capable de répondre rapidement à un signal développemental (Young 2011). Ces actions reposent sur les facteurs de transcription ainsi que sur les complexes protéiques liés à l'ADN qu'ils recrutent comme Mediator ou Cohésin (Kagey et al. 2010), sans oublier les régulateurs de chromatine tels que le complexe Polycomb ou SetDB1 (Bracken et al. 2006; Bilodeau et al. 2009) et les divers moyens de contrôle de la RNA polymérase II (Young 2011).

Par exemple, dans les CSE, le facteur de transcription ZIC2 s'associe au complexe de désacétylation et de remodelage nucléosomique (NuRD) afin de réguler l'activation de séquences amplificatrices de transcription lors de la transition de pluripotence naïve vers amorcée (Luo et al. 2015).

Un autre exemple est celui du complexe de répression Polycomb, qui propage des marques de répression de type H3K27me3 (Leeb et al. 2010). Il en existe deux types, PRC1 et PRC2 (Polycomb-repressive complex 1 et 2). Il a été montré qu'ensemble, ils occupent plus de cinq cents gènes comprenant de nombreux facteurs de transcription impliqués dans le déroulement du développement au-delà de la pluripotence (L. A. Boyer et al. 2006). De manière captivante, certaines régions activatrices de transcription liées au développement portent à la fois des marques répressives H3K27me3 déposées par Polycomb et des marques activatrices H3K4me2/3 déposées par le complexe du groupe Trithorax, ce qui pourrait indiquer des régions préparées à être activées de manière très dynamique, comme cela a été démontré chez la drosophile (Bernstein et al. 2006; Ang et al. 2011; Orlando et al. 1998).

Dans les CSEpi, en plus des différences évoquées précédemment comme un chromosome X inactivé et une chromatine globalement moins ouverte, des changements de séquences amplificatrices ont lieu, comme cela a été démontré par exemple pour le gène *Pou5f1* qui code pour OCT4 (Choi et al. 2016).

Chapitre 3 : Le cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est une partie fondamentale du développement. En effet, son bon déroulement assure à la fois la croissance de l'embryon et son intégrité au niveau cellulaire. En contrôlant à la fois la multiplication du matériel génétique et la division cellulaire, le cycle cellulaire est indispensable pour la génération de deux cellules filles intègres et donc finement régulé par des mécanismes complexes. Je vais d'abord développer les différentes phases du cycle cellulaires et leur rôle, avant de détailler les acteurs responsables de la progression du cycle cellulaire, et enfin évoquer les spécificités du cycle cellulaire dans les cellules pluripotentes.

I- Les différentes phases du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est historiquement divisé en quatre phases : G1, S, G2 et M (Paweletz 2001). Il existe également une phase appelée G0 dite de quiescence, durant laquelle les cellules ne prolifèrent pas. L'ensemble des phases G1, S et G2 constitue une période appelée interphase préparant à la mitose qui équivaut à 95% de la durée totale du cycle, durant laquelle le matériel génétique est décompacté et entouré d'une enveloppe nucléaire qui est dissoute au début de la mitose. Durant les phases synthèse (S) et mitose (M), la cellule réalise des étapes fondamentales à savoir la réplication de son ADN et la division de cet ADN en deux part égales. Les phases gap/growth 1 et 2 (G1 et G2) sont des phases d'intervalles qui préparent la cellule aux phases S et M, et durant lesquelles il existe de multiples points de contrôle qui évitent une prolifération incontrôlée et assurent la qualité du matériel génétique transmis.

La phase G0/G1

À la suite de la mitose, la cellule se trouve confrontée à un premier choix : entrer en phase G0 et s'arrêter ou reprendre un cycle en entrant en phase G1. La quiescence peut être induite par des stress comme l'inhibition de contact ou la perte d'adhésion cellulaire (Coller, Sang, et Roberts 2006; Pack, Daigh, et Meyer 2019) mais les cellules différenciées qui ne prolifèrent plus, ainsi que certaines cellules souches adultes sont également en phase G0. Il a longtemps été pensé que ce choix dépendait d'un unique point de restriction situé en phase G1 sensible aux conditions extrinsèques telles que la disponibilité des facteurs de croissances, nucléotides et acides aminés (Tobey et Ley 1970; Pardee 1974; Saqcena et al. 2013). Des études plus récentes utilisant notamment de l'imagerie au niveau cellule unique proposent que cette bifurcation entre G0 et G1 s'effectue en fait juste après la mitose, et que l'engagement dans

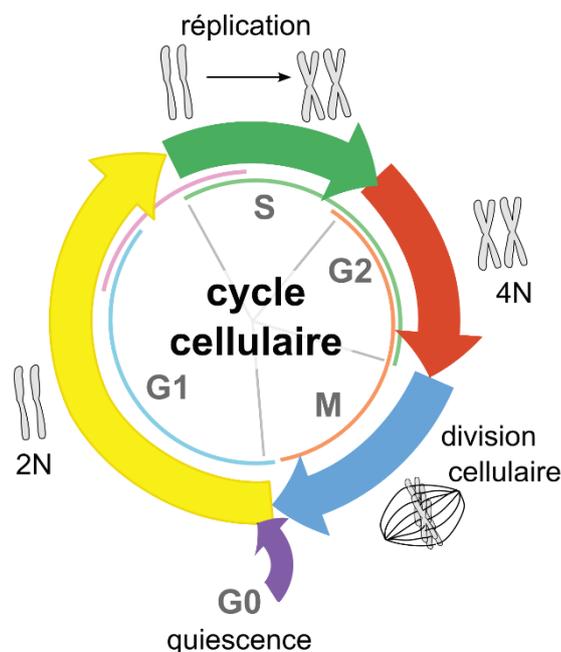


Figure 11 : Le cycle cellulaire.

Le cycle cellulaire prépare la cellule à sa division. Durant la phase G1, la cellule a une quantité 2N d'ADN. Elle le réplique durant la phase S et en possède une quantité 4N durant la phase G2. Elle se divise ensuite pendant la phase M. Les cellules en phase G0 sont quiescentes et ne prolifèrent pas.

le cycle cellulaire dépend en fait de trois points de contrôle, qui ne sont pas tous dépendants des nutriments disponibles (Spencer et al. 2013; Hume, Dianov, et Ramadan 2020).

Il n'existe pas vraiment de point de restriction réversible en phase S car une fois la réplication de l'ADN commencée elle ne peut s'arrêter, et de même pour la phase M sous peine d'affecter la bonne distribution des chromosomes. La phase G2 n'est pas non plus contrôlée par l'absence de nutriments, car la plupart des cellules de mammifères étant diploïdes, la cellule ne peut pas rester avec le double de matériel génétique. Les cellules peuvent cependant être arrêtées de manière irréversible à n'importe quel moment du cycle et entrer en sénescence en cas de stress intense (Pack, Daigh, et Meyer 2019). De plus, il existe des exceptions à cette règle et ce notamment dans d'autres espèces puisque qu'une étude récente a montré que des progéniteurs neuronaux chez le Xénope étaient capables de s'arrêter de manière réversible en phase G2 en l'absence de nutriments (McKeown et Cline 2019).

Il existe également de nombreux points de contrôle dans le cycle cellulaire qui vérifient des paramètres intrinsèques tels que l'absence de dommages à l'ADN (Hume, Dianov, et Ramadan 2020; Khoronenkova et Dianov 2015), mais j'aborderai cet aspect important du contrôle du cycle plus en détail dans la partie sur la phase G2.

Première phase du cycle ayant lieu après la mitose, la phase G1 est cruciale pour la préparation de la phase S. En effet, durant cette phase la cellule va reprendre un rythme de transcription

intense afin de pouvoir accumuler toutes les protéines nécessaires en particulier à sa croissance et à la réplication de l'ADN (Blobel et al. 2009; Muramoto et al. 2010; Hsiung et al. 2016). La transcription étant quasiment nulle durant la mitose, cette rapide réactivation dépend notamment d'un système de « marque-pages » où les gènes activement transcrits pré-mitoses sont annotés afin de pouvoir retrouver leur niveau préalable de transcription au plus vite (Sarge et Park-Sarge 2005; R. Zhao et al. 2011).

De nombreuses voies de signalisation sont importantes pour réguler la croissance de la cellule et la progression du cycle vers la phase S, comme en particulier la voie mTOR (mammalian target of rapamycin). Cette voie évolutivement très conservée a un rôle important dans l'intégration des signaux relatifs aux états d'énergie et de nutrition de la cellule, et il a été montré que son inhibition a un rôle délétère sur la prolifération et la progression du cycle cellulaire (Fingar et Blenis 2004; Fingar et al. 2002; Inoki, Zhu, et Guan 2003; Abraham et Wiederrecht 1996).

La phase S

La phase S a pour rôle la réplication de l'entièreté du génome de manière fidèle et efficace. Afin d'alléger cette lourde tâche, la phase S est préparée en amont avec la mise en place de complexes hélicases appelés MCM au niveau des origines de réplication durant la phase G1 (Musiałek et Rybaczek 2015; Remus et Diffley 2009). Ce processus appelé « licensing » est réalisé par la monométhylation H4K20me1 des sites d'initiation de la réplication par l'enzyme SETD8 (Tardat et al. 2010). Le fait de limiter la charge des origines de réplication à la phase G1 permet aussi d'éviter les phénomènes de re-réplication, qui peuvent avoir de sérieuses conséquences (Hanlon et Li 2015; Bui et Li 2019; Muñoz et al. 2017). Le point de contrôle du licensing a longtemps été sous-étudié notamment car il n'existe pas chez la levure, mais de nombreuses études tentent de rattraper ce retard (Lunn, Chrivia, et Baldassare 2010; Machida, Teer, et Dutta 2005; Gardner et al. 2017).

Ces origines de réplifications chargées sont mises à feu au début de la phase S. Cette mise à feu n'est pas synchronisée : en effet, les gènes de l'hétérochromatine sont activés plus tardivement que ceux de l'euchromatine, sûrement en raison d'une moindre accessibilité par les facteurs de mise à feu (Rivera-Mulia et Gilbert 2016).

Certaines fourches de réplication rencontrent des lésions et s'arrêtent. Pour éviter que cette situation devienne définitive, il existe de nombreux systèmes de réparation, redémarrage et de contournement induits pendant la phase G1 afin d'être disponibles en phase S (Hustedt et Durocher 2016). Des origines de réplifications en excès sont également chargées en phase G1 afin de pouvoir prendre le relai si l'ADN doit être répliqué à partir d'une nouvelle fourche (Woodward et al. 2006).

Une fois la réplication terminée, les complexes MCM sont déchargés de l'ADN avant la fin de la phase S (Håland et al. 2015; Nishiyama, Frappier, et Méchali 2011). Peu de choses sont connues sur la transition S-G2, mais une récente étude suggère l'implication de la kinase ATR

(ATM and Rad3-related) dans un checkpoint liant la réplication à l'activation du réseau génétique lié à la mitose (Saldivar et al. 2018).

La phase G2

La phase G2 est une phase de croissance, de multiplication des organelles et de synthèse de protéines importantes en préparation de la mitose. Cependant, certaines cellules cancéreuses ainsi que les cellules de l'embryon précoce de Xénope peuvent sauter cette phase et entrer directement en phase M, accélérant ainsi significativement leur cycle cellulaire (Liskay 1977; Alberts et al. 2002).

Durant la phase S, l'ADN est répliqué de la manière la plus fidèle possible, et de nombreux systèmes de réparation corrigent les éventuelles erreurs. Toutefois, il arrive que des cassures double brin (CDB) soient accidentellement créées. Ces cassures sont réparées en G2, avant que la phase M n'intervienne, grâce à un système de réparation par recombinaison homologue, qui utilise le brin sœur intact comme modèle (Burgoyne, Mahadevaiah, et Turner 2007).

De manière générale, les dommages à l'ADN présents en phase G2 activent un même point de contrôle *via* l'activation de la kinase CHK1 (Matthew J. O'Connell et Cimprich 2005). En effet, lorsqu'un dommage à l'ADN se produit, des complexes constitués de différentes protéines des familles Rad, Rfc, Hus, ATR et ATRIP sont recrutés à cet endroit. La protéine ATR phosphoryle ensuite CHK1 grâce à d'autres protéines médiatrices (M. J. O'Connell, Walworth, et Carr 2000), ce qui l'active et entraîne une phosphorylation inhibitrice de CDK1 (Cyclin-dépendant kinase 1). L'action du complexe cycline B1/CDK1 qui contrôle l'entrée de la cellule en phase M est ainsi bloquée, laissant le temps aux systèmes de réparation de résoudre les problèmes. L'absence de CHK1 a des conséquences catastrophiques sur l'initiation et le maintien du point de contrôle, démontrant ainsi son rôle crucial pour la transition G2/M (Latif, Elzen, et O'Connell 2004).

La phase M

Durant la phase M, la cellule mère va se diviser de manière égale afin d'obtenir deux cellules filles quasiment identiques. Elle peut être divisée en quatre étapes distinguables au microscope, chacune indispensable pour le bon déroulement de la mitose : la prophase, la métaphase, l'anaphase et la télophase (Paweletz 2001).

La prophase commence avec la condensation des chromosomes répliqués et leur association avec leur chromatide sœur au niveau du centromère *via* la formation des kinétochores (Hirano 2006). Le centrosome qui contient alors quatre centrioles va se diviser pour former deux centrosomes à deux centrioles, qui vont chacun migrer à un pôle opposé de la cellule (Bornens 2021). Cette migration va de pair avec une réorganisation du réseau de microtubules pour former ce qu'on appelle le fuseau mitotique (Pavin et Tolić 2021). Lors de la métaphase, les

forces de traction et de poussée exercées par le fuseau mitotique entraînent l'alignement des chromosomes le long du plan équatorial, au centre de la cellule (Risteski et al. 2021). Au préalable, l'enveloppe nucléaire est détruite (Dey et Baum 2021). Une fois alignés, le point de contrôle de l'assemblée du fuseau est désactivé, et l'anneau de cohésine maintenant les chromatides ensemble est détruit. Ceci provoque le déclenchement très rapide de l'anaphase où les chromatides sont brusquement séparés et migrent à une vitesse de presque 1µm/minute vers les pôles de la cellule (McIntosh 2021; Scholey, Civelekoglu-Scholey, et Brust-Mascher 2016). Enfin, la télophase est marquée par la décondensation des chromosomes, par la formation d'une enveloppe nucléaire autour des deux noyaux nouvellement formés des cellules filles et par la constitution d'un anneau contractile de filaments d'actine et de myosine II, qui va entourer le milieu de la cellule (Antonin et Neumann 2016; Warecki et Sullivan 2022; Larijani et Poccia 2009; Pollard et O'Shaughnessy 2019). Lors de la cytotélorèse, cet anneau va être activé par des ATPases et se resserrer, menant ainsi à la division du cytoplasme et des organites pour former deux cellules filles individualisées et concluant la mitose. Cette division peut être parfaitement symétrique ou mener à une asymétrie des cellules filles, ce qui pourrait avoir de nombreux rôles dans la formation des axes de l'embryon, dans la maintenance de la polarité épithéliale ou encore dans la formation de lumière (Sugioka 2022).

II- Les acteurs du cycle cellulaire

La bonne tenue du cycle cellulaire repose sur de nombreux acteurs, qui sont souvent régulés par phosphorylation afin d'obtenir un réseau contrôlé de manière complexe et très dynamique (Nigg 2001; Palmer et Kaldis 2016). De manière intéressante, ce réseau est souvent perturbé dans les cellules cancéreuses (Suski et al. 2021). Il existe de nombreuses transitions au cours du cycle, qui doivent chacune être orchestrées à la perfection. Cette coordination dépend en particulier du réseau de facteurs de transcriptions E2F, auquel s'associent les protéines de poche RB (ou pRB, Retinoblastoma protein), p107 et p130 afin de maîtriser l'expression des gènes acteurs des différentes transitions, le tout supervisé par les complexes cyclines/CDK (Schafer 1998; Morgan 2010)(Figure 12). Dans cette partie, je détaillerai les différentes familles avec tout d'abord les cyclines et cyclines dépendantes kinases, suivies des protéines de poches pRB, p107 et p130, puis des protéines E2F. Enfin, j'évoquerai brièvement un des principaux outils employés pour l'étude du cycle cellulaire que j'ai utilisé durant ma thèse, le système Fucci (Fluorescence Ubiquitin Cell Cycle Indicator).

Les cyclines et cyclines-dépendantes kinases

Les oscillations du cycle cellulaires sont contrôlées principalement par trois types d'acteurs : les cyclines, qui sont des protéines exprimées comme leur nom l'indique de manière cyclique à différents moments du cycle, les CDK (cyclin-dependent kinases) et les CKI (CDK inhibitors) (Schafer 1998). Il a longtemps été pensé que ces protéines avaient une fonction unique liée

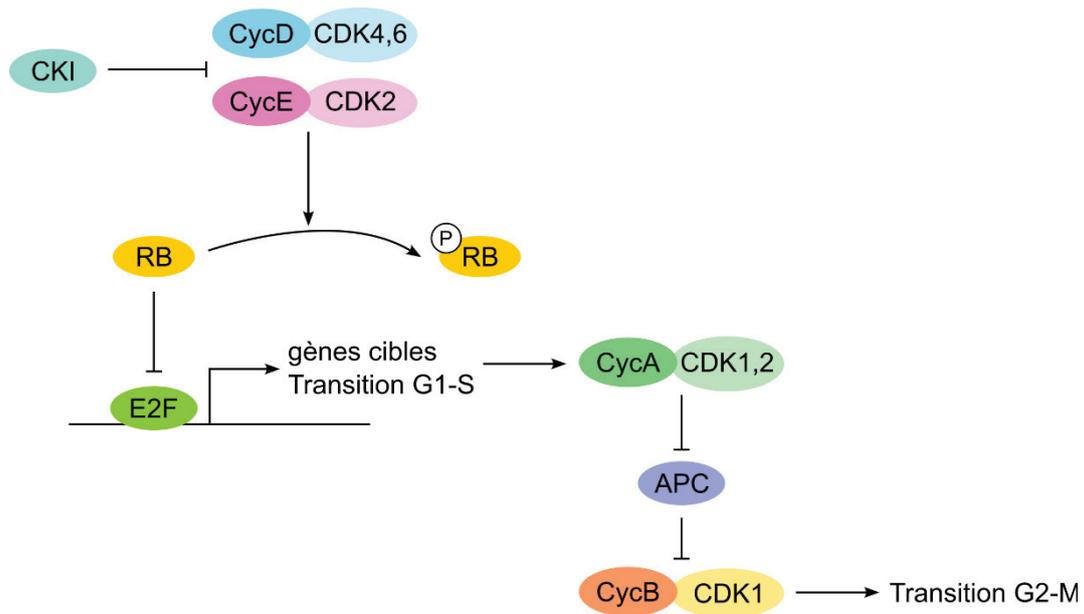


Figure 12 : Mécanismes de régulation des acteurs du cycle cellulaire.

Les Cyclines D et E, qui peuvent être inhibées par les CKI, activent les CDK qui leur sont associées, et entraînent l'hyperphosphorylation de RB et donc son inactivation. Les facteurs de transcription de la famille E2F sont alors libres d'induire leurs cibles, et soutiennent la progression de la phase G1 vers la phase S. Parmi leurs cibles, Cycline A va inhiber le complexe de destruction APC, et ainsi permettre l'expression de Cycline B, qui va activer CDK1 et assurer la transition G2-M. CKI, cyclin kinase inhibitor ; CycN, cyclin N ; CDK, cyclin dependant kinase.

au cycle cellulaire, mais de nombreux rôles additionnels leur ont depuis été attribués, entre autres dans la transcription, le métabolisme, la régulation épigénétique et l'auto-renouvellement des cellules souches (Lim et Kaldis 2013; Tatum et Endicott 2020). Dans le modèle classique, l'expression des cyclines varie au cours du cycle, tandis que les CDK sont régulées de façon bien plus stables (Hochegger, Takeda, et Hunt 2008). Par exemple, les cyclines A et B sont détruites durant la phase M par le complexe APC (anaphase-promoting complex) constitué de plusieurs sous-unités qui possèdent ensemble une activité E3 ubiquitine ligase (Sudakin et al. 1995). De même, la cycline D doit être dégradée au début de la phase S, sous peine d'engendrer la re-réplication du génome (Aggarwal et al. 2007).

Les CDK sont des enzymes catalytiques sérines/thréonines kinases activées à des moments précis du cycle par leur interaction directe avec les cyclines. Chez les mammifères, une vingtaine de CDK ont été décrites jusqu'à présent, certaines interagissant avec une unique cycline et d'autres avec de multiples (Malumbres 2014). Elles sont cruciales pour la progression du cycle cellulaire : en effet, il a été montré que leur inactivation bloque les cellules dans différentes phases du cycle (Devault et al. 1991; van den Heuvel et Harlow 1993). Une étude plus récente montre cependant que l'absence *in vivo* de toutes les protéines CDK d'interphase (CDK2, CDK3, CDK4 et CDK6) n'affecte pas la viabilité des embryons jusqu'à la moitié de la gestation ; en effet, la protéine CDK1 est capable de les remplacer, ce qui indique

une forte versatilité et des redondances fonctionnelles dans la famille CDK (Santamaría et al. 2007).

Les CKI sont répartis en deux familles : les membres de la famille INK4, qui inhibent CDK4 et CDK6 sont p16^{INK4A}, p15^{INK4B}, p18^{INK4C} and p19^{INK4D}, et les membres de la famille CIP/KIP, qui inhibent CDK4, CDK6 et CDK2 sont p21^{Cip1}, p27^{Kip1} and p57^{Kip2} (Pavletich 1999; Cao et al. 2014; Deshpande, Sicinski, et Hinds 2005; Malumbres 2014).

L'appartenance à la famille des cyclines est caractérisée uniquement par la présence dans la séquence protéique d'une boîte cycline qui permet la liaison aux CDK (Nugent et al. 1991; Gopinathan, Ratnacaram, et Kaldis 2011). De manière intéressante, le nombre de cyclines encodées par le génome a augmenté parallèlement à l'évolution vers la pluricellularité : *Saccharomyces cerevisiae* en possède six, alors que le génome humain en code plus d'une vingtaine (Cao et al. 2014; Lim et Kaldis 2013). Ceci est probablement dû à la nécessité pour les organismes pluricellulaires d'intégrer de nombreux signaux environnementaux de manière plus complexe afin d'organiser le développement des tissus. Ici, seules les cyclines A-E, qui ont une activité liée à la progression du cycle cellulaire et dont l'expression protéique oscille réellement seront évoquées (Martínez-Alonso et Malumbres 2020).

Au début de la phase G1, les signaux de croissance reçus par la cellule engendrent *via* la protéine Ras l'accumulation de la cycline D (CCND) (Aktas, Cai, et Cooper 1997). Ceci provoque l'activation de CDK4/6, ce qui entraîne l'hyper phosphorylation de la protéine pRB et donc son inactivation, permettant ainsi l'augmentation de l'activité de transcription des protéines E2F (Harbour et al. 1999; Kato et al. 1993).

La cycline E (CCNE), dont la transcription dépend des E2F (Bartek, Bartkova, et Lukas 1996), est alors transcrite et active CDK2 en fin de phase G1, ce qui a pour conséquence de maintenir la phosphorylation de pRB et donc son inactivation (Geng et al. 1996; Chung et al. 2019). Les E2F sont alors libérés complètement et peuvent induire la transcription de gènes requis pour la réplication, la progression en phase S et l'induction de la mitose. L'inactivation du complexe de destruction APC/CDH1 par CCNE/CDK2 juste avant le début de la phase S marque le point de non-retour du cycle (Cappell et al. 2016).

La fin de la phase G1 marque le début de l'expression de la cycline A (CCNA), qui forme avec CDK1 ou CDK2 un complexe qui va permettre la continuation en phase S, et l'entrée en mitose (Morgan 2010; T. Niwa et al. 2021). Le complexe CCNA/CDK1 régule également le programme de mise à feu de certaines origines de réplication dans la phase S tardive, et son activation prématurée entraîne une réplication aberrante (Katsuno et al. 2009). Une autre fonction cruciale de CCNA/CDK2 est l'induction de la phosphatase CDC25 (cell-division control 25) *via* la stimulation de PLK1 (Polo-like kinase 1) (Gheghiani et al. 2017). CDC25 va supprimer les phosphorylations inhibitrices qui empêchent l'activation de cycline B1 (CCNB1)/CDK1, et ainsi promouvoir l'entrée en phase M.

La cycline B1 commence donc à être exprimée à la fin de la phase S ; cependant, elle s'accumule dans le cytoplasme et ne se relocalise dans le noyau qu'au moment de la destruction de l'enveloppe nucléaire, durant la phase M (Pines et Hunter 1991; Álvarez-Fernández et Malumbres 2014; Strauss et al. 2018). Le complexe CCNB1/CDK1 contrôle la

transcription d'un grand nombre de protéines mitotiques qui sont requises entre autres pour la ségrégation des chromosomes, celle des organites, et pour la fission mitochondriale (Malumbres 2014; Álvarez-Fernández et Malumbres 2014). De plus, le complexe CCNB1/CDK1 a un rôle fondamental durant la mitose puisqu'il contribue avec AURKB (Aurora kinase B) au recrutement au niveau des kinétochores de la protéine MPS1 (protein monopolar spindle 1), organisateur clé de la cascade de signalisation du point de contrôle du fuseau mitotique (Hayward, Alfonso-Pérez, et Gruneberg 2019). Enfin, CCNB1 est dégradée rapidement lors de l'initiation de l'anaphase par le complexe APC/Cyclosome (APC/C) qui est activé par la protéine CDC20 (cell division cycle 20) (Peters 2006; Hayward, Alfonso-Pérez, et Gruneberg 2019). En l'absence de cycline B1, l'embryon de souris est incapable d'entrer en mitose et s'arrête au stade 4 cellules, confirmant ainsi l'importance cruciale de cette protéine pour le développement, contrairement à cycline B2 dont l'absence résulte en des souris viables et fertiles, mais de plus petite taille (Strauss et al. 2018; Brandeis et al. 1998).

Les protéines de poche : pRB, p107 et p130

pRB est un gène suppresseur de tumeur, découvert à la fin des années 80 et nommé ainsi car sa délétion entraînait l'apparition d'un rétinoblastome (Friend et al. 1986; Weinberg 1991; 1995). Avec les deux autres protéines de poches, p107 (codée par le gène RB-like 1 (*Rbl1*)) et p130 (codée par le gène RB-like 2, (*Rbl2*)), elles sont des acteurs clés du cycle cellulaire qui possèdent des fonctions de contrôle de la transcription. Ces protéines sont appelées ainsi à cause de la présence dans leur séquence d'un domaine structural en forme de fente appelé domaine de poche, qui permet leur liaison physique à de nombreuses protéines partenaires, dont les facteurs E2F dont elles répriment l'activité de facteur de transcription (Chellappan et al. 1991; Dick et Rubin 2013). Plusieurs études ont montré que l'action de répression transcriptionnelle de pRB sur les promoteurs de gènes du cycle régulés par les protéines E2F passe notamment par le recrutement de régulateurs chromatiniens telles que l'histone désacétylase HDAC1, enrichissant localement le promoteur en marques de type H3K9me3 (Brehm et al. 1998; Takaki et al. 2004; Talluri et al. 2010).

La phosphorylation de pRB par les différentes CDK sur de multiples sites au niveau des liaisons entre ses domaines protéiques engendre un changement de conformation qui masque le domaine d'interaction de la poche et l'empêche donc de s'associer à ses partenaires, notamment les protéines E2F (Burke, Hura, et Rubin 2012; Burke et al. 2014). Contrairement aux cyclines, pRB n'est pas dégradé à la fin du cycle, mais est déphosphorylé par la phosphatase PP1 pour pouvoir jouer à nouveau son rôle en phase G1 (Kolupaeva et Janssens 2013). La phosphatase PP2A semble également pouvoir déphosphoryler les trois protéines de poche : néanmoins, ceci n'a été observé qu'à la suite de signaux de stress (Cicchillitti et al. 2003; Magenta et al. 2008; Voorhoeve et al. 1999). Des modifications post-transcriptionnelles telles que des méthylations et acétylations peuvent également affecter la phosphorylation de pRB et donc son niveau d'activité (Munro, Carr, et La Thangue 2012). La structure des autres protéines de poches étant similaire, il est probable qu'elles soient régulées de la même façon.

L'absence des protéines de poches provoque une prolifération incontrôlée due à la dérégulation du cycle cellulaire, et leurs fonctions sont dans une certaine mesure redondantes (Dannenberget al. 2000; Classon et Harlow 2002). Les protéines de poches s'autorégulent *via* des boucles de rétroaction, comme le montre cette étude où les auteurs ont muté deux domaines du promoteur du gène *Rb1* (codant pour p107), ce qui a révélé un contrôle direct de sa transcription par des membres des familles pRB et E2F, notamment au moment de son pic d'expression en phase S (Burkhardt et al. 2010).

Contrairement à pRB et p107, l'activité de p130 semble être majoritairement restreinte aux cellules en quiescence. En se liant à E2F4, elle réprime la transcription de gènes liés à la rentrée dans le cycle (Moberg, Starz, et Lees 1996). Lors de la rentrée dans le cycle, E2F4 change de partenaire et se lie préférentiellement à pRB ou p107 afin de réguler un nouvel ensemble de gènes (Hurford et al. 1997).

Les facteurs de transcription E2F

Une grande partie des gènes nécessaires à la progression du cycle cellulaire, et notamment des phases S et M, est régulée transcriptionnellement par une famille de facteurs de transcription appelés E2F (*E2 promoter binding factor*) (Attwooll, Lazzarini Denchi, et Helin 2004; H.-Z. Chen, Tsai, et Leone 2009).

Ces facteurs sont au nombre de dix (encodés par huit gènes) chez les mammifères, et sont classiquement répartis en facteurs activateurs (E2F1, E2F2, E2F3a) et répresseurs (E2F3b, E2F4, E2F5, E2F6, E2F7a, E2F7b, E2F8)(Palmer et Kaldis 2016). Plusieurs études ont montré qu'il existe une redondance fonctionnelle non négligeable entre eux, et qu'ils s'entre-régulent (Tsai et al. 2008; Danielian et al. 2008; J. Li et al. 2008). Ils se lient directement à l'ADN afin de réguler le programme génétique du cycle cellulaire et sont réprimés par pRB, p107 et p130 comme évoqué précédemment. Cependant, contrairement aux autres E2F, E2F6-8 ont été décrits comme fonctionnant indépendamment d'une quelconque interaction avec les protéines de poche (Trimarchi et al. 1998; de Bruin et al. 2003; Maiti et al. 2005). Comme discuté dans la partie « Les cyclines et cyclines-dépendantes kinases », les protéines E2F sont principalement actives durant la fin de la phase G1 et le début de la phase S, lorsque la protéine pRB est inactivée par phosphorylation.

Bien que la perte d'un des trois E2F activateurs soit facilement compensable pour la cellule, c'est loin d'être le cas si l'expression des trois est simultanément perdue : le cycle est alors immédiatement arrêté et la prolifération est *de facto* fortement affectée (L. Wu et al. 2001).

Le système Fucci

Jusque récemment, les études du cycle cellulaire reposaient principalement sur la fixation des cellules ou sur leur synchronisation grâce à la privation de sérum, qui bloque les cellules en phase G1 au niveau du point de restriction, ou à l'utilisation de substances telles que le

nocodazole, qui empêche la formation du fuseau mitotique et donc l'entrée en phase M. Ces méthodes sont critiquables puisqu'elles ne permettent pas d'avoir un suivi en direct, et impliquent un stress et des effets secondaires potentiels pour les cellules. De plus, elles ne faciliteraient pas l'étude des cellules telles que les CSE, qui ne présentent pas de point de restriction en G1 et ne sont donc pas synchronisables dans cette phase. L'un des outils qui a révolutionné l'étude du cycle cellulaire est le système Fucci. Ce système repose sur deux protéines fluorescentes rapportrices de l'expression de deux protéines dont l'expression varie au cours du cycle : CDT1 (chromatin licensing and DNA replication factor 1, CDC10-dependent transcript 1) et GMNN (Geminin) (Sakaue-Sawano et al. 2008) (Figure 13). CDT1 est un facteur exprimé au début de la phase G1 et actif principalement durant la phase S, après le début de laquelle il est rapidement dégradé, qui évite la re-réplication durant le cycle cellulaire (Y. Kim et Kipreos 2007; Nishitani et al. 2001). GMNN, qui inhibe CDT1, est accumulée durant les phases S, G2 et M avant d'être dégradée par l'action E3 ubiquitine ligase du complexe APC/Cdh1 durant la fin de la phase M (C. Lee et al. 2004; Wohlschlegel et al. 2000; Nishitani, Lygerou, et Nishimoto 2004). L'oscillation de l'expression de ces deux protéines durant le cycle permet ainsi d'assurer un système fiable de suivi, et d'observer les variations du cycle cellulaire en direct sur des cellules vivantes.

Il existe de nombreuses variations du système Fucci, que ce soit en terme de fluorochromes utilisés (Azami Green, Kusabira Orange 2, Green Fluorescent Protein, Venus, Cherry...) ou de protéines utilisées comme rapportrices du cycle, avec notamment la version récente « Fucci(CA) » du système où CDT1 est modifiée pour être sensible à l'ubiquitinylation par CUL4^{Dbp1}, ce qui permet de distinguer les phases G1, S et G2+M séparément (Sakaue-Sawano et al. 2017). Dans le cadre de ma thèse, j'ai utilisé cette dernière version afin d'étudier les liens entre le cycle cellulaire et la voie de signalisation NTN1.

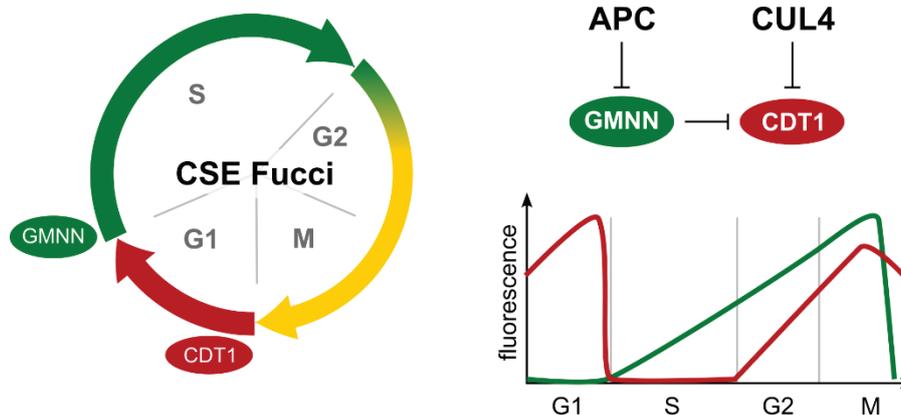


Figure 13 : Le système Fucci(CA) d'étude du cycle cellulaire.

Ce système est basé sur deux protéines, CDT1 et GMNN donc l'expression est régulée par APC et CUL4 au cours du cycle cellulaire. CDT1 est fusionné à une protéine de fluorescence rouge, et GMNN à une protéine de fluorescence verte. Leur expression permet donc de distinguer les cellules en phases G1, S et G2/M du cycle cellulaire.

III- Les particularités du cycle cellulaire dans les cellules souches

Après avoir décrit le fonctionnement du cycle cellulaire chez les mammifères, je vais maintenant détailler les différences existantes entre le cycle cellulaire des CSP comparées aux cellules somatiques. En effet, de nombreuses études ont montré que le cycle cellulaire des cellules souches présentait de multiples particularités, avec des potentielles implications pour la pluripotence et la différenciation (Boward, Wu, et Dalton 2016; Zaveri et Dhawan 2018; L. Liu et al. 2019)(Figure 14). Pour ajouter à la complexité du système, des cellules souches dans des états de pluripotence différents semblent posséder des mécanismes de régulation présentant de subtiles distinctions. Dans cette partie, j'évoquerai tout d'abord les caractéristiques et mécanismes du cycle cellulaire propres aux CSP, puis je développerai les liens complexes interconnectant le réseau du cycle cellulaire avec celui de la pluripotence, et enfin je présenterai les différences découvertes récemment entre les différents types de CSP.

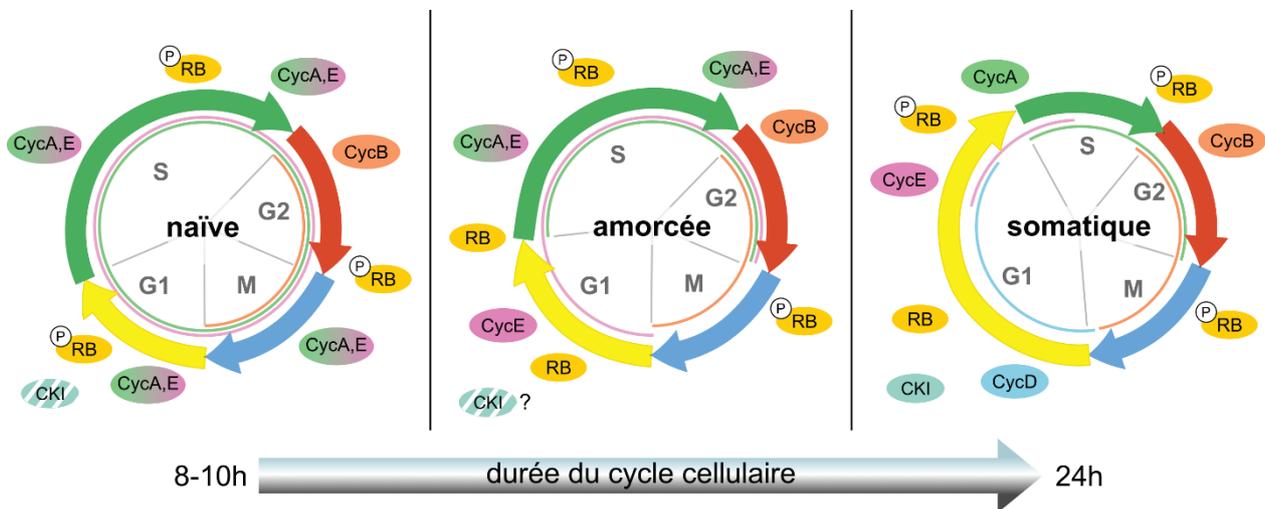


Figure 14 : Les différences entre le cycle cellulaire des cellules pluripotentes et somatiques.

Les cellules souches de la pluripotence naïve, amorcée ou les cellules somatiques présentent des différences importantes dans leur cycle. La durée du cycle cellulaire et la phase G1 s'allongent au fur et à mesure que l'on sort de la pluripotence. Les cellules souches naïves ont un axe RB-E2F non fonctionnel puisque RB est hyperphosphorylée en permanence. La cycline D n'est que peu exprimée et ne semble pas jouer un rôle important dans le cycle. Les cyclines A et E sont exprimées tout au long du cycle cellulaire et non pas en fin de phase G1 et en phase S. Les CKI ne sont pas exprimées ou sont inactives dans les cellules souches naïves.

Les principales différences avec le cycle cellulaire des cellules somatiques

La première chose remarquable lorsque l'on s'intéresse au cycle cellulaire des CSP est sa durée. En effet, alors qu'un cycle de cellule somatique dure environ 24h, le cycle cellulaire des CSP est bien plus rapide : 8 à 10h pour les CSE de souris, 15 à 18h pour les CSE et les iPS humaines (Becker et al. 2006; Boward, Wu, et Dalton 2016; Ghule et al. 2011). De la même

manière, des études ont montré que l'épiblaste *in vivo* avait un cycle cellulaire accéléré par rapport à celui des cellules somatiques, d'environ 10h entre les stades E4,5 et E6,5 (Solter, Skreb, et Damjanov 1971) et pouvant même atteindre 4,4h entre E6,5 et E7, juste avant la gastrulation (Power et Tam 1993; Hogan, Beddington, et Costantini 1994). Ce cycle accéléré est notamment dû à la quasi-disparition de la phase G1, ainsi qu'à l'absence du point de restriction.

D'importantes différences au niveau des acteurs contrôlant le cycle cellulaire peuvent être constatées lorsque l'on compare par exemple le cycle des CSE et des cellules somatiques. Tout d'abord, les cyclines A et E sont exprimées à un plus fort niveau et de manière constitutive tout au long du cycle des CSE. Les CDK qui leur sont associées, comme CDK2 par exemple, sont par conséquent activées en permanence. En revanche, CCNB1 et son partenaire CDK1, bien qu'exprimés à des niveaux plus forts, présentent des profils d'expression similaires à ceux des cellules somatiques (Stead et al. 2002; Faast et al. 2004; White et al. 2005). La cycline D3 semble être la seule cycline D active dans les CSE et pourrait jouer un rôle limité dans la pluripotence, cycline D1 étant exprimée à des niveaux très faibles à la fois dans les CSE et la MCI des embryons, et cycline D2 étant indétectable (Savatier et al. 1994; Wianny et al. 1998; Stead et al. 2002; Faast et al. 2004). Une autre cause de l'activation permanente des CDK est la perturbation de la régulation par les CKI qui est due soit à l'insensibilité aux CKI, soit à l'absence de ces dernières : par exemple, il a été montré que p21 et p27 sont absentes ou très faiblement exprimées dans les CSE murines (Stead et al. 2002; Faast et al. 2004; White et Dalton 2005).

L'activation constitutive de CDK2 a plusieurs effets, le plus important étant l'hyperphosphorylation permanente de pRB, qui est donc à l'état inactif tout au long du cycle et ne peut contrôler le point de restriction. En accord avec cela, la délétion de *pRB*, *p107* et *p130* n'a pas d'effet majeur sur la prolifération des CSE de souris, et ces cellules sont insensibles aux signaux déclenchant habituellement l'arrêt au point de restriction comme l'absence de nutriments ou l'inhibition de contact (Sage et al. 2000). La perte de ces trois mêmes gènes dans des fibroblastes embryonnaires de souris induit une prolifération accélérée, qui n'est pas sensible à l'absence des signaux de croissance, montrant ainsi que l'inactivation permanente de pRB a une part importante dans le phénotype des CSE. Cette phosphorylation constitutive de pRB a pour conséquence directe l'expression précoce des gènes cibles des E2F, ce qui mène à une entrée en phase S rapide et explique la courte durée de la phase G1 (Stead et al. 2002). Il a aussi été montré que la phase de licensing des origines de réplication était accélérée dans les CSE, ce qui participe également au raccourcissement de la phase G1 (Matson et al. 2017).

Les liens complexes entre cycle cellulaire et réseau de pluripotence

De manière fascinante, il a été découvert que l'allongement artificiel de la phase G1 pouvait entraîner l'engagement des cellules dans la différenciation. Par exemple, les cellules souches neuronales qui ont perdu les kinases actives en G1 ou dans lesquelles on inhibe l'activité CDK

se différencient prématurément en neurones (Calegari et Huttner 2003; Lim et Kaldis 2012). Les mécanismes exacts de ce phénomène sont inconnus, mais il est suggéré par plusieurs études que la phase G1 du cycle représente une fenêtre de temps durant laquelle les cellules sont plus sensibles aux signaux induisant la différenciation, et que son allongement provoque donc le dépassement d'un seuil nécessaire au déclenchement de cette dernière (Coronado et al. 2013; Gonzales et al. 2015; Kareta et al. 2015; Pauklin et Vallier 2014). Cependant, le lien entre cycle cellulaire et pluripotence doit être étudié de manière plus approfondie puisqu'une autre étude a au contraire montré que bien que la phase G1 ait une importance dans la mise en place de la différenciation, son allongement n'induit pas la différenciation dans les CSE (V. C. Li, Ballabeni, et Kirschner 2012). Ceci pourrait être dû à des différences entre cellules de la pluripotence naïve ou amorcées, qui ont été évoquées plus en détails dans le chapitre précédent, ou encore au fait que dans cette étude, la durée d'allongement de la phase G1 n'est pas suffisante pour atteindre le seuil critique déclenchant la différenciation. Les tests employés pour déterminer l'effet de ces expériences sur la pluripotence ont également toute leur importance, car des effets subtils pourraient être négligés en fonction du test utilisé. Dans la même ligne d'idée, d'autres chercheurs ont montré que le ralentissement du cycle des CSE n'avait pas d'influence sur leur pluripotence (Stead et al. 2002).

D'autre part, il a été montré que certains acteurs du cycle cellulaire peuvent interagir avec les acteurs de la pluripotence. Quelques exemples seulement seront ici évoqués, mais les études sur ce sujet, de plus en plus nombreuses ces dernières années, sont résumées dans plusieurs revues (Kareta, Sage, et Wernig 2015; Zaveri et Dhawan 2018; Boward, Wu, et Dalton 2016).

Premièrement, de nombreuses études évoquent les liens entre les acteurs du cycle cellulaire et le facteur de transcription OCT4 (She et al. 2017). En effet, une étude rapporte l'interaction de CDK1 avec le facteur de transcription OCT4 indépendamment des cyclines A et B1, ce qui a pour effet de réprimer l'expression de CDX2 et d'empêcher la différenciation vers le TE (L. Li et al. 2012). La liaison d'OCT4 à CDK1 cause également l'inhibition prolongée de ce dernier et l'allongement de la phase G2, ce qui permet à la cellule de vérifier de manière approfondie qu'elle n'a pas de dommages à l'ADN, ce qui peut arriver en cas de prolifération rapide (R. Zhao et al. 2014). Une autre étude montre qu'OCT4 est phosphorylé par AURKB (Aurora kinase B) à la fin de la phase G2/M et entraîne sa dissociation de la chromatine, et que la phosphatase PP1 le déphosphoryle au moment de la rentrée en phase G1, permettant ainsi une réinitialisation de la transcription (Shin et al. 2016). OCT4, qui joue un rôle primordial dans le maintien de la pluripotence, semble donc régulé à plusieurs niveaux par de multiples membres du cycle cellulaire (She et al. 2017; Zaveri et Dhawan 2018).

Deuxièmement, des acteurs du cycle cellulaire pourraient jouer des rôles importants dans les CSE en dehors des phases où ils sont habituellement présents. Par exemple, une étude propose un rôle crucial de GMNN dans le maintien de la pluripotence lors de la phase G1 des CSE de souris (V. S. Yang et al. 2011). En effet, contrairement à ce qui a lieu dans les cellules somatiques où GMNN est dégradée en fin de mitose, GMNN serait présente en phase G1 dans les CSE et participerait au maintien de l'expression de NANOG, SOX2 et OCT4. Ces observations sont en accord avec le fait qu'*in vivo*, l'absence de GMNN impacte la formation de la MCI dans le blastocyste pré-implantatoire (Gonzalez et al. 2006; Hara, Nakayama, et Nakayama 2006).

Troisièmement, les acteurs du cycle cellulaire ont parfois des rôles plus subtils dans la pluripotence. Une étude a permis d'affiner le rôle du facteur de transcription E2F4 dans les CSE de souris en montrant qu'il avait un rôle non indispensable mais que son absence affectait tout de même la pluripotence (J. Hsu et al. 2019). Les colonies formées par les CSE où le gène *E2F4* est délété sont plus petites et contiennent moins de cellules, mais sont tout de même capables de former des tératomes. Le rôle d'activateur et non de répresseur transcriptionnel mené par E2F4 dans cette étude est inédit, et s'effectue indépendamment des protéines de poche. Ces données confirment la multiplicité des rôles des acteurs du cycle cellulaire dans la pluripotence à des échelles non étudiées jusqu'à présent.

Enfin, les acteurs du cycle peuvent jouer un rôle important lors de la reprogrammation, comme le fait remarquer une étude qui indique que la phosphorylation de SOX2 par CDK2 est requise pour la reprogrammation de fibroblastes en cellules iPS (Ouyang et al. 2015).

Le réseau de contrôle du cycle cellulaire pourrait donc exercer une influence sur le réseau de pluripotence, mais l'inverse est également vrai. En effet, les facteurs de transcription clés OCT4 et NANOG interagissent avec et/ou contrôlent des acteurs du cycle, avec comme exemples respectivement la protéine CKI p21 pour OCT4 et CDK6 ainsi que CDC25B pour NANOG. Ceci leur permet notamment de moduler l'entrée en phase S des cellules et ainsi de préserver la pluripotence (J. Lee et al. 2010; X. Zhang et al. 2009). Il a également été montré que le facteur de transcription OCT4 régule positivement la transcription d'*E2F3a* en se liant directement à son promoteur, ce qui a pour conséquence de promouvoir la croissance des CSE (Kanai et al. 2015).

Les différences du cycle cellulaire entre les différents états de pluripotence

J'ai évoqué dans le chapitre 2 partie III l'existence de nombreux états de pluripotence plus ou moins interconvertibles, et pouvant en partie être capturés *in vitro* par des conditions de culture bien particulières. Il existe de la même façon autant de cycles cellulaires que d'états de pluripotence, et cette diversité complexifie d'autant plus l'étude des différences apportées par la pluripotence au cycle des cellules somatiques.

In vivo, une étude récente utilisant des données d'analyse ARN en cellule unique a montré que seules les cellules de l'EPI au stade E3,5-E4,5 possèdent une phase G1 très courte, et que celle-ci s'allonge ensuite au fur et à mesure du développement (Perera et al. 2022; Nowotschin et al. 2019). De manière générale, les cellules considérées comme naïve ont un cycle très court avec des phases G1 et G2 quasiment absentes et une protéine pRB hyperphosphorylée en permanence, alors que celles proches de la pluripotence amorcée ont un cycle intermédiaire entre celui des cellules naïves et celui des cellules somatiques, avec une phase G1 un peu plus longue par exemple (Singh et Dalton 2009; Waisman et al. 2019). Cependant, il existe des exceptions à cette observation. Un exemple flagrant est celui des CSEF, cultivées en 2i+LIF, comparées aux CSE, cultivées en sérum+LIF. Comme évoqué précédemment, ces cellules sont ordinairement considérées comme étant plus naïves que les CSE, car elles correspondent transcriptionnellement à l'épiblaste préimplantatoire, alors que les CSE correspondent à

l'épiblaste post-implantatoire. Néanmoins, une étude a montré que de manière surprenante, les CSEF ont un cycle plus long que celui des CSE avec une phase G1 plus prononcée, une protéine pRB hypophosphorylée en G1, et des niveaux d'expression protéique des CKI p16, p21 et p27 fortement augmentés (Ter Huurne et al. 2017). Toutes ces propriétés correspondent classiquement à un cycle de cellules se rapprochant de la différenciation, ce qui indique bien la singularité de cet état de pluripotence, puisque ces CSEF sont capables au contraire de contribuer à la formation de chimère à plus haut niveau que les cellules cultivées en sérum+LIF (Alexandrova et al. 2016). Ceci est en accord avec certaines études évoquées dans la partie précédente, qui montrent que le ralentissement du cycle ou l'allongement de la phase G1 n'a pas d'effet sur la pluripotence des CSE, et ainsi que la durée du cycle pourrait n'avoir aucun lien avec l'état pluripotent ou non de la cellule (Stead et al. 2002; V. C. Li, Ballabeni, et Kirschner 2012).

Ces données à priori contradictoires attestent donc de la nécessité de réaliser des études plus approfondies afin de mieux comprendre à la fois les caractéristiques du cycle cellulaire des différentes CSP et les implications que ces disparités ont sur la pluripotence et la différenciation.

Chapitre 4 : La voie de signalisation Nétrine

Les Nétrines sont des molécules de communication qui ont de multiples rôles que ce soit dans la mise en place du système nerveux, le maintien de l'homéostasie des tissus, l'angiogenèse ou le développement par exemple. De manière fascinante, leur large éventail de récepteurs leur autorise des fonctions pléiotropes en fonction de la stœchiométrie de ces derniers. Dans ce chapitre, j'aborderai les différents acteurs de cette voie, ses différents points de contrôle, et enfin les différents rôles qui ont pu lui être attribués au fil des ans.

I- La famille Nétrine

Le nom Nétrine (Ntn) provient du mot sanskrit *netr*, qui signifie guider. En effet, leur découverte a eu lieu dans le cadre d'études sur le guidage axonal et la migration cellulaire dans la formation du système nerveux. La famille des Nétrines est une famille de protéines extracellulaires ayant une structure similaire à celle des Laminines. De taille modeste, il s'agit d'une famille particulièrement conservée au cours de l'évolution puisqu'on la retrouve dans de nombreuses espèces de vertébrés et invertébrés. Cette partie abordera l'historique de leur découverte et détaillera les différentes branches de la famille.

Historique

En 1990, plusieurs gènes découverts lors d'un précédent crible génétique analysant les perturbations de la migration neuronale sont identifiés chez le ver *Caenorhabditis Elegans* comme responsables de la création d'un gradient qui permettrait le guidage axonal (Hedgecock, Culotti, et Hall 1990). L'un d'entre eux, *Unc-6* (Uncoordinated-6) est la première forme découverte de la Ntn. Quelques années plus tard, deux homologues d'*Unc-6*, *Nétrine-1* et *Nétrine-2* sont clonés chez le poulet, où il a été montré qu'ils codent pour des protéines responsables de la croissance et du guidage des axones commissuraux de la moelle épinière (Serafini et al. 1994; Kennedy et al. 1994). Une étude plus récente remet cependant en cause le modèle où la NTN1 sécrétée par les cellules d'une structure spécifique ventrale et médiane de la moelle épinière, appelée la plaque du plancher, est indispensable à la migration des neurones et révèle que la NTN1 serait plutôt sécrétée de manière locale par les cellules ventriculaires de la moelle épinière, et jouerait en premier lieu un rôle dans l'adhésion des cônes de croissance neuronaux (Dominici et al. 2017).

Les différents membres de la famille et leur structure

Par la suite, plusieurs autres membres de la famille ont été décrits. Chez les mammifères, six formes de Nétrines ont été découvertes. Les Nétrine-1, -3, -4 et -5 sont sécrétées, tandis que Nétrine-G1 et Nétrine-G2 (dites Nétrine-G) sont maintenues à la membrane par une ancre GPI (glycosylphosphatidylinositol) (Serafini et al. 1996; Wang et al. 1999; Y. Yin, Sanes, et Miner 2000; Yamagishi et al. 2015; Nakashiba et al. 2002). La Nétrine-2 n'est pas présente chez les mammifères, et se retrouve uniquement chez les oiseaux et les poissons (Rajasekharan et Kennedy 2009).

L'ensemble de la famille Nétrine fait partie de la superfamille des Laminines, qui sont des glycoprotéines présentes dans la matrice extracellulaire et composées de trois chaînes α , β et γ . Les Nétrines sont des protéines d'environ 70 kDa qui possèdent trois domaines : à l'extrémité N-terminale, un domaine appelé domaine VI qui est homologue au domaine VI des Laminines, un domaine central appelé domaine V, homologue au domaine V des Laminines et constitué de 3 répétitions EGF (epidermal growth factor) dites V1, V2 et V3, et enfin un domaine C-terminal dit domaine C pour les Nétrines sécrétées et domaine C' pour les Nétrine-G (Cirulli et Yebra 2007)(Figure 15). Les domaines V et VI de la Nétrine-1 sont les domaines qui lui permettent de se lier à ses différents récepteurs DCC, NEO1 et Unc-5 (Serafini et al. 1994; Rajasekharan et Kennedy 2009). Les Nétrine-1, -2, -3 et -G sont plutôt similaires à la chaîne γ des Laminines, tandis que la Nétrine-4 est semblable à la chaîne β . La Nétrine-5 aurait quant à elle une structure proche de celle de la chaîne γ des Laminines, mais ne possède pas de domaine VI et son domaine V ne comprend que deux répétitions EGF (Yamagishi et al. 2015).

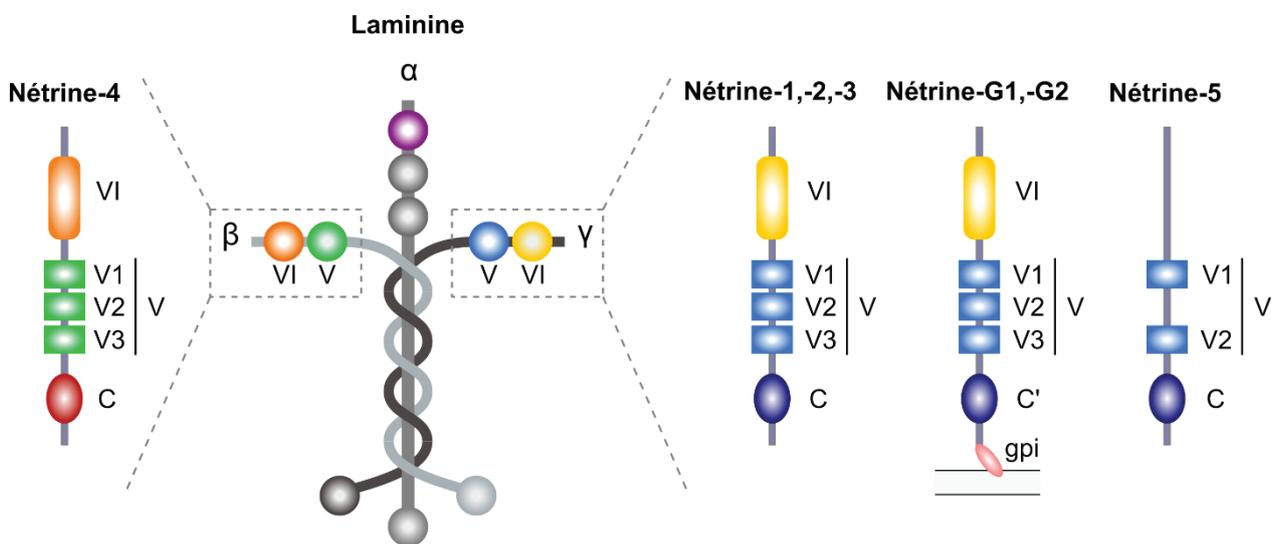


Figure 15 : Structure des membres de la famille Nétrine chez les vertébrés.

On trouve dans la famille Nétrine cinq membres sécrétés (Nétrine-1,2,3,4 et 5) et deux membres attachés à la membrane par une ancre GPI. Ils sont principalement formés d'un domaine globulaire (jaune/orange), d'un domaine central comprenant des répétitions EGF (bleu/vert) et d'un domaine C en C-terminal (bleu marine/rouge). La Nétrine-4 est structurellement proche de la chaîne β , tandis que les autres sont plus proches de la chaîne γ . (Adapté de Cirulli et Yebra 2007)

Le domaine C possède grâce à ses acides aminés positivement chargés une forte affinité pour les héparines, ce qui permettrait la présentation des Nétrines à la surface cellulaire ou leur séquestration dans la matrice extracellulaire grâce à des liaisons aux protéoglycanes à héparane sulfate (Kappler et al. 2000). Ce domaine, apparenté à Frizzled et à certaines protéines du complément, est celui qui varie le plus au sein des espèces de vertébrés (Serafini et al. 1994).

La Nétrine-1 (NTN1) est la plus étudiée des Nétrines, notamment dans les CSE. Elle est exprimée à très hauts niveaux dans le système nerveux central (SNC) en développement dans la plaque du plancher et les cellules neuroépithéliales de la moelle épinière ainsi que dans le cerveau, mais également dans de nombreux autres tissus tels que le mésoderme somatique, la glande mammaire, le pancréas et le tissu cardiaque entre autres. Chez l'adulte, NTN1 est fortement exprimé dans les neurones de la moelle épinière, dans les oligodendrocytes et de manière moindre en dehors du système nerveux dans certains organes comme les ovaires (Barallobre et al. 2005).

De manière intéressante, la délétion *in vivo* du gène *Ntn1* n'affecte pas la viabilité de l'embryon durant son développement, mais les individus meurent en période néonatale sans malformation visible (Yung, Nishitani, et Goodrich 2015).

II- Les récepteurs de la voie de signalisation Nétrine

Il a été montré dans de nombreuses études que les Nétrines ont la capacité de se lier à différents récepteurs dans différents contextes, et de réguler ainsi différentes fonctions cellulaires aussi variées que la tumorigenèse ou la pluripotence en passant par la formation des myotubes (Arakawa 2004; Boyé et al. 2022; Meijers et al. 2020; Huyghe et al. 2020; Wang et al. 1999; J.-S. Kang et al. 2004; Villanueva et al. 2019). De manière intéressante, les voies de signalisation activées par Nétrine-1 en aval des récepteurs ne sont pas toujours les mêmes, soulignant ainsi l'aspect pléiotrope de ses fonctions.

Les récepteurs les plus connus et étudiés de NTN1 sont DCC (Deleted in Colorectal Cancer) et son paralogue NEO1 (Néogénine) ainsi que la famille UNC-5, mais il existe de nombreux autres récepteurs avec lesquels elle peut interagir, comme DSCAM, A2B ou encore certaines Intégrines ($\alpha6\beta4$ et $\alpha3\beta1$)(Figure 16).

Les récepteurs DCC et NEO1

Le gène *Dcc* doit son nom au fait qu'il a été découvert lors de l'analyse d'une région chromosomique 18q21 qui présentait une perte d'hétérozygotie dans 70% des cancers colorectaux, ce qui lui a également octroyé une réputation de gène suppresseur de tumeur dans les premiers temps (Fearon et al. 1990; Grady 2007). Quelques années plus tard, en 1996, les gènes *unc-5* et *unc-40* (ce dernier étant homologue de *DCC* et *Neo1*) identifiés lors d'un crible génétique précédent sont décrits comme régulant la migration cellulaire en direction

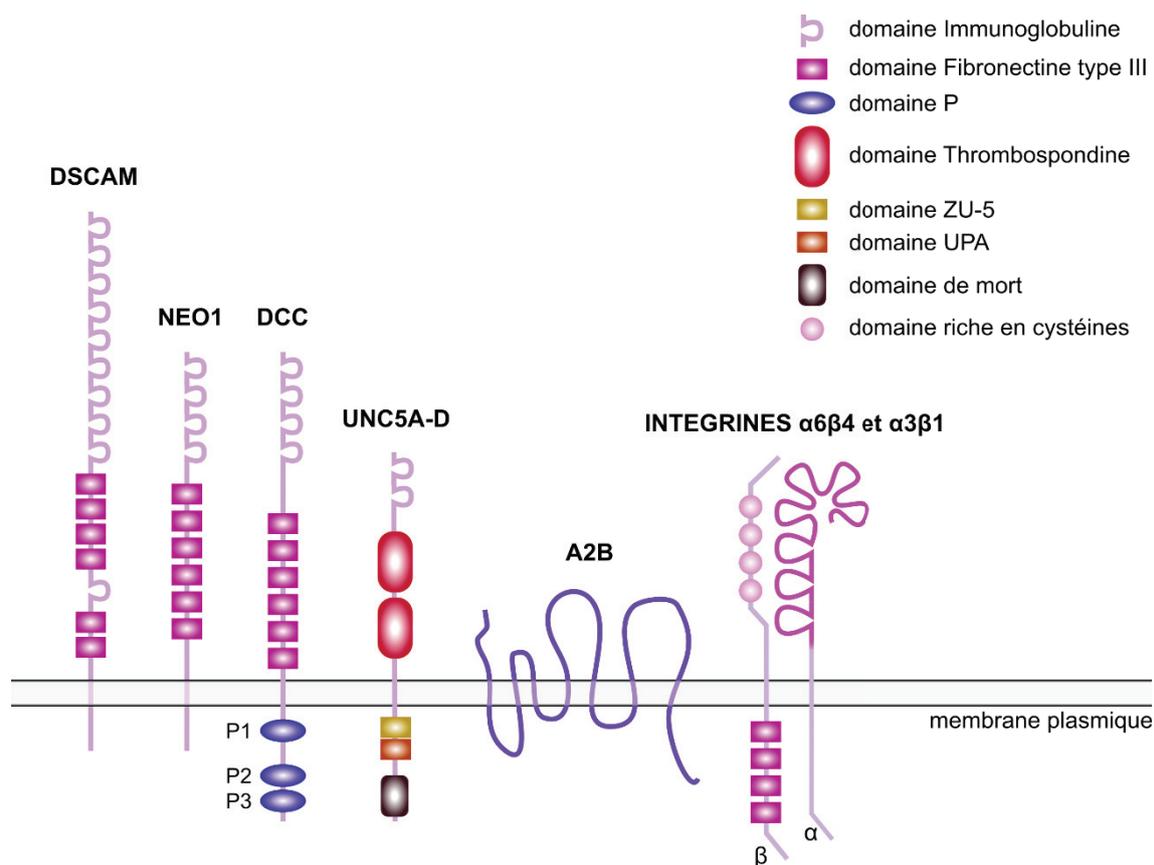


Figure 16 : Structure des différents récepteurs de la Nétrine.

NTN1 peut se lier à différents récepteurs afin de médier différentes fonctions. Les récepteurs les plus communément cités sont représentés ici. (Adapté de Cirulli et Yebra 2007)

des sources de Nétrine ou au contraire à l'opposé (Chan et al. 1996). La même année, une équipe fait le lien entre Nétrine et DCC en tant que récepteur de cette dernière, et démontre son implication dans la croissance des neurones commissuraux (Keino-Masu et al. 1996). Ces découvertes furent confirmées un an plus tard par l'établissement d'un modèle murin délété pour *Dcc*, qui présente un déficit migratoire au niveau des axones commissuraux ventraux de la moelle épinière, et dont les embryons partagent un phénotype similaire avec les embryons ayant perdu l'expression de *NTN1* (Fazeli et al. 1997; Dominici et al. 2017; Yung, Nishitani, et Goodrich 2015). DCC est fortement exprimé lors du développement embryonnaire, majoritairement dans le SNC mais aussi dans le système nerveux périphérique. En comparaison, son expression chez l'adulte est très réduite et restreinte à quelques structures encore une fois majoritairement dans le système nerveux, comme les neurones dopaminergiques de la substance noire (Gad et al. 1997; Osborne et al. 2005).

Son homologue NEO1 fut découvert en 1994 grâce à l'utilisation d'un anticorps monoclonal généré afin d'isoler les protéines de surface des tissus en développement dans le poulet (Vielmetter et al. 1994). Son nom provient du fait que NEO1 est principalement exprimé dans des tissus nouvellement générés dont les cellules entament leur différenciation terminale. De

même que DCC, NEO1 semble jouer un rôle dans le guidage de la croissance axonale, et a été décrit pour la première fois comme récepteur à la Nétrine-1 dans la même étude que DCC (Keino-Masu et al. 1996; N. H. Wilson et Key 2006). Cependant, ce rôle dans le processus de guidage axonal semble avoir lieu majoritairement indépendamment de NTN1, et à travers l'interaction de NEO1 avec un autre ligand, RGMA (Repulsive Guidance Molecule a) (Rajagopalan et al. 2004). En accord avec ceci, contrairement aux souris KO pour NTN1 ou DCC, les embryons n'exprimant pas NEO1 sont viables à la naissance et ne présentent pas de défaut de guidage neuronal. Cependant, ils meurent moins de 30 jours après la naissance et possèdent de sévères problèmes de développement musculaire, neuronal et osseux (Bae et al. 2009; D.-H. Lee et al. 2010). L'interaction entre NTN1 et NEO1 semble aussi arbitrer d'autres processus comme entre autres l'adhésion cellulaire, la différenciation ou la dormance, comme le montrent plusieurs études (Park et al. 2004; J.-S. Kang et al. 2004; Srinivasan et al. 2003; Renders et al. 2021). Au cours du développement embryonnaire, au stade E14,5, l'expression de NEO1 n'est pas limitée au système nerveux contrairement à celle de DCC, mais se retrouve dans des tissus variés tels que les poumons, le pancréas, l'intestin et les reins (Gad et al. 1997; Fitzgerald, Seaman, et Cooper 2006). De plus, il est probable que NEO1 joue un rôle dans l'organogenèse étant donné son expression précise et localisée au sein des tissus. Chez la souris adulte, NEO1 semble exprimé de manière significative dans de nombreux organes (Keeling, Gad, et Cooper 1997).

Structurellement, DCC est un récepteur de 175 à 190 kDa (en fonction de l'isoforme) qui fait partie de la superfamille des Immunoglobulines (Ig), tout comme NEO1 qui est une protéine d'environ 250 kDa. Il a cependant été montré que NTN1 était incapable d'interagir avec d'autres membres de la superfamille des Ig tels que TAG-1 et L1 par exemple, démontrant ainsi la spécificité de sa liaison à DCC et NEO1 (Keino-Masu et al. 1996). DCC et NEO1 sont tous deux composés d'une grande extrémité N-terminal extracellulaire comprenant quatre domaines Ig et six domaines Fibronectine III (FNIII), ce qui les rend fortement homologues des molécules d'adhésion cellulaire neuronales N-CAM, et d'un domaine intracellulaire composé notamment de trois régions P1, P2 et P3 nécessaires à la signalisation induite et très conservées chez les vertébrés. En revanche, le reste de leurs domaines intracellulaires est très différent (S. J. Cole, Bradford, et Cooper 2007). Au total, la structure en acide aminés de NEO1 et DCC est donc partagée à environ 50% (Vielmetter et al. 1994), et leur structure secondaire est similaire. Bien que leur liaison à NTN1 fasse intervenir les 4^{ème} et 5^{ème} domaines FNIII chez les deux récepteurs, il existe des différences structurelles et stœchiométriques entre ces deux types de liaisons (Xu et al. 2014).

Les voies de signalisation induites par NTN1 chez les vertébrés ont principalement été décrites dans le cadre du guidage de la mobilité du cône de croissance des axones. Dans ces derniers, la réception d'un signal de guidage axonal induit des voies de signalisation qui causent la réorganisation du cytosquelette, et permettent ainsi de diriger la migration du cône de croissance vers ou à l'opposé de la cible, en fonction du signal reçu. La fixation du ligand à son récepteur DCC provoque l'homodimérisation de ce dernier à travers l'association des domaines P3 au niveau de structures spécifiques de la membrane plasmique : les radeaux lipidiques. Ce changement structurel et de localisation permet à DCC d'interagir avec de

nombreuses autres protéines, telles que la protéine adaptatrice NCK1 (non catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1), de multiples kinases comme les protéines à activité tyrosine kinase FAK (Focal adhesion kinase) et FYN ou la protéine sérine thréonine kinase PAK1 (p21-activating kinase 1), ou encore les protéines ENA/VASP et N-WASP (Neuronal Wiskott-Aldrich syndrom protein) qui sont des modulateurs de la polymérisation de l'actine (Barallobre et al. 2005). Ces associations mènent à l'activation de plusieurs voies de signalisation, avec notamment la voie des Rho GTPases qui régule l'organisation du cytosquelette ainsi que l'adhésion cellulaire, la voie des seconds messagers comprenant AMPc (Adénosine monophosphate cyclique), GMPc (Guanosine monophosphate cyclique) et le calcium, la voie PI3K et la voie des MAPK (Lai Wing Sun, Correia, et Kennedy 2011; Nguyen et Cai 2006; S.-J. Lee et al. 2014). En comparaison, les voies de signalisation activées par la liaison de NTN1 sur NEO1 ont été moins étudiées. Il a cependant été montré entre autres que NEO1 peut lui aussi induire l'activation des voies PI3K, en particulier dans le cancer de l'estomac (Qu, Sun, et Wang 2018; K. Yin et al. 2017), de FAK (Ren et al. 2004), contrôle la voie SHH (Sonic Hedgehog) lors de la formation des doigts de la main (M. Hong et al. 2012) et régule de manière contexte-dépendante la voie BMP (Abdullah, Herdenberg, et Hedman 2021; D.-H. Lee et al. 2010; Z. Huang et al. 2016; Healey et al. 2015).

Le récepteur UNC5B

Le gène *Unc-5* a été décrit pour la première fois lors du crible réalisé en 1990 par Hedgecock et ses collègues qui a permis de mettre en évidence le rôle similaire à *Unc-6* du gène *Unc-5* dans le guidage des projections axonales dorso-ventrales dans la moelle épinière (Hedgecock, Culotti, et Hall 1990). Cette étude, qui a constaté que les phénotypes des mutants *Unc-5*, *Unc-6* et *Unc-40* étaient similaires, a donc pour la première fois établi le modèle d'une Nétrine-1 bifonctionnelle en fonction des récepteurs liés, qui attirerait les projections axonales des neurones exprimant *Unc-40* (*Dcc*) et repousserait celles des neurones exprimant *Unc-5*. Ces résultats ont plus tard été confirmés chez les vertébrés par d'autres chercheurs (Colamarino et Tessier-Lavigne 1995). Il existe actuellement quatre homologues *Unc-5* décrits chez les vertébrés : *Unc-5a*, *b*, *c* et *d*. Il a été montré chez le rat que les récepteurs UNC-5 sont fortement exprimés dans le SNC au cours du développement (Leonardo et al. 1997; Barrett et Guthrie 2001; Zhong et al. 2004). Contrairement à UNC5A dont l'expression semble être restreinte au SNC, le reste des récepteurs UNC5 est présent dans diverses structures comme notamment les bourgeons de membres (Engelkamp 2002). En particulier, UNC5B semble jouer un rôle important dans le cadre du développement du système vasculaire. Les récepteurs UNC5A à C sont particulièrement exprimés dans la moelle épinière des organismes adultes, mais sont présents de manière relativement ubiquitaire dans le reste des tissus, notamment dans le cas d'UNC5B (Thiebault et al. 2003). Curieusement, l'absence d'UNC5A et UNC5D n'est pas délétère pour la survie des animaux ; en revanche, les embryons incapables d'exprimer UNC5B meurent au stade E12,5 à la suite de défauts de vascularisation du placenta, et ceux où UNC5C est manquant décèdent dans les heures qui suivent la naissance (M. E. Williams et

al. 2006; Y. Zhu et al. 2013; Lu et al. 2004; Burgess, Jucius, et Ackerman 2006; Tai-Nagara et al. 2017).

Structurellement, les membres de la famille UNC5 font eux aussi partie de la superfamille des Ig. Ce sont des récepteurs transmembranaires de type I d'environ 110 kDa. À leur extrémité N-terminale extracellulaire, ils présentent deux domaines Ig, puis deux domaines Thrombospondines de type I. Ils sont suivis d'un domaine transmembranaire, et enfin de trois domaines distincts intra-cytoplasmiques : un domaine ZU-5 (Zona Occludens-1/Unc-5 homology domain) homologue à celui présent dans les protéines des jonctions serrées Zona Occludens-1, un domaine UPA (Unc-Pidd-Ankyrins) qui est partagé par les protéines UNC5, PIDD et Ankyrines et aussi appelé DB (DCC binding) car il permet la liaison au domaine intra-cytoplasmique P3 du récepteur DCC, et enfin un domaine de mort DD (Death Domain), homologue à celui de la famille des TNF (Tumor Necrosis Factor). Les deux domaines Ig sont ceux qui permettent l'interaction entre NTN1 et UNC5B (Bhat et al. 2019).

Il existe un nombre restreint d'études s'intéressant aux voies de signalisation induites en aval d'UNC5B (Bhat et al. 2019). Tout comme NEO1, le récepteur UNC5B est capable d'induire les voies MAPK et PI3K afin de promouvoir la migration des cellules de Schwann *via* la signalisation NTN1 dans le système nerveux périphérique (Lv et al. 2015). D'autres études montrent qu'UNC5B régule positivement la voie BMP lors de l'ostéogenèse (Hu et al. 2018), la voie WNT par son association avec LRP6 dans les cellules endothéliales (Boyé et al. 2022), ou encore les voies Hippo et PI3K dans le cerveau (Ahn et al. 2020; Tang et al. 2008). Des recherches plus approfondies sont nécessaires pour décrypter l'existence d'autres voies de signalisation activées par UNC5B, les mécanismes moléculaires exacts impliqués, et les différences dans les réponses induites en fonction du contexte.

Les autres récepteurs de la famille Nétrine

Les axones commissuraux de la moelle épinière expriment, en plus de DCC, un autre récepteur appelé DSCAM (Down syndrom cell adhesion molecule) qui contribuerait également au guidage axonal *via* la liaison de NTN1 (Ly et al. 2008; G. Liu et al. 2009). Étonnamment, les souris pour lesquelles l'expression de *Dscam* est perdue ne présentent cependant pas de défaut de croissance ou de guidage des prolongements axonaux (Palmesino et al. 2012). En revanche, la synchronisation des neurones pré-inspiratoires est perdue, menant à la mort des animaux moins de 24h après la naissance et indiquant un rôle dans la mise en place de la respiration à la naissance (Amano et al. 2009). Des études plus récentes ont permis de conclure que le rôle de DSCAM dans le développement du système nerveux et la mise en place de la locomotion était multiple, et qu'il serait notamment impliqué dans la stratification neuronale, la synaptogenèse, la fasciculation et la ramification des axones ainsi que dans la mort cellulaire programmée (Lemieux et al. 2021). DSCAM est lui aussi un récepteur transmembranaire de classe I faisant partie de la superfamille des Ig. Il est constitué au niveau de son domaine N-terminal extracellulaire de dix domaines Ig et de six domaines FNIII, et son

domaine C-terminal ne correspond à aucun autre domaine décrit. Il est exprimé principalement dans le SNC, dans l'embryon et dans l'adulte (Yamakawa et al. 1998).

Une liaison entre NTN1 et un parmi deux membres de la famille des Intégrines ($\alpha 6\beta 4$ ou $\alpha 3\beta 1$) ayant une affinité particulière pour les Laminines a également été décrite dans le développement embryonnaire de l'épithélium du pancréas (Yebra et al. 2003). Elle fait intervenir le domaine C-terminal de la NTN1 qui est homologue de la région basique des Laminines, contrairement aux autres interactions ligand-récepteur décrites. Les Intégrines sont des protéines transmembranaires hétérodimériques composées de deux sous-unités alpha et bêta, de masse moléculaire variant entre 200 et 300 kDa (Hynes 1992; Takada, Ye, et Simon 2007). Dix-huit sous-unités α et huit sous-unités β sont connues chez l'Homme, et génèrent vingt-quatre hétérodimères différents. Ces protéines sont impliquées dans de nombreuses fonctions cellulaires telles que l'adhésion, la motilité, la polarisation, la différenciation et la prolifération. Elles sont exprimées à des phases très précoces du développement, et les souris KO pour l'intégrine $\beta 1$ par exemple présentent une dégénération de la MCI, montrant ainsi le rôle crucial de cette sous-unité pour le compartiment pluripotent (Stephens et al. 1995). Dans un contexte tumoral, il a également été démontré que la liaison de NTN1 à NEO1 permet d'activer l'intégrine $\beta 1$ *via* FAK, promouvant ainsi la migration des cellules de neuroblastome (Villanueva et al. 2021).

Le récepteur A2B (Adenosin 2b receptor) possède une structure typique de récepteur couplé à des G-protéines et fait partie de la famille des récepteurs à Adénosine dont le rôle consiste à contrôler le taux intracellulaire d'AMPc, qui est un second messenger crucial pour le guidage axonal (Sun et Huang 2016). Il peut également activer la voie MAPK et moduler ainsi la transition épithélio-mésenchymateuse dans les cellules épithéliales du poumon (Giacomelli et al. 2018). L'interaction de NTN1 avec A2B en tant que co-récepteur de DCC a été décrite en 2000 dans les axones dorsaux de la moelle épinière avant d'être remise en question peu de temps après par une autre étude (Corset et al. 2000; Stein et al. 2001). Des études plus récentes montrent un rôle de la signalisation NTN1/A2B dans la réduction de l'inflammation liée à l'hypoxie, le dégorgement du liquide alvéolaire dans les œdèmes pulmonaires, la protection envers la néphropathie diabétique et la migration des cellules de cancer colorectal, indiquant ainsi la probabilité d'un rôle tissu-dépendant pour cette interaction (Rosenberger et al. 2009; He et al. 2014; Tak et al. 2013; Rodrigues et al. 2007).

Enfin, le peptide App (Amyloid precursor protein) qui a été très caractérisé dans le cadre de la maladie d'Alzheimer a été décrit comme interagissant avec DCC afin de guider la croissance des axones commissuraux en réponse à NTN1 dans la moelle épinière lors du développement (Rama et al. 2012). Le clivage d'App par des sécrétases provoque l'accumulation de peptide A β (Amyloid β) qui forme des plaques intercellulaires, dites plaques amyloïdes, constituant l'un des signes distinctifs de la maladie d'Alzheimer (Scheltens et al. 2021). Chez la souris, la surexpression de NTN1 semblerait activer la signalisation induite par App et réduire la quantité de plaques amyloïdes dans le cerveau (Lourenço et al. 2009).

III- Rôles de la voie Nétrine

Comme discuté dans les parties I et II de ce chapitre, NTN1 et ses récepteurs NEO1 et UNC5B sont principalement exprimés dans le système nerveux. Cependant, leur rôle ne se limite pas à cela et cette voie de signalisation est véritablement pléiotrope, avec des fonctions englobant aussi bien le développement embryonnaire que l'homéostasie des tissus adultes, dans les organes sains comme malades.

La voie Nétrine dans le développement du système nerveux

NTN1 et ses récepteurs étant très fortement exprimés dans le SNC au cours du développement, il s'agit de la structure où la voie Nétrine a été la mieux étudiée.

La NTN1 est particulièrement présente lors du développement de la moelle épinière dans les cellules de la plaque du plancher ainsi que dans les progéniteurs neuronaux, dont les corps cellulaires comprenant le noyau sont au niveau de la partie dorsale et dont les prolongements axonaux sont en contact avec la surface de la colonne vertébrale (Serafini et al. 1996). Comme déjà évoqué plus tôt dans ce chapitre, au cours de ce processus NTN1 joue un rôle fondamental dans le guidage axonal de ces derniers afin de les amener de la zone dorsale à la zone ventrale où ils traversent la ligne médiane avant de changer de direction et de se projeter vers l'avant ou l'arrière de la moelle épinière (Wentworth 1984)(Figure 17). L'expression de NTN1 en gradient progressif dorso-ventral par les neurones de la zone ventriculaire permet

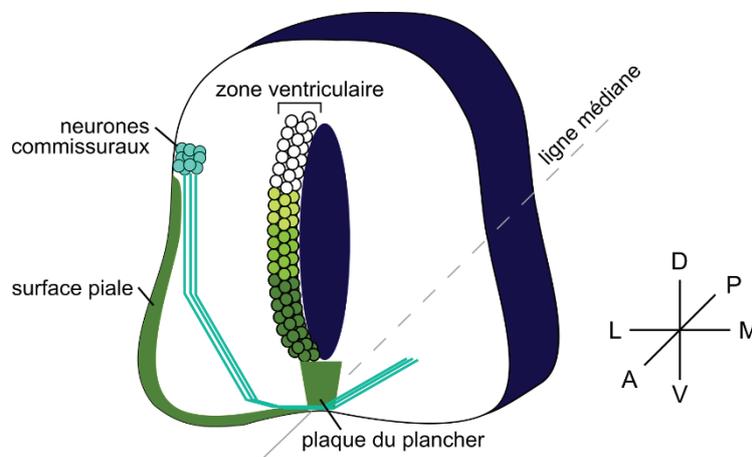


Figure 17 : *Guidage axonal par la Nétrine-1 des neurones commissuraux à travers la ligne médiane de la moelle épinière.*

Les axones des neurones commissuraux se dirigent vers la zone ventrale et sont guidés par la Nétrine-1 sécrétée par les cellules de la zone ventriculaire, avant de franchir la ligne médiane au niveau de la plaque du plancher et de se projeter longitudinalement vers l'avant ou l'arrière de la moelle épinière. Les structures sécrétant de la Nétrine-1 sont représentées en vert. (Adapté de Hand et Kolodkin 2017)

d'attirer les cônes de croissances, qui expriment DCC, et ainsi de les amener le long de cet axe vers la plaque du plancher (Keino-Masu et al. 1996). La NTN1 de la plaque du plancher n'est pas responsable de ce guidage, contrairement à ce qui a longtemps été pensé, puisque sa suppression n'entraîne pas de défaut de migration (Hand et Kolodkin 2017). Dans ce contexte, la NTN1 agirait donc comme une molécule haptotactique de courte distance plutôt que comme un signal attractif diffusible de longue distance.

De manière intéressante, NTN1 est une molécule bifonctionnelle puisqu'elle joue un rôle chimio-attractif pour les neurones exprimant DCC, et répulsif pour ceux exprimant UNC5, seul à courte distance ou en combinaison avec DCC pour de plus longs trajets (Colamarino et Tessier-Lavigne 1995; K. Hong et al. 1999). Dans ce dernier cas, DCC et UNC5 s'associent grâce à leurs domaines intracytoplasmiques respectifs P3 et UPA/DB, ce qui entraîne la conversion du signal attractif en signal répulsif. Dans le SNC, les récepteurs exprimés par les cellules réceptrices du signal NTN1 conditionnent donc la nature de ce dernier.

De plus, NTN1 semble également jouer un rôle important dans la régénération nerveuse, puisqu'il est notamment surexprimé dans les cellules de Schwann après une lésion nerveuse périphérique (Madison, Zomorodi, et Robinson 2000). À la suite d'une blessure, les cellules de Schwann perdent leur myéline et forment une structure en forme de pont au niveau de l'espace nerveux traumatisé appelées bandes de Büngner (Büngner 1891; Salzer 2015). Cet aspect de la signalisation Nétrine a beaucoup été étudié et a été revu récemment par deux chercheurs de l'université de Plymouth (Dun et Parkinson 2017). Dans ce contexte bien particulier, la NTN1 semble promouvoir la prolifération et la migration des cellules de Schwann (H. K. Lee et al. 2007; Lv et al. 2015). De manière similaire, dans le SNC, NTN1 est impliquée dans la maturation et la migration des oligodendrocytes (Rajasekharan et al. 2009).

La voie Nétrine dans l'organogenèse

Le rôle de la voie Nétrine dans le développement ne se limite pas au SNC. En effet, il a été montré que NTN1 prend part à la morphogenèse de plusieurs organes.

La régulation de la migration et de l'adhésion cellulaire par NTN1 participe à la formation de nombreux organes. Dans la glande mammaire, NTN1 est exprimée dans les cellules pré-luminales, et son récepteur NEO1 est exprimé de façon adjacente et complémentaire dans les cellules cap multipotentes des bourgeons terminaux. Ensemble, ils stabilisent la couche de cellules cap au cours de la mise en place des bourgeons terminaux mammaires (Srinivasan et al. 2003). Dans un autre contexte, NTN1 est exprimée au cours du développement embryonnaire du pancréas, où elle joue un rôle important *via* les intégrines $\alpha 6\beta 4$ et $\alpha 3\beta 1$ (De Breuck et al. 2003; Yebra et al. 2003). Ces dernières sont exprimées par les cellules de l'épithélium, qui vont migrer en direction de la lame basale, où la NTN1 est déposée et séquestrée au niveau de la matrice extra-cellulaire. Cette régulation de l'adhésion pourrait également être liée à un rôle de NTN1 dans la modulation de la production de protéines de la matrice extra-cellulaire, comme le montre cette étude récente où la signalisation NTN1/NEO1

régule la production de fibronectine dans les cellules mésangiales du rein (Chaudhari et al. 2022).

Un autre aspect de la participation de NTN1 à la morphogenèse touche à sa modulation de la réponse à d'autres voies de signalisation. Ainsi, dans le poumon, NTN1 et NTN4 sont sécrétées par les cellules épithéliales des bourgeons en cours de croissance, et déposées dans la lame basale adjacente (Dalvin et al. 2003). Dans ce système, elles sont indispensables à la bonne ramification du poumon, qu'elles régulent en inhibant la réponse à ERK1/2 induite par FGF7 et FGF10 (Y. Liu et al. 2004).

Enfin, NTN1 semble jouer un rôle particulièrement important dans l'angiogenèse. Ce rôle semble être médié principalement par la signalisation à travers UNC5B, comme l'a montré une étude importante, où les auteurs ont montré que NTN1 réduisait l'extension des filopodes dans les cellules endothéliales lorsqu'UNC5B était présent, et régulait ainsi la ramification des vaisseaux (Lu et al. 2004). De plus, les auteurs ont rapporté que la suppression de l'expression d'*Unc5b* menait à un phénotype où les filopodes des cellules des extrémités des capillaires s'étiraient de manière aberrante, où les vaisseaux se ramifiaient excessivement, et ultimement à la mort de l'embryon autour du stade E12,5. *In vitro*, il a été montré que la signalisation NTN1 promeut la prolifération, la migration et l'adhésion des cellules endothéliales ainsi que des cellules des muscles lisses vasculaires (Park et al. 2004). De manière intrigante, ce phénotype semble opposé au précédent, et rejoint d'autres études montrant que la NTN1 pourrait jouer un rôle positif dans l'angiogenèse (B. D. Wilson et al. 2006; Castets et al. 2009; Yao et al. 2020). Ceci pourrait être dû à une différence dans le récepteur impliqué dans chaque système. En effet, des études réalisées plus récemment montrent que NTN1 pourrait interagir avec d'autres récepteurs afin de promouvoir l'angiogenèse (Tu et al. 2015; Prieto et al. 2017; Yao et al. 2020). C'est le cas de NEO1 qui contrôlerait l'homéostasie des vaisseaux sanguins dans le cortex par son interaction avec NTN1 (Yao et al. 2020), mais également de CD146 (aussi connu comme melanoma cell adhesion molecule, MCAM), membre de la famille des Ig qui a été identifié pour la première fois comme récepteur de NTN1 dans les cellules endothéliales, où il transduit le signal de la voie VEGF (Tu et al. 2015).

La voie Nétrine dans le cancer

La voie NTN1 a particulièrement été étudiée dans le cancer. En effet, les fonctions cellulaires régulées par cette voie comme la survie, la prolifération et la migration sont capitales dans la progression du cancer. De plus, il a été montré que NTN1 était surexprimée dans de nombreux cancers de divers organes tels que par exemple le sein, la prostate, le poumon, le pancréas, le colon, et le cerveau (Fitamant et al. 2008; Latil et al. 2003; Delloye-Bourgeois et al. 2009; Bernet et al. 2007; pour revue, Kefeli et al. 2017).

Un des rôles principaux décrits pour NTN1 dans le cancer est son rôle dans le cadre du modèle des récepteurs à dépendance, dans lequel NTN1/DCC fait partie des premiers couples découverts (Goldschneider et Mehlen 2010). Dans ce contexte, le récepteur n'a pas

uniquement un rôle actif de signalisation en présence du ligand, mais également un rôle passif de signalisation pro-apoptotique en absence du ligand. Ce système permettrait de contrôler l'homéostasie des tissus en éliminant les cellules proliférant de manière anormale dans un environnement où la quantité de ligand est limitée (Mehlen et al. 1998). Afin d'échapper à cette surveillance, les cellules cancéreuses pourraient donc soit surexprimer le ligand afin de saturer les récepteurs, soit supprimer leur expression du récepteur afin de ne jamais déclencher la signalisation pro-apoptotique.

En plus de leur survie, NTN1 semble favoriser la migration des cellules cancéreuses. En effet, NTN1 et NTN4 ont par exemple été démontrées comme promouvant la migration des cellules de neuroblastome *via* NEO1 (Villanueva et al. 2019; 2021). Dans le cas de NTN1, cette action se fait *via* la formation d'un complexe comprenant NEO1, l'intégrine β 1 et FAK (Villanueva et al. 2021). Dans le cadre du glioblastome, il a aussi été montré que NTN1 favorisait le caractère invasif des cellules cancéreuses en augmentant leur motilité et en activant la voie Notch, leur conférant ainsi des propriétés souches (Ylivinkka et al. 2017). Un autre exemple est celui de la métastase des cellules de cancer de l'estomac qui est également induite par NTN1 en association avec NEO1, cette fois à travers l'activation de l'expression de la protéine YAP, qui est un activateur majeur de la voie Hippo régulant entre autres l'adhésion cellulaire (K. Yin et al. 2019).

Enfin, de récentes études suggèrent que NTN1 pourrait avoir un rôle clé dans l'immunité et donc moduler le microenvironnement des tumeurs, avec par exemple l'activation de réponses pro-inflammatoires dans les lymphocytes T, la mobilisation des macrophages tissulaires ou encore la réduction de l'inflammation liée à l'hypoxie (Nakayama et al. 2018; Rosenberger et al. 2009; Feinstein et Ramkhelawon 2017; Xia et al. 2022).

La voie Nétrine dans les cellules souches

Un des rôles les plus récents et mystérieux de la voie de signalisation NTN1 est sa fonction dans les cellules souches pluripotentes. La première mention dans la littérature d'un rôle de NTN1 et NEO1 dans le blastocyste préimplantatoire remonte en effet seulement à 2014 (J. H. Lee et al. 2014).

Depuis, une étude de notre laboratoire publiée en 2015 a montré que NTN1 jouait un rôle important dans la reprogrammation et dans la biologie des CSE (Ozmadenci et al. 2015). En effet, lors de la reprogrammation l'expression de NTN1 est réduite dans les premiers jours, avant d'être fortement induite après le jour 6. Des tests fonctionnels plus approfondis ont montré que les niveaux de NTN1 pouvaient affecter le processus de reprogrammation de fibroblastes embryonnaires en cellules iPS. Biologiquement, le traitement par une protéine NTN1 recombinante permet d'améliorer l'efficacité de la reprogrammation grâce à son action anti-apoptotique de ligand de DCC. De la même manière, NTN1 pourrait jouer un rôle primordial dans la pluripotence où elle semble limiter la mort cellulaire dans les CSE, puisque la réduction de son expression entraîne une augmentation du pourcentage de cellules en apoptose.

Le lien entre NTN1 et le caractère souche des cellules a déjà été étudié une première fois dans le cadre du cancer colorectal humain (Sung et al. 2019). En effet, l'expression de NTN1 et UNC5B est corrélée dans la base de données de ce cancer à une signature de fibroblastes associés au cancer. De plus, l'inhibition pharmacologique de NTN1 par un anticorps dans ces cellules résulte en la diminution de l'expression de marqueurs de programmes de pluripotence naïve tels que NANOG et OCT4.

De manière intéressante, il a récemment été montré que NTN1 et NEO1 jouaient un rôle dans le maintien du réservoir de cellules souches hématopoïétiques (Renders et al. 2021). La délétion de *Ntn1* entraîne l'activation et la différenciation de ces cellules, ainsi qu'une détérioration de leur fonctionnalité. Dans ce contexte, la signalisation NTN1/NEO1 semble promouvoir la quiescence afin de maintenir l'homéostasie de la niche de cellules souches.

Ces études indiquent donc à première vue que NTN1 semble favoriser la pluripotence des cellules souches naïves. Mon travail de thèse a consisté à étudier plus en détail la voie de signalisation NTN1 et sa fonction dans les cellules souches embryonnaires, afin de répondre aux multiples questions apportées par ces résultats.

Résultats

Les questions biologiques restées sans réponse

La récente mise en évidence d'un rôle de la voie de signalisation Nétrine-1 dans la reprogrammation et la pluripotence ouvre la voie à une meilleure compréhension des propriétés des cellules souches, et à une potentielle exploitation de cette voie dans une visée thérapeutique. Cependant, il est auparavant nécessaire de répondre aux nombreuses questions biologiques soulevées par cette découverte.

Tout d'abord, la question du rôle exact de NTN1 dans la pluripotence se pose. En effet, la réalisation d'un test AP sur des cellules où l'expression de *Ntn1* était réduite montre que ces cellules forment moins de colonies pluripotentes (Ozmadenci et al. 2015). Cependant, nous souhaitons comprendre plus en détail ce résultat et en particulier savoir si l'absence de *Ntn1* affectait par exemple la prolifération ou la propension des cellules à résister à la différenciation. En relation avec cela, l'étude évoquée précédemment soulève également la question de l'intégration de la voie de signalisation Nétrine-1 dans l'ensemble du réseau de pluripotence, de son interaction avec les autres voies de signalisation (LIF, BMP, WNT, MAPK et Activin/Nodal), et plus généralement des événements de signalisation en aval de NTN1.

Par ailleurs, NTN1 jouant un rôle dans la pluripotence, il est pertinent de se demander quels sont les autres membres de la famille Nétrine potentiellement exprimées dans les CSE, et de même pour les récepteurs. Si plusieurs récepteurs sont présents, la question de la bifonctionnalité de NTN1, qui a déjà été démontrée dans d'autres systèmes, se pose. Nous nous demandons en particulier si un récepteur unique pouvait être associé à une fonction dans ce contexte, ou si les propriétés cellulaires attribuées à NTN1 dépendaient d'un équilibre stœchiométrique précis de plusieurs récepteurs.

En outre, la question controversée de la portée d'action de NTN1, paracrine ou autocrine, reste également pertinente et d'actualité. En effet, NTN1 a tout d'abord été présentée comme un facteur soluble diffusible (Kennedy et al. 1994), mais les similitudes de sa séquence avec celle des laminines ainsi que des études structurales par rayon X ont renforcé la vision d'une protéine d'adhésion faisant partie de la matrice extracellulaire (Grandin et al. 2016), remettant ainsi en question l'hypothèse précédente. Il s'agit donc d'une interrogation de plus à laquelle nous avons tenté de répondre dans le contexte de la pluripotence.

Pour finir, si NTN1 est un facteur sécrété, il n'est pas forcément nécessaire que toutes les cellules l'expriment afin de promouvoir la pluripotence. De même, il est possible que l'ensemble des cellules de la population n'expriment pas les récepteurs à la NTN1, et donc que toutes les cellules n'aient pas la capacité de répondre à la signalisation. Cette question de l'hétérogénéité éventuelle de NTN1 et ses récepteurs dans la population cellulaire, et son potentiel lien avec l'hétérogénéité de la population de CSE (déjà évoquée dans l'introduction p.32) par exemple restait à élucider.

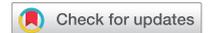
Durant ma thèse, j'ai donc cherché à répondre à ces nombreuses questions. Dans la première partie de mes résultats, je présenterai les données obtenues lorsque mon équipe a cherché à

en savoir plus sur la voie Nétrine-1 dans la pluripotence naïve, son rôle dans le maintien de la pluripotence et la façon dont elle s'intégrait dans le réseau de signalisation existant. Nous avons montré que l'axe de signalisation NTN1/NEO1/UNC5B promouvait la pluripotence naïve à travers l'activation de la voie WNT et l'inhibition de la voie MAPK. J'ai notamment participé à travers la création et la caractérisation des lignées CRISPR KO pour *Ntn1*, *Neo1* et *Unc5b*. Ce travail a donné lieu à une publication dans le journal *Nature Cell Biology* en 2020 (Huyghe et al. 2020). Dans la deuxième partie, sur laquelle est centrée mon travail de thèse, je détaillerai les résultats obtenus lorsque j'ai travaillé sur la dynamique de la voie de signalisation Nétrine dans les CSE. Grâce à un système rapporteur, j'ai pu montrer que l'expression endogène de *Ntn1*, *Neo1* et *Unc5b* était hétérogène et variait au cours du temps dans la culture cellulaire. Cette expression délimite plusieurs sous-populations ayant des caractéristiques différentes et exprimant différenciellement des marqueurs de la pluripotence naïve et amorcée. En outre, j'ai découvert que le cycle cellulaire contrôlait l'expression de *Ntn1* et de *Neo1* à travers notamment les facteurs CCNB1 et E2F4. Enfin, j'ai montré que l'expression de *Ntn1* en phase S du cycle cellulaire participait à la clonogénicité accrue de cette population. L'article présentant ces résultats est en cours de préparation.

I - Rôle de la signalisation NTN1/NEO1/UNC5B dans la pluripotence naïve

Aurélia Huyghe^{1,2}, Giacomo Furlan^{1,2}, Duygu Ozmadenci^{1,2}, Christina Galonska³, Jocelyn Charlton^{4,5}, Xavier Gaume², Noémie Combémoré², Christina Riemenschneider⁴, Nicolas Allègre⁶, Jenny Zhang⁷, Pauline Wajda², Nicolas Rama⁸, Pauline Vieugué⁸, Isabelle Durand⁹, Marie Brevet¹⁰, Nicolas Gadot¹⁰, Thomas Imhof¹¹, Bradley J. Merrill⁷, Manuel Koch¹¹, Patrick Mehlen⁸, Claire Chazaud⁶, Alexander Meissner^{4,5} & Fabrice Laval^{2,12}

1. La contribution de ces auteurs est équivalente
2. Cellular reprogramming and oncogenesis Laboratory - Lyon University, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, Centre Léon Bérard, Cancer Research Center of Lyon, Lyon, France
3. Department of Genome Regulation, Max Planck Institute for Molecular Genetics, Berlin, Germany
4. Department of Genome Regulation, Max Planck Institute for Molecular Genetics, Berlin, Germany
5. Broad Institute of MIT and Harvard, Cambridge, MA, USA ; Harvard Stem Cell Institute, Cambridge, MA, USA ; Department of Stem Cell and Regenerative Biology, Harvard University, Cambridge, MA, USA
6. GReD, Université Clermont Auvergne, CNRS, INSERM, BP38, Clermont-Ferrand, France
7. Department of Biochemistry and Molecular Genetics, University of Illinois at Chicago, Chicago, IL, USA
8. Apoptosis, Cancer and Development Laboratory, Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, Centre Léon Bérard, Centre de recherche en cancérologie de Lyon, Lyon, France
9. Cytometry Facility, Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Centre Léon Bérard, Centre de recherche en cancérologie de Lyon, INSERM 1052, CNRS 5286, Lyon, France
10. Research Pathology platform, Department of translational research and innovation, Centre Léon Bérard, Lyon, France
11. Institute for Dental Research and Oral Musculoskeletal Research, Center for Biochemistry, University of Cologne, Cologne, Germany
12. Correspondance : fabrice.laval@lyon.unicancer.fr



Netrin-1 promotes naive pluripotency through Neo1 and Unc5b co-regulation of Wnt and MAPK signalling

Aurélia Huyghe^{1,13}, Giacomo Furlan^{1,13}, Duygu Ozmadenci^{1,13}, Christina Galonska², Jocelyn Charlton^{2,3,4,5}, Xavier Gaume¹, Noémie Combémoré¹, Christina Riemenschneider², Nicolas Allègre⁶, Jenny Zhang⁷, Pauline Wajda¹, Nicolas Rama⁸, Pauline Vieugué⁸, Isabelle Durand⁹, Marie Brevet¹⁰, Nicolas Gadot¹⁰, Thomas Imhof¹¹, Bradley J. Merrill¹², Manuel Koch¹¹, Patrick Mehlen^{8,12}, Claire Chazaud⁶, Alexander Meissner^{12,3,4,5} and Fabrice Laval¹✉

In mouse embryonic stem cells (mESCs), chemical blockade of Gsk3 α / β and Mek1/2 (2i) instructs a self-renewing ground state whose endogenous inducers are unknown. Here we show that the axon guidance cue Netrin-1 promotes naive pluripotency by triggering profound signalling, transcriptomic and epigenetic changes in mESCs. Furthermore, we demonstrate that Netrin-1 can substitute for blockade of Gsk3 α / β and Mek1/2 to sustain self-renewal of mESCs in combination with leukaemia inhibitory factor and regulates the formation of the mouse pluripotent blastocyst. Mechanistically, we reveal how Netrin-1 and the balance of its receptors Neo1 and Unc5B co-regulate Wnt and MAPK pathways in both mouse and human ESCs. Netrin-1 induces Fak kinase to inactivate Gsk3 α / β and stabilize β -catenin while increasing the phosphatase activity of a Ppp2r2c-containing Pp2a complex to reduce Erk1/2 activity. Collectively, this work identifies Netrin-1 as a regulator of pluripotency and reveals that it mediates different effects in mESCs depending on its receptor dosage, opening perspectives for balancing self-renewal and lineage commitment.

Mouse embryonic stem cells (mESC) are mainly regulated by four signalling cues^{1–3}. Leukaemia inhibitory factor (lif)⁴, Wnt3a⁵ and Bmp4⁶ sustain self-renewal, whereas fibroblast growth factor 4 (Fgf4) triggers exit from self-renewal via Erk1/2 activation⁷. Conventional culture conditions require Lif and serum or knockout serum replacement (hereafter serum/Lif) to maintain a self-renewing state. In this state, the Fgf–MAPK and the repressive Gsk3 α / β –Tcf7l1 pathways remain active, leading to a heterogeneous population of cells. These metastable mESCs exhibit fluctuating expression of *Nanog* and detectable levels of lineage-affiliated genes⁸. The suppression of MAPK signalling (via Mek1/2 blockade) and activation of the Wnt pathway (via Gsk3 α / β blockade) (hereafter 2i), supports self-renewal of mESCs and instructs a ground state of pluripotency^{9–10}. The 2i mESCs display uniform *Nanog* expression and negligible levels of lineage-affiliated genes. This finding has led to the establishment of germline-competent ESCs from recalcitrant mouse strains and from rat^{11,12}. However, the prolonged blockade of Mek1/2 has been shown to compromise mESC genomic stability, calling into question the use of 2i¹³. Thus, the identification of endogenous

pathways controlling naive pluripotency is crucial not only for advancing our understanding of embryonic development but also for best developing strategies to generate stable human naive pluripotent cells.

Netrins are secreted proteins that have been identified as having a role in axon guidance during nervous system development^{14,15}. Netrin-1 (encoded by the *Ntn1* gene), which was initially purified as a soluble laminin-related molecule that elicited the growth of commissural axons, is now considered as a pleiotropic ligand involved in development and diseases^{14,16,17}. Most functions of Netrin-1 are mediated through the receptors deleted in colorectal carcinoma (Dcc), Unc5 homologues (that is, Unc5A, Unc5B, Unc5C and Unc5D) and neogenin (Neo1)^{18–20}. The characterization of this repertoire led to identification of Netrin-1 as a bifunctional molecule that exerts opposing effects—attracting or repelling—neurons, endothelial or immune cells, depending on the receptors it engages^{21–23}. Our previous work showed that it constrains apoptosis during reprogramming²⁴ but the function of this pathway in self-renewal and lineage commitment remains unknown.

¹Cellular Reprogramming and Oncogenesis Laboratory, Equipe labellisée la Ligue contre le cancer, Labex DEVweCAN, Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, Centre Léon Bérard, Centre de recherche en cancérologie de Lyon, Lyon, France. ²Department of Genome Regulation, Max Planck Institute for Molecular Genetics, Berlin, Germany. ³Broad Institute of MIT and Harvard, Cambridge, MA, USA. ⁴Harvard Stem Cell Institute, Cambridge, MA, USA. ⁵Department of Stem Cell and Regenerative Biology, Harvard University, Cambridge, MA, USA. ⁶GReD, Université Clermont Auvergne, CNRS, INSERM, BP38, Clermont-Ferrand, France. ⁷Department of Biochemistry and Molecular Genetics, University of Illinois at Chicago, Chicago, IL, USA. ⁸Apoptosis, Cancer and Development Laboratory, Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, Centre Léon Bérard, Centre de recherche en cancérologie de Lyon, Lyon, France. ⁹Cytometry Facility, Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Centre Léon Bérard, Centre de recherche en cancérologie de Lyon, INSERM 1052, CNRS 5286, Lyon, France. ¹⁰Research Pathology platform, Department of translational research and innovation, Centre Léon Bérard, Lyon, France. ¹¹Institute for Dental Research and Oral Musculoskeletal Research, Center for Biochemistry, University of Cologne, Cologne, Germany. ¹²Department of Translational Research and Innovation, Centre Léon Bérard, Lyon, France. ¹³These authors contributed equally: Aurélia Huyghe, Giacomo Furlan, Duygu Ozmadenci. ✉e-mail: fabrice.laval@lyon.unicancer.fr

Here, we reveal an early developmental function for Netrin-1 in the control of naive pluripotency. We found that Netrin-1 and its receptors *Neo1* and *Unc5B* control Wnt and MAPK signalling in mESCs and support self-renewal in combination with Lif. In vivo, Netrin-1 regulates the formation of the pluripotent compartment of mouse preimplantation embryos. Our findings shed light on an unexpected regulator of pluripotency and reveal that a single ligand can have diverse effects in stem cells depending on its repertoire of receptors.

Results

Netrin-1 is regulated by Wnt and MAPK signalling in mouse and human pluripotent stem cells. To identify regulators of naive pluripotency, we compared the transcriptomes of serum/Lif mESCs supplemented with inhibitors of Gsk3 α/β (CHIR99021), Mek1/2 (PD0325901) or both (2i) for 48 h. Among the transcripts affected by modulation of Wnt and MAPK signalling, *Ntn1* was induced by Gsk3 α/β inhibition and by 2i but repressed by Mek1/2 blockade at both transcript and protein levels (Fig. 1a,b), whereas other Netrin family members (*Netrin-4*, *Netrin-5*, *Netrin-G1* and *Netrin-G2*)²⁵ remained unaffected (Extended Data Fig. 1a). Since Netrin-1 is expressed at basal levels in serum/Lif but is elevated following Gsk3 α/β inhibition (Fig. 1a,b), we investigated whether it constitutes a target of Wnt. Consistently, mESCs treated with recombinant Wnt3a increased Netrin-1 levels, whereas treatment with Lif and Bmp4 had no effect (Fig. 1c). Netrin-1 induction was also observed in human induced pluripotent stem (hiPS) cells in response to Gsk3 α/β inhibition or Wnt3a stimulation (Extended Data Fig. 1b). Since canonical Wnt stimulation has been shown to alleviate the repressive effect of Tcf7l1²⁶, we evaluated Netrin-1 expression in mESCs lacking *Tcf7l1* and/or *Lef1* (J.Z., B.R. Shy and B.J.M., manuscript in revision). Netrin-1 was released in the absence of Tcf7l1 but reduced if both Tcf7l1 and Lef1 were depleted, indicating that Tcf7l1 acts as a repressor of Netrin-1 activation by Lef1 (Extended Data Fig. 1c,d). Collectively, these results demonstrate that Netrin-1 is regulated by Wnt and MAPK signalling in pluripotent stem cells.

The activation of the Netrin-1–Neo1–Unc5B signalling axis sustains Nanog and mESC undifferentiated state. The distribution of naive pluripotency factors such as Nanog is heterogeneous in serum/Lif and becomes homogeneous with 2i⁹. Using *Ntn1* ^{β geo} knock-in reporter mESCs²⁷, we found that Netrin-1 expression is confined to 8% of serum/Lif mESCs, confirming its basal expression in this condition. This β -galactosidase-positive fraction increased to 26 and 23% in the presence of Gsk3 α/β inhibitor

and 2i, respectively (Fig. 1d). Exploration of single-cell transcriptomic data²⁸ showed similar results (Extended Data Fig. 1e) but revealed that the mean *Ntn1* expression level per cell is higher with 2i (Extended Data Fig. 1f).

Due to its induction with 2i, we investigated whether Netrin-1 could actively instruct ground-state pluripotency features. In serum/Lif mESCs, mouse induced pluripotent stem cells (miPSCs) and preimplantation embryos, the Dcc receptor was not expressed but *Unc5B* and *Neo1* were detected (Extended Data Fig. 2a,b). We therefore generated mESCs that exogenously express different haemagglutinin (HA)-tagged Netrin-1 forms from Cre-excisable transgenes (Fig. 1e), wild-type (WT) Netrin-1 or Netrin-1 mutated on residues critical for its interaction with the Dcc-related protein Neo1 (Netrin-1(Neo1-mut)) or with Unc5B (Netrin-1(Unc5B-mut))^{17,20} (Fig. 1f,g). We established mESC monoclonal lines expressing the Netrin-1 proteins at similar levels (Extended Data Fig. 2c), comparable to its level in 2i (Extended Data Fig. 2d). Fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis showed that the size and granulometry of Netrin-1(WT) cells became homogeneous, with a prominent contribution of Unc5B (Extended Data Fig. 2e). We next revealed that Nanog heterogeneity was reduced in Netrin-1(WT) mESCs grown in serum/Lif (Fig. 1h,i). This observation was associated with increased levels of *Esrrb* and *Sox2*, whereas *Oct4* levels remained constant (Fig. 1j). Both Netrin-1 mutants failed to confer this effect, highlighting the complementary roles of Neo1 and Unc5B (Fig. 1h–j). Transcriptomic data of single mESCs grown in serum/Lif also revealed a correlation between *Ntn1* and *Esrrb* levels²⁹ (Extended Data Fig. 2f).

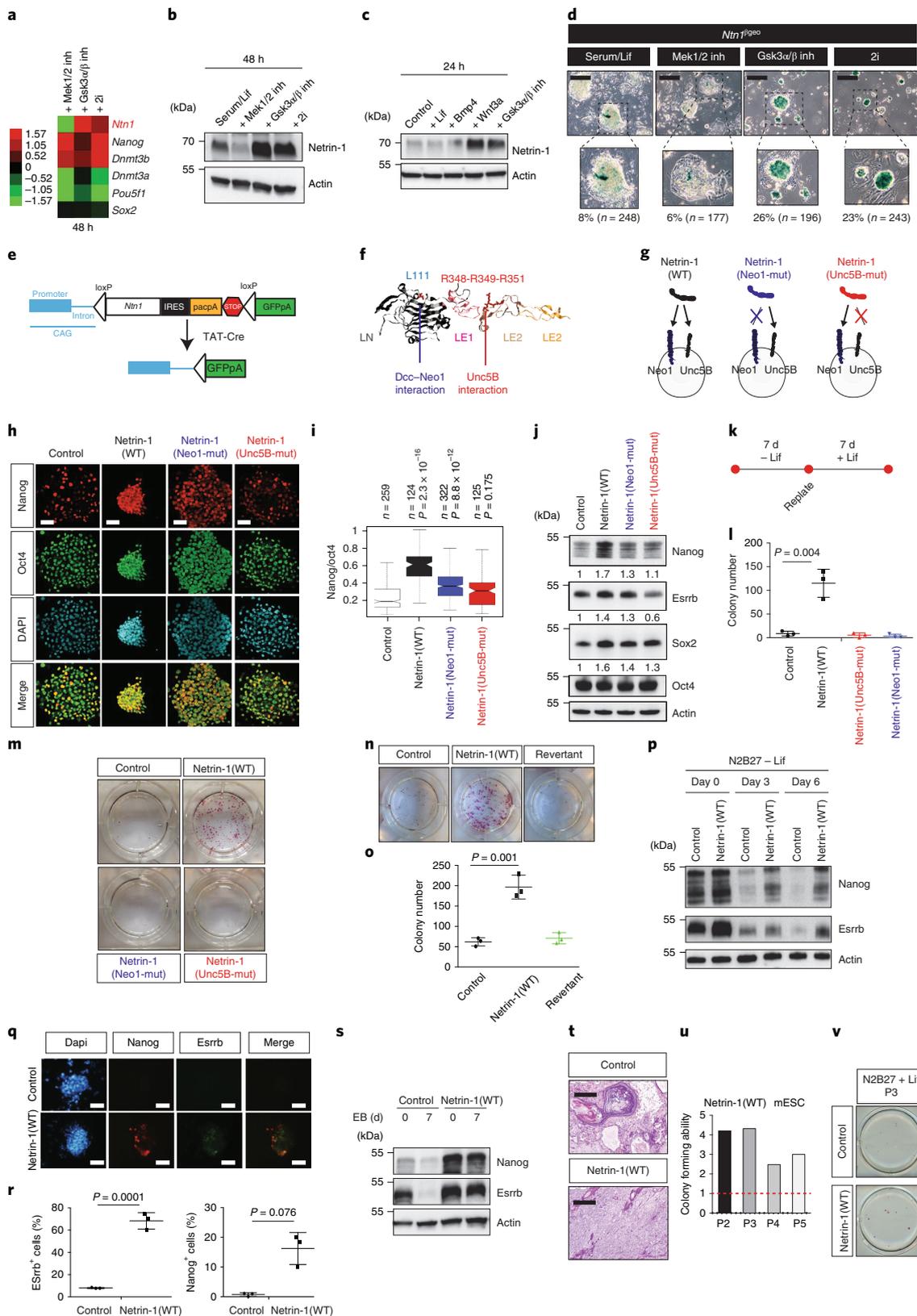
We next assessed whether activation of Netrin-1 signalling, by sustaining Nanog, safeguards the undifferentiated state. When cells were grown without Lif for 7 d and replated for 7 d with Lif (Fig. 1k), expression of Netrin-1(WT) conferred strong resistance to differentiation, whereas both mutants failed to do so, reinforcing the involvement of both receptors in Netrin-1 function (Fig. 1l,m). As expected, excision of the Netrin-1 transgene abrogated the effect in revertant cells (Fig. 1n,o). mESCs with doxycycline (dox)-inducible (doxi) Netrin-1 expression also presented enhanced resistance to differentiation upon dox addition (Extended Data Fig. 2g–i).

We next demonstrated that sustained expression of Netrin-1 severely impairs mESC differentiation. We first evaluated whether Netrin-1 maintains the expression of naive pluripotency markers in differentiation conditions. Nanog and *Esrrb* were still expressed in Netrin-1(WT) mESCs after 6 d of culture in N2B27 medium without Lif, but were not expressed in control cells (Fig. 1p). Immunofluorescence confirmed that some Netrin-1(WT) mESCs

Fig. 1 | Netrin-1 signalling controls pluripotency features. **a**, *Ntn1* transcript levels in mESCs grown as indicated. Data are log₂ FPKM values normalized to serum/Lif mESCs. Inh, inhibitor. **b**, Western blots performed in similar settings as **a**. **c**, Western blot in mESCs cultured in serum/Lif as indicated (3 independent experiments). **d**, Representative bright-field images of *Ntn1* ^{β geo} mESCs grown as in **a**. Scale bars, 250 μ m. Percentages of positive cells are indicated. *n* is the total number of cells counted. **e**, Schematic of the approach. The mESCs were stably transfected with the depicted constructs. IRES, internal ribosome entry site; Pac, puromycin N-acetyltransferase; pA, polyA. **f**, Netrin-1 protein structure. LN, laminin-like domain; LE, EGF repeats. **g**, Representation of the Netrin-1 mESC mutants. Netrin-1(Neo1-mut) harbours the L111E mutation, whereas Netrin-1(Unc5B-mut) contains R348A/R349A/R351A mutations. **h**, Nanog and Oct4 immunofluorescence on indicated mESCs. Scale bars, 50 μ m. **i**, Quantification of the Nanog/Oct4 intensity ratio. *n* is the number of cells analysed. The centre line represents the median of the data, the box edges represent upper and lower quartiles, whiskers show highest and lowest values excluding outliers. Two-tailed Student's *t*-test. **j**, Western blot on indicated mESCs. **k**, Scheme depicting assays for exit from pluripotency. **l,m**, Colony counts for alkaline phosphatase activity (**l**) and images from a representative experiment (**m**) from assays for exit from pluripotency. Data are mean \pm s.d., *n* = 3 independent experiments; two-tailed Student's *t*-test. **n,o**, Assays for exit from pluripotency. **n**, Images from a representative experiment (*n* = 3 independent experiments). **o**, Colony counts. Data are mean \pm s.d., *n* = 3 independent experiments; two-tailed Student's *t*-test. **p**, Western blot for Nanog and *Esrrb* after 6 d in N2B27 (–Lif) (*n* = 3 independent experiments). **q,r**, Nanog and *Esrrb* immunofluorescence after 6 d in N2B27 (–Lif). **q**, Representative images. Bars: 50 μ m. **r**, Counts of Nanog- and *Esrrb*-positive cells. Data are mean \pm s.d., *n* = 3 independent experiments; two-tailed Student's *t*-test; 488 control and 416 Netrin-1(WT) mESCs. **s**, Western blot of embryoid bodies (*n* = 3 independent experiments). **t**, Histological analysis of teratoma. Scale bars, 250 μ m. Four independent teratomas were analysed per cell line. **u,v**, Long-term self-renewal assays. **u**, Colony counts, normalized to the number of colonies formed by control cells for each passage (P) (red dotted line). **v**, Images from a representative experiment (*n* = 2 independent experiments).

sustain Nanog and Esrrb expression in differentiation-promoting conditions (Fig. 1q,r). Similarly, after 7 d in non-adherent culture conditions, embryoid bodies derived from Netrin-1(WT) mESCs failed to repress Nanog or Esrrb expression (Fig. 1s) or to induce differentiation genes (Extended Data Fig. 2j). Teratoma assays

also revealed a severe differentiation defect caused by sustained expression of Netrin-1 (Fig. 1t). Finally, when cells were grown at clonal density on laminin in N2B27 medium with Lif for five passages, Netrin-1 expression increased the self-renewal ability of mESCs (Fig. 1u,v). Collectively, these results showed that the



Netrin-1–Neo1–Unc5B signalling axis sustains Nanog and protects mESCs from differentiation.

The activation of the Netrin-1–Neo1–Unc5B signalling axis induces transcriptomic and epigenetic changes in mESC. To gain insight into Netrin-1 function, we compared the transcriptomes of control and Netrin-1(WT) mESCs grown in serum/Lif. Netrin-1(WT) affected expression of 434 genes (fold change (FC) > 1.5 or FC < -1.5 at adjusted $P < 0.05$), with strong repression of differentiation genes (*Gata6* and *Gata4*) (Fig. 2a). Functional-annotation clustering of differentially expressed genes (DEGs) by gene ontology (GO) Panther analysis revealed association with ‘embryo development’, ‘endoderm development’ and ‘regulation of MAPK cascade’ (Extended Data Fig. 2k). Differences were also observed in cell proliferation, in agreement with the accelerated growth of Netrin-1(WT) mESCs (Extended Data Fig. 2l,m). Because similar GO terms are modulated with 2i, we investigated whether Netrin-1 triggered ground-state pluripotency features. We compared the transcriptomes of control and Netrin-1(WT) mESCs grown in serum/Lif with those from published datasets^{30,31} (see Methods). The transcriptome of Netrin-1(WT) cells acquired limited but significant similarities with 2i mESCs (Fig. 2b). To evaluate the role of the receptors, we next compared the transcriptomic effects of Netrin-1(WT), Netrin-1(Unc5B-mut) and Netrin-1(Neo1-mut) (Fig. 2c,d). Both mutant forms failed to induce the full transcriptomic signature, supporting the importance of the interaction of Netrin-1 with both Neo1 and Unc5B in regulation of mESC physiology.

We assessed whether Netrin-1 signalling instructs ground-state-related epigenomic modifications. We found that Netrin-1(WT) mESCs displayed increased activity of the naive *Oct4* distal enhancer alongside *Jarid2* and *Prdm14* enhancers, which were also induced with 2i³² (Fig. 2e). Chromatin immunoprecipitation with sequencing (ChIP-seq) analyses revealed a global increase in both H3K4me3 and H3K27me3 histone marks in Netrin-1(WT) mESCs (Fig. 2f), which included increased H3K4me3 enrichment at pluripotency genes *Nanog* and *Sox2* (Fig. 2g). We also observed increases in both H3K4me3 and H3K27me3 at bivalent promoters⁸ (Fig. 2h,i). In 2i, reduced levels of Dnmt3A, Dnmt3B, Dnmt3L and Uhrf1 trigger genome-wide DNA hypomethylation^{10,13,33,34}. By contrast, restricted representation bisulfite sequencing revealed that Netrin-1(WT) mESCs (grown for more than 30 passages in the presence of the transgene) display DNA methylation resembling that of control cells (mean = 0.25 ± 0.003 and 0.24 ± 0.004 respectively) (Fig. 2j and Extended Data Fig. 2n). In addition, even if the level of *Dnmt3A* was slightly reduced (Extended Data Fig. 2o), Uhrf1 protein level was induced in Netrin-1(WT) mESCs (Fig. 2k). Moreover, even though 2i represses differentiation genes of the three germ layers⁸, ectodermal genes were not downregulated in Netrin-1(WT) mESCs (Fig. 2l).

Collectively, these results indicate that the Netrin-1–Neo1–Unc5B signalling axis induces transcriptomic and epigenomic changes in mESC that share limited analogies with 2i.

Netrin-1 controls Wnt and MAPK signalling by modulating Gsk3 α / β and Erk1/2 in mouse and human pluripotent stem cells. We dissected how Netrin-1 instructs pluripotency features at the molecular level. With 2i, blockade of Gsk3 α / β activates the Wnt pathway, whereas Mek1/2 inhibition suppresses MAPK signalling⁹. The Wnt pathway was strongly activated in Netrin-1(WT) mESCs, as indicated by β -catenin levels, and expression of Netrin-1 mutants showed that Neo1 and Unc5B were required for this effect (Fig. 3a). Gsk3 α / β activity was also reduced in Netrin-1(WT) mESCs, as revealed by increased levels of its inactive form³⁵ (Fig. 3a). Moreover, the level of inactive phosphorylated (p-) Gsk3 α / β in Netrin-1(WT) mESCs was equivalent to that in control cells treated with Wnt3a, and could not be increased further by Wnt3a addition (Fig. 3b).

Netrin-1 has been linked to various kinases^{36–40} that may be involved in Gsk3 α / β phosphorylation. Among these, we found slightly increased levels of active Fak in Netrin-1(WT) mESCs (Fig. 3c). Because Fak was shown to phosphorylate Gsk3 α / β ⁴¹, we investigated whether the effect of Netrin-1 on Wnt is mediated by Fak. Depletion of Fak using short interfering RNA (siRNA) in Netrin-1(WT) mESCs (>80%; Extended Data Fig. 3a) reduced p-Gsk3 α / β , thereby reducing Wnt-pathway activation (Fig. 3d).

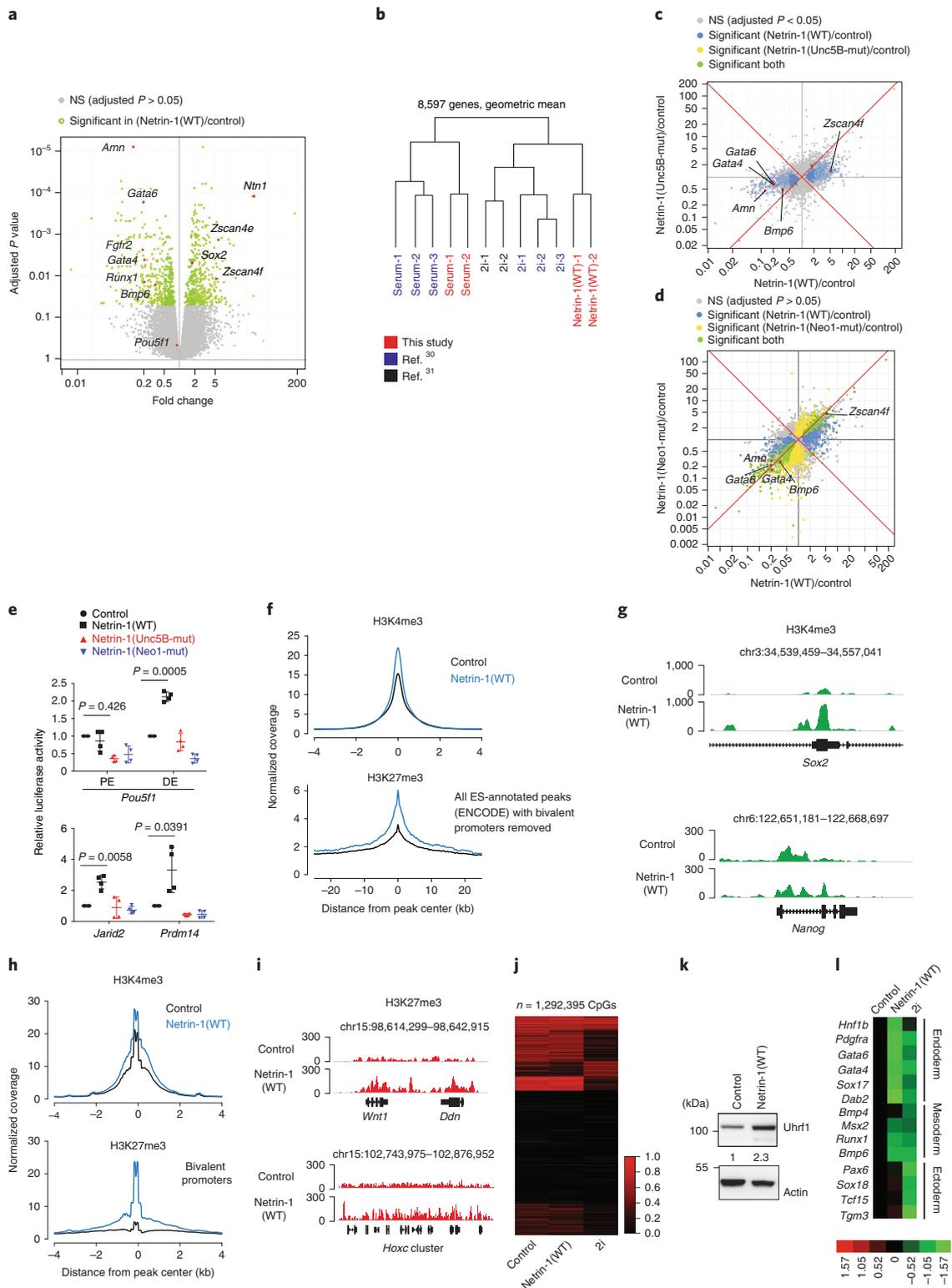
We next showed that Netrin-1(WT) mESCs harbour reduced levels of p-Erk1/2, whereas p-Mek1/2 levels remained similar to those in the control cells (Fig. 3e). Because MAPK activation is controlled by Lif and Fgf, we determined whether Netrin-1 signalling modulated the sensitivity of mESCs to these cytokines. Deprivation and stimulation experiments indicated that Fgf4 responsiveness was markedly reduced in Netrin-1(WT) mESCs, as indicated by p-Erk1/2 (Fig. 3f). In similar settings, Lif-mediated p-Erk1/2 and p-Stat3 inductions were not affected (Extended Data Fig. 3b). The link between Unc5B and the phosphatase complex Pp2a³⁶ prompted us to investigate whether this complex regulated the decrease in p-Erk1/2 in mESCs⁴². Immunoprecipitation of the catalytic subunit Pp2ac α showed that Netrin-1 activation triggered a substantial increase of its phosphatase activity (Fig. 3g). The qualitative composition of the complex has been shown to modulate its activity⁴³, and we observed an induction of the regulatory subunit ppp2r2c in Netrin-1(WT) mESCs (Fig. 3h). To evaluate whether the Pp2a complex is responsible for MAPK attenuation, we attempted to rescue p-Erk1/2 levels by siRNA-mediated depletion of Ppp2ca or Ppp2r2c. We showed that knockdown (>80%; Extended Data Fig. 3c) of both subunits rescued p-Erk1/2 level, while levels of p-Mek1/2 and p-Gsk3 α / β remained steady (Fig. 3i).

Fig. 2 | Netrin-1 signalling triggers transcriptomic and epigenetic changes in mESCs. **a**, Volcano plot comparing transcriptomes of control and Netrin-1(WT) mESCs. $n = 3$ independent samples. Benjamini–Hochberg adjusted P values of the comparisons were computed using the limma-voom workflow; modified two-sided t -test. **b**, Hierarchical clustering of transcriptomes with published datasets^{30,31} (see Methods for details). **c,d**, Comparison of the effects of Netrin-1(WT), Netrin-1(Unc5B-mut) (**c**) and Netrin-1(Neo1-mut) (**d**) on the transcriptome of mESCs. $n = 3$ independent samples. Benjamini–Hochberg adjusted P values of the comparisons were computed using the limma-voom workflow; modified two-sided t -test. **e**, Luciferase assays. Data are normalized to *Renilla* activity produced by a plasmid as a control of transfection efficiency and expressed as the mean \pm s.d. ($n = 4$ independent experiments). Two-sided Student’s t -test. **f–i**, H3K4Me3 and H3K27Me3 distribution in control and Netrin-1(WT) mESCs. Data are representative of 3 independent experiments. **f**, H3K4Me3 and H3K27Me3 distribution in control and Netrin-1(WT) mESCs. Data are representative of 3 independent experiments. Modified two-sided t -test. Normalized enrichment of H3K4me3 and H3K27me3 for ENCODE-annotated embryonic stem cell peaks (ENCF001XWU and ENCF001XWQ, respectively) located at least 10 kb from bivalent promoters. **g**, Representative browser tracks of H3K4me3 enrichment (in fragments per kilobase of transcript per million (FPKM)) at *Nanog* and *Sox2* loci. **h**, Normalized H3K4Me3 and H3K27Me3 enrichment at bivalent promoters in control and Netrin-1(WT) mESCs. **i**, Representative browser tracks of H3K27me3 enrichment (FPKM) at bivalent loci. **j**, Heat map of methylation levels for 1.3 million matched CpGs in control, Netrin-1(WT) mESCs grown in serum/Lif and 2i mESCs. Each horizontal line is one CpG. **k**, Western blot for Uhrf1 in indicated mESCs grown in serum/Lif (3 independent experiments). **l**, Expression of differentiation-related genes in control, 2i and Netrin-1(WT) mESCs. Dendrogram presents RNA-seq data. FPKM values are normalized to control mESCs and presented as log₂ values. Colour scale is provided.

mESCs with Netrin-1-doxi expression showed dose-dependent changes in Wnt and MAPK signalling following dox addition (Fig. 3j). When mESCs were plated on Netrin-1-doxi feeder cells, with or without dox treatment, we observed similar changes in signalling, indicating that Netrin-1 can act in a paracrine manner on pluripotency (Fig. 3k). Finally, human iPS cells exogenously expressing Netrin-1 showed limited but similar elevation of Wnt

and reduction of MAPK activities—but these were not sufficient to increase Nanog expression (Fig. 3l).

Collectively, these results show that activation of Netrin-1 signalling promotes Wnt signalling by activating Fak, which triggers Gsk3 α/β inactivation and β -catenin stabilization. Netrin-1 also modifies Pp2a complex composition and activity to dephosphorylate Erk1/2.



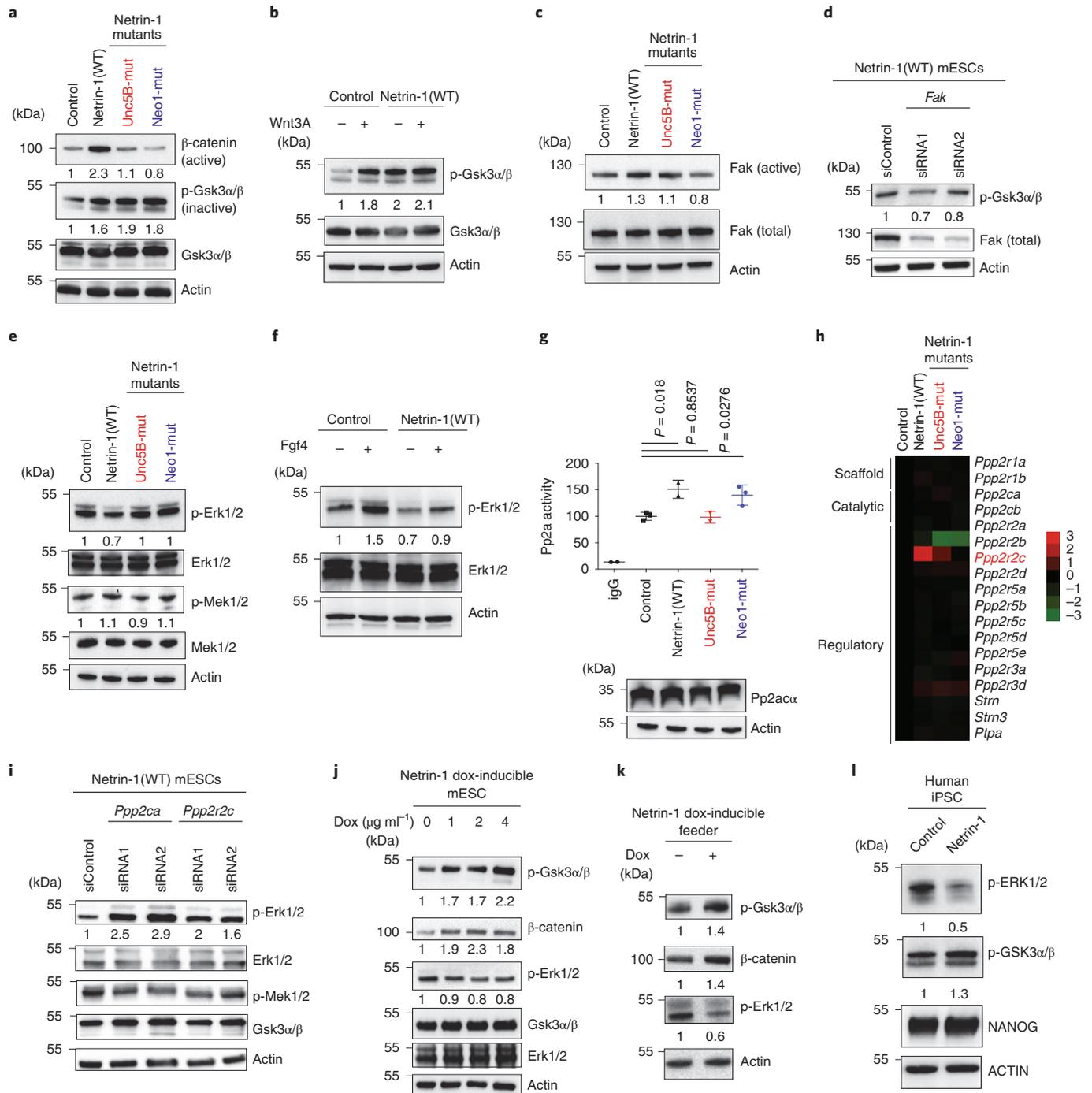


Fig. 3 | Netrin-1 regulates Gsk3α/β and Erk1/2 activities in mouse and human pluripotent stem cells. a, Western blot of Wnt-pathway proteins in the indicated mESCs grown in serum/Lif. **b**, Effect of Netrin-1 signalling on Wnt3a sensitivity. Control and Netrin-1(WT) mESCs were serum-starved overnight and stimulated with recombinant Wnt3a for 6 h before sample collection. **c**, Western blot of phosphorylated (active) and total Fak levels in control and Netrin-1(WT) mESCs. **d**, Western blot of Netrin-1(WT) mESCs transfected with control siRNA or two independent siRNAs targeting Fak. **e**, Western blot of MAPK proteins in the indicated mESCs grown in serum/Lif. **f**, Effect of Netrin-1 on Fgf4 sensitivity. Control and Netrin-1(WT) mESCs were serum-starved overnight and stimulated with recombinant Fgf4 for 20 min before sample collection. **g**, Modulation of Pp2a activity by Netrin-1 signalling in mESCs. Top, phosphatase activity of the complex in Pp2acα (or control IgG) immunoprecipitates from control and Netrin-1-expressing mESCs. Data are mean ± s.d. (n = 3 independent experiments). Two-sided Student's *t*-test. Bottom, western blot showing Pp2acα levels in the corresponding mESC populations. **h**, Dendrogram showing levels of transcripts of Pp2a subunits. The raw FPKM data are normalized to control mESCs and presented as log₂ values. Three independent samples. **i**, Western blot in Netrin-1(WT) mESCs transfected with control siRNA or two independent siRNAs targeting Ppp2ca or Ppp2r2c. **j**, Western blot showing Wnt and MAPK activation in Netrin-1-doxi mESCs. Dox was added at the indicated concentrations for 48 h. **k**, Netrin-1-expressing feeder cells trigger similar signalling changes in mESCs. The irradiated feeder was plated and untreated or treated with 2 μg ml⁻¹ dox for 24 h. The next day, mESCs were plated on the feeders and grown for 3 d before collection. **l**, Western blot of Wnt and MAPK proteins in control and Netrin-1(WT) human iPSC cells. Western blots in **a–g** and **i–l** are representative of 3 independent experiments.

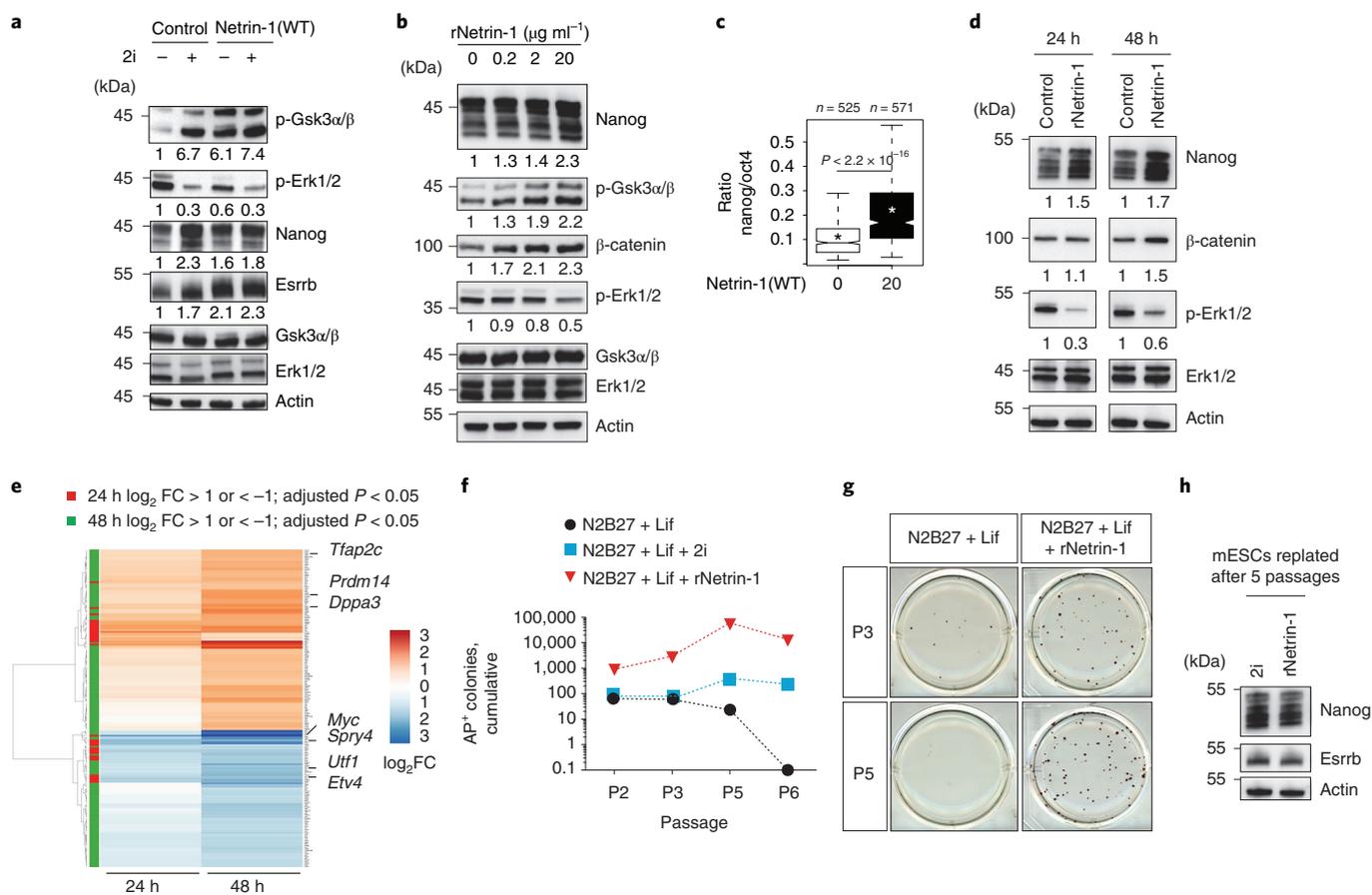


Fig. 4 | Recombinant Netrin-1 supports mESC self-renewal in combination with Lif. **a**, Western blot comparing signalling and pluripotency changes induced by Netrin-1 and 2i. Control and Netrin-1(WT) mESCs were grown in serum/Lif and treated with 2i for 2 d (3 independent experiments). **b**, Western blot of Nanog, Wnt and MAPK proteins in response to increasing doses of rNetrin-1. Cells were treated with the indicated concentrations for 48 h (3 independent experiments). **c**, Quantification of the Nanog/Oct4 intensity from immunofluorescence in single cells from the different populations. n corresponds to the number of cells. The centre line represents the median of the data, box edges show the upper and lower quartiles and whiskers show the highest and lowest values, excluding outliers. Two-tailed Student's t -test. **d**, Western blot of pluripotency and signalling changes occurring after 24 and 48 h of treatment with 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ rNetrin-1 (3 independent experiments). **e**, Heat map of DEGs. RNA-seq was performed on untreated or rNetrin-1-treated mESCs. $n = 4$ independent samples. P values from two-sided Wald test; two-sided Benjamini-Hochberg test for adjustment. **f**, Self-renewal assays. E14Tg2a mESCs were maintained for six passages in the indicated conditions. After splitting at P2, P3, P5 and P6, cells were counted and similar cell numbers were plated at clonal density in serum/Lif for 7 d and the number of alkaline phosphatase-positive colonies was counted to evaluate the self-renewal potential of the cells. Data from one representative experiment of two independent experiments. **g**, Self-renewal abilities of mESCs grown in the indicated conditions for three or five passages. Similar results were obtained from 3 independent experiments. **h**, Western blot of pluripotency factors. mESCs cultured in N2B27 + Lif + 2i or N2B27 + Lif + rNetrin-1 for 5 passages (15 d) were cultured in serum/Lif for a further 7 d before collection (3 independent experiments).

Netrin-1 supports mESC self-renewal in combination with Lif.

To compare the magnitude of the changes induced by Netrin-1 and 2i, control and Netrin-1(WT) mESCs were treated with 2i for 48 h in serum/Lif (Fig. 4a). Basal levels of p-Gsk3 α/β , Nanog and Esrrb in Netrin-1(WT) mESCs were similar to those in 2i-treated mESCs. However, there was less reduction in MAPK signalling in the Netrin-1(WT) cells (Fig. 4a), and these cells remained responsive to 2i treatment, confirming that Netrin-1 only partially mimics signalling changes induced by 2i.

We assessed whether recombinant Netrin-1 (rNetrin-1; see Methods) triggers similar changes to transgenes in mESCs. Using western blot and immunofluorescence, we showed that 48 h treatment with different doses of rNetrin-1 led to Nanog induction, demonstrating a paracrine effect of rNetrin-1 (Fig. 4b,c). This treatment also led to dose-dependent changes of β -catenin, p-Gsk3 α/β and p-Erk1/2, as expected (Fig. 4b). We next dissected the sequence of events by analysing mESCs at 24 and 48 h of treatment. Changes in signalling appeared with different kinetics: Erk1/2 phosphorylation

was decreased at 24 h, whereas β -catenin was induced only at 48 h (Fig. 4d). Transcriptomic analyses enabled us to define clusters of early and late responders (Fig. 4e). At 24 h, there was a very limited response (35 DEGs, \log_2 FC <1 or >1 and adjusted $P < 0.05$) and significant downregulation was detected for pluripotency genes (*Myc* and *Utf1*). Differentiation genes (*Hand1*) and Fgf targets (*Etv4*, *Spry4* and *Dusp6*) were also repressed, in line with the rapid changes of p-Erk1/2. At 48 h, a larger transcriptomic response was evident (193 DEGs), including upregulation of *Tfap2c*, *Prdm14* and *Dppa3*. Most of the endoderm and mesoderm genes repressed in Netrin-1(WT) mESCs (Fig. 2l) were not repressed at these early time points, suggesting that Netrin-1 induces signalling changes prior to repressing differentiation.

We next investigated whether rNetrin-1 can support mESC self-renewal in combination with Lif. mESCs were grown at clonal density on laminin in N2B27 + Lif with rNetrin-1 or 2i for six passages (18 d) (Fig. 4f,g). Colony-formation assays confirmed that Lif is not sufficient to maintain self-renewal in serum-free

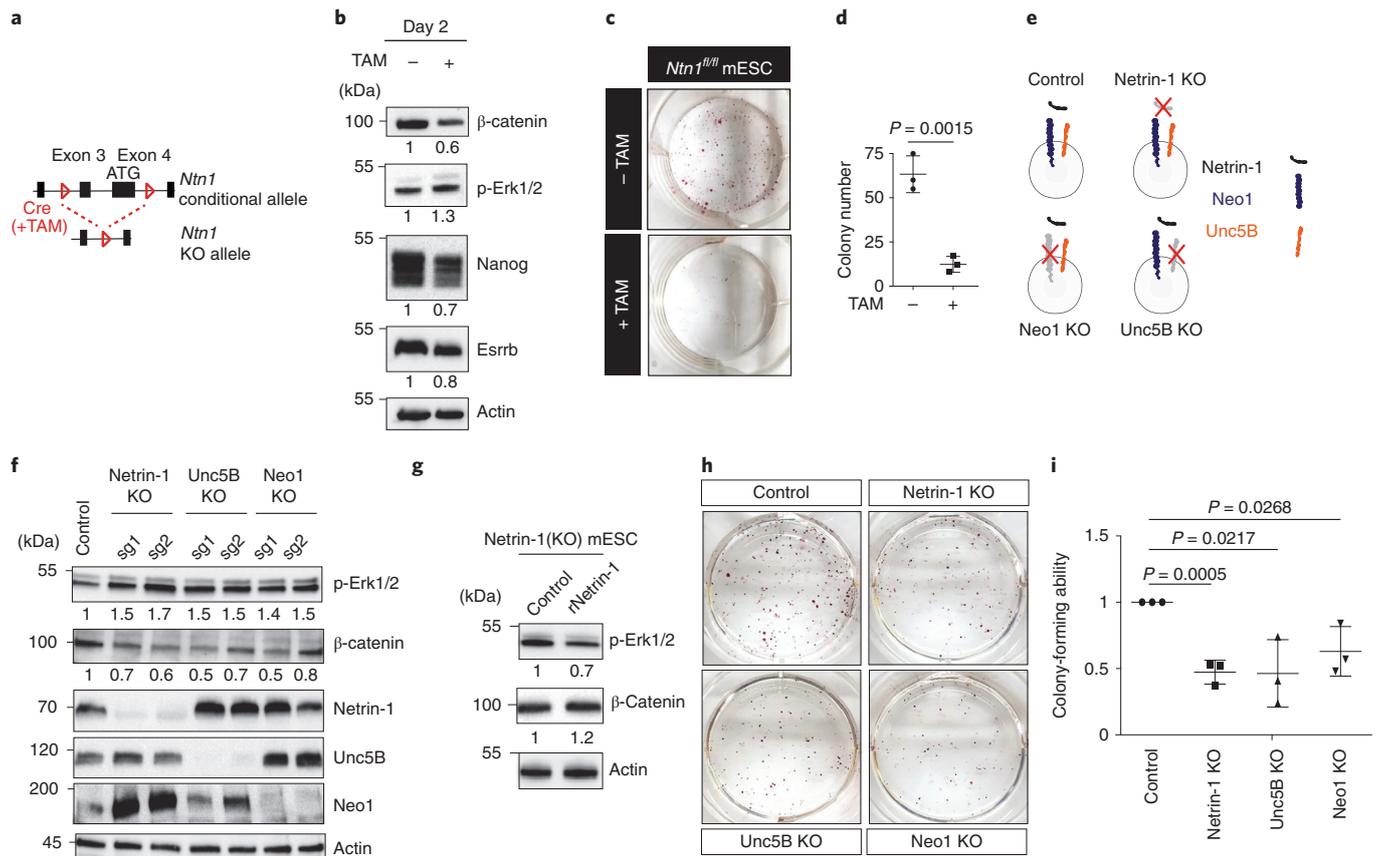


Fig. 5 | Endogenous Netrin-1 controls pluripotent features via Neo1 and Unc5b. **a**, Schematic of the *Ntn1* conditional allele. KO, knockout. **b**, Western blot for Wnt and MAPK proteins in *Ntn1^{fl/fl}* mESCs treated overnight or not with tamoxifen (TAM) in N2B27 + Lif for 48 h before collection (3 independent experiments). **c**, Colony-formation assays. Similar results were obtained from 3 independent experiments. **d**, Colony counts. Data are mean \pm s.d., $n = 3$ independent experiments; two-sided Student's *t*-test. **e**, Scheme depicting the Netrin-1(KO), Neo1(KO) and Unc5B(KO) mESCs generated using CRISPR-Cas9. **f**, Effect of Netrin-1, Neo1 and Unc5B depletion on Wnt and MAPK pathways (3 independent experiments). **g**, Western blot for Wnt and MAPK proteins. Netrin-1(KO) mESCs were treated for 48 h with rNetrin-1 (20 μ g ml⁻¹) before collection (3 independent experiments). **h**, **i**, Effect of ligand or receptor depletion on mESC self-renewal ability. Cell lines from **e** were analysed by colony-formation assay. **h**, Bright-field images of a single experiment representative of 3 independent experiments. **i**, Colony counts. Data are mean \pm s.d., $n = 3$ independent experiments; two-sided Student's *t*-test.

medium (Fig. 4f,g). However, the addition of rNetrin-1 enabled sustained self-renewal, similar to 2i (Fig. 4f,g). When replated in serum/Lif after five passages in N2B27 + Lif + rNetrin-1 or N2B27 + Lif + 2i, mESCs exhibited similar Nanog and Esrrb levels (Fig. 4h). Together, these results show that rNetrin-1 co-regulates Wnt and MAPK signalling and sustains self-renewal in combination with Lif.

The Neo1 and Unc5b receptors are required for endogenous Netrin-1 function in mESCs. Because Netrin-1 is expressed at basal levels in serum/Lif (Fig. 1b), we assessed its endogenous function in mESCs. We generated *Ntn1* conditional-knockout (KO) mESCs by crossing *Ntn1^{fl/fl}* (ref. 44) and *Rosa26^{CreERT2}* mice (Fig. 5a) (Extended Data Fig. 4a). Because feeder cells secrete Netrin-1, *Ntn1^{fl/fl}* mESCs were adapted on gelatin. After 48 h, *Ntn1* deletion induced changes in signalling and pluripotency that mainly mirrored gain of function. Wnt-pathway activation was reduced, whereas MAPK activity was induced and Nanog and Esrrb levels were reduced (Fig. 5b). However, the expression of epiblast (*Fgf5* and *Otx2*) or primitive endoderm (*Gata4* and *Gata6*) transcripts was not significantly induced (Extended Data Fig. 4b). Netrin-1 loss also led to a significant decrease of mESC self-renewal ability (Fig. 5c,d) with no significant changes in proliferation and cell death (Extended Data Fig. 4c,d). These defects, observed in

the first days following Netrin-1 deletion, were compensated and *Ntn1^{-/-}* mESCs could be maintained at high density for more than 20 passages (Extended Data Fig. 4e).

We next generated Netrin-1-, Neo1- and Unc5B-KO mESCs using clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)-CRISPR-associated protein 9 (Cas9) genome editing (Fig. 5e,f and Extended Data Fig. 4f). CRISPR-Cas9-mediated loss of Netrin-1 led to similar changes in p-Erk1/2 and β -catenin levels as the conditional KO (Fig. 5f), and these changes were partially rescued by treatment with rNetrin-1 (Fig. 5g). Loss of Netrin-1 triggered a self-renewal defect (Fig. 5h,i) that was compensated in 2i (Extended Data Fig. 4g), in agreement with the effects of Netrin-1 on Wnt and MAPK. Importantly, in serum/Lif, Unc5B and Neo1 single-KO induced signalling and clonogenicity changes that largely mimicked loss of Netrin-1 (Fig. 5f-i), indicating that a tight regulation of receptor dosage is required to co-regulate Wnt-MAPK and therefore self-renewal.

Netrin-1 regulates cell-fate allocation in preimplantation embryos. Netrin-1 depletion has been reported to cause embryonic lethality at embryonic day (E)14.5 (ref. 45), but no function has been reported in preimplantation embryos. Due to the unexpected function we described in mESCs, we assessed whether Netrin-1 could be expressed and have a role at an earlier stage. In situ hybridization

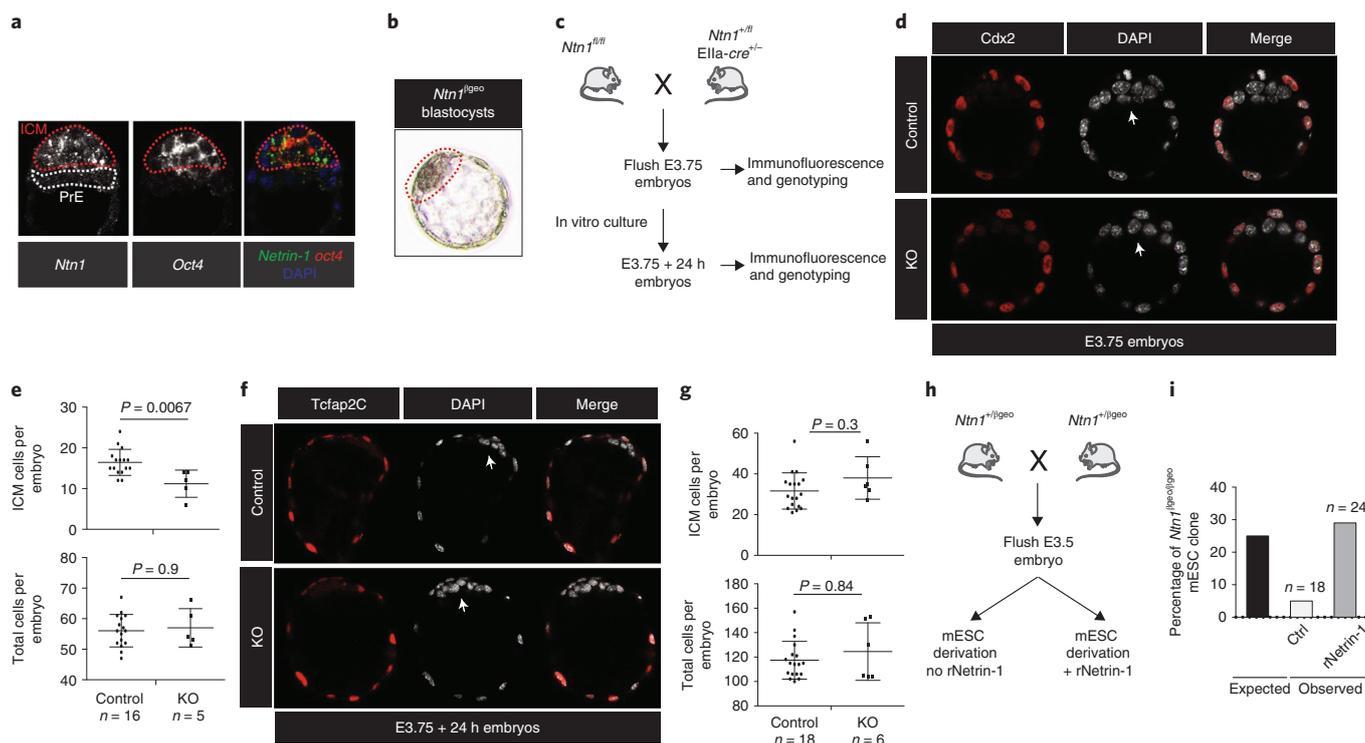


Fig. 6 | Netrin-1 regulates cell-fate allocation in preimplantation embryos. **a**, In situ hybridization of *Netrin-1* and *Oct4* in an E4.5 embryo. Representative of 17 E4.5–E4.75 embryos from 3 independent experiments. ICM, inner cell mass; PrE, primitive endoderm. **b**, X-gal activity in blastocyst-stage embryos. *Ntn1*^{βgeo} reporter embryos were flushed at E3.5 and grown in vitro for 24 h before fixation (9 embryos from 3 independent experiments). **c**, Scheme depicting the intercrosses. **d**, Image of control and Netrin-1(KO) E3.75 embryos. Cdx2 immunofluorescence marks trophectoderm cells. Arrows indicate ICM cells (4 independent experiments). **e**, Average number of ICM cells per embryo. Data are mean ± s.d. of (DAPI⁺ cells) – (Cdx2⁺ cells); 16 control and 5 Netrin-1(KO) embryos were analysed. Control, *Ntn1*^{+/+} and *Ntn1*^{+/-} embryos; Netrin-1(KO), *Ntn1*^{-/-}. Two-sided non-parametrical Wilcoxon test. **f**, Control and Netrin-1(KO) E3.75 embryos grown in vitro for a further 24 h. Immunofluorescence for Tcfap2C marks trophectoderm cells. Arrows indicate epiblast cells (3 independent experiments). **g**, Number of ICM cells per embryo. Data are mean ± s.d. of (DAPI⁺ cells) – (Tcfap2c⁺ cells). *n* = 18 (control) and 6 (Netrin-1(KO)) embryos. Two-sided non-parametrical Wilcoxon test. **h**, Scheme of the intercrosses. **i**, The percentage of *Ntn1*^{βgeo/βgeo} mESC lines obtained from *Ntn1*^{+/-βgeo} heterozygous crosses. *n* represents the number of lines generated and is indicated on the graph. Embryos were flushed at E3.5, grown on feeder cells in N2B27 + Lif + 2i for 3 d and then in serum/Lif. Netrin-1 status was evaluated by western blot.

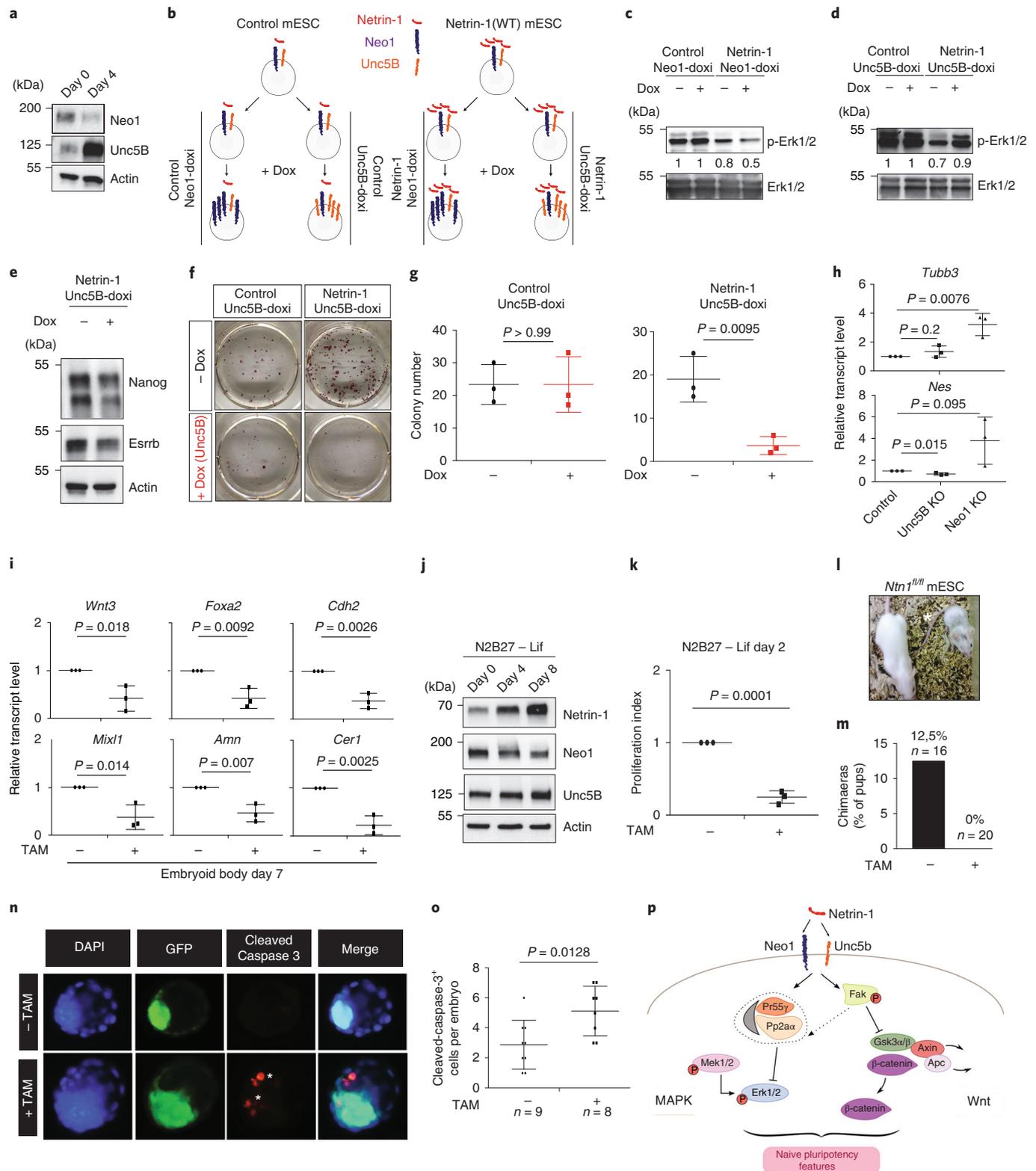
of *Ntn1* and *Oct4* revealed that *Ntn1* expression was confined to the naive epiblast, while no signal was detected in the adjacent primitive endoderm (Fig. 6a). Previously published single-cell transcriptomic data confirmed significantly higher *Ntn1* expression in epiblastic cells than in primitive endoderm in E4.5 embryos⁴⁶ (Extended Data Fig. 4h). The use of *Ntn1*^{βgeo} embryos also showed specific βgal activity in the epiblast of blastocysts, indicating that Netrin-1 is expressed in pluripotent blastomeres (Fig. 6b).

We next analysed E3.75 and E4.5 (E3.75 grown in vitro for 24 h) embryos from intercrosses between *Ntn1*^{fl/fl} males and *Ntn1*^{fl/WT}; *EIIa-cre*^{+/-} females (Fig. 6c). This strategy was selected because offsprings inheriting *EIIa-cre* maternally exhibit a widespread reporter expression⁴⁷. Netrin-1 depletion led to a significant reduction of the number of cells in the inner cell mass (DAPI⁺Cdx2⁻) in E3.75 embryos, indicating a function for Netrin-1 in the homeostasis of the inner cell mass (Fig. 6d,e). This defect was compensated when embryos were grown in vitro and analysed 24 h later, in agreement with a lack of requirement for Netrin-1 at these embryonic stages (Fig. 6f,g).

We finally assessed whether Netrin-1 controls mESC derivation. Starting from blastocysts obtained through *Ntn1*^{+/-βgeo} mice crosses²⁷ (Fig. 6h), 18 expanded blastocyst outgrowths were subsequently amplified. Among these, a single *Ntn1*^{βgeo/βgeo} mESC line was detected (Fig. 6i), a deviation from the expected 1:2:1

genotype frequency. The use of rNetrin-1 rescued this deviation (Fig. 6i), indicating that Netrin-1 controls optimal pluripotency capture. Together, these results reveal an unexpected function for Netrin-1 during preimplantation development.

Netrin-1 exerts different effects in mESCs depending on the Neo1/Unc5B stoichiometry. Netrin-1 has been shown to trigger opposite responses depending on the receptor dosage^{21–23}. We investigated whether it also exerts different functions depending on the Neo1/Unc5B stoichiometry in mESCs and differentiated derivatives. While Netrin-1 and both receptors are expressed in mESCs, embryoid body formation induced Netrin-1 expression and tilted the dosage toward a Neo1^{low}/Unc5B^{high} ratio (Fig. 7a). *Unc5b* induction was already detected in epiblast-like (EpiLC) cells⁴⁸ (Extended Data Fig. 5a). To alter experimentally the ligand and receptors ratio, we engineered control and Netrin-1(WT) mESCs to express Neo1 or Unc5B on addition of dox (Fig. 7b). We found that the decrease in p-Erk1/2 triggered by Netrin-1 was more pronounced when Neo1 was exogenously expressed (Fig. 7c). By contrast, when Unc5B was induced, p-Erk1/2 levels were increased by Netrin-1, indicating that the ligand has different effects on MAPK depending on the balance of its receptors (Fig. 7d). In line with a function of p-Erk1/2 in lineage commitment, we found that this setting, Netrin-1^{high}Neo1^{low}Unc5B^{high}, triggered downregulation of Nanog



and *Esrrb* (Fig. 7e) and a reduction of mESC resistance to differentiation (Fig. 7f,g). In addition, by subjecting mESCs expressing solely *Unc5B* (*Neo1*(KO)) or *Neo1* (*Unc5B*(KO)) to differentiation in N2B27 – Lif, we found that mESCs expressing *Unc5B* exhibited increased induction of differentiation genes (Fig. 7h). Collectively, these data indicate that the effect of *Netrin-1* on self-renewal is tightly regulated by the balance of *Netrin-1* receptors.

Netrin-1 coordinates differentiation in vitro and in vivo. Loss of a pro-self-renewal signal in mESCs leads to their accelerated differentiation, as shown for *Lif*⁴, *Wnt*⁴⁹ and *Bmp*⁶. However, because *Netrin-1* can either repress or induce p-Erk1/2, we assessed whether and how its loss affects mESC differentiation. We subjected *Ntn1*^{fl/fl} mESCs, untreated or treated with TAM, to differentiation assays. In embryoid bodies, *Netrin-1* deletion led to a delay in the induction

Fig. 7 | Netrin-1 exerts different effects in mESCs depending on receptor balance. **a**, Western blot in mESCs and day 4 embryoid bodies. **b**, Schematic of mESC lines generation. **c–e**, Western blot of p-Erk1/2 levels in indicated cell lines. **f, g**, Assays for exit from pluripotency performed on the indicated cell lines. **f**, Representative images of a single experiment representative of 3 independent experiments. **g**, Colony counting. Data are mean \pm s.d. ($n=3$ independent experiments). Two-sided Student's *t*-test. **h**, Results of quantitative PCR with reverse transcription (RT-qPCR), showing transcript levels at day 8 of differentiation in N2B27 + Lif. Data are normalized to housekeeping genes and value 1 is given to day 8 control mESCs. Data are mean \pm s.d. (3 independent experiments). Two-sided Student's *t*-test. **i**, RT-qPCR showing levels of differentiation transcripts in day 7 embryoid bodies generated with *Ntn1^{fl/fl}* mESCs, untreated or treated with TAM. Data are mean \pm s.d., $n=3$ independent experiments; value 1 is given to untreated mESCs. Two-sided Student's *t*-test. **j**, Western blot showing Netrin-1, Unc5b and Neo1 expression during neural differentiation. **k**, Proliferation assays. *Ntn1^{fl/fl}* mESCs, untreated or treated with TAM, were grown for 2 d in N2B27 + Lif and cell number was counted. Data are mean \pm s.d., 3 independent experiments; two-sided Student's *t*-test. **l, m**, Blastocyst injections performed with *Ntn1^{fl/fl}* mESCs, untreated or treated with TAM prior to injection. **l**, Example of a coat colour chimaera obtained following injection of *Ntn1^{fl/fl}* mESCs. **m**, Percentage of chimaeras obtained (n represents the number of live pups obtained and is indicated on the graph). **n**, Image of representative embryos immunostained for GFP and cleaved Caspase-3. Morulas are aggregated with 5–10 *Ntn1^{fl/fl}* mESCs, untreated or treated with TAM. Blastocysts were fixed 36 h after aggregation. Asterisks mark apoptotic cells. **o**, Count of cells positive for cleaved Caspase-3. Data are mean \pm s.d., 3 independent experiments; n represents the number of embryos analysed and is indicated on the graph. Two-sided Student's *t*-test. **p**, Graphical summary of the results. Western blots in **a, c–e, j**, are representative of 3 independent experiments.

of differentiation genes of the three germ layers (Fig. 7i), indicating that Netrin-1 contributes to coordinated differentiation. Cells depleted of Netrin-1 generated teratomas of similar size to those generated by control cells (Extended Data Fig. 5b). To assess whether these defects were associated with differentiation, proliferation and/or cell death, we performed guided neural differentiation, during which Netrin-1 is induced and the switch of receptors occurs (Fig. 7j). After 8 d, we observed a reduced induction of differentiation transcripts in the absence of Netrin-1 (Extended Data Fig. 5c). This difference was accompanied by a reduction of proliferation, which was observed as early as day two (Fig. 7k), without significant difference in cell death (Extended Data Fig. 5d), indicating that Netrin-1 controls differentiation and proliferation. When injected into blastocysts, mESCs depleted of Netrin-1 harboured a reduced ability to give rise to coat-colour chimaeras (Fig. 7l,m). To better characterize this defect, GFP-labelled *Ntn1^{fl/fl}* mESCs, untreated or treated with TAM, were aggregated with morulas. Immunofluorescence analysis of late blastocysts for GFP and cleaved Caspase-3 revealed an increase in the number of apoptotic cells in embryos injected with Netrin-1-depleted cells, suggesting that Netrin-1 promotes cell survival (Fig. 7n,o). Altogether, these results demonstrate that Netrin-1 deregulation triggers differentiation, proliferation and survival defects.

Discussion

In this study, we document that the neuronal guidance cue Netrin-1, which is expressed in the epiblast and in mESCs, is an autocrine and paracrine factor that promotes pluripotent features. Netrin-1 controls self-renewal of mESCs and triggers signalling, transcriptomic and epigenetic features that partially overlap with the ground state of pluripotency⁹ (Fig. 7p). Even if Netrin-1 signalling acts by reducing MAPK and promoting Wnt in a similar manner to 2i, it targets a different effector of the MAPK pathway—namely Erk1/2—via Pp2a. In line with this difference and in contrast to prolonged Mek1/2 blockade, we did not observe global DNA hypomethylation in Netrin-1(WT) mESCs¹³. Because the use of a Src inhibitor preserves mESCs genomic integrity, and since Src and Fak are interconnected⁵⁰, it will be interesting to assess whether Src inhibition triggers a similar cascade to the one described here.

Using genetic models, we reveal that Netrin-1 influences cell-fate allocation during preimplantation development (Fig. 6). Despite this effect, mouse embryos lacking zygotic Netrin-1 expression develop normally through the epiblast stage and die at E14.5 (ref. 45). The cause of the embryonic death is currently unknown, but it coincides with the embryonic lethality in Unc5B-null mice²³. It remains to be investigated whether, as with gp130, such a role may be accentuated in the context of delayed implantation⁵¹.

We show that Netrin-1 exerts different effects on MAPKs depending on the Neo1/Unc5B dosage. The repressive activity of Netrin-1 on MAPKs is converted to a stimulation by Unc5B induction, but questions remain to be answered. First, the factors triggering Unc5B induction remain to be identified. Publicly available resources indicate that transcription factors such as Otx2 or Cdx2, MyoD and Gata3 induce *Unc5B* when expressed in mESCs (Gene Expression Omnibus GSE31381)⁵². Second, the molecular mechanisms responsible for the differential effects of Netrin-1 remain to be dissected. Because these effects are mediated by the Pp2a subunit Ppp2r2c, whose paralogues Ppp2r2a and Ppp2r2d were shown to affect the Nodal pathway in opposite ways⁴³, it will be interesting to assess whether Pp2a composition is responsible for the differential effects of Netrin-1. Finally, while Netrin-1 has been shown to mediate differential responses in various cell types^{21,22}, our study suggests that this ability reflects a fundamental characteristic of this protein, which manifests earlier in development than previously proposed, and which might govern other cellular responses than cell migration, such as cell-fate decisions.

Collectively, our work positions Netrin-1 as a signalling pathway that participates in feedback loops with Wnt and MAPK in pluripotent cells, and demonstrates that a single ligand can trigger different effects in stem cells depending on the stoichiometry of its receptors, opening fascinating perspectives for regenerative medicine and cancer biology.

Online content

Any methods, additional references, Nature Research reporting summaries, source data, extended data, supplementary information, acknowledgements, peer review information; details of author contributions and competing interests; and statements of data and code availability are available at <https://doi.org/10.1038/s41556-020-0483-2>.

Received: 3 November 2017; Accepted: 13 February 2020;
Published online: 30 March 2020

References

- Evans, M. J. & Kaufman, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**, 154–156 (1981).
- Martin, G. R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **78**, 7634–7638 (1981).
- Dunn, S. J., Martello, G., Yordanov, B., Emmott, S. & Smith, A. G. Defining an essential transcription factor program for naive pluripotency. *Science* **344**, 1156–1160 (2014).
- Williams, R. L. et al. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* **336**, 684–687 (1988).
- Sato, N., Meijer, L., Skaltsounis, L., Greengard, P. & Brivanlou, A. H. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells

- through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat. Med.* **10**, 55–63 (2004).
6. Ying, Q. L., Nichols, J., Chambers, I. & Smith, A. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* **115**, 281–292 (2003).
 7. Kunath, T. et al. FGF stimulation of the Erk1/2 signalling cascade triggers transition of pluripotent embryonic stem cells from self-renewal to lineage commitment. *Development* **134**, 2895–2902 (2007).
 8. Marks, H. et al. The transcriptional and epigenomic foundations of ground state pluripotency. *Cell* **149**, 590–604 (2012).
 9. Ying, Q. L. et al. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* **453**, 519–523 (2008).
 10. Ficz, G. et al. FGF signaling inhibition in ESCs drives rapid genome-wide demethylation to the epigenetic ground state of pluripotency. *Cell Stem Cell* **13**, 351–359 (2013).
 11. Buehr, M. et al. Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts. *Cell* **135**, 1287–1298 (2008).
 12. Li, P. et al. Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts. *Cell* **135**, 1299–1310 (2008).
 13. Choi, J. et al. Prolonged Mek1/2 suppression impairs the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* **548**, 219–223 (2017).
 14. Serafini, T. et al. The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell* **78**, 409–424 (1994).
 15. Kennedy, T. E., Serafini, T., de la Torre, J. R. & Tessier-Lavigne, M. Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell* **78**, 425–435 (1994).
 16. Cirulli, V. & Yebra, M. Netrins: beyond the brain. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 296–306 (2007).
 17. Grandin, M. et al. Structural decoding of the netrin-1/UNC5 interaction and its therapeutical implications in cancers. *Cancer Cell* **29**, 173–185 (2016).
 18. Bell, C. H. et al. Structure of the repulsive guidance molecule (RGM)-neogenin signaling hub. *Science* **341**, 77–80 (2013).
 19. Rajagopalan, S. et al. Neogenin mediates the action of repulsive guidance molecule. *Nat. Cell Biol.* **6**, 756–762 (2004).
 20. Xu, K. et al. Neural migration. Structures of netrin-1 bound to two receptors provide insight into its axon guidance mechanism. *Science* **344**, 1275–1279 (2014).
 21. Ko, S. Y., Dass, C. R. & Nurgali, K. Netrin-1 in the developing enteric nervous system and colorectal cancer. *Trends Mol. Med.* **18**, 544–554 (2012).
 22. Hong, K. et al. A ligand-gated association between cytoplasmic domains of UNC5 and DCC family receptors converts netrin-induced growth cone attraction to repulsion. *Cell* **97**, 927–941 (1999).
 23. Lu, X. et al. The netrin receptor UNC5B mediates guidance events controlling morphogenesis of the vascular system. *Nature* **432**, 179–186 (2004).
 24. Ozmadenci, D. et al. Netrin-1 regulates somatic cell reprogramming and pluripotency maintenance. *Nat. Commun.* **6**, 7398 (2015).
 25. Rajasekharan, S. & Kennedy, T. E. The netrin protein family. *Genome Biol.* **10**, 239 (2009).
 26. Wray, J. et al. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 alleviates Tcf3 repression of the pluripotency network and increases embryonic stem cell resistance to differentiation. *Nat. Cell Biol.* **13**, 838–845 (2011).
 27. Skarnes, W. C., Moss, J. E., Hurlley, S. M. & Beddington, R. S. Capturing genes encoding membrane and secreted proteins important for mouse development. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **92**, 6592–6596 (1995).
 28. Kumar, R. M. et al. Deconstructing transcriptional heterogeneity in pluripotent stem cells. *Nature* **516**, 56–61 (2014).
 29. Guo, G. et al. Serum-based culture conditions provoke gene expression variability in mouse embryonic stem cells as revealed by single-cell analysis. *Cell Rep.* **14**, 956–965 (2016).
 30. Bulut-Karslioglu, A. et al. Inhibition of mTOR induces a paused pluripotent state. *Nature* **540**, 119–123 (2016).
 31. Boroviak, T. et al. Lineage-specific profiling delineates the emergence and progression of naive pluripotency in mammalian embryogenesis. *Developmental Cell* **35**, 366–382 (2015).
 32. Galonska, C., Ziller, M. J., Karnik, R. & Meissner, A. Ground state conditions induce rapid reorganization of core pluripotency factor binding before global epigenetic reprogramming. *Cell Stem Cell* **17**, 462–470 (2015).
 33. Habibi, E. et al. Whole-genome bisulfite sequencing of two distinct interconvertible DNA methylomes of mouse embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* **13**, 360–369 (2013).
 34. Ren, X. R. et al. Impairment of DNA methylation maintenance is the main cause of global demethylation in naive embryonic stem cells. *Molecular Cell* **62**, 848–861 (2016).
 35. Beurel, E., Grieco, S. F. & Jope, R. S. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases. *Pharmacol. Ther.* **148**, 114–131 (2015).
 36. Guenebeaud, C. et al. The dependence receptor UNC5H2/B triggers apoptosis via PP2A-mediated dephosphorylation of DAP kinase. *Molecular Cell* **40**, 863–876 (2010).
 37. Ren, X. R. et al. Focal adhesion kinase in netrin-1 signaling. *Nat. Neurosci.* **7**, 1204–1212 (2004).
 38. Liu, G. et al. Netrin requires focal adhesion kinase and Src family kinases for axon outgrowth and attraction. *Nat. Neurosci.* **7**, 1222–1232 (2004).
 39. Moore, S. W. & Kennedy, T. E. Protein kinase A regulates the sensitivity of spinal commissural axon turning to netrin-1 but does not switch between chemoattraction and chemorepulsion. *J. Neurosci.* **26**, 2419–2423 (2006).
 40. Qu, C. et al. c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) is required for coordination of netrin signaling in axon guidance. *J. Biol. Chem.* **288**, 1883–1895 (2013).
 41. Gao, C. et al. FAK/PYK2 promotes the Wnt/ β -catenin pathway and intestinal tumorigenesis by phosphorylating GSK3 β . *eLife* **4**, e10072 (2015).
 42. Sangodkar, J. et al. All roads lead to PP2A: exploiting the therapeutic potential of this phosphatase. *FEBS J.* **283**, 1004–1024 (2016).
 43. Batut, J. et al. Two highly related regulatory subunits of PP2A exert opposite effects on TGF- β /Activin/Nodal signalling. *Development* **135**, 2927–2937 (2008).
 44. Dominici, C. et al. Floor-plate-derived netrin-1 is dispensable for commissural axon guidance. *Nature* **545**, 350–354 (2017).
 45. Bin, J. M. et al. Complete loss of netrin-1 results in embryonic lethality and severe axon guidance defects without increased neural cell death. *Cell Rep.* **12**, 1099–1106 (2015).
 46. Nakamura, T. et al. A developmental coordinate of pluripotency among mice, monkeys and humans. *Nature* **537**, 57–62 (2016).
 47. Hefner, C. S. et al. Supporting conditional mouse mutagenesis with a comprehensive cre characterization resource. *Nat. Commun.* **3**, 1218 (2012).
 48. Hayashi, K., Ohta, H., Kurimoto, K., Aramaki, S. & Saitou, M. Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. *Cell* **146**, 519–532 (2011).
 49. ten Berge, D. et al. Embryonic stem cells require Wnt proteins to prevent differentiation to epiblast stem cells. *Nat. Cell Biol.* **13**, 1070–1075 (2011).
 50. Mitra, S. K. & Schlaepfer, D. D. Integrin-regulated FAK–Src signaling in normal and cancer cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**, 516–523 (2006).
 51. Nichols, J., Chambers, I., Taga, T. & Smith, A. Physiological rationale for responsiveness of mouse embryonic stem cells to gp130 cytokines. *Development* **128**, 2333–2339 (2001).
 52. Correa-Cerro, L. S. et al. Generation of mouse ES cell lines engineered for the forced induction of transcription factors. *Sci. Rep.* **1**, 167 (2011).

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Limited 2020

Methods

Animal studies. Teratoma assays were performed with 7-week-old severe combined immunodeficient (SCID) male mice (CB17/SCID, Charles River). *Ntn1*^{fl^{ox}} reporter and Netrin-1 conditional-KO mESCs were derived from C57/bl6 mixed-background pregnant females at 8–15 weeks of age. Blastocyst injections were done using BALB/cANRj embryos. Embryos were flushed with M2 medium (Sigma) and grown overnight in KSOM (Sigma) or sequential blast (Origio) medium. Genotyping of *Ntn1*^{fl^{ox}} embryos was performed as previously described⁴⁴. X-gal was detected in blastocysts using secondary antibodies coupled with biotin, the Vectastain ABC kit and DAB (Vector System). Teratoma-formation assays were performed by injecting 1×10^6 mESCs in the testes of 7-week-old SCID mice. After 3–4 weeks, the mice were euthanized and lesions were surgically removed and fixed in formalin or in 4% paraformaldehyde for sections. For blastocyst injections, *Ntn1*^{fl^{ox}}, untreated or treated with TAM for 48 h, were injected into BALB/cANRj blastocysts. The day before injection, frozen BALB/cANRj morulas from Quickblasto (Janvier) were thawed according to the manufacturer's instructions and incubated overnight in KSOM medium (Millipore) at 37 °C with 5% CO₂. Between 5 and 15 cells were injected into expanded blastocysts in M2 medium (Sigma) using standard blastocyst injection techniques. Blastocysts were then allowed to recover for a period of 1–3 h prior to being implanted into pseudopregnant females. All animal procedures were performed in accordance with institutional guidelines (French ceccapp project 01369.01).

Cell culture. The following cell lines were used in the study. Cgr8 ES cells (ECACC 07032901) were provided by the B. Pain laboratory (SBRI, Bron, France). E14Tg2a ES cells (ATCC CRL 1821) were provided by the M. E. Torres Padilla laboratory (IES, Munchen, Germany). *Ntn1*^{fl^{ox}} reporter²⁷ and Netrin-1 conditional-KO (*Ntn1*^{fl^{ox}})⁴⁴ mESCs were derived from C57/bl6 mixed-background mice for the study, with no further authentication. Netrin-1 depletion in *Ntn1*^{fl^{ox}} mESCs was induced by treatment with 0.2 μM 4'-OH-tamoxifen (TAM) for 48 h. Cgr8 and E14Tg2a ES cells were cultured on gelatin as previously described²⁴. Control, Netrin-1(WT), Netrin-1(Unc5B-mut) and Netrin-1(Neo1-mut) were established from the same starting Cgr8 population. The Netrin-1(KO), Neo1(KO), Unc5B(KO) and Netrin-1-doxi mESCs were generated by stable transfection of Cgr8 mESCs using EugeneHD reagent (Promega) or Lipofectamine 2000 (Life technologies). Netrin-1 revertant mESCs were obtained by treating cells with 100 units TAT-Cre (SCR-508, Millipore) for 24 h followed by FACS of GFP-expressing cells. Control Neo1-doxi, Netrin-1 Neo1-doxi, control Unc5B-doxi and Netrin-1 Unc5B-doxi mESCs were generated by infecting control and Netrin-1-expressing mESCs with doxi plasmids (a kind gift from the Mehlen laboratory). The siRNA (Dharmacon) were reverse transfected in Cgr8 ES cells at a final concentration of 30 nM using lipofectamine 2000. Silenced Negative Control siRNA (Life Technologies) was used as negative control for siRNA transfection. Cells were collected 2–3 d after transfection. siRNA sequences are detailed in Supplementary Table 1. The hiPS cells were generated from human dermal fibroblasts (Merck 106-05A) using Sendai viruses, cultured in complete TeSR-E8 medium on vitronectin-coated plates (StemCell Technologies). Medium was changed daily and cells were passaged once a week in the presence of 10 μM ROCK inhibitor Y-27632 (Sigma-Aldrich) with Ultra-Pure EDTA solution (Invitrogen). All cell lines used in the study were tested mycoplasma-free (using the Mycoalert kit). The following recombinant proteins were used as follows: mouse Wnt3a (R&D Systems, 1324-WN) 50 ng ml⁻¹, human Fgf4 (Peprotech, 100-31) 10 ng ml⁻¹ and human Activin (Invitrogen, PHG9014). The 293 T and platt-E cells were grown in DMEM supplemented with 10% FCS and penicillin–streptomycin. PD0325901 (Millipore, 444968) and CHIR99021 (Millipore, 361571) were purchased from Merck Millipore. Luciferase assays were performed using dual luciferase reporter assay system (Promega E1910). Wild-type Netrin-1 from *Gallus gallus*, lacking the C-terminal domain (NP_990750, amino acid residues 26–458) was cloned into a modified PCEP vector with an C-terminal Strep-II tag. HEK293 cells were stably transfected and secreted Netrin-1 was purified by streptavidin chromatography (IBA) followed by the removal of the tag by thrombin digestion. Purified Netrin-1 was then dialysed against PBS and passed through a sterile filter. Protein concentration was corrected using the calculated extinction coefficients for Netrin-1 (ProtParam utility available on the ExPaSy server).

Self-renewal and exit from pluripotency assays. For colony-formation assay, mESCs were plated at clonal density (60–100 cells per cm², depending on the strain) in serum/Lif on gelatin-coated plates. Medium was changed every day for 7 d before detection of alkaline phosphatase-positive colonies (AP0100-1KT, Sigma). For exit-from-pluripotency assays, mESCs were grown for 7 d in serum without Lif on gelatin, then split and replated for 7 d more in serum/Lif. For self-renewal assays, E14Tg2a mESCs were plated at clonal density on laminin-coated dishes and split every 3 d.

Differentiation assays. Serum deprivation and stimulation experiments were conducted by growing mESCs overnight in N2B27 medium without cytokines, followed by exposure to the appropriate molecules for the times indicated in the figures. Control Neo1-doxi and Netrin-1 Neo1-doxi mESCs were grown in N2B27 + doxycycline medium for 24 h prior to collection and embryoid body-formation assays were carried out by growing mESCs in non-adherent

culture conditions in non-treated plastic plates for the indicated times. EpiLC induction was performed as previously described¹⁸.

Constructs. To perform in situ hybridization on mouse embryos, a *Ntn1* probe was cloned from mESC cDNA into pGEMTeasy (Promega) (sequence available on request) and in situ hybridization was performed as previously described. Point mutations were introduced into the pcagg-Netrin-1-ires-puro vector to generate mutant Netrin-1 versions using the quick site-directed mutagenesis kit (Agilent). CRISPR-KO plasmids were engineered using the backbone pSpCas9 (BB)-2A-Puro and the protocol from the Zhang lab (Ran et al., 2013). The small guide RNAs were designed using the UCSC genome browser and CRISPOR websites. Guides are detailed in Supplementary Table 1. Neo1- and Unc5B-doxi pITR vectors were kind gifts from P. Mehlen laboratory (CRCL, Lyon, France).

Antibodies, RT-qPCR and biochemical assays. Primary antibodies used in this study are detailed in Supplementary Table 1. The main antibodies were validated using gain- and loss-of-function approaches. Membrane fractionation was performed by using Mem-PER Plus Membrane Protein Extraction Kit (ThermoFisher 89842). Nuclear and cytoplasmic extraction was performed with the NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents Kit (ThermoFisher 78833). Pp2a activity was measured using an immunoprecipitation-based method (Millipore 17-313). RT-qPCR, immunofluorescence and western blots were performed as previously described²⁴. Primers are presented in Supplementary Table 2.

Deep sequencing. For RNA-sequencing (RNA-seq) experiments, RNA quality was analysed using a Bioanalyser (Agilent). Libraries were constructed and sequenced on an illumina Hiseq 2000 (Beckman Coulter Genomics and Genewiz). ChIP-seq experiments were performed as previously described³². For ChIP-seq analysis, BWA was used for alignment of data to the mm9 genome with de-duplication performed using Picard tools, followed by peak calling using macs2 with narrow peak settings. To compare between control and Netrin-1 conditions, Homer was used to create tag directories from aligned reads, then annotatePeaks.pl was used with size = 8,000 and hist = 10 for all plots except H3K27me3 global enrichment, where size = 50,000 and hist = 200 was used due to the wider distribution. Bed files used for these analyses included bivalent promoters defined in ref.³² and ENCODE-defined H3K4me3 and H3K27me3 peaks in Bruce4 ES cells (ENCF001XWU and ENCF001XWQ). Data were then plotted using R. IGV was used for visualization of ChIP-seq enrichment (expressed in fragments per kilobase of transcript per million (FPKM)). For analysis of restricted representation bisulfite-sequencing data, UCSC liftOver was used to convert coordinates from mm10 to mm9 and the two replicates for control and Netrin-1 samples were averaged at matching CpGs. For comparison to 2i conditions, WGBS data from Gene Expression Omnibus dataset GSM1027572 were used. Control, Netrin-1 and 2i data were then merged so that only matched CpGs with coverage of at least 5× (for control and Netrin-1) and 1× (for 2i) were used. Violin plots were generated in R using the library 'Violplot' v.0.2 and heat maps were made using custom scripts in R. BedTools v.2.25.0 was used to intersect CpGs with the following genomic features: high CpG promoters, CpG islands, low CpG promoters, CpG island shores, exons, introns, long interspersed nuclear elements, short interspersed nuclear elements, long terminal repeats and intracisternal A-particle elements, with all annotation downloaded from UCSC with the exception of CpG islands, low CpG promoters and high CpG promoters, which were computationally assigned. For any CpGs located within these features, mean methylation was calculated and plotted in R.

Hierarchical clustering. Control and Netrin-1 mESC datasets were processed as follows. The primary assembly *Mus musculus* genome sequence (release GRCh38.p5) and transcriptome annotations (Ensembl release 87) were downloaded from the GENCODE website. Raw read data (fastq files) were mapped to these sequences using STAR (with parameters -outFilterType BySJout, -outSAMtype BAM Unsorted, and -quantMode GeneCounts). This last parameter enables direct conversion of the mappings to gene counts. These gene counts were transformed into FPKM and combined with the table provided⁷. Only gene names present in both datasets were kept. The following process was applied: (1) keep genes with an average FPKM of at least 10 in at least one cell type (resulting in, as reported, 9,639 genes); (2) normalize between datasets by subtracting, for each gene, the average log₂(FPKM + 1) in each dataset from this gene and log₂(FPKM + 1) in the corresponding samples (geometric mean); (3) compute a dissimilarity matrix between samples by using the 1 – Spearman correlation between samples; and (4) generate a hierarchical clustering using the 'average' agglomeration method.

FACS. FACS analysis was performed on a BD LSRFortessa. Sorting was performed on a BD FACSDiVa. Cells were sorted, washed immediately and centrifuged before being plated directly in fresh medium or frozen for RNA extraction and gene expression analysis.

Statistics and reproducibility. Western blot quantifications were performed with ImageJ. Statistical analyses of mean and variance were performed with Prism 6 (GraphPad Software) and Student's *t*-test or Wilcoxon tests where indicated. For western blots presented in the figures, three independent experiments gave similar results.

Reporting Summary. Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

Data availability

Deep sequencing and ChIP-seq data that support the findings of this study have been deposited in the Gene Expression Omnibus under accession code [GSE102831](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE102831). Previously published sequencing data that were re-analysed here are available under accession code [E-MTAB-2958](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=E-MTAB-2958), [E-MTAB-2959](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=E-MTAB-2959) (ref. ³¹), [GSE81285](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE81285) (ref. ³⁰) and [GSE31381](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE31381) (ref. ³²). All other data supporting the findings of this study are available from the corresponding author on reasonable request.

Acknowledgements

We are grateful to the PBES Lyon for technical assistance. We thank V. Azuara and D. Stupack for critical reading of the manuscript and L. Favre-Louis for technical assistance. This work was supported by institutional grants from INSERM/CNRS, Atip-avenir, Plan cancer, La ligue contre le cancer nationale et régionale (F.L.), INCa (F.L.), Fondation ARC (F.L., G.F. and D.O.), Centre Léon Bérard (F.L. and A.H.), Fondation pour la recherche médicale (F.L.), National Institutes of Health (R01-HD081534 (B.J.M.)), ANR (P.M.), ERC (P.M.) Max Planck Society (A.M.) and the DFG Forschergruppe 2722 (M.K.).

Author contributions

A.H. and G.F. performed most of the experiments in Figs. 1–7. D.O. performed experiments in Figs. 1, 5 and 7. X.G. and N.C. performed experiments in Figs. 1, 3 and 5. A.M., C.G. and C.R. performed and analysed ChIP-seq experiments. J.C. and N.R. carried out the bioinformatic analyses. M.K. and T.I. produced recombinant Netrin-1 used in Figs. 4 and 5. P.W. performed teratoma experiments. F.L., A.H., G.F. and D.O. designed experiments. F.L. initiated, designed and supervised the study. F.L. wrote the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

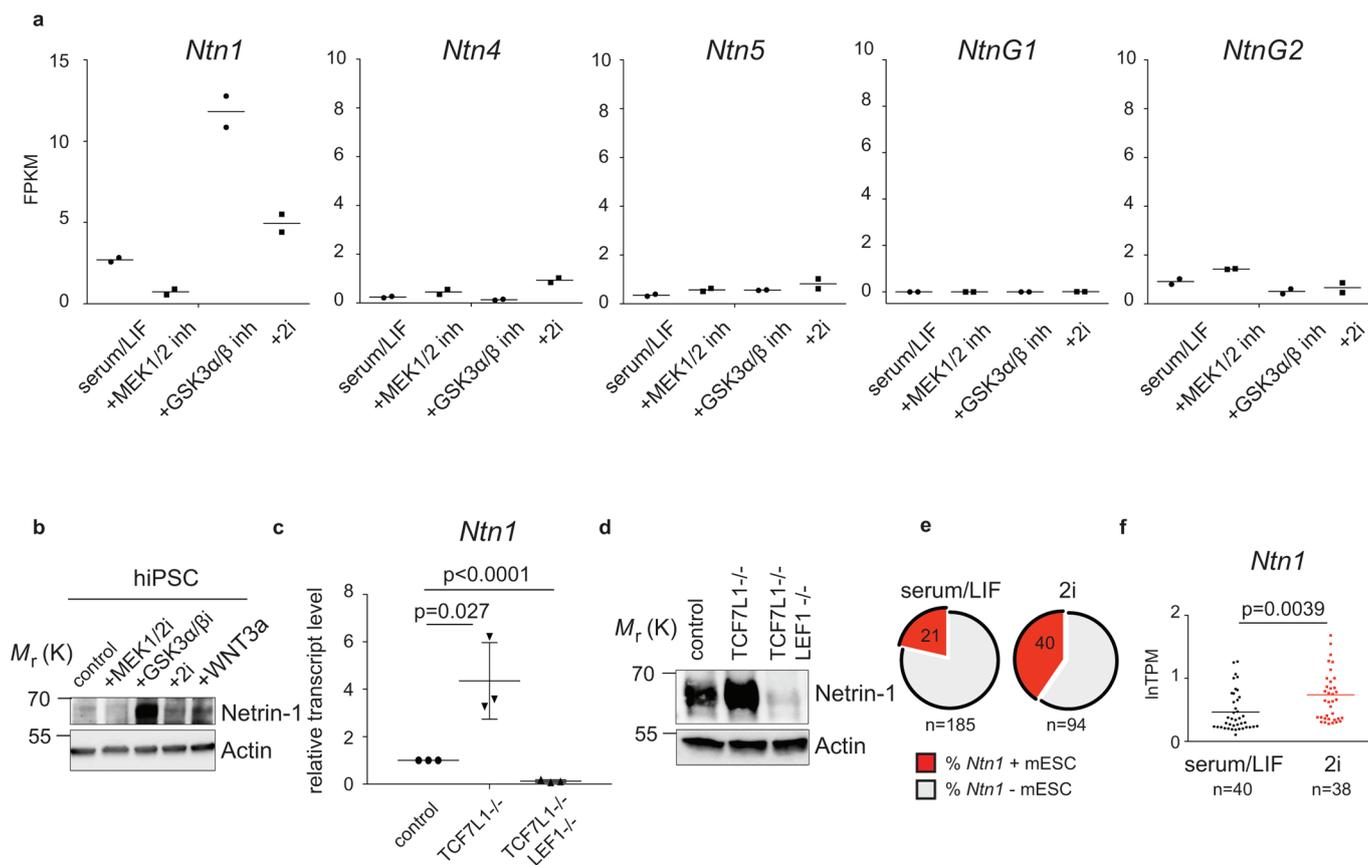
Additional information

Extended data is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41556-020-0483-2>.

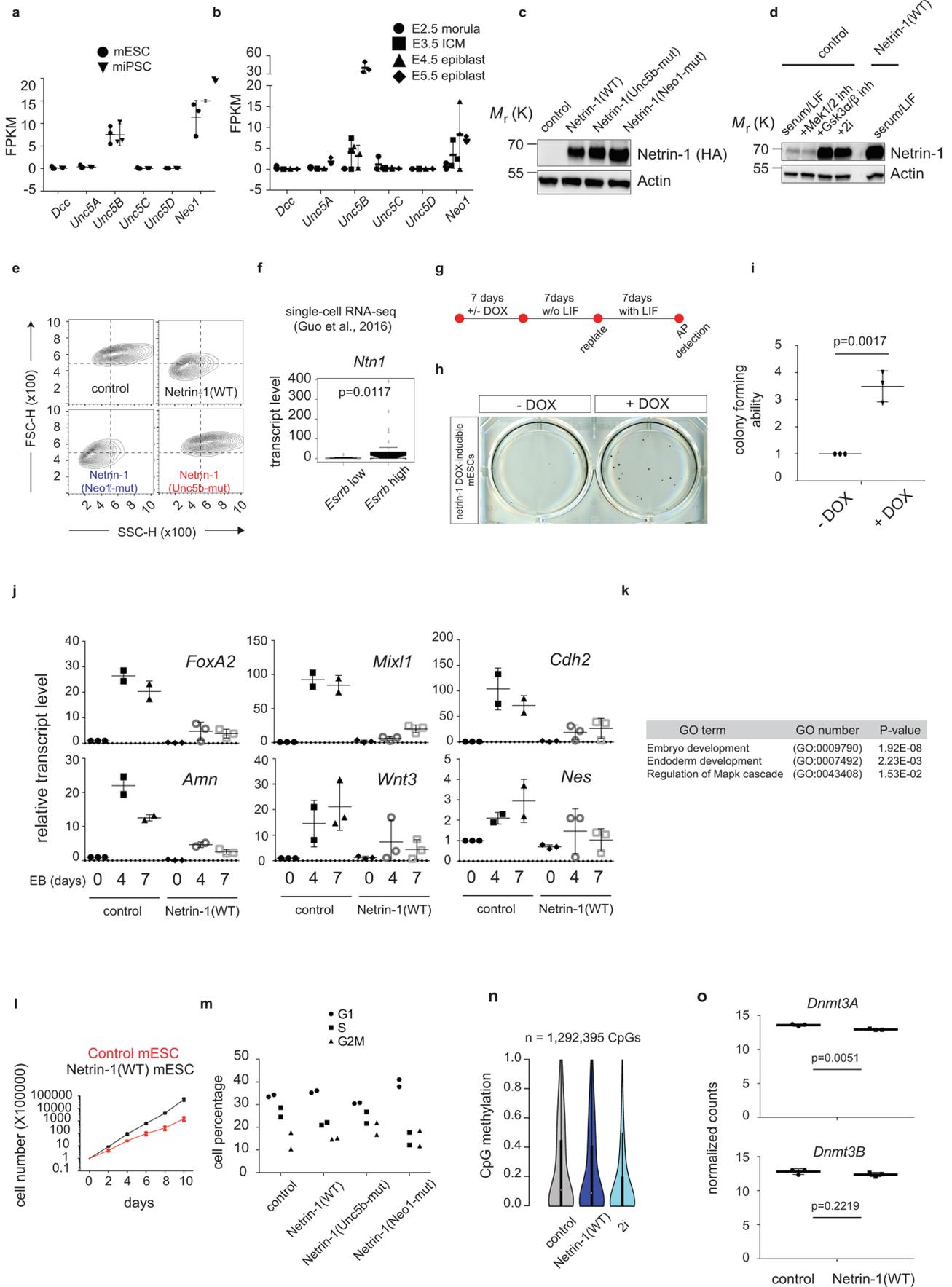
Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41556-020-0483-2>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to F.L.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

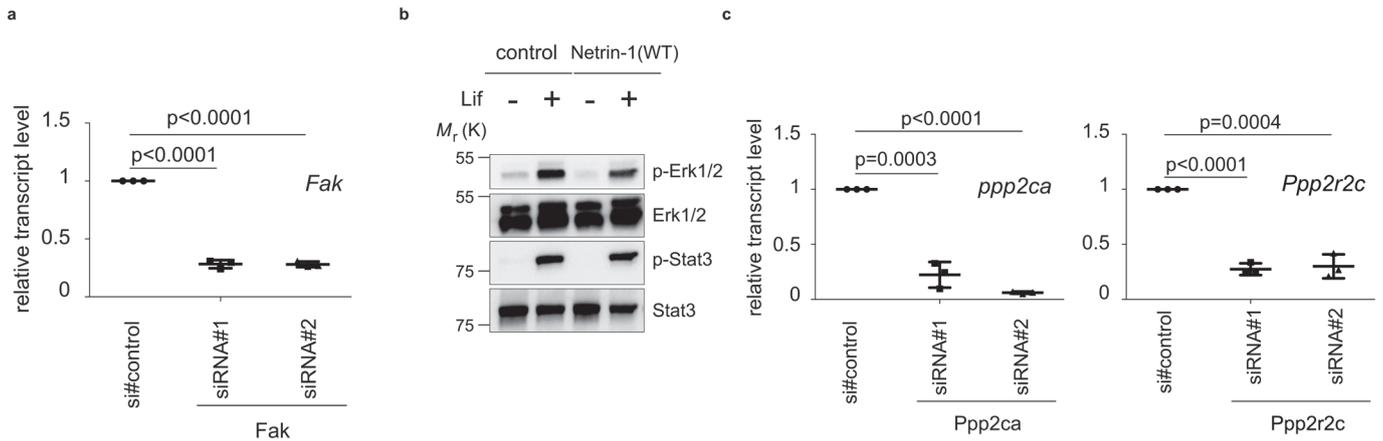


Extended Data Fig. 1 | Netrin-1 is expressed in naive pluripotent cells *in vitro*. (a) Data present FPKM values for *Ntn1*, *Ntn4*, *Ntn5*, *NtnG1* and *NtnG2* in serum/Lif mESCs treated or not with Mek1/2-inh (PD), Gsk3α/β-inh (CHIR) or both (2i). 2 independent experiments. (b) Western blot depicting netrin-1 levels in human iPSCs treated similarly as (a) (3 independent experiments). (c) *Netrin-1* transcripts level in indicated mESCs. Q-RT-PCR data are expressed relative to mESCs as the mean ± s.d. (n = 3 independent experiments). Student's t-test was used and two-tailed p-values are indicated. (d) Netrin-1 western blot in indicated mESCs (3 independent experiments). (e) *Netrin-1* expression in single mESCs in Serum/Lif and 2i. Single-cell transcriptomic data are extracted from Kumar et al., 2014, ref. ²⁸. n = number of cells analysed in each condition. (f) *Netrin-1* mean expression in single mESCs. Data are extracted from Kumar et al., 2014, ref. ²⁸. n = number of cells analysed in each condition. The bar represents the mean ± s.d. of *netrin-1* expression in the 2 conditions. Student t-test was used and two-sided p-value is indicated.

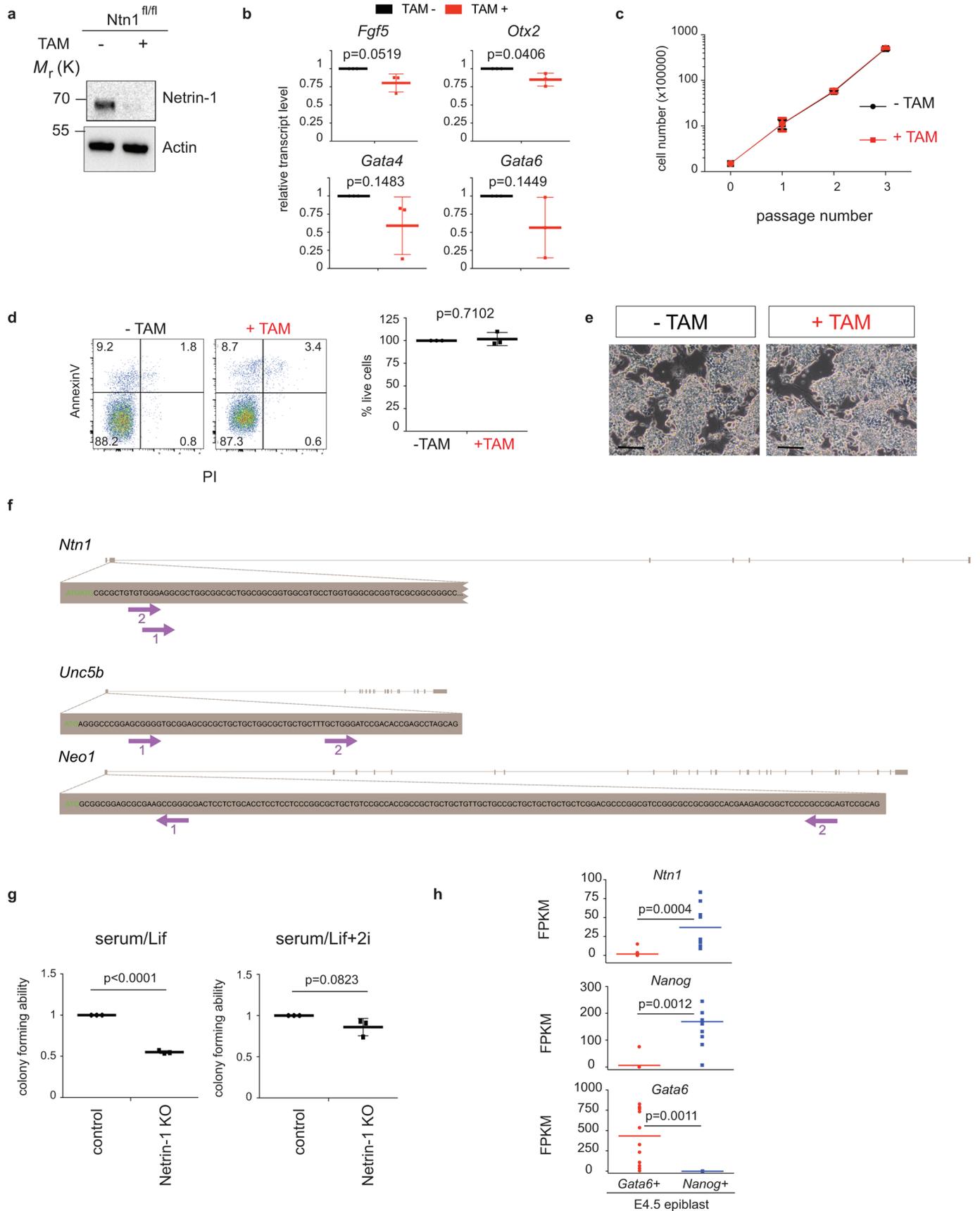


Extended Data Fig. 2 | See next page for caption.

Extended Data Fig. 2 | Netrin-1 triggers pluripotency features partially overlapping with the ground state. **(a)** Netrin-1 receptors transcript levels in mouse ES and iPS cells. RNA-seq data are presented as FPKM values and expressed as the mean \pm s.d. ($n=3$ independent experiments). **(b)** Netrin-1 receptors expression during early mouse development. Data, extracted from Boroviak. et al., 2015, ref. ³¹, present transcripts level in FPKM. Data are presented as the mean \pm s.d. ($n=3$ independent experiments). **(c)** Western blot performed in the indicated cell lines (3 independent experiments). **(d)** Western blot performed in the indicated mESCs grown in serum/Lif (3 independent experiments). **(e)** FACS analysis (FSC/SSC) of the different populations grown in serum/Lif. **(f)** netrin-1 expression in ES cells subpopulations. Data are extracted from Guo et al. 2016, ref. ²⁹. *Esrrb* expression is used to distinguish quartiles of *Esrrb*^{high} ($>Q1$) and *Esrrb*^{low} ($<Q1$) cells. netrin-1 expression is analysed in the corresponding quartile. $n=48$ total cells were analysed, 12 cells for $<Q1$ and 36 cells for $>Q1$. Student's t-test was used and two-tailed p-value is indicated. **(g)** Scheme depicting exit from pluripotency assays. **(h)** Pictures of a single experiment representative of three independent ones. **(i)** Colony counting. Data are the mean \pm s.d. ($n=3$ independent experiments). Student's t-test was used and two-sided p-values are indicated. **(j)** Q-RTPCR depicts transcript level in mESCs and EBs generated with indicated cell lines. Data are the mean \pm s.d. $n=3$ independent experiments with exclusion of outliers. **(k)** Statistical overrepresentation analysis. Panther DB was used to detect overrepresented GO within differentially expressed genes. A Fisher's exact two-sided test was used to calculate p-values. $n=3$ independent samples. **(l)** Proliferation curves. Data are the mean \pm s.d. of 2 independent experiments. **(m)** Cell cycle features. Data are the mean \pm s.d. ($n=2$ independent experiments). **(n)** Violin plots displaying methylation levels for $n=1.3$ M matched CpGs. Bold line indicates 25-75th percentile, white dot indicates median. **(o)** *Dnmt3A* and *Dnmt3B* expression levels. Data are the mean \pm s.d. ($n=3$ independent experiments) of normalized counts. Student's T test was used and two-sided p-values are indicated.

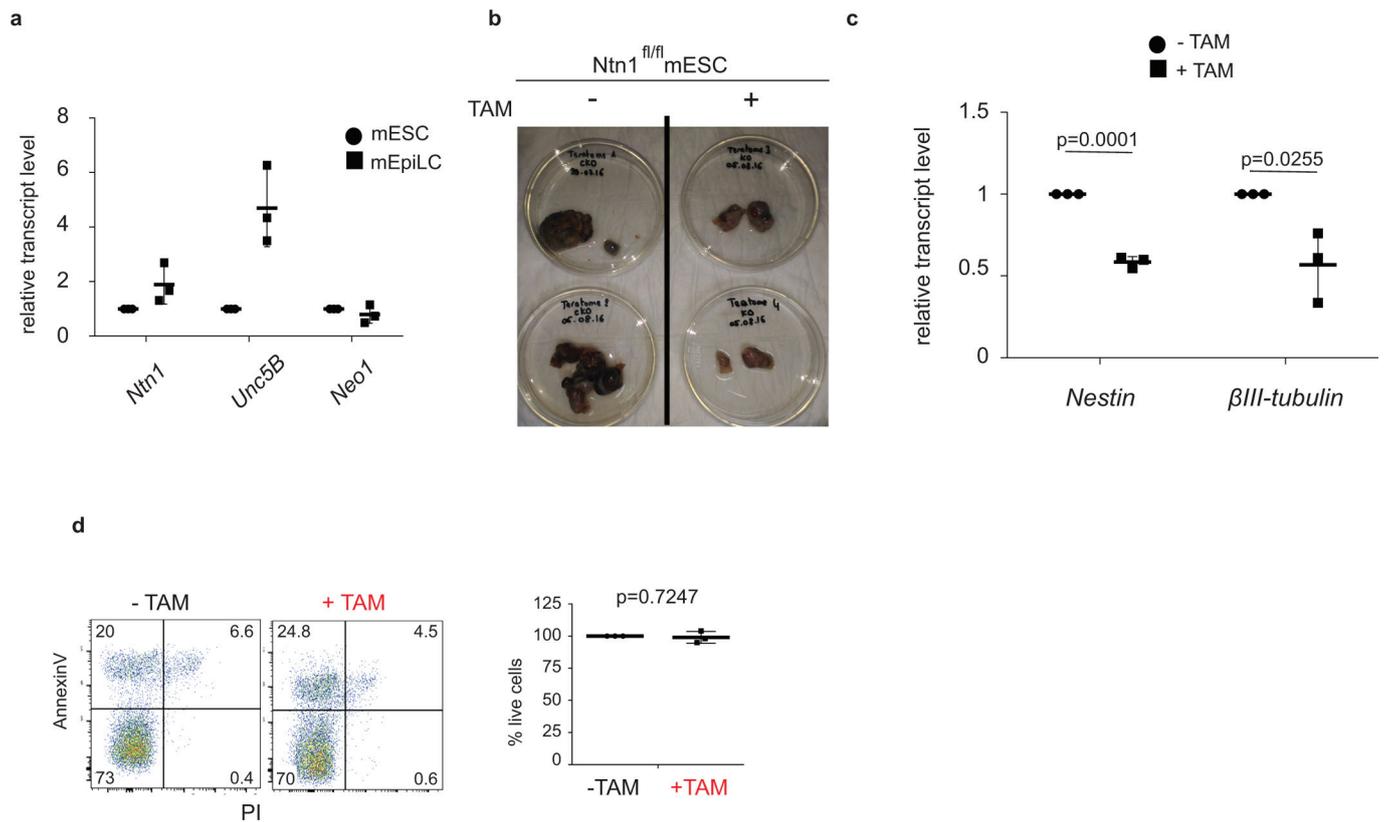


Extended Data Fig. 3 | Molecular cascade downstream of Netrin-1 in mESCs. (a) Knockdown efficiency of *Fak* in mESCs. Q-RT-PCR depicts *Fak* transcript level following transfection of netrin-1 mESCs with independent siRNA. Data, normalised to si#control mESCs, are the mean \pm sd of $n=3$ independent experiments. Student T-test was used and two-sided p-values are indicated. (b) Effect of netrin-1 signalling on Lif sensitivity. Control and netrin-1 (WT) mESCs were serum-starved ON and stimulated with Lif for 10 mins prior to samples collection (3 independent experiments). (c) Knockdown efficiency of *Ppp2ca* and *Ppp2r2c* in mESCs. Similar settings as (a). Data, normalised to si#control mESCs, are the mean \pm sd of $n=3$ independent experiments. Student T-test was used and two-sided p-values are indicated.



Extended Data Fig. 4 | See next page for caption.

Extended Data Fig. 4 | Endogenous Netrin-1 controls pluripotency features. **(a)** Western blot in $Ntn1^{fl/fl}$ mESCs treated or not with 4'OH-tamoxifen (TAM) for 3 days before collection (3 independent experiments). **(b)** Q-RT-PCR depicts *Fgf5*, *Otx2*, *Gata4* and *Gata6* transcript level following netrin-1 depletion in mESCs. Data are the mean \pm sd of $n=3$ independent experiments. Student T-test was used and two-sided p-values are indicated. **(c)** Proliferation curves. The $Ntn1^{fl/fl}$ mESCs, treated or not with TAM, were counted at each passage in serum/Lif. Data are the mean \pm sd of $n=3$ independent experiments. **(d)** Cell death analysis. The $Ntn1^{fl/fl}$ mESCs, treated or not with TAM, were grown for 2 days in N2B27+Lif before PI-AnnexinV staining was performed. The left panel presents a representative FACS profile and the right panel a graph of mean data \pm s.d. ($n=3$ independent experiments). Value 100% is given to the percentage of live cells in untreated $Ntn1^{fl/fl}$ mESCs. Student T-test was used and two-sided p-values are indicated. **(e)** Brightfield pictures of $Ntn1^{fl/fl}$ mESCs treated or not with 4'OH-tamoxifen and subsequently maintained in culture for 22 passages. Bars: 50 μ m. 3 independent experiments. **(f)** Scheme of the crisper/cas9 guides. The grey boxes correspond to exons, and pink arrows indicate the 2 independent guides for each locus. **(g)** Self-renewal assay. Control and netrin-1 KO mESCs are plated at clonal density in serum+Lif (left panel) or serum+Lif+2i (right panel) for 7 days before AP positive colonies was scored. Data are mean \pm s.d. ($n=3$ independent experiments). Student's t-test was used and two-sided p-values are indicated. **(h)** Gene expression in single blastomeres. Data, extracted from Nakamura et al., 2016 (ref. ⁴⁶), correspond to FPKM values. $n=9$ nanog positive cells $n=12$ gata6 positive blastomeres. Each dot corresponds to a cell, the bar is the mean \pm s.d. Student T-test was used and two-sided p-values are indicated.



Extended Data Fig. 5 | Netrin-1 controls coordinated differentiation. (a) *Neo1* and *Unc5B* expression in epiblast-like cells (EpiLC). Q-RTPCR data are expressed relative to mESCs as the mean \pm s.d. ($n=3$ independent experiments). (b) Pictures of teratoma obtained following injection of *Ntn1*^{fl/fl} mESCs treated (right panel) or not (left panel) with TAM 24 hours prior to injection. 4 independent teratoma per condition were analysed. (c) Q-RTPCR depicts *Nestin* and β III-tubulin levels at day 8 of differentiation in N2B27-Lif. Data are normalized to housekeeping genes and value 1 is given to day8 Ctrl mESCs. Data are the mean \pm s.d. ($n=3$ independent experiments). Student's t-test was used and two-sided p-values are indicated. (d) Cell death analysis. The *Ntn1*^{fl/fl} mESCs, treated or not with TAM, were grown for 2 days in N2B27-Lif before PI-AnnexinV staining was performed. The left panel present a representative FACS profile and the right panel a graph of mean data \pm s.d. ($n=3$ independent experiments). Value 100% is given to the percentage of live cells in untreated *Ntn1*^{fl/fl} mESCs. Student T-test was used and two-sided p-values are indicated.

II - Modulation de la pluripotence au cours du cycle cellulaire *via* le contrôle de l'expression de *Ntn1* et *Neo1*

Noémie Combémoré¹, Debora Libetti¹, Élodie Cascales¹, Nicolas Rama², Xavier Gaume¹, Célia Maruéjols¹, Maëva Ruel¹, Hubert Lincet¹, Julien Sage³, Fabrice Lavial^{1,4}

1. Cellular reprogramming and oncogenesis Laboratory - Lyon University, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, Centre Léon Bérard, Cancer Research Center of Lyon, Lyon, France
2. Dependence receptors, cancer and development Laboratory - Lyon University, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, Centre Léon Bérard, Cancer Research Center of Lyon, Lyon, France
3. Department of Pediatrics, 300 Pasteur Drive, Stanford University, Stanford, CA, 94305, USA; Department of Genetics, 300 Pasteur Drive, Stanford University, Stanford, CA, 94305, USA
4. Correspondance : fabrice.lavial@lyon.unicancer.fr

Introduction

Dans l'étude précédente, nous avons réalisé une analyse poussée de la fonction de la voie NTN1 dans le cadre de la pluripotence naïve. Nous avons tout d'abord montré que les seuls acteurs de la voie exprimés dans ce contexte sont NTN1, NEO1 et UNC5B. Nous avons également révélé que l'expression de NTN1 était hétérogène dans la population de CSE. Par ailleurs, nous avons montré dans cette étude que la Nétrine-1 était une molécule de signalisation qui à travers ses récepteurs UNC5B et NEO1 promeut la pluripotence naïve. Ces propriétés sont liées à l'activation en aval de NTN1 de la voie WNT *via* l'inhibition de GSK3 α/β et à la répression de la voie MAPK *via* l'inhibition de ERK1/2. Enfin, nous avons montré que ce contrôle de la pluripotence naïve par NTN1 *in vitro* était également important *in vivo*, puisque les embryons n'exprimant pas NTN1 présentaient au stade E3,75 un déficit du nombre de cellules présentes dans leur MCI, exposant ainsi un rôle conséquent de NTN1 dans le maintien du compartiment pluripotent de l'embryon.

Bien que ce travail nous ait donc permis d'avoir une idée beaucoup plus claire du rôle de NTN1 dans les CSE, de nombreuses zones d'ombres persistaient.

Premièrement, alors qu'il était désormais apparent que toutes les cellules de la population n'exprimaient pas NTN1, l'état d'expression de NEO1 et UNC5B demeurait inconnu. En effet, nous avons révélé que l'expression de NTN1 était hétérogène dans la population de CSE, avec environ 8% seulement de cellules exprimant NTN1 à un moment *t* en milieu sérum + LIF (Huyghe et al. 2020, Fig. 1d). De plus, ayant utilisé un système nécessitant de fixer les cellules, nous ignorions si une petite partie de la population était responsable de la sécrétion de NTN1 ou si toutes les cellules en étaient capables, et si son expression était donc dynamique. La question de l'interconvertibilité de cet état de sécrétion ou non de NTN1 nous intriguait également.

Deuxièmement, nous avons pu constater dans cette première étude que NEO1 et UNC5B ont visiblement des rôles non redondants. En effet, lors de la différenciation en corps embryoïdes, l'expression de NEO1 diminue alors qu'UNC5B est fortement induit (Huyghe et al. 2020, Fig. 7a). Cela aurait pu signifier un rôle antagoniste de NEO1 et UNC5B, le premier étant responsable du maintien de la pluripotence et l'autre de l'engagement vers la différenciation. De manière évidente, la réalité est cependant plus subtile. En effet, l'expression forte de NTN1 et UNC5B semble causer une baisse de l'expression des facteurs NANOG et ESRRB, et réduire la résistance des CSE à la différenciation. Cependant, la délétion d'UNC5B provoque la diminution du nombre de colonies formées lors d'un test AP (Huyghe et al. 2020, Fig. 5h), ce qui laisse penser que le rôle d'UNC5B lors de la différenciation est plus subtil, et montre ainsi que nous n'avons pas vraiment réussi à identifier précisément la fonction respective de NEO1 et UNC5B.

Enfin, comme évoqué dans l'introduction p.32, les études récentes montrent que la condition classique de culture des CSE en sérum+LIF donnerait en fait lieu à un mélange hétérogène d'états pluripotents métastables, plus ou moins proches de l'engagement vers la différenciation. Dans ce contexte, nous souhaitions savoir si la balance de l'expression des

récepteurs UNC5B/NEO1 pouvait donner lieu à un éventail de réponses à la NTN1, et ainsi participer à la création de cette hétérogénéité.

Toutes ces questions restées sans réponse ont mené à l'élaboration de l'étude que je vais maintenant présenter dans cette seconde partie des résultats de mon travail de thèse.

NTN1, NEO1 et UNC5B sont exprimés de manière hétérogène dans la population de CSE

En premier lieu, afin d'avoir une idée de l'hétérogénéité potentielle de *Ntn1*, *Neo1* et *Unc5b*, j'ai analysé des données de séquençage ARN de cellules uniques présentes dans la littérature. En particulier, une étude de Kumar et ses collègues étudiant l'hétérogénéité transcriptomique dans les CSE (Kumar et al. 2014) révèle qu'en effet, *Ntn1*, *Neo1* et *Unc5b* sont exprimés de manière hétérogène dans la population en sérum+LIF (Figure 18a). *Ntn1* est exprimé par 21% des CSE, alors que *Neo1* et *Unc5b* sont légèrement plus exprimées, avec respectivement 34% et 38% de cellules dans lesquelles on peut détecter leur ARN. De manière intéressante, toutes les configurations possibles semblent exister, avec des cellules n'exprimant aucune des trois molécules, d'autres exprimant deux parmi les trois, et enfin certaines exprimant les trois à la fois.

Cette étude ainsi que les résultats obtenus dans la première partie de mon manuscrit confirment donc l'hétérogénéité de l'expression de *Ntn1* dans les cellules pluripotentes. Cependant, les méthodes employées n'autorisent pas une étude de la dynamique de cette expression, puisque les cellules sont fixées. De plus, la profondeur de séquençage des études sur les cellules uniques est souvent insuffisante pour les gènes faiblement exprimés, dont font partie *Ntn1*, *Neo1* et *Unc5b*. Il est également important de noter qu'il n'existe pas d'anticorps commercial permettant une détection fiable de l'expression de NTN1, NEO1 ou UNC5B par immunofluorescence.

Afin de pouvoir étudier en direct l'hétérogénéité de l'expression de *Ntn1*, j'ai tout d'abord généré une lignée monoclonale appelée pNtn1-ZsGreen de CSE transfectées avec un plasmide comportant deux éléments (Figure 18b) : un promoteur *Ntn1* partiel (2,7kb) déjà utilisé dans une étude de mon laboratoire présentée dans l'introduction (Ozmadenci et al. 2015, Fig. 4e), et une cassette ZsGreen codant pour une protéine fluorescente verte à laquelle a été fusionnée une séquence de déstabilisation, lui octroyant ainsi une demi-vie très courte (environ 4h) (X. Li et al. 1998). J'ai utilisé cette lignée cellulaire afin de réaliser des vidéos de la population sur une durée de 17h, ce qui m'a permis de confirmer l'activation fortement hétérogène du promoteur de *Ntn1* dans la population (Figure 18c). Néanmoins, ce système ne nous satisfaisait pas car il était imparfait : il reflète seulement l'activation d'un promoteur non endogène de *Ntn1*, auquel il manque potentiellement des éléments régulateurs. En effet, les cellules produites ne répondaient par exemple pas à l'utilisation du 2i comme attendu, laissant penser que ce promoteur ne représentait pas vraiment fidèlement l'activation de l'expression de *Ntn1* (données non présentées).

Nous avons donc décidé d'employer un système plus complet et plus ambitieux. J'ai créé un modèle de rapporteur trois couleurs (3C) nous permettant de suivre l'activation endogène dans des cellules vivantes du promoteur du ligand *Ntn1* et de ses récepteurs, *Neo1* et *Unc5b* grâce à la technique CRISPR-Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-Caspase 9). J'ai réalisé un triple knock-in, insérant séquentiellement à la fin des gènes *Ntn1*, *Neo1* et *Unc5b* trois cassettes comprenant à chaque fois une fluorescence (respectivement *GFP*, *mTagBFP2* et *mCherry*) et un gène de résistance (Figure 18d). Les différentes fluorescences ont été sélectionnées pour leur brillance forte, leur emploi documenté dans des cellules de mammifères et leurs fenêtres d'émission très distinctes, limitant ainsi le besoin de réaliser des compensations. Les différents gènes ciblés et les séquences codant pour les fluorescences et résistances sont séparés par des séquences 2a, qui codent pour un peptide clivé à la traduction (de Felipe et al. 2006), détachant donc l'expression protéique de NTN1, NEO1 et UNC5B de celle des protéines fluorescentes. Ceci permet d'éviter les problèmes de mauvais repliement des protéines ou de masquage de séquence entraînant une perturbation

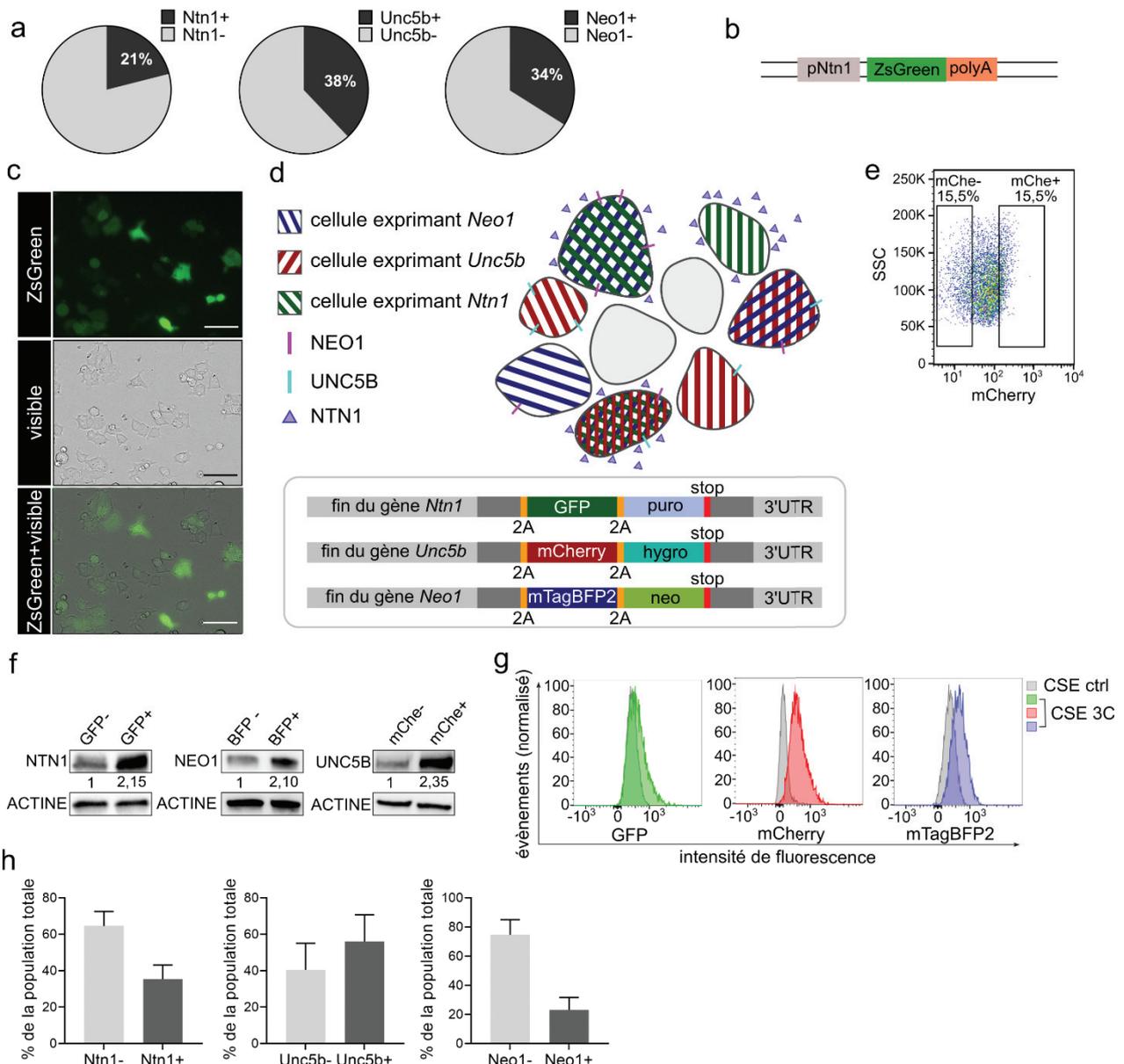


Figure 18 : L'expression de *Ntn1*, *Neo1* et *Unc5b* est hétérogène dans la population de CSE.

(a) Expression de *Ntn1*, *Neo1* et *Unc5b* dans des CSE cultivées en sérum+LIF et analysées en cellule unique. Les données de transcriptomique sont extraites de l'étude de Kumar et ses collègues (Kumar et al. 2014). $n = 185$ cellules analysées. (b) Schéma de la construction utilisée, avec laquelle les CSE murines ont été transfectées de manière stable. *pNTN1*, promoteur partiel de *Ntn1* de 2,7kb ; polyA, polyadénosine. (c) Photographies représentatives de CSE *pNtn1-ZsGreen* en *ZsGreen*, lumière visible et *ZsGreen+lumière visible*. Barres d'échelle : 30 μ m. (d) Schéma du modèle CSE 3C. Les cellules ont été modifiées par CRISPR-Cas9 afin d'obtenir un triple knock-in à la fin des gènes *Ntn1*, *Neo1* et *Unc5b* endogènes. Les cellules exprimant ainsi *Ntn1* expriment GFP simultanément, les cellules exprimant *Unc5b* expriment mCherry, et les cellules exprimant *Neo1* expriment mTagBFP2. *puro*, gène de résistance à la puromycine ; *hygro*, gène de résistance à l'hygromycine ; *neo*, gène de résistance à la neomycine ; 3'UTR, région non transcrite en 3'. (e) Profil FACS représentatif des tris réalisés afin d'isoler les populations négatives et positives pour chaque fluorescence (ici, mCherry). mChe, mCherry. (f) Western-blot de CSE triées pour l'expression positive ou négative des fluorescences décrites précédemment. $n = 3$ expériences indépendantes. (g) Histogrammes représentatifs montrant le nombre d'évènements en fonction de l'intensité mesurées par FACS des fluorescences GFP, mCherry et mTagBFP2 des CSE contrôles (ctrl) comparées aux CSE 3C. (h) Quantification des populations positives ou négatives pour l'expression de *Ntn1*, *Unc5b* et *Neo1* mesurées par FACS dans les CSE 3C. $n = 3$ expériences indépendantes.

de la fonction du gène rapporté. En revanche, l'absence de fusion signifie que ce rapporteur suit principalement l'expression de l'ARN et non de la protéine. J'ai cependant validé l'enrichissement de NTN1, NEO1 et UNC5B par Western-Blot (WB) dans les populations triées respectivement GFP-/+ , mTagBFP2-/+ et mCherry-/+ (Figure 18e), et ai pu constater que les populations exprimant fortement les fluorescences exprimaient également la protéine associée de manière plus importante (Figure 18f). À partir de ce moment, j'ai donc considéré les populations triées GFP-/+ comme étant *Ntn1*-/+ , mTagBFP2-/+ comme étant *Neo1*-/+ , et mCherry-/+ comme étant *Unc5b*-/+ , pour une facilité d'écriture et de compréhension du lecteur. Il est cependant important de noter que les populations « - » ne sont pas négatives pour l'expression de NTN1, NEO1 ou UNC5B, mais présentent un niveau d'expression plus faible que les populations « + ».

J'ai d'abord validé ce système par PCR (Polymerase Chain Reaction), quantification du nombre de copies insérées dans le génome et microscopie (Annexe 1a,b,c,d). J'ai ensuite analysé la répartition de l'expression endogène de *Ntn1*, *Neo1* et *Unc5B* au sein de la population de CSE afin de confirmer les résultats précédents. L'analyse au FACS (Fluorescence activated cell sorting) de la lignée de CSE 3C a révélé que l'expression endogène de *Ntn1*, *Neo1* et *Unc5B* est hétérogène, avec des pourcentages similaires à ceux rapportés dans l'étude de Kumar et ses collègues, bien qu'un peu plus faibles pour *Neo1* et un peu plus fort pour *Unc5b* (Figure 18g,h). Environ 35% de cellules en moyenne sont positives pour l'expression de *Ntn1* (*Ntn1*+), 23% pour l'expression de *Neo1* (*Neo1*+) et 56% pour l'expression d'*Unc5b* (*Unc5b*+). Ce pourcentage peut cependant varier de manière conséquente selon les expériences. Il est également important de noter que l'intensité de fluorescence est considérablement faible

(Figure 18g), ce qui est attendu pour un rapporteur d'expression endogène notamment dans le cas de *Ntn1*, *Neo1* et *Unc5b* qui sont exprimés plutôt faiblement comparés à d'autres gènes, mais cet élément technique nous a beaucoup limité en termes d'approches possibles. En effet, malgré de nombreuses tentatives incluant l'utilisation d'anticorps anti-GFP ou le changement des conditions de culture en 2i+LIF par exemple, nous avons par exemple renoncé à étudier de manière approfondie les CSE 3C au microscope car l'intensité de fluorescence nécessaire n'était pas atteignable.

Ayant confirmé l'hétérogénéité de l'expression de *Ntn1*, *Neo1* et *Unc5b* dans la population de CSE, nous nous sommes ensuite demandé si elle était fixée dans le temps ou si les cellules pouvaient activement allumer et éteindre ces gènes.

NTN1, NEO1 et UNC5B sont exprimés dynamiquement dans la population de CSE

Afin de vérifier l'hypothèse selon laquelle l'expression de *Ntn1* n'était pas restreinte à une partie de la population de CSE, j'ai établi une nouvelle lignée cellulaire monoclonale pNtn1-CRE comportant une CRE recombinase située sous le contrôle du promoteur *Ntn1* utilisé précédemment (Figure 18b), ainsi qu'une séquence *Gfp* précédée d'un codon stop encadré par deux sites *Lox* (Figure 19a). Dans ce système, l'activation du promoteur *Ntn1* entraîne la production de la CRE, qui va sous contrôle du tamoxifène exciser le codon STOP, et va par conséquent rendre les cellules positives à la GFP de manière permanente. Les CSE pNtn1-CRE ont été traitées au tamoxifène sur plusieurs semaines, et analysées au FACS tous les sept jours (Figure 19b). Lorsque les cellules sont traitées au tamoxifène, on observe une augmentation stable et constante du pourcentage de cellules GFP+ au fil des semaines (Figure 19c). Ce pourcentage reste cependant faible, ce qui peut être expliqué par exemple par une cinétique insuffisamment longue ou par un défaut de ce promoteur. J'ai également réalisé un contrôle où le traitement au tamoxifène a été arrêté au bout de 3 semaines, afin de vérifier que cette augmentation n'était pas due à une fuite du système CRE, ce qui est bien le cas. La production de NTN1 ne semble donc pas restreinte à une petite proportion définie de la population.

L'analyse plus précise des vidéos de la population pNtn1-ZsGreen m'a permis d'observer une forte dynamique intracellulaire d'expression de *Ntn1*. En effet, lorsque l'on s'intéresse à une cellule, on peut voir que l'intensité de fluorescence de cette dernière varie en fonction du temps, de façon très rapide (Figure 19d). De manière fascinante, on peut voir que l'intensité de la ZSGREEN semble devenir maximale juste avant la division cellulaire. Cette observation, ajoutée à la grande fluctuation de l'expression de *Ntn1*, *Neo1* et *Unc5b*, nous a mené à l'hypothèse que cette expression dynamique pouvait être liée au cycle cellulaire, ce que nous avons exploré plus en détail plus tard dans l'étude.

Par la suite, j'ai souhaité tester l'interconvertibilité des populations exprimant ou non NTN1, NEO1 et UNC5B. Tout d'abord, j'ai trié les CSE pNtn1-ZsGreen en fonction de leur expression ZSGREEN positive (ZsGreen+) ou négative (ZsGreen-), avant de les remettre en culture et de les analyser sept jours plus tard au FACS (Figure 19e). Cette expérience a révélé que les populations exprimant ou non NTN1 sont interconvertibles, puisqu'une semaine après le tri,

la moitié environ des cellules ZsGreen+ sont devenues ZsGreen-, et environ 24% des cellules ZsGreen- sont devenues ZsGreen+ (Figure 19f). Cette cinétique est similaire à ce qui a été décrit dans le cadre de l'étude de l'hétérogénéité de NANOG (Chambers et al. 2007). Le tri cellulaire des lignées 3C sur les cellules GFP+ (Ntn1+), GFP- (Ntn1-), mTagBFP2+ (Neo1+) et mTagBFP2- (Neo1-) montre que cette interconvertibilité existe également dans le cadre de l'expression de *Neo1* (Figure 19g,h). De plus, elle est bien plus dynamique que dans le système pNtn1-ZsGreen, puisque à 48h, on ne distingue déjà plus de différence entre les populations Ntn1+ et Ntn1- initiales.

On peut remarquer que dans les deux cas, les populations exprimant le facteur ont une cinétique différente de celles ne l'exprimant pas. En effet, les populations triées GFP+ ou mTagBFP2+ perdent brusquement, dans les premières 24h, une grande partie de leurs cellules qui deviennent négatives avant d'atteindre un plateau, alors que les populations triées GFP- ou mTagBFP2- présentent une augmentation stable de leur pourcentage de cellules positives, et donc de cellules qui activent l'expression de *Ntn1* ou *Neo1*. Il est également intéressant de noter que l'interconvertibilité de *Neo1* semble être légèrement plus lente que celle de *Ntn1*, puisque à 48h la différence entre les populations Neo1+ et Neo1- est toujours significative.

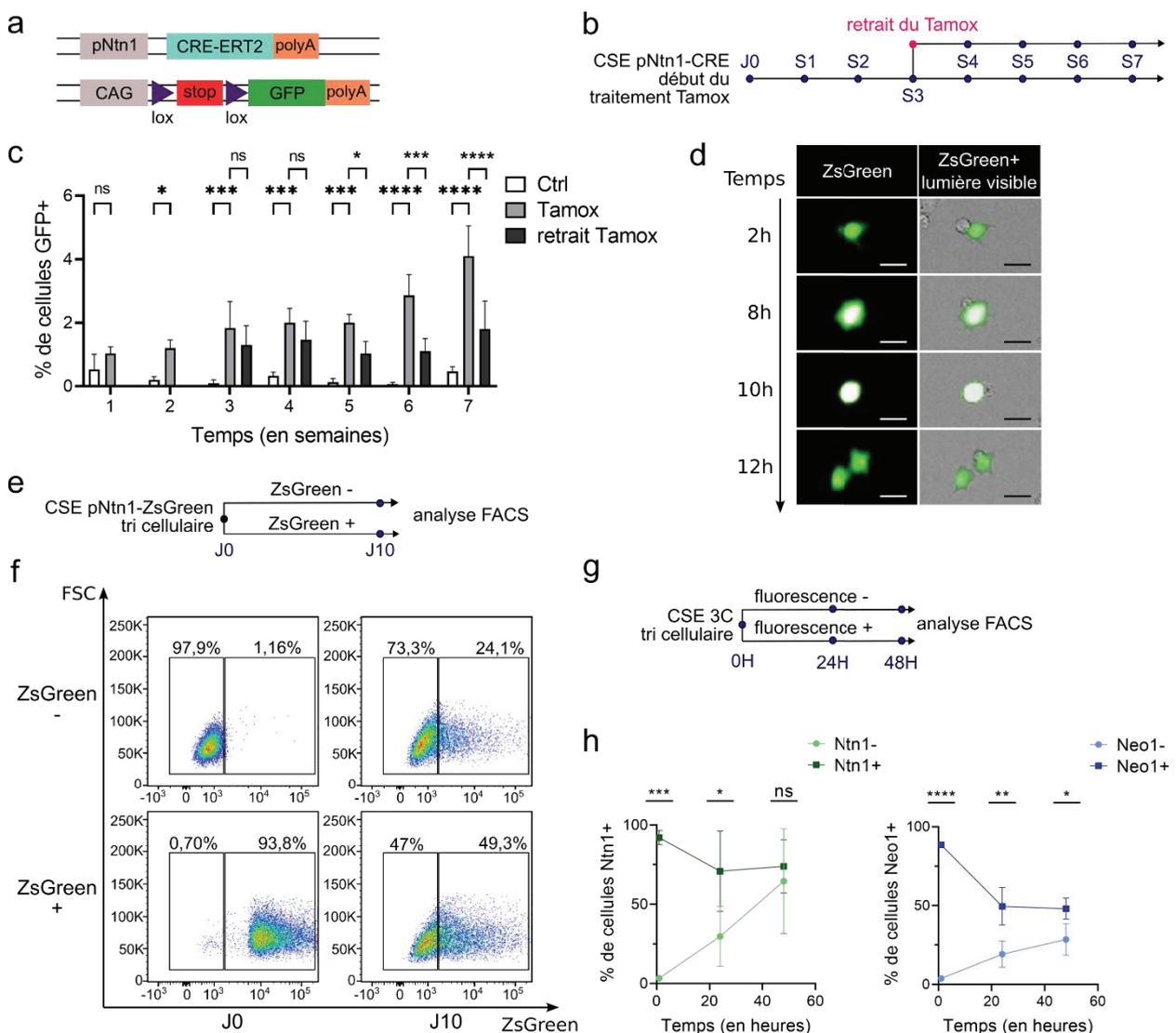


Figure 19 : L'expression de *Ntn1*, *Neo1* et *Unc5b* est dynamique dans la population de CSE.

(a) Schéma des constructions utilisées, avec lesquelles les CSE murines ont été transfectées de manière stable. *pNtn1*, promoteur partiel de *Ntn1* de 2,7kb ; CAG, promoteur fort ; *lox*, site de recombinaison ; *polyA*, polyadénosine. (b) Représentation schématique de l'expérience réalisée. Les CSE ont été traitées avec du tamoxifène (Tamox) à partir de J0, et une lecture de leur fluorescence GFP a été effectuée une fois par semaine. À partir de la semaine 3, le traitement a été arrêté pour une partie des cellules. J, jour ; S, semaine. (c) Quantification du pourcentage de cellules GFP+ au cours du temps. ns, non significatif ; *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,0005$, ****, $p < 0,0001$. $n = 3$ expériences indépendantes. (d) Photographies ZsGreen et ZsGreen+lumière visible suivant une cellule au cours du temps jusqu'à sa division. Barres d'échelle : $15\mu\text{m}$. (e) Représentation schématique de l'expérience réalisée. Les CSE *pNtn1*-ZsGreen ont été triées en fonction de leur expression ZsGreen-/+ , analysées au FACS et remises en culture, avant d'être analysées à nouveau 10 jours plus tard. J, jour. (f) Analyse FACS du pourcentage de cellules ZsGreen en fonction de la FSC. J, jour. $n = 2$ expériences indépendantes. (g) Représentation schématique de l'expérience réalisée. Les CSE 3C ont été triées en fonction de leur expression positive ou négative des fluorescences GFP et *mTagBFP2* et analysées, et re-analysées 24h et 48h plus tard. (h) Évolution du pourcentage de cellules positives *Ntn1*+ ou *Neo1*+ en fonction du temps. ns, non significatif ; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,005$; ***, $p < 0,0005$, ****, $p < 0,0001$. $n = 3$ expériences indépendantes.

Malheureusement, les tentatives de tri sur mCherry n'ayant pas atteint les standards de puretés que nous nous étions fixés pour cette expérience (>80%), cette expérience n'a pu être réalisée pour *Unc5b* dans le temps imparti pour ma thèse, bien qu'il semble également exister une interconvertibilité.

J'ai donc pu montrer grâce à mes différents systèmes que l'expression de NTN1, NEO1 et UNC5B était hétérogène et que les cellules étaient capables de passer d'un état d'expression positive à négative, et inversement. J'ai par la suite souhaité étudier les sous-populations délimitées par l'expression de *Ntn1*, *Neo1* et *Unc5b* afin de voir si elles présentaient des différences morphologiques, fonctionnelles, ou d'expression protéique en dehors de cette expression différentielle de *Ntn1*, *Neo1* ou *Unc5b*.

L'expression de NTN1, NEO1 et UNC5B délimite des sous-populations de CSE présentant des propriétés distinctes

Les CSE 3C ont été analysées au FACS afin d'avoir une idée précise des différentes sous-populations existantes et de leur proportion dans la population (Figure 20a). J'ai ainsi mis en évidence l'existence de huit sous-populations distinctes, présentes en diverses proportions dans la culture. De manière intéressante, on peut voir que la répartition n'est pas du tout la même quand on compare entre les populations exprimant fortement ou faiblement *Ntn1*, *Neo1* ou *Unc5b*. En effet, si on s'intéresse par exemple aux cellules triées *Unc5b*- et *Unc5b*+, les cellules qui expriment au moins soit *Ntn1* soit *Neo1* représentent environ 30% des cellules *Unc5b*-, et environ 55% des cellules *Unc5b*+. De manière similaire, si on compare les

populations positives pour *Ntn1*, *Neo1* ou *Unc5b* entre elles, on constate que des différences apparaissent, et de même avec les populations négatives. Par exemple, si on s'intéresse aux cellules *Neo1+*, on peut voir qu'elle est constituée à 69% de la sous-population triple positive *Ntn1+/Neo1+/Unc5b+*, mais que la proportion de cette sous-population diminue à environ 52,7% dans les cellules *Ntn1+*, et qu'elle constitue seulement 22% environ des cellules *Unc5b+*. Cette analyse nous a également indiqué que les populations exprimant seulement *Neo1* ou seulement *Neo1* et *Ntn1* sont plutôt rares. Plusieurs explications peuvent être apportées à ce phénomène. Premièrement, il est possible que des boucles d'auto-régulation de la voie Nétrine existent, et l'expression de *Neo1* pourrait ainsi par exemple induire celle d'*Unc5b*. Cependant, cette idée est contredite par les données obtenues précédemment avec les CSE délétées pour *Ntn1*, *Neo1* ou *Unc5b* (Huyghe et al. 2020, Fig.5f). En effet, nous avons pu observer que les KO de *Ntn1*, *Neo1* et *Unc5b* mènent à des augmentations du niveau d'expression protéique des autres acteurs de la voie, laissant ainsi penser qu'ils se répriment entre eux. Deuxièmement, il est possible que les cellules exprimant uniquement *Neo1* ou *Neo1* et *Ntn1* soient éliminées, par exemple par un système de compétition cellulaire comme celui existant pour les CSE n'exprimant pas le gène *Myc* (Díaz-Díaz et al. 2017). Enfin, il est possible que d'autres régulations externes existent et mènent à ce phénotype.

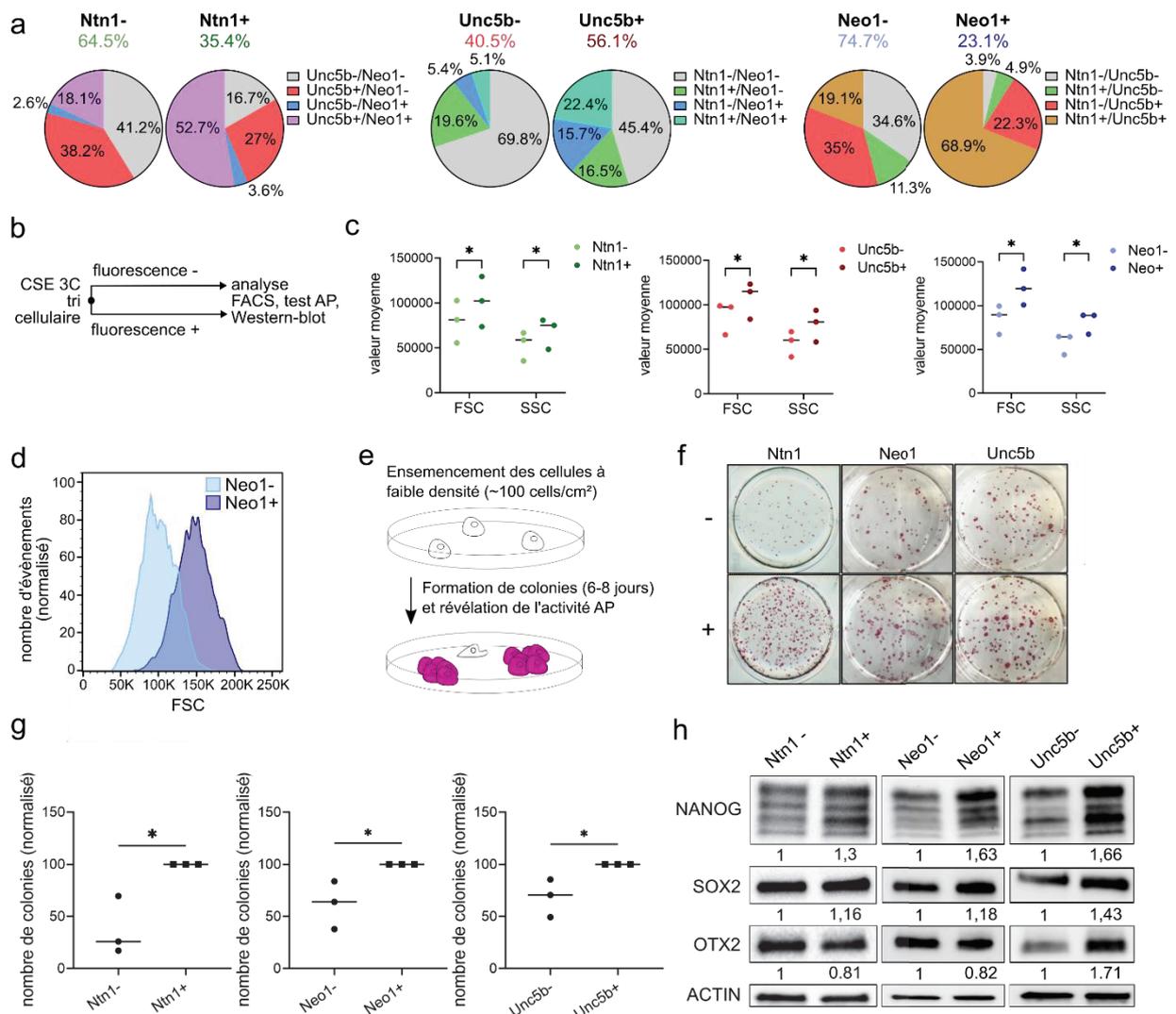


Figure 20 : L'expression de *Ntn1*, *Neo1* et *Unc5b* démarque des sous-populations aux propriétés spécifiques.

(a) Représentation de la répartition des différentes sous-populations exprimant ou non *Ntn1*, *Neo1* ou *Unc5b* dans la population de CSE. Les CSE 3C ont été analysées par FACS, et les données de $n = 3$ expériences indépendantes ont été moyennées et représentées ici. (b) Représentation schématique de l'expérience réalisée. Les CSE 3C ont été triées en fonction de leur expression positive ou négative de *Ntn1*, *Neo1* ou *Unc5b*, avant d'être analysées au FACS, par test AP ou par WB. (c) Quantification de la FSC et SSC moyenne des populations triées en fonction de leur expression positive ou négative de *Ntn1*, *Neo1* ou *Unc5b*. *, $p < 0,05$. $n = 3$ expériences indépendantes. (d) Histogramme représentatif de la FSC des populations *Neo1*- et *Neo1*+. (e) Représentation schématique de la réalisation d'un test AP. (f) Images représentatives des résultats des tests AP réalisés sur les populations de CSE 3C triées. (g) Comptages du nombre de colonies obtenues dans les tests AP, normalisés sur la population positive. $n = 3$ expériences indépendantes. (h) Western-blot réalisés sur les populations de CSE 3C triées. $n = 3$ expériences indépendantes.

Malheureusement, nous n'avons pas eu le temps d'explorer plus en détails ces hypothèses durant ma thèse.

Par la suite, j'ai souhaité caractériser ces différentes sous-populations afin de déterminer si elles avaient des propriétés différentes, et en particulier en ce qui concerne la pluripotence. L'idéal aurait été de trier les huit sous-populations afin de les étudier séparément et d'obtenir ainsi le maximum d'informations. Malheureusement, toutes mes tentatives en ce sens se sont soldées par un échec : en effet, les populations représentaient parfois un pourcentage insuffisant de la population totale, et je n'étais pas convaincue de la pureté du tri après validation par WB. Nous avons donc décidé dans un premier temps de caractériser les populations exprimant ou non *Ntn1*, *Neo1* ou *Unc5b* (Figure 20b).

Après un tri cellulaire, j'ai tout d'abord remarqué une différence de morphologie de ces différentes populations en termes de taille (FSC, forward scatter) et de granulosité (SSC, side scatter). En effet, les cellules exprimant *Ntn1*, *Neo1* et *Unc5b* sont significativement plus grosses et plus granuleuses comparées aux cellules ne les exprimant pas, indiquant ainsi une composition intracellulaire plus complexe (Figure 20c). Cette différence était particulièrement marquée lors de la comparaison des populations *Neo1*- et *Neo1*+ (Figure 20d).

J'ai ensuite étudié la clonogénicité des différentes sous-populations exprimant ou non *Ntn1*, *Neo1* ou *Unc5b*. J'ai pu observer que les cellules *Ntn1*+, *Neo1*+ et *Unc5b*+ sont respectivement plus clonogéniques que les populations *Ntn1*-, *Neo1*- et *Unc5b*- (Figure 20e,f,g).

Enfin, j'ai analysé l'expression protéique de marqueurs distinctifs des états de pluripotence naïve et amorcée dans les différentes sous-populations triées. Les cellules *Ntn1*+ et *Neo1*+ présentent par rapport aux cellules *Ntn1*- et *Neo1*- une expression plus forte des facteurs de transcription NANOG et SOX2 qui sont des marqueurs de pluripotence naïve, et une expression réduite d'OTX2 qui est un marqueur de la pluripotence amorcée (Figure 20h). En revanche, les cellules *Unc5b*+ ont un profil distinct puisque comparées aux cellules *Unc5b*-, elles expriment plus de NANOG et de SOX2 mais également plus d'OTX2, se démarquant ainsi

des populations Neo1+. De manière intéressante, ce profil d'expression de NANOG et OTX2 est semblable à celui des CSR, qui expriment fortement ces deux facteurs (Neagu et al. 2020). Le résultat précédent pouvait laisser penser que les cellules des populations « - » sont des populations en cours de différenciation ; cependant, on voit ici que la réalité est plus complexe, puisque ces populations conservent un niveau appréciable de NANOG et SOX2.

Ces résultats montrent que l'expression du ligand *Ntn1* et de ses deux récepteurs *Neo1* et *Unc5b* permet de définir au sein de la culture de CSE différentes sous-populations présentant différents profils de pluripotence. J'ai ensuite souhaité savoir si l'expression hétérogène des membres de la voie Nértrine était liée à des signaux intracellulaires ou si les changements environnementaux pouvaient également affecter cette variabilité.

NTN1, NEO1 et UNC5B sont exprimés différemment en fonction de la configuration pluripotente de la population

Nous avons montré dans la première étude de cette thèse que l'expression de NTN1 pouvait varier lorsque les cellules étaient traitées avec différents inhibiteurs, comme le 2i+LIF par exemple (Aurélia Huyghe et al. 2020, Fig. 1b). L'expression de NEO1 et UNC5B semble également varier lorsque les cellules sont cultivées dans des conditions de différenciation (Aurélia Huyghe et al. 2020, Fig. 7a). De plus, il a été rapporté que la modification du milieu cellulaire et des signaux associés pouvait faire varier l'hétérogénéité intercellulaire, et que les CSEF cultivées en 2i+LIF présentaient une grande homogénéité par rapport aux CSE en sérum+LIF (Kumar et al. 2014; Kolodziejczyk et al. 2015). Nous avons donc souhaité étudier de manière plus approfondie la modification de l'expression endogène de NTN1, NEO1 et UNC5B lorsque les cellules sont placées dans différentes configurations de pluripotence. Pour cela, nous avons utilisé les CSE contrôles cultivées en sérum+LIF et transférées pendant 48H dans des milieux induisant différents types de pluripotence avant que leur expression protéique ne soit analysée (Figure 21a,b).

De manière intéressante, on peut voir que chaque configuration pluripotente donne naissance à un patron d'expression particulier de NTN1, NEO1 et UNC5B (Figure 21c). En effet, alors que les CSEF présentent une expression extrêmement forte de NTN1 et NEO1, on voit qu'au cours de la progression du développement, l'expression de NTN1 diminue drastiquement. Au contraire, l'expression d'UNC5B augmente fortement dans les CSEpiL, ce qui est en accord avec les données de séquençage ARN que nous avons analysées dans notre première étude (Huyghe et al. 2020, Fig. supp. 5a), tandis que celle de NEO1 augmente et atteint un pic au stade CSR avant de diminuer à nouveau. Ceci indique potentiellement une fonction déterminante de ces deux facteurs à ces stades respectifs, et expliquerait au moins en partie la confusion précédente sur leurs rôles au cours de la différenciation. Dans ces circonstances, la temporalité de l'expression de NEO1 et UNC5B serait donc essentielle pour la sortie de la pluripotence.

Afin d'explorer de manière plus précise le phénotype lié à l'expression de *Ntn1*, *Neo1* et *Unc5b* dans la pluripotence post-implantation, j'ai dérivé une lignée de CSEpi 3C à partir de mes CSE

3C, d'après un protocole décrit dans la littérature (Rugg-Gunn 2017)(Figure 21d). En accord avec les données précédentes, l'expression protéique d'UNC5B dans les CSEpi est environ quatre fois plus importante que dans les CSE (Figure 21e). L'augmentation de cette expression pourrait être due soit à une quantité accrue d'UNC5B produite par les cellules, soit à un nombre plus important de cellules produisant Unc5b. L'analyse FACS de ces cellules a révélé que toutes les cellules de cette population sont positives pour l'expression d'*Unc5b* (Figure 21f). En revanche, les CSEpi présentent une population exprimant *Ntn1* ou *Neo1* réduite par rapport aux CSE (Figure 21g).

J'ai ensuite souhaité vérifier si ces données étaient en accord avec les observations *in vivo*, et j'ai donc étudié des résultats provenant de la littérature de séquençage ARN d'échantillons provenant des différents compartiments de l'embryon (Boroviak et al. 2015). L'expression de *Ntn1* semble transitoirement induite seulement dans l'EPI du blastocyste précoce E4,5, ce qui correspond normalement aux CSE *in vitro* (Figure 21h). *Neo1* commence à être induit très tôt dans la MCI de l'embryon E3,5, et est présent ensuite à un niveau relativement moyen

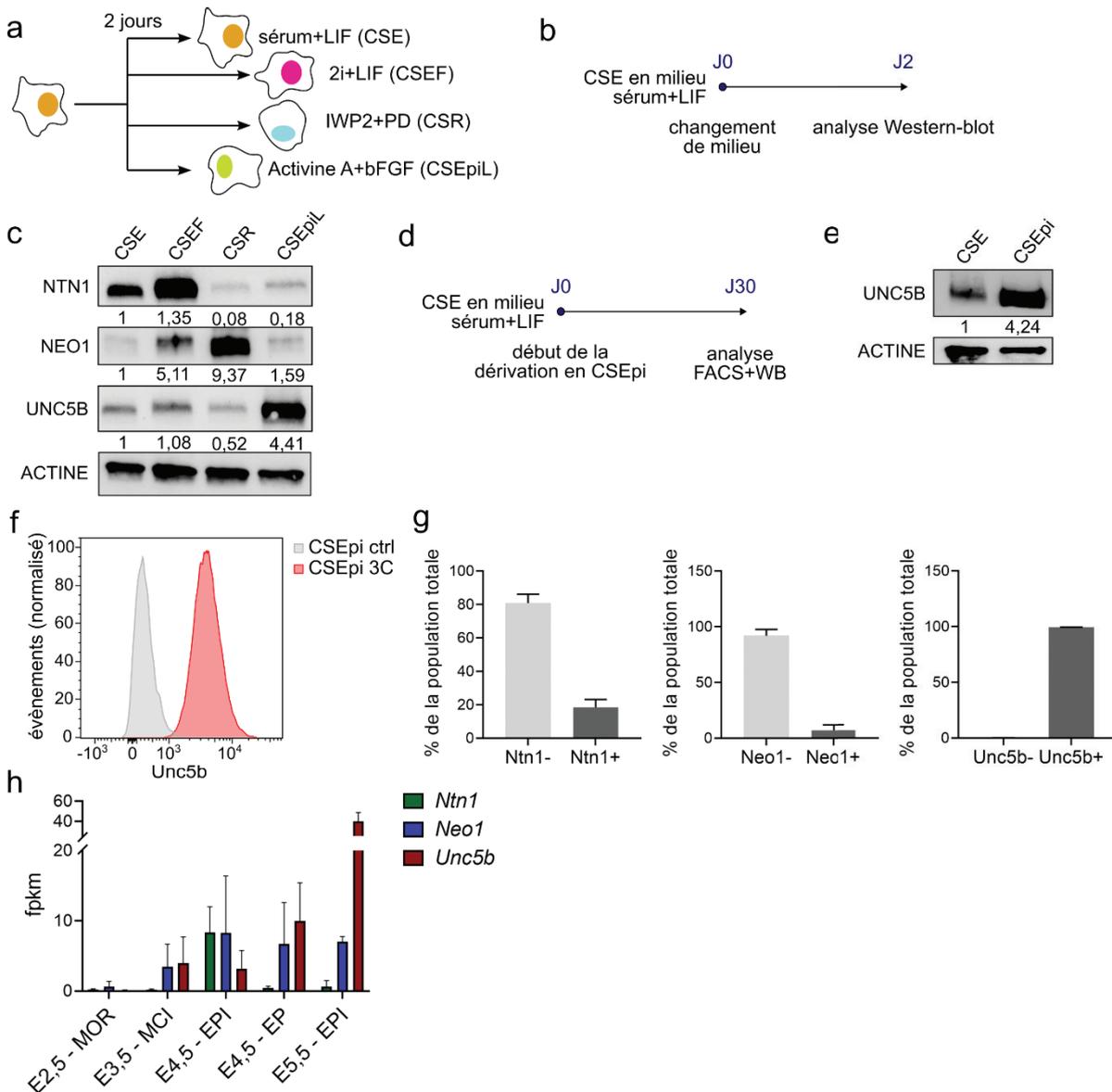


Figure 21 : Les différentes configurations de la pluripotence donnent lieu à des patrons d'expression de *Ntn1*, *Neo1* et *Unc5b* variables.

(a) Schéma représentant les différents milieux de pluripotence utilisés. (b) Représentation schématique de l'expérience réalisée. Les CSE contrôles en milieu sérum+LIF ont été transférées dans les différents milieux utilisés pendant deux jours, avant d'être analysées par WB. J, jour. (c) Western-blot réalisé sur les CSE en différents milieux de pluripotence. $n = 3$ expériences indépendantes. (d) Représentation schématique de l'expérience réalisée. Les CSE 3C en milieu sérum+LIF ont été dérivées en CSEpi par transfert sur fibronectine et dans un milieu chimiquement défini, sur une durée d'environ 30 jours. J, jour. (e) Western-blot de CSE contrôles et CSEpi contrôles. $n = 3$ expériences indépendantes. (f) Histogramme FACS représentatif de l'expression d'*Unc5b* dans les CSEpi contrôles (ctrl) et 3C. (g) Quantification des populations positives ou négatives pour l'expression de *Ntn1*, *Unc5b* et *Neo1* mesurées par FACS dans les CSEpi 3C. $n = 3$ expériences indépendantes. (h) Graphique représentant les fpkm (fragment per kilobase million) de *Ntn1*, *Neo1* et *Unc5b* au cours du développement embryonnaire. Données issues de (Boroviak et al., 2015). MOR, Morula ; MCI, Masse cellulaire interne ; EPI, Épiblaste ; EP, Endoderme primitif.

jusqu'au stade E5,5 au moins. Enfin, *Unc5b* est exprimé à partir du stade E3,5 dans la MCI, et son expression croît progressivement pour devenir extrêmement forte dans l'EPI du blastocyste post-implantation, au stade E5,5. Bien que ces résultats diffèrent quelque peu de ce que nous avons pu observer *in vitro*, où *Ntn1* est fortement induit dans la pluripotence fondamentale par exemple, qui correspondrait au stade E3,5 *in vivo*, on retrouve une certaine cohérence. Ces différences peuvent être au moins en partie attribuées au fait que la capture des états pluripotents *in vitro* n'est pas parfaite et repose encore beaucoup sur l'utilisation d'inhibiteurs chimiques, qui ne reflètent pas la situation physiologique (Morgani, Nichols, et Hadjantonakis 2017).

L'ensemble de ces résultats dessine donc une situation où *Ntn1*, *Neo1* et *Unc5b* sont exprimés tout au long du développement péri-implantatoire, avec des variations de niveaux aux différents stades de pluripotence. Ces fluctuations semblent cruciales afin de réguler la pluripotence naïve par exemple. J'ai donc ensuite cherché à trouver l'origine de ces variations observées *in vitro* dans la culture de CSE.

L'expression de NTN1 et NEO1 est contrôlée par le cycle cellulaire

Afin de mieux comprendre l'origine de l'hétérogénéité de l'expression des acteurs de la voie Nétrine, je me suis intéressée au cycle cellulaire de mes différentes sous-populations exprimant ou non *Ntn1*, *Neo1* ou *Unc5b*, sur la base de certaines observations réalisées précédemment (Figure 19d). Tout d'abord, j'ai réalisé un marquage à l'iodure de propidium sur les CSE 3C triées en fonction de leur expression positive ou négative de *Ntn1*, *Neo1* ou *Unc5b* afin de pouvoir observer le profil de répartition du cycle cellulaire dans ces cellules (Figure 22a). Dans les cellules contrôles, on peut observer une majorité de cellules ayant une quantité 2N d'ADN, qui sont donc en phase G1, des cellules en phase G2/M ayant une quantité

4N d'ADN, et une population intermédiaire, en cours de réplication d'ADN, qui est en phase S. Cette analyse FACS a révélé que les populations n'exprimant pas *Ntn1* ou *Neo1* (Ntn1- et Neo1-) sont quasiment exclusivement constituées de cellules en phase G1, au contraire des populations positives, qui sont enrichies en cellules en phase G2/M (Figure 22b,c). Ce phénotype très frappant ne se retrouve pas dans les populations triées en fonction de leur expression d'*Unc5b*, ce qui indique qu'il est spécifique de *Ntn1* et *Neo1*. Pour la suite de l'étude, j'ai donc exclu *Unc5b* de l'analyse. Il est important de souligner que les cellules Ntn1- et Neo1- ne sont pas bloquées en phase G1, car elles prolifèrent lorsqu'on les trie et qu'on les remet en culture.

J'ai ensuite souhaité tester si à l'inverse, le blocage des cellules en phase G2/M par un traitement avec du Taxol, un inhibiteur du fuseau mitotique (Schiff et Horwitz 1980; Parness et Horwitz 1981), entraînait un enrichissement en cellules positives pour l'expression de *Ntn1* et *Neo1*. Après 16h de traitement, environ 78% des cellules sont en phase G2/M (Figure 22d). On peut alors observer un doublement du nombre de cellules positives à *Ntn1*, et une augmentation d'un facteur 3 pour les cellules Neo1+ (Figure 22e), confirmant ainsi l'hypothèse d'une régulation de l'expression de *Ntn1* et *Neo1* en fonction de la position des cellules dans le cycle cellulaire.

Il est un peu surprenant que nous n'ayons jamais observé de phénotype lié au cycle auparavant malgré nos nombreux modèles cellulaires pour les acteurs de la voie Nétrine. Ceci peut s'expliquer simplement. En effet, ces données laissent la porte ouverte à deux hypothèses : soit l'axe NTN1/NEO1 régule le cycle cellulaire, soit c'est le cycle cellulaire qui régule l'expression de *Ntn1* et *Neo1*. Afin de discriminer ces deux possibilités, j'ai analysé le cycle cellulaire de CSE déletées pour l'expression de *Ntn1* et *Neo1*. Ces cellules ne présentent

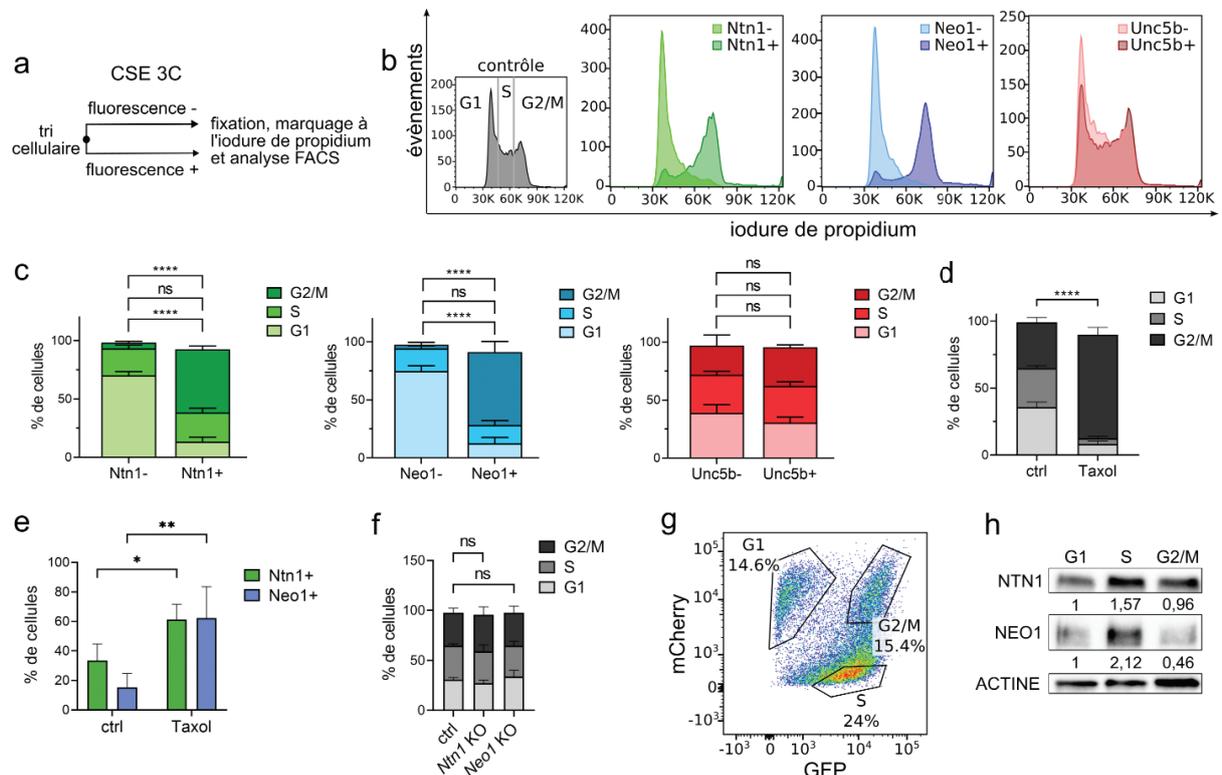


Figure 22 : Le cycle cellulaire contrôle l'expression de *Ntn1* et *Neo1*, mais pas d'*Unc5b*.

(a) Représentation schématique de l'expérience réalisée. Les CSE 3C ont été triées en fonction de leur expression positive ou négative de *Ntn1*, *Neo1* ou *Unc5b*, avant d'être fixée, marquées à l'iodure de propidium et analysées au FACS. (b) Histogrammes représentatifs du profil du cycle cellulaire des CSE contrôle et 3C triées. Les cellules les plus à gauche sur le profil contrôle sont en phase G1, les plus à droite sont en phase G2/M, et les cellules intermédiaires sont en phase S. $n = 3$ expériences indépendantes. (c) Comptage du pourcentage de cellules en phase G1, S et G2/M dans les populations triées. ns, non significatif ; ****, $p < 0,0001$. $n = 3$ expériences indépendantes. (d) Comptage du pourcentage de cellules en phase G1, S et G2/M dans les CSE 3C traitées ou non au Taxol. ctrl, contrôle ; ns, non significatif ; ****, $p < 0,0001$. $n = 3$ expériences indépendantes. (e) Comptage du pourcentage de cellules *Ntn1+* et *Neo1+* dans les CSE 3C traitées ou non au Taxol. ctrl, contrôle ; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,005$. $n = 3$ expériences indépendantes. (f) Comptage du pourcentage de cellules en phase G1, S et G2/M dans les CSE contrôle (ctrl) ou délétées pour l'expression de *Ntn1* (*Ntn1 KO*) ou *Neo1* (*Neo1 KO*). ns, non significatif. $n = 3$ expériences indépendantes. (g) Profil FACS représentatif des tris réalisés sur des CSE Fucci afin d'isoler les populations en phase G1, S et G2/M du cycle cellulaire. (h) Western-blot représentatif réalisé sur cellules Fucci triées. $n = 3$ expériences indépendantes.

pas de différence significative dans leur proportion de cellules en phase G1, S et G2/M, ce qui indique que c'est à priori le cycle cellulaire qui régule *Ntn1* et *Neo1*, et pas le contraire, comme nos autres données laissaient supposer (Figure 22f). Il est à noter que ces résultats ne nous permettent cependant pas d'exclure un rôle de la voie Nétrine dans l'accélération du cycle cellulaire, ce qui pourrait en partie expliquer la prolifération accrue des CSE en présence de NTN1 observée précédemment (Huyghe et al. 2020, Fig. supp. 2l).

Pour confirmer ces résultats, nous avons décidé d'utiliser un système non toxique pour les cellules et largement répandu dans les études du cycle cellulaire, le système Fucci. Composé de deux rapporteurs fluorescents de l'expression des protéines CDT1 et GMNN dont l'expression est régulée au cours du cycle cellulaire, il nous permet de distinguer par FACS les cellules en phase G1, S ou G2/M (Figure 22g). J'ai trié des CSE Fucci obtenues auprès d'un collaborateur afin d'analyser l'expression protéique de NTN1 et NEO1 au cours du cycle cellulaire. J'ai ainsi pu observer qu'en effet, l'expression de NTN1 et NEO1 varie au cours du cycle, et qu'elles sont prédominantes durant la phase S (Figure 22h).

*Les différentes sous-populations exprimant ou non *Ntn1/Neo1* présentent des variations transcriptomiques importantes*

J'ai ensuite souhaité caractériser plus précisément les populations exprimant seulement *Ntn1* ou *Neo1*, les deux, ou n'exprimant aucun des deux. L'objectif était de tenter d'obtenir plus d'informations sur les cibles de NTN1 et NEO1 ainsi que sur les facteurs induisant l'expression des acteurs de la voie Nétrine. Tout d'abord, j'ai trié les populations doubles négatives (DN), doubles positives (DP), et simple positives pour *Ntn1* (*Ntn1+*/*Neo1-*) et *Neo1* (*Ntn1-*/*Neo1+*) par FACS avant d'analyser leur cycle cellulaire (Figure 23a,b). Le marquage à l'iodure de

propidium révèle que les profils des cellules DN et DP sont similaires respectivement aux profils des populations négatives et positives pour l'expression de *Ntn1* ou *Neo1* obtenus précédemment (Figure 23c,d). En revanche, l'analyse du cycle des cellules *Ntn1+*/*Neo1-* et *Ntn1-*/*Neo1+* montre que bien que les cellules exprimant uniquement *Neo1* soient majoritairement en G2/M, les cellules exprimant uniquement *Ntn1* présentent un profil plus équilibré avec une proportion équivalente de cellules dans chacune des phases du cycle cellulaire. Ce phénomène pourrait être expliqué par l'hypothèse qu'il existe un décalage temporel entre l'activation de l'expression de *Ntn1* et celle de *Neo1* au cours du cycle, ce qui indiquerait également qu'il est probable que des mécanismes différents régulent ces

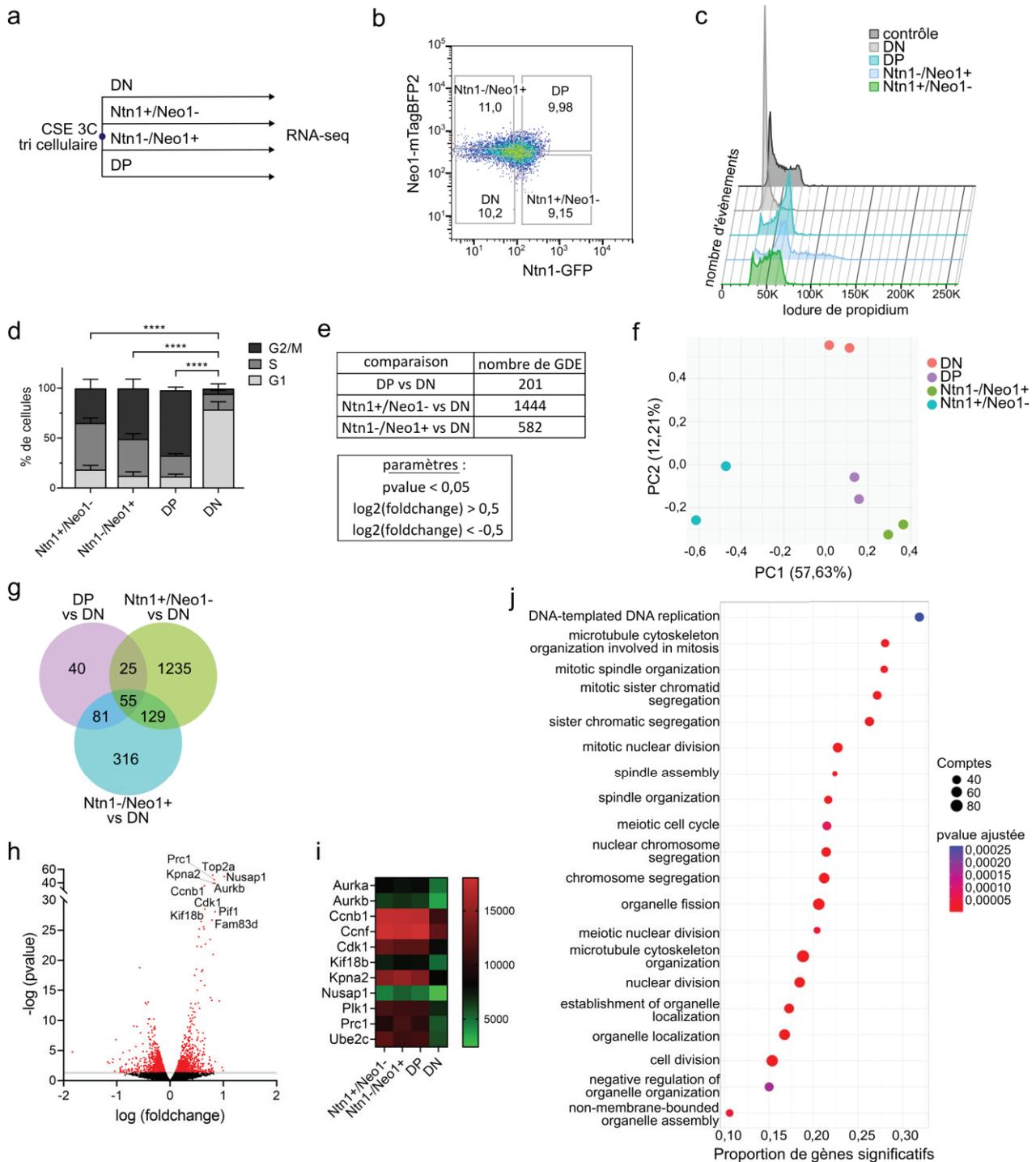


Figure 23 : L'expression de *Ntn1/Neo1* délimite des sous-populations présentant des transcriptomes différents.

(a) Représentation schématique de l'expérience réalisée. Les CSE 3C ont été triées en fonction de leur expression de *Ntn1/Neo1*, et analysées par séquençage ARN (RNA-seq). DN, doubles négatives ; DP, doubles positives. (b) Profil FACS représentatif des tris réalisés sur les CSE 3C en fonction de leur expression de *Ntn1* et *Neo1*. (c) Histogrammes empilés représentatifs du cycle cellulaire des différentes sous-populations de CSE 3C triées en fonction de leur expression de *Ntn1* et *Neo1*. DN, doubles négatives ; DP, doubles positives. $n = 3$ expériences indépendantes. (d) Graphique représentant le pourcentage de cellules en phase G1, S et G2/M dans les différentes sous-populations de CSE 3C triées en fonction de leur expression de *Ntn1/Neo1*. Les statistiques ont été réalisées sur les pourcentages de cellules en phase G1 uniquement ; les paires non indiquées sont non significatives. ****, $p < 0,0001$. $n = 3$ expériences indépendantes. (e) Tableau résumant le nombre de gènes différentiellement exprimés (GDE) de chaque analyse de séquençage ARN. Les paramètres utilisés ($\log_2(\text{foldchange})$, $p\text{value}$) pour obtenir ces nombres sont indiqués. vs, versus. (f) Analyse en composantes principales (PC) des différents échantillons du séquençage ARN. DN, doubles négatives ; DP, doubles positives. (g) Diagramme de Venn indiquant le recoupement entre les différentes listes de GDE. DN, doubles négatives ; DP, doubles positives ; vs, versus. (h) Volcano plot indiquant les GDE de la population doubles positives par rapport à la population double négatives. Les 10 gènes ayant la $p\text{value}$ la plus significative sont indiqués. La barre horizontale représente le seuil de $p\text{value}$ utilisé pour déterminer les GDE. (i) Carte thermique de certains GDE parmi les plus significatifs. DN, doubles négatives ; DP, doubles positives. (j) Ontologie des GDE de la population double négative par rapport à toutes les autres surreprésentés dans les processus biologiques.

expressions au niveau moléculaire. De plus, à ce stade deux hypothèses étaient possibles : soit l'expression de *Ntn1* et *Neo1* est fortement réprimée au cours de la phase G1, soit elle est activée au début de la phase S. J'ai exploré ces deux hypothèses plus tard au cours de ma thèse.

Afin d'étudier de manière plus approfondie les différences existantes entre les quatre sous-populations exprimant ou non *Ntn1* et *Neo1*, j'ai réalisé une analyse de séquençage ARN (RNA-seq). L'analyse du transcriptome des différentes populations nous a révélé de profondes différences entre elles. En effet, bien que ces populations n'aient été isolées que sur la base de l'expression d'un ou deux gènes, nous avons détecté plusieurs centaines de gènes différentiellement exprimés entre elles (Figure 23e). Plus précisément, en comparant chaque population à la population DN, nous avons découvert 1444 gènes différentiellement exprimés avec les cellules exprimant uniquement *Ntn1*, 582 avec les cellules exprimant uniquement *Neo1*, et 201 avec les cellules DP. L'analyse en composantes principales a révélé que les populations exprimant uniquement *Ntn1* ou uniquement *Neo1* avaient les variances les plus éloignées (Figure 23f). Les gènes partagés entre les populations DP et simples positives, au nombre de 55 seulement, pourraient jouer un rôle dans la régulation de l'expression de *Ntn1* et *Neo1* (Figure 23g). De même, les 81 gènes partagés entre les populations DP et simple positive pour *Neo1* peuvent nous renseigner sur les acteurs activés en aval de *NEO1* dans le cadre de la signalisation Nétrine, tout comme les 316 gènes différentiellement exprimés entre les cellules DN et simple positive pour *Neo1* mais non partagés avec les autres populations

pourraient nous communiquer des informations sur les rôles de NEO1 indépendants de NTN1 dans la cellule. Dans le cadre de ma thèse, je n'ai cependant pas eu le temps de m'intéresser à tous ces candidats, et je me suis majoritairement concentrée sur la comparaison des populations DP et DN.

La double expression de *Ntn1/Neo1* affecte l'expression de 201 gènes dans les cellules ($\log_2(\text{foldchange})$ supérieur à 0,5 ou inférieur à 0,5 et pvalue inférieure à 0,05), et on peut noter dans les 10 premiers ayant la pvalue la plus significative plusieurs acteurs connus du cycle cellulaire et notamment de la mitose, comme *Aurkb* (aurora kinase b), *Ccnb1* (cycline b1) ou sa partenaire, *Cdk1* (cycline-dépendent kinase 1) (Figure 23h). La carte thermique de certains gènes parmi ceux ayant les plus grandes pvalue montre que les populations DP, *Ntn1+/Neo1-* et *Ntn1-/Neo1+* présentent des profils très similaires, et se démarquent de la population DN, qui exprime de manière attendue plus faiblement les gènes liés à la phase M (Figure 23i). Enfin, une analyse des réseaux ontologiques des gènes différentiellement exprimés dans les DN par rapport aux autres populations a confirmé que les voies surreprésentées parmi ces gènes comprenaient en grande partie des processus biologiques liés aux phases S et M, comme la réplication de l'ADN, l'organisation du fuseau mitotique et du cytosquelette, la ségrégation des chromosomes ou encore la fission des organites (Figure 23j).

Cette analyse a donc permis de révéler d'importantes différences dans le transcriptome des populations exprimant ou non *Ntn1* et *Neo1*. Ces différences sont notamment dues à l'absence dans les cellules DN de gènes liés aux phases S et G2/M. Il est intéressant de remarquer que nous avons observé une expression protéique de NTN1 et NEO1 prépondérante en phase S, mais que les gènes ressortant ici semblent en grande partie liés à la phase M. Une hypothèse possible pour expliquer cela est le léger décalage temporel qui peut être créé par notre système rapporteur. En effet, il est possible que les protéines de fluorescence GFP et mTagBFP2 aient une demi-vie plus importante que NTN1 et NEO1, qui semblent être exprimées et dégradées au moins une fois par cycle cellulaire de CSE, soit toutes les 8h environ, alors que la GFP a une demi-vie d'environ 26h (Corish et Tyler-Smith 1999). Grâce à cette analyse, nous avons également une idée plus claire des candidats pouvant réguler l'expression de *Ntn1* et *Neo1*.

L'expression de Ntn1 et Neo1 est dynamique et régulée par des acteurs du cycle cellulaire

Afin de détailler la dynamique des cellules exprimant à la fois *Ntn1* et *Neo1*, j'ai réalisé une expérience d'interconvertibilité. Après avoir trié les populations DP et DN des CSE 3C, je les ai analysées au FACS plusieurs fois sur deux jours afin d'étudier leur rééquilibrage (Figure 24a). On peut voir qu'après 48h, les populations DP et simple positives pour *Ntn1* et *Neo1* sont réapparues dans la population triée DN (Figure 24b). Similairement, après 48h, les cellules qui étaient DP sont à 60% DN, à 17,3% *Ntn1-/Neo1+* et 4,6% *Ntn1+/Neo1-*, et seulement 19% sont restées DP. Ces résultats nous informent notamment sur plusieurs points. Premièrement, la

population *Ntn1*⁺/*Neo1*⁻ semble contrôlée assez strictement, et ne dépasse jamais 17%. En effet, dans les DP, on peut voir que leur pourcentage augmente de 7,1% à 14,6%, avant de diminuer drastiquement d'environ dix points entre 24h et 48h. Dans les DN, leur pourcentage monte à environ 17%. Deuxièmement, on peut observer que la dynamique d'extinction semble extrêmement rapide, au contraire de la dynamique d'induction qui semble plus lente. En effet, en 48h les cellules DP sont devenues à 60% DN, et environ 20% des cellules supplémentaires ont réprimé l'expression d'au moins un des deux gènes. Il est donc probable que *Ntn1* et *Neo1* soient fortement réprimés au début de la phase G1, ce qui est également cohérent avec l'enrichissement très propre de cellules en G1 dans la population DN. Troisièmement, contrairement à ce qui a été évoqué au début de la section résultats de ma thèse, les populations interconvertibles qui passent par exemple de DP à DN pour l'expression de *Ntn1* et *Neo1* ne reflètent principalement pas un changement d'identité cellulaire mais simplement la progression du cycle cellulaire. On peut cependant remarquer que si la régulation de *Ntn1* et *Neo1* ne dépendait que de ce dernier, le système devrait complètement revenir à l'état d'équilibre en environ 8h. Ce n'est pas le cas ici, ce qui peut indiquer l'existence d'autres systèmes de régulation de l'expression de *Ntn1* et *Neo1* indépendants, comme évoqué précédemment (Huyghe et al. 2020, Fig. supp. 1c,d).

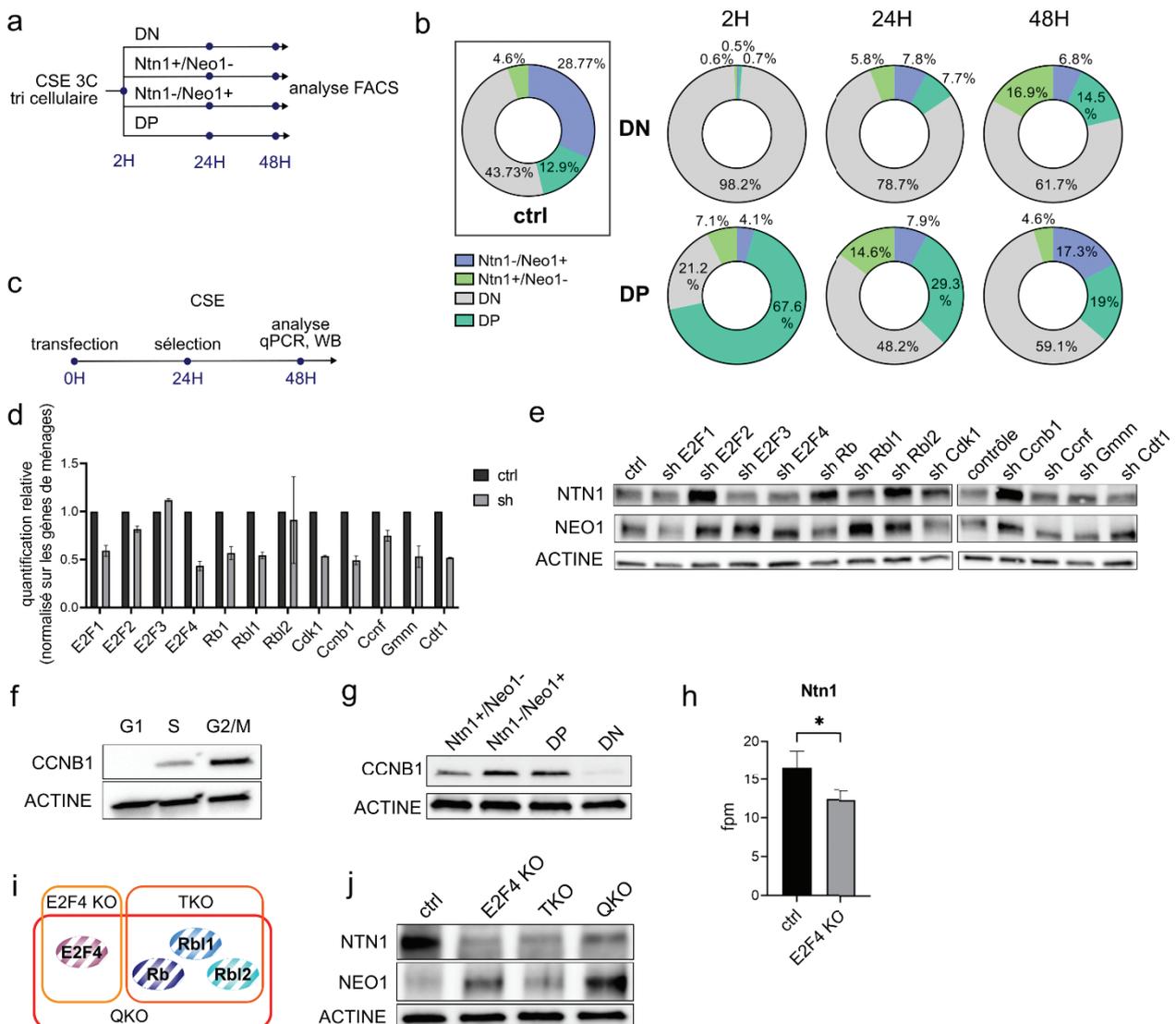


Figure 24 : L'expression de *Ntn1* et *Neo1* est modulable et contrôlée par le cycle cellulaire.

(a) Représentation schématique de l'expérience réalisée. Les CSE 3C ont été triées en fonction de leur expression de *Ntn1* et *Neo1* avant d'être analysées au FACS 2h, 24h et 48h après le tri. DN, doubles négatives ; DP, doubles positives. (b) Graphiques représentant la répartition en pourcentage des différentes sous-populations *Ntn1/Neo1* en fonction du temps et de la population initiale triée. DN, doubles négatives ; DP, doubles positives. (c) Représentation schématique de l'expérience réalisée. Les CSE ont été transfectées avec les shARN avant d'être mises en sélection 24h plus tard, puis validées et analysées par qPCR et WB 48h après la transfection. (d) Quantification relative des transcrits exprimés des différentes cibles du crible. Ctrl, contrôle ; sh, small hairpin. n = 2 expériences indépendantes. (e) Western-blot représentatif réalisé sur des cellules transfectées avec les différents shARN. Ctrl, contrôle. n = 2 expériences indépendantes. (f) Western-blot représentatif réalisé sur des cellules Fucci triées. n = 3 expériences indépendantes. (g) Western-blot représentatif réalisé sur des CSE 3C triées en fonction de leur expression de *Ntn1* et *Neo1*. DN, doubles négatives ; DP, doubles positives. n = 3 expériences indépendantes. (h) Graphique représentant les fpm (fragments par million) du gène *Ntn1* dans les cellules contrôles (ctrl) et délétées pour *E2F4* (*E2F4* KO). (i) Schéma représentant les différentes lignées cellulaires utilisées. Les hachures blanches représentent la délétion du gène en question. KO, knock-out ; TKO, triple knock-out ; QKO, quadruple knock-out. (j) Western-blot représentatif réalisé sur les lignées de CSE *E2F4* KO, TKO et QKO. n = 3 expériences indépendantes. KO, knock-out ; TKO, triple knock-out ; QKO, quadruple knock-out.

J'ai ensuite cherché à identifier les acteurs du cycle cellulaire responsables de la régulation de *Ntn1* et *Neo1* dans les CSE. Pour cela, j'ai réalisé un crible à petite échelle grâce à des shARN (small hairpin RNA). J'ai sélectionné douze cibles sur la base des résultats de mon séquençage ARN et de la littérature, que j'ai transfectées dans des CSE (Figure 24c). Après 48h, j'ai d'abord validé la diminution de l'expression des ARN ciblés (Figure 24d). Hormis *E2F3* et *Rbl2*, toutes les cibles choisies sont bien réprimées. Je me suis ensuite intéressée à l'effet de ces acteurs sur l'expression de *NTN1* et *NEO1*. J'ai pu observer d'une part que *E2F2*, *RB*, *CDK1*, *CCNB1* et *GMNN* semblent réprimer l'expression de *NTN1* (Figure 24e). D'autre part, *RBL1*, *CCNB1* et *CDT1* paraissent réprimer l'expression de *NEO1*. La majorité des facteurs mis en évidence par ce crible semble réprimer *NTN1* et *NEO1*, avec comme seules exceptions les facteurs *E2F4* et *E2F1*, qui activent respectivement l'expression de *NTN1* et de *NEO1*.

Un candidat, *CCNB1*, semble réprimer particulièrement fortement à la fois l'expression de *NTN1* et de *NEO1*. J'ai donc analysé l'expression protéique de *CCNB1* dans les CSE Fucci triées. De manière intéressante, *CCNB1* commence à être exprimé en phase S, et est fortement exprimé en phase G2/M (Figure 24f). J'ai également étudié l'expression de *CCNB1* dans les CSE 3C triées en fonction de leur expression de *Ntn1* et *Neo1*. De même, on peut voir que *CCNB1* est absente de la population DN, qui est composée quasi-exclusivement de cellules en phase G1 (Figure 24g). *CCNB1* semble donc réguler l'expression de *NTN1* et *NEO1*, sûrement en partenariat avec *CDK1* dans le cadre de *NTN1*.

Les cyclines et CDK agissent en général *via* les protéines de poche RB, p107 (aussi appelé RBL1) et p130 (aussi appelé RBL2), qu'elles phosphorylent afin de les empêcher d'activer les facteurs de transcription E2F. E2F4 semblant activer l'expression de NTN1, j'ai analysé des données de séquençage ARN de la littérature, et en particulier d'une étude ayant généré des CSE KO pour E2F4 (E2F4 KO) (J. Hsu et al. 2019). Les cellules E2F4 KO présentent une quantité un peu moins importante de *Ntn1*, indiquant ainsi qu'E2F4 semble effectivement induire l'expression de *Ntn1* (Figure 24h).

J'ai ensuite utilisé différentes lignées de CSE fournies par un collaborateur : une lignée KO pour l'expression d'E2F4, une lignée de CSE KO pour les trois protéines de poche RB, p107, et p130 (TKO), et une lignée combinant le KO d'E2F4 avec les TKO formant ainsi un quadruple KO (QKO), afin d'observer l'effet de ces diverses délétions sur l'expression de NTN1 et NEO1 (Figure 24i). L'analyse par WB de ces cellules a montré que NTN1 était fortement réprimée dans toutes ces lignées comparées au contrôle, confirmant ainsi l'activation de son expression par E2F4 (Figure 24j). Ces résultats ont également révélé que les trois protéines de poche RB, p107 et p130 activent l'expression de NTN1. Au contraire, NEO1 est fortement exprimée en l'absence d'E2F4. Ceci confirme ainsi que le facteur de transcription E2F4 peut jouer aussi bien un rôle activateur que répresseur dans les CSE, et démontre que les mécanismes de régulation de NTN1 et NEO1 liés au cycle cellulaire sont au moins partiellement différents.

Grâce à ces expériences, nous avons donc maintenant une meilleure compréhension de la façon dont le cycle cellulaire contrôle la voie Nétrine, à travers notamment CCNB1 et E2F4. J'ai ensuite souhaité savoir si l'expression de *Ntn1* durant le cycle cellulaire était associée à un rôle précis.

L'axe de signalisation NTN1/NEO1 contribue à la résistance des CSE aux signaux de différenciation en phases S, G2 et M

Ces différents résultats m'ont menée à m'interroger sur la question suivante : l'expression de *Ntn1* et *Neo1* à un moment précis du cycle cellulaire remplit-elle une fonction particulière pour la cellule ? En effet, comme évoqué dans l'introduction p.61, de nombreuses études suggèrent que les cellules en phase G1 seraient plus sensibles aux signaux de différenciation, créant ainsi une fenêtre d'opportunité pour la cellule afin de se préparer à quitter l'état pluripotent.

Pour répondre à cette problématique, j'ai tout d'abord étudié la clonogénicité des CSE dans les différentes phases du cycle cellulaire. Grâce à un tri des CSE Fucci suivi d'un test AP, j'ai montré que les cellules en phase S étaient plus clonogéniques que celles en phase G1 ou G2/M (Figure 25a,b), ce qui indique que ces cellules sont dans un état plus prolifératif et moins sensibles à la différenciation.

J'ai ensuite cherché à examiner la pluripotence des CSE 3C dans les différentes populations délimitées par leur expression de *Ntn1* et *Neo1*. Après tri des populations DP, DN et Ntn1+/Neo1- et Ntn1-/Neo1, j'ai réalisé un test AP qui a montré que les populations DP et

Ntn1+/Neo1- sont significativement plus clonogéniques que la population DN (Figure 25c,d). J'ai également étudié l'expression des marqueurs de pluripotence naïve ou amorcée NANOG, SOX2 et OTX2 dans ces cellules. L'expression de NANOG et SOX2 est quasiment identique dans toutes les populations ; en revanche, OTX2 est nettement plus exprimé dans les cellules DN, ce qui indique que ces cellules pourraient plutôt correspondre à un état de pluripotence amorcée (Figure 25e). Enfin, j'ai analysé l'expression du marqueur OCT4 par marquage FACS dans ces sous-populations. De manière intéressante, toutes les cellules présentent le même pourcentage de cellules Oct4+, indiquant ainsi que la sous-population DN n'est pas en train de se différencier. Cependant, la moyenne d'intensité de fluorescence exprimée par ces cellules est significativement inférieure à celle des autres populations, ce qui nous informe

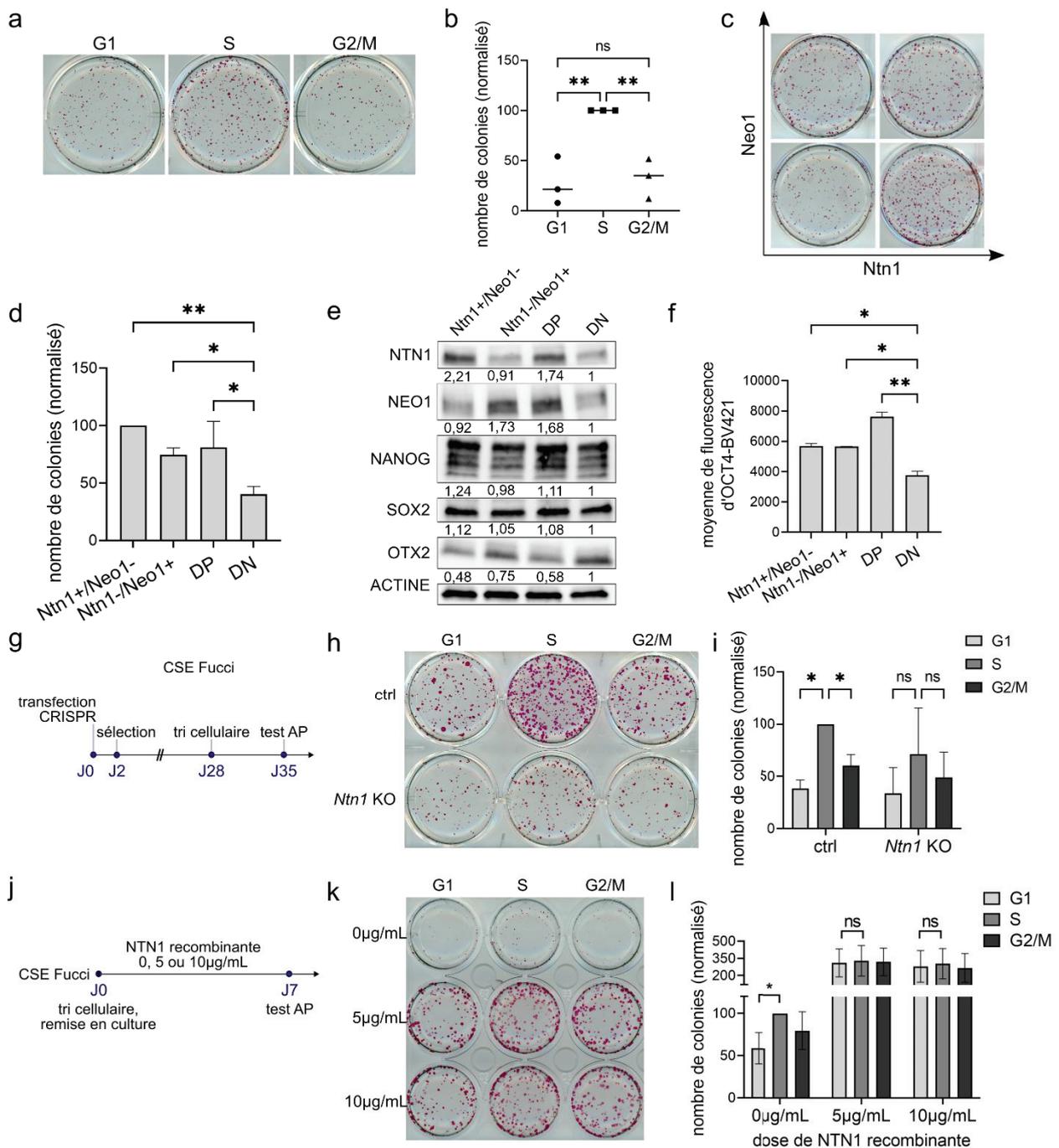


Figure 25 : La voie NTN1 promeut la pluripotence des CSE en phase S.

(a) Images représentatives des résultats des tests AP réalisés sur les populations de Fucci triées. (b) Comptage du nombre de colonies obtenues lors des tests AP, normalisé sur le nombre de colonies en phase S. ns, non significatif ; **, $p < 0,005$. $n = 3$ expériences indépendantes. (c) Images représentatives des résultats des tests AP réalisés sur les CSE 3C triées en fonction de leur expression de Neo1 et Ntn1. (d) Comptage du nombre de colonies obtenues lors des tests AP, normalisé sur le nombre de colonies dans la population triée Ntn1+/Neo1-. Les statistiques ont été réalisées sur le nombre de colonies de chaque population triée par rapport à la population DN uniquement. DN, doubles négatives ; DP, doubles positives, *, $p < 0,05$; **, $p < 0,005$. $n = 3$ expériences indépendantes. (e) Western-blot représentatif réalisé sur les populations de CSE 3C triées en fonction de leur expression de Neo1 et Ntn1. $n = 3$ expériences indépendantes. (f) Graphique représentant la moyenne de fluorescence mesurée par FACS de cellules marquées par un anticorps OCT4-BV421. Les statistiques ont été réalisées sur la moyenne de chaque population triée par rapport à la population DN. DN, doubles négatives ; DP, doubles positives, *, $p < 0,05$; **, $p < 0,005$. $n = 3$ expériences indépendantes. (g) Représentation schématique de l'expérience réalisée. Les CSE Fucci ont été transfectées avec le plasmide CRISPR contenant le guide ARN ciblant Ntn1 et la séquence codant pour l'enzyme Cas9, avant d'être mises en sélection deux jours plus tard et triées après environ quatre semaines. Elles ont ensuite été remises en culture pour réaliser un test AP une semaine plus tard. J, jour. (h) Image représentative des résultats des tests AP réalisés sur les cellules triées en fonction de leur phase du cycle cellulaire. Ctrl, contrôle ; Ntn1 KO, knock-out Ntn1. (i) Comptage du nombre de colonies obtenues lors des tests AP, normalisé sur le nombre de colonies en phase S du contrôle. Les statistiques ont été réalisées sur le nombre de colonies en phase S comparé au nombre de colonies dans les autres phases uniquement, de manière indépendante entre le ctrl et les Ntn1 KO. ns, non significatif ; *, $p < 0,05$. $n = 3$ expériences indépendantes. (j) Représentation schématique de l'expérience réalisée. Les CSE Fucci ont été triées et remises en culture pour réaliser un test AP une semaine plus tard. Durant ce temps, elles ont été traitées avec 0, 5 ou 10 $\mu\text{g/mL}$ de NTN1 recombinante. (k) Image représentative des résultats des tests AP réalisés sur les CSE Fucci triées en fonction de leur phase du cycle cellulaire. (l) Comptage du nombre de colonies obtenues lors des tests AP, normalisé sur le nombre de colonies en phase S des cellules non traitées. ns, non significatif ; *, $p < 0,05$. $n = 3$ expériences indépendantes.

qu'elles continuent à exprimer OCT4, mais à un niveau bien moindre, et pourraient donc être préparées à perdre rapidement leur identité pluripotente pour ébaucher le début de la différenciation (Figure 25f). J'ai donc montré que la population n'exprimant ni Ntn1 ni Neo1 est moins clonogénique et exprime plus d'OTX2 et moins d'OCT4, ce qui indique que ces cellules pourraient avoir une identité de cellules amorcées précoces.

Pour finir, étant donné que les cellules en phase S sont plus clonogéniques, et qu'il s'agit de la phase du cycle où NTN1 et NEO1 sont les plus exprimées, j'ai questionné la possibilité que cette clonogénicité accrue soit en partie due à la signalisation de la voie Nétrine. Pour tester cette hypothèse, j'ai tout d'abord réalisé un KO du gène *Ntn1* dans les CSE Fucci, avant de trier les cellules en phase G1, S et G2/M et de tester leur clonogénicité (Figure 25g). Remarquablement, l'absence de *Ntn1* dans les CSE abolit complètement la différence de clonogénicité entre les phases G1, S et G2/M, montrant ainsi que *Ntn1* joue un rôle dans la

pluripotence durant la phase S (Figure 25h,i). De la même manière, j'ai souhaité voir si traiter les cellules en phase G1 et G2/M à la NTN1 recombinante leur permettait de pallier leur clonogénicité réduite. J'ai donc traité des CSE Fucci triées avec 0, 5 ou 10 μ g/mL de NTN1 recombinante pendant toute la durée du test AP (Figure 25j). Les résultats montrent que le traitement à la NTN1 recombinante permet aux cellules en phase G1 et G2/M de compenser leur différence de clonogénicité, et de former autant de colonies que les cellules en phase S, même à la dose la plus faible de NTN1 (Figure 25k,l).

Discussion

Au cours de ma thèse, j'ai donc étudié de manière approfondie la fonction de la voie NTN1 dans les CSE murines. Nous avons tout d'abord montré que NTN1, NEO1 et UNC5B étaient les acteurs de la voie Nétrine présents dans les CSE. Nous avons également décrit les profonds changements induits par cette voie dans la signalisation, le transcriptome et l'épigénome de la cellule. Dans ce contexte développemental, la voie NTN1 joue un rôle prépondérant dans la pluripotence naïve, en maintenant les cellules dans un état indifférencié *via* l'activation de la voie WNT et l'inhibition de la voie MAPK, à travers respectivement l'activation de FAK et l'inhibition d'ERK. *In vivo*, cette fonction se traduit par la capacité de NTN1 à maintenir l'homéostasie de l'épiblaste, et son absence mène à un nombre de cellules réduit dans ce dernier au stade E3,75.

Dans la seconde partie de ma thèse, j'ai étudié la répartition de NTN1, NEO1 et UNC5B dans la population de CSE *in vitro*. J'ai notamment utilisé un rapporteur tricolore de l'expression endogène de *Ntn1*, *Neo1* et *Unc5b* afin de montrer que ces derniers étaient exprimés de manière hétérogène et dynamique par la population de CSE. Les différentes sous-populations définies par l'expression de ces facteurs présentent des différences fonctionnelles, et semblent se rapprocher de divers états de pluripotence intermédiaire. De manière fascinante, cette expression dynamique et hétérogène est liée au cycle cellulaire dans le cas de NTN1 et NEO1, mais pas d'UNC5B. De plus, l'acuité du phénotype observé pour les cellules *Ntn1*-/*Neo1*- montre que l'expression de ces gènes au cours du cycle est contrôlée très sévèrement. J'ai pu identifier certains des régulateurs de NTN1 et NEO1 liés au cycle, comme *CCNB1* et *E2F4*. Enfin, j'ai montré que l'expression élevée de NTN1 en phase S était liée à une clonogénicité plus importante des cellules, renforçant ainsi l'hypothèse selon laquelle la phase G1, au cours de laquelle l'expression de NTN1 et NEO1 est fortement réprimée, serait une fenêtre de sensibilité à la différenciation pour les cellules (Coronado et al. 2013; Pauklin et Vallier 2014; Dalton 2015).

L'hétérogénéité dans les CSE

Comme évoqué dans l'introduction, la variabilité de l'expression des gènes dans les CSE cultivées en sérum+LIF est largement décrite et discutée depuis quelques années (Graf et Stadtfeld 2008; Torres-Padilla et Chambers 2014). Cependant, l'hétérogénéité étudiée concernait jusqu'à maintenant essentiellement des facteurs de transcription, et c'est donc la première fois que dans une voie de signalisation, un ligand et ses récepteurs sont identifiés comme étant répartis de manière hétérogène dans la population de CSE.

Curieusement, il a été observé que les cellules au sein d'une colonie de CSE sont fortement homogènes entre elles pour ces facteurs de transcription variables à l'échelle de la culture (Kumar et al. 2014). L'hypothèse avancée par les auteurs de cette étude est que les variations

d'état transcriptionnel pour l'expression de ces facteurs ont lieu de manière peu fréquentes par rapport au cycle cellulaire. Cependant, une autre explication possible est que les cellules physiquement proches soient exposées à la même quantité de NTN1, et y répondent en adaptant leur état de pluripotence de manière homogène. Il pourrait donc être intéressant de voir si les cellules d'une même colonie sont homogènes pour l'expression de NEO1 ou UNC5B, et si elles réceptionnent donc de la même façon le signal NTN1.

De nombreuses études se sont concentrées sur l'hétérogénéité du facteur de transcription NANOG, qui gouvernerait par association l'hétérogénéité de l'expression d'autres facteurs comme ESRRB et KLF4 (Singh et al. 2007; Chambers et al. 2007). D'après ces études, il existe dans la population de CSE 10 à 20% de cellules Nanog- (n'exprimant pas NANOG). Ces cellules ne sont cependant pas en cours de différenciation, puisqu'elles répondent au LIF, et conservent notamment la capacité à former des chimères (Chambers et al. 2007). Bien que les pourcentages de cellules *Ntn1*- et *Nanog*- soient différents, la question se pose du recoupement entre leurs identités cellulaires, étant donné qu'il existe de nombreuses similarités entre les hétérogénéités d'expression de *Ntn1* et *Nanog*. En effet, elles sont toutes deux résolues par la mise en culture des CSE en 2i+LIF, et la surexpression de NTN1 mène également à l'homogénéisation de l'expression de NANOG dans la culture (Wray, Kalkan, et Smith 2010; Huyghe et al. 2020 Fig. 1d,h). De plus, le niveau d'expression de NANOG est corrélé à celui de NTN1 dans mes sous-populations triées (Fig. 3h). Dans le cas de *Nanog*, une étude utilisant l'imagerie par intervalles de temps a montré que son homogénéisation en 2i+LIF était en partie due à la sélection et l'élimination des cellules *Nanog*- (Hastreiter et al. 2018). Cependant, au contraire des cellules *Nanog*- qui disparaissent quasiment complètement de la culture, les cellules *Ntn1*- diminuent en proportion mais restent bien présentes dans les cellules en 2i+LIF (Huyghe et al. 2020, Fig. 1d,h), soutenant ainsi l'hypothèse selon laquelle l'expression de ces gènes correspond bien à deux identités cellulaires similaires mais non identiques. Une autre étude a suggéré que l'hétérogénéité de *Nanog* pourrait être due à une expression mono-allélique (Miyanari et Torres-Padilla 2012). Ce n'est a priori pas le cas pour *Ntn1*, *Neo1* et *Unc5b*, puisque nous n'observons pas de différence dans le pourcentage de cellules positives pour leur expression entre les clones homozygotes et hétérozygotes pour nos insertions (données non présentées), et un autre mécanisme gouverne donc leur hétérogénéité d'expression.

Il serait donc intéressant de comparer la compétence pluripotente de nos différentes sous-populations dans le cadre de la formation de chimères, et de tester la formation de tératomes afin de vérifier si les populations exprimant de faibles niveaux de *Ntn1*, *Neo1* ou *Unc5b* sont dans un état de pluripotence solide ou partiellement dissolu, et si elles sont biaisées envers un lignage particulier lors de la différenciation. En effet, les résultats obtenus au cours de notre première étude montrent que les cellules délétées pour l'expression de *Ntn1* présentent une capacité réduite à participer à la formation de chimères (Huyghe et al. 2020, Fig. 7l,m), et que les cellules surexprimant NTN1 répriment l'expression de gènes marqueurs du mésoderme et de l'endoderme, mais pas de l'ectoderme (Huyghe et al. 2020, Fig. 2l). Cependant, ces modèles ne reflètent pas des différences endogènes d'expression de *Ntn1*, et les résultats obtenus pourraient donc être différents. En revanche, la formation de chimères ou tératomes est

plutôt longue et se fait en plusieurs semaines ; bien que ce système soit plus artificiel, il serait donc peut-être plus judicieux de trier des CSE 3C et de les mettre en culture pour former des corps embryoides, qui peuvent être récoltés et analysés après cinq jours, afin d'étudier la différenciation dans nos différentes sous-populations et de limiter l'effet de la rééquilibration de notre système.

De manière intéressante, la vision générale sur l'hétérogénéité dans les CSE s'orientait jusqu'à présent vers l'hypothèse selon laquelle cette hétérogénéité est aléatoire et permet à la cellule de générer un bruit de fond de différenciation (Marks et al. 2012; Singh et al. 2013). Elle serait alors un reflet du potentiel développemental non verrouillé et plastique des CSE, qui leur permet à la fois de préserver leur capacité d'auto-renouvellement et d'avoir l'opportunité de passer facilement de la pluripotence naïve à amorcée de manière réversible. Cependant, cette vision contraste fortement avec notre système, où l'expression de *Ntn1* et *Neo1* est hétérogène mais étroitement régulée, et non laissée libre de fluctuer, ce qui laisse penser que l'hétérogénéité peut donc être contrôlée de manière globale dans la culture, et pose la question de sa signification biologique. En effet, l'hétérogénéité des CSE a parfois été décrite comme un artefact créé par les conditions de culture *in vitro* (A. Smith 2013). Cependant, des études *in vivo* montrent que les facteurs de transcription NANOG, OTX2, GATA6, SOX2, SOX21 et KLF4 sont également exprimés de manière hétérogène dans l'épiblaste, et que cette hétérogénéité ne dépend pas des signalisations NANOG, GATA6 ou MAPK, confirmant ainsi la pertinence de l'étude de ce phénomène (Acampora et al. 2016; Allègre et al. 2022).

Régulation d'une voie de signalisation par le cycle cellulaire

De nombreuses études se sont intéressées aux liens existants entre la pluripotence et le cycle cellulaire. En effet, comme évoqué dans l'introduction p.61, les acteurs du cycle cellulaire peuvent interagir avec ceux de la pluripotence, et les cellules ne sont pas sensibles de la même façon aux signaux de différenciation au cours du cycle cellulaire. Plusieurs études ont déjà souligné la régulation par le cycle cellulaire de voies de signalisation liées à la pluripotence et en particulier de leur activation notamment par phosphorylation de certains effecteurs (Davidson et Niehrs 2010; Jarrin, Pandit, et Gunhaga 2012; Salotti et al. 2013; Lobjois et al. 2004; J. Zhu et al. 2015; Davidson et al. 2009; Hadjihannas et al. 2012). C'est cependant la première fois qu'il est montré que le cycle cellulaire régule directement l'expression d'un ligand ainsi que de son récepteur dans une voie de signalisation associée à la pluripotence.

Les implications de cette découverte sont importantes. Premièrement, nos résultats indiquent par exemple que le cycle module la capacité des cellules à répondre aux signaux de différenciation à travers le contrôle de l'expression de *Ntn1* et *Neo1* (Fig. 8g-l). Il serait donc intéressant de vérifier si les ligands et récepteurs des autres voies de signalisation impliquées dans la pluripotence sont exprimés de manière hétérogène et régulés de la même manière par le cycle, ou indirectement *via* la voie Nétrine pour les voies WNT et MAPK par exemple. On pourrait pour cela consulter des données de séquençage de cellules uniques, mais elles présentent l'inconvénient d'avoir une profondeur de séquençage insuffisante pour ce genre

d'analyse ; par exemple, dans les données de Kumar et ses collègues utilisées dans ce manuscrit (Kumar et al. 2014), on ne détecte dans aucune cellule l'expression d'acteurs reconnus de la pluripotence tels que LIF, BMPRII, ALK4, ALK7 ou encore WNT3A. Notre système utilisant des rapporteurs fluorescent a permis de contourner ce problème, et de dévoiler des pans de la régulation de la voie Nétrine inconnus jusqu'alors.

Deuxièmement, les résultats obtenus durant ma thèse montrent que les mécanismes régulant l'expression de *Ntn1* et *Neo1* sont différents. Le facteur E2F4 par exemple semble induire l'expression de *Ntn1* et au contraire réprimer *Neo1* (Fig.7j). Cette régulation différentielle d'un récepteur et de son ligand est particulièrement intrigante puisqu'elle met en évidence une autre problématique étroitement liée : la temporalité de la production de Ntn1 et Neo1. En effet, si *Ntn1* et *Neo1* semblent induits au même moment, au début de la phase S, NTN1 doit être transcrite, traduite, sécrétée dans le milieu extracellulaire avant d'être liée à un récepteur et de transduire un signal, tandis que NEO1 est opérationnel beaucoup plus tôt en théorie. Même si ces processus se déroulent de manière rapide, il est donc possible que NTN1 et NEO1 aient des rôles légèrement différents dans la pluripotence.

Troisièmement, j'ai montré que l'expression de *Ntn1* et *Neo1* est très dynamique et que les populations triées se rééquilibrent rapidement (Fig. 2e-h). Ainsi, les cellules pourraient ajuster rapidement leur sensibilité aux signaux de différenciation. En revanche, ceci n'est valable que si les demi-vies des protéines NTN1 et NEO1 sont suffisamment courtes, un fait qui n'a pas vraiment été étudiée jusqu'à présent. Un blocage de la traduction par traitement au cycloheximide permettrait de répondre à cette interrogation. On peut aussi se demander si cette rééquilibration est simplement liée au cycle cellulaire et à la progression des cellules dans ce dernier. C'est sûrement en grande partie le cas, puisque les cinétiques rapides sont en accord avec la célérité du cycle cellulaire dans les CSE. Cependant, la régulation de l'expression *Ntn1* et *Neo1* est également dépendante de facteurs supplémentaires non liés au cycle, comme nous l'avons montré avec TCF7L1 et LEF1 par exemple (Huyghe et al. 2020, Fig. supp. 1c,d). De plus, nous avons pu observer que les cellules exprimant *Neo1* sont également majoritairement positives pour l'expression d'*Unc5b*, qui ne dépend pourtant pas du cycle cellulaire (Fig. 3a). Ceci soutient l'hypothèse selon laquelle il existe d'autres mécanismes de régulation, y compris potentiellement des boucles de régulation entre le ligand et les récepteurs de la voie Nétrine.

Enfin, nos données laissent penser que *Ntn1* et *Neo1* ne jouent pas un rôle primordial dans la progression du cycle cellulaire, puisque leur délétion n'affecte pas la répartition des cellules dans les différentes phases (Fig. 5f). L'observation dans l'analyse de l'ontologie des gènes différenciellement exprimés entre les populations DN et les autres sous-population triées démontre une surreprésentation des gènes liés à la progression de la phase G2/M (Fig. 6j), mais ceci pourrait être une simple corrélation due à l'absence de cellules en mitose dans la population DN. Cependant, on ne peut totalement exclure une contribution modeste de la voie Nétrine à la progression du cycle cellulaire. En effet, nous avons montré que les cellules traitées à la NTN1 recombinante présentaient une prolifération accrue, sans modification de la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle (Huyghe et al. 2020, Fig. supp. 2l,m). On pourrait notamment supposer que NTN1 et NEO1 participent à la réorganisation du

cytosquelette, ce qui a déjà été décrit dans d'autres contextes, mais reste à démontrer dans les CSE (Dent et al. 2004; Stavoe et Colón-Ramos 2012; Rajasekharan et Kennedy 2009; N. P. Boyer et Gupton 2018).

Rôle de Ntn1 dans la reprogrammation

L'influence de la phase du cycle sur l'efficacité de la reprogrammation est un phénomène qui a été peu étudié, mais une étude en particulier a montré que durant la reprogrammation en iPS de cellules souches neurales progénitrices murines, le tri de cellules Fucci en phase S, G2 et M permettait d'augmenter le taux de cellules reprogrammées (Roccio et al. 2013). Dans mon introduction p.63, j'ai également évoqué le fait que certains acteurs du cycle cellulaire comme CDK2 pouvaient jouer un rôle lors de la reprogrammation. NTN1 a précédemment été étudiée comme améliorant la reprogrammation en cellules iPS, et ce phénotype avait alors été attribué à son rôle anti-apoptotique. Cependant, les résultats obtenus durant ma thèse laissent penser que le contrôle de son expression par le cycle cellulaire pourrait également jouer un rôle important au cours de la reprogrammation, en addition de son action prévenant la mort cellulaire. La différence de compaction de la chromatine au cours des différentes phases a sûrement une grande importance dans ce processus, mais on peut supposer que l'augmentation de l'accessibilité de la chromatine spécifiquement au niveau du promoteur de *Ntn1*, ou des changements de méthylation à ce niveau menant à la sécrétion plus importante de NTN1 durant la phase S pourraient également contribuer à l'amélioration du taux de succès de la reprogrammation.

Mécanistique de la régulation et de la signalisation de la voie Nétrine

Durant ma thèse, j'ai montré que la signalisation Nétrine-1 reposait sur un ligand et la balance de ses récepteurs. Ce système très dynamique permet à la cellule une grande souplesse de modulation de ses réponses à l'environnement extérieur, et nous a amené à une réflexion sur le concept de « versatilité moléculaire », sur lequel nous avons écrit une revue (acceptée dans Nature Communications)(Annexe 2). Brièvement, ce concept regroupe les différents mécanismes au niveau notamment des voies de signalisation, des facteurs de transcription et des régulateurs épigénétiques qui peuvent être reconfigurés afin d'avoir des fonctions différentes dans des configurations cellulaires très proches, conférant ainsi une robustesse aux processus de transition.

Comparée aux cellules somatiques, la transcription dans les CSE n'est que peu corrélée au cycle cellulaire, comme l'ont montré plusieurs études d'analyse dans des cellules uniques (Gambardella et al. 2017; Klein et al. 2015; DeVeale et al. 2022). Nos résultats indiquant que NTN1 et NEO1 sont particulièrement exprimées durant la phase S sont donc surprenants. Une partie de l'explication réside sûrement dans le fait que la différence se situe ici principalement au niveau de la régulation post-traductionnelle et non post-transcriptionnelle. En effet, les

cellules exprimant l'ARN *Ntn1* ou *Neo1* se retrouvent d'après nos résultats dans toutes les phases du cycle cellulaires, bien qu'enrichies en phase G2/M. De manière générale, les acteurs du cycle étant principalement régulés par ubiquitinylation et dégradation (Dang, Nie, et Wei 2021), nous avons récemment réalisé des analyses sur le protéome des cellules 3C triées DP, DN, *Ntn1*⁺/*Neo1*⁻ et *Ntn1*⁻/*Neo1*⁺ afin d'en savoir plus sur les effets de la signalisation Nétrine au cours du cycle cellulaire. Les résultats ne nous étant pas encore parvenus au moment où j'écris ces lignes, je n'ai pu les inclure dans ce manuscrit.

Une étude réalisée dans le système nerveux a précédemment montré une régulation de *Neo1* par RB de manière indépendante du cycle, mais aucune observation n'a été faite dans ce sens durant ma thèse, ce qui implique donc des rôles bien distincts de RB dans et en dehors du cycle, en fonction du contexte (Andrusiak et al. 2011). Bien que l'axe RB-E2F soit non fonctionnel dans les CSE, de récentes études suggèrent que les protéines de poche RB, p107 et p130 pourraient y jouer un rôle en régulant négativement la pluripotence (ter Huurne et Stunnenberg 2021). Nos résultats appuient cette hypothèse, puisque j'ai montré que les protéines de poche répriment l'expression de *Ntn1* et *Neo1*, qui participent au maintien de la pluripotence (Figure 24e). Au contraire, les cyclines D et E, qui contrôlent la progression de la phase G1 et la transition vers la phase S ont récemment été découvertes comme jouant un rôle essentiel dans le maintien du réseau de pluripotence à travers la stabilisation d'OCT4, NANOG et SOX2 (L. Liu et al. 2017). Bien que je sois parvenue à identifier plusieurs répresseurs de l'expression de *Ntn1* et *Neo1*, nous manquons d'informations sur les facteurs induisant leur expression, et ces cyclines, présentes en fin de phase G1, représentent des candidates idéales. Cependant, l'analyse des données de séquençage ARN de cette étude n'a pas mis en évidence de différence significative dans l'expression de *Ntn1*, *Neo1* et *Unc5b* entre les CSE contrôle et les CSE cycline *D1*^{-/-}*D2*^{-/-}*D3*^{-/-}*E1*^{F/F} (knock-out conditionnel) *E2*^{-/-} (données non présentées). Les régulateurs positifs de l'expression de *Ntn1*, *Neo1* et *Unc5b* restent donc à identifier.

De nombreuses modifications épigénétiques ont lieu au cours du cycle cellulaire, et il a été montré par exemple que les sous-unités de PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2) étaient recrutées de manière différentielle au cours du cycle cellulaire, facilitant ainsi durant la phase G1 l'induction de gènes responsables de l'engagement vers la différenciation (Asenjo et al. 2020). De plus, les facteurs de transcription clés de la pluripotence OCT4 et SOX2 ont été décrits comme régulant l'accessibilité de la chromatine durant les différentes phases du cycle cellulaire (Friman et al. 2019). Il serait donc également intéressant de voir si des changements au niveau de la chromatine sont impliqués dans la régulation de l'expression de *Ntn1*, *Neo1* et *Unc5b*, et si leur expression différentielle induit des modifications d'accessibilité au niveau de gènes cibles. Pour répondre à cette question, j'ai réalisé une étude d'accessibilité de la chromatine par la transposase et séquençage (ATAC-seq). Les résultats sont en cours d'analyse et n'ont donc pas pu être inclus dans ce manuscrit.

Enfin, bien que nous ayons accumulé des connaissances sur les voies de signalisation avec lesquelles la voie Nétrine-1 interagit, nous manquons d'informations sur les partenaires physiques directs d'UNC5B et NEO1 qui transduiraient le signal jusqu'à l'activation de FAK ou du complexe Pp2a (Huyghe et al. 2020, Fig. 7p). Pour remédier à cela, j'ai réalisé durant ma thèse la construction d'une lignée cellulaire où les récepteurs sont fusionnés à un tag ainsi

qu'à un système BioID (Roux et al. 2018). La purification du tag suivie de spectrométrie de masse nous permettra d'identifier les protéines physiquement en relation avec UNC5B et NEO1, tandis que le système BioID, qui permet de biotinyler les molécules proches des récepteurs, nous communiquera des informations supplémentaires sur les partenaires indirects de ces récepteurs.

*Généralisation du rôle de *Ntn1*, *Neo1* et *Unc5b* au cours du développement*

Cette étude a permis d'éclaircir un grand nombre de points sur le rôle joué par *Ntn1*, *Neo1* et *Unc5b* dans la pluripotence naïve. Nos données ont cependant relevé que l'expression de NTN1, NEO1 et UNC5B semble évoluer au cours du développement péri- et post-implantatoire, et notamment pour les récepteurs dont l'expression augmente de manière temporellement définie, soulignant ainsi l'importance potentielle de ces derniers lors de ces étapes cruciales du développement (Figure 21). En outre, comme je l'ai déjà souligné, le profil d'expression de NANOG et OTX2 dans les cellules *Unc5b*⁺ rappelle celui des CSR (Figure 20h). Il serait donc intéressant d'étudier d'une part à quel point les CSE des différentes sous-populations sont similaires aux différents états de pluripotence identifiés *in vitro*, et d'autre part le rôle de la voie Nétrine dans les CSR et dans les CSEpi. Enfin, nous aimerions savoir si le cycle cellulaire régule également l'expression de NTN1 et NEO1 dans ces systèmes, où il est lui-même mal caractérisé.

De nombreuses études suggèrent qu'il existe également des liens forts entre cycle cellulaire et pluripotence dans les CSE humaines (CSEh), et que la phase G1 est de la même manière que dans les CSE une phase encline à la dissolution de l'état pluripotent (Pauklin et Vallier 2014; Gonzales et al. 2015). Nous souhaiterions donc tester l'expression cyclique de *Ntn1* et *Neo1* dans des CSEh, qui ont un cycle cellulaire plus proche des cellules somatiques, avec une phase G1 longue et une régulation dépendante de l'activation de RB (Boward, Wu, et Dalton 2016; Zaveri et Dhawan 2018). En collaboration avec l'équipe du Dr Pierre Savatier (SBRI, Bron), nous allons donc analyser l'expression de NTN1 et NEO1 dans des CSEh Fucci.

Pour finir, il sera crucial de valider les données obtenues *in vivo* afin de démontrer leur pertinence. En effet, il est important de déterminer si similairement à NANOG, l'expression de NTN1, NEO1 et UNC5b est également hétérogène dans le blastocyste. Comme je l'ai évoqué dans le chapitre 3 de l'introduction p.60, les cellules de l'épiblaste au stade E3,5-E4,5 possèdent un cycle similaire semblable aux CSE, avec une phase G1 très courte (Perera et al. 2022). Il est donc possible que la régulation de *Ntn1* et *Neo1* soit liée au cycle cellulaire de la même manière que dans les CSE. Afin de tenter de répondre à cette question, des expériences d'hybridation *in situ* marquant d'une part *Ntn1* ou *Neo1* et d'autre part des ARN caractéristiques des phases du cycle cellulaire sont en cours avec l'aide de notre collaboratrice, le Dr Claire Chazaud (GReD, Clermont-Ferrand).

Matériel et méthodes

Culture cellulaire

Les lignées cellulaires suivantes ont été utilisées dans ma thèse. Les CSE CGR8 (ECACC 07032901) ont été fournies par le laboratoire de B. Pain (SBRI, Bron, France). Les CSE E14TG2a (ECACC 08021401) Fucci ont été fournies par le laboratoire de P. Savatier (SBRI, Bron, France). Les CSE R1 (ECACC 07072001) contrôle, E2F4 KO, TKO et QKO ont été fournies par le laboratoire de J. Sage (Stanford University, Stanford, USA). Les CSE ont été cultivées sur des plaques préalablement enduites de gélatine 0,1% pendant 30 min à température ambiante, dans un milieu composé de DMEM (Life technologies, 41965062), 15% Knock-out Serum Replacement (Life technologies, 10828028), 1% de pénicilline/streptomycine, 1% d'acides aminés non-essentiels, 1% de sodium pyruvate, 2mM de L-glutamine, 100µM de β-mercaptoéthanol et supplémenté avec du LIF produit maison. Le milieu a été changé une fois par jour, et les cellules ont été passées tous les deux jours en utilisant de la TrypLE express (Life technologies). Toutes les lignées cellulaires ont été testées régulièrement et déclarées non porteuses de mycoplasme grâce au test MycoAlert (Lonza, LT07-318). Les CSE pNtn1-ZsGreen, pNtn1-CRE, 3C ont été générées par transfection stable de CSE CGR8 avec de la Lipofectamine 2000 (Life Technologies). Des monoclonales ont été isolés, amplifiés et caractérisés. Le crible shARN a également été réalisé par transfection de CSE avec de la Lipofectamine 2000. Les cellules transfectées ont été sélectionnées par addition de puromycine (Life technologies, A1113803, 1,5µg/mL), neomycine (Santa Cruz Biotechnologies, sc-29065A, 300µg/mL) ou hygromycine (Life technologies, 10687010, 250µg/mL) jusqu'à l'élimination complète des cellules contrôles (2 à 18 jours). La délétion du stop dans les pNtn1-CRE a été induite par un traitement avec du 4'-OH-tamoxifen 0,2µM pendant les temps indiqués. Pour les tests en différents états de pluripotence, les CSE en sérum+LIF ont été cultivées pendant 2 jours avec ajout des produits suivants : pour le milieu CSEF, 1µM de PD0325901 (Millipore, 444968) et 3µM de CHIR99021 (Millipore, 361571) ; pour le milieu CSR, 1µM de PD0325901 (Millipore, 444968) et 2µM d'IWP2 (Sigma, 681671) ; pour le milieu CSEpiL, 20ng/mL d'Activine A (R&D systems, 338-AC-010) et 12ng/mL de bFGF (R&D systems, 3139-FB-025). Les CSEpi ont été dérivées comme décrit dans la littérature (Rugg-Gunn 2017), et cultivées sur des plaques enduites de fibronectine 10µg/mL, dans un milieu composé à 1 :1 d'IMDM (Life technologies, 31980030) et de F12 (Life technologies, 31765035), ainsi que de 5mg/mL de BSA, 1% de pénicilline/streptomycine, 1% d'acides aminés non-

essentiels, 1% de concentrat lipidique défini chimiquement (Life technologies, 11905031), 2mM de L-glutamine, 100µM de β-mercaptoethanol, 6,25µg/mL de transferrine (Sigma, T8158), 7µg/mL d'insuline (Life technologies, 12585014), et supplémenté fraîchement avec 20ng/mL d'Activine A (R&D systems, 338-AC) et 12ng/mL de bFGF (R&D systems, 3139-FB). Pour l'expérience de blocage en phase G2/M, les cellules ont été traitées avec du Taxol 0,025µg/mL pendant 16h avant d'être analysées. La NTN1 recombinante a été fournie par le laboratoire de M. Koch (Center for Biochemistry, Cologne).

Constructions

Deux plasmides différents, pNtn1-ZsGreen et pNtn1-CRE ont été générés en utilisant une construction contenant la séquence de 2,7kb d'une partie du promoteur Ntn1 fournie par le laboratoire de P. Mehlen (CRCL, Lyon). La séquence ZsGreen a été obtenue à partir de la construction de base pZsGreen1-DR (Clontech) fournie par le laboratoire d'A. Besson (CRCT, Toulouse).

Les plasmides utilisés pour générer les KI et KO CRISPR ont été réalisés en utilisant la construction pSpCas9 (BB)-2A-Puro et le protocole du laboratoire de F. Zhang (Ran et al. 2013). Les sgARN (small guide RNA) ont été conçus avec les sites UCSC genome browser et CRISPOR. Leur séquence est détaillée dans la Table 2. La taille des bras d'homologie de part et d'autre du codon STOP utilisés pour l'insertion par KI de chaque gène est également indiquée dans la Table 2.

sgRNA	séquence
Ntn1 - KI	TGCAAGAAGGCCTAGCGCGG
Neo1 - KI	TTGGAGTCATGTCCAGGCGA
Unc5b - KI	CACTCAGCAATCGCCATCTG
Ntn1 - KO	CAGCATGATGCGCGCTGTGT
Neo1 - KO	GGAGGTGCAGAGGAGTCGCC
Unc5b - KO	GCTGGCGCTGCTGCTTTGCT
	taille des bras d'homologie
	avant stop ; après stop
Ntn1	645 ; 493
Neo1	600 ; 605
Unc5b	581 ; 987

Table 2

shRNA	séquence
E2F1	GCCAAGAAGTCCAAGAATCAT
E2F2	GCTCCTGACCAAGAAGTTCAT
E2F3	CTCAATAGAGAGCCTACAAAT
E2F4	CATCGGTCTGATCGAGAAGAA
Rb	CCGTGGATTCTGAACGTACTION
Rbl1	ATCTTTGCCAATGCTATAATG
Rbl2	CCAGAACATCATGCGTTGTTA
Cdk1	GCTGTATCTCATCTTTGAGTT
Ccnb1	CGTGTTTACTTGCTCTTCAAT
Ccnf	CCTACTAAACGAAGAATCAAA
Gmnn	GCCTTTGATCTTATAAGTAAA
Cdt1	GAGACTGTGACCTTTGCCAAA

Table 1

Les plasmides utilisés pour réprimer l'expression des gènes du crible ont été réalisés en utilisant la construction pLKO.1-TRC. Les shARN (small hairpin RNA) ont été conçus sur la base des siARN (short interfering RNA) Sigma. Leur séquence est détaillée dans la Table 1.

Test de clonogénicité

Pour le test de clonogénicité, les CSE ont étéensemencées à densité clonale (60 à 100 cellules par cm²) en sérum+LIF dans des plaques préalablement enduites de gélatine. Le milieu a été

changé tous les jours pendant 7 jours avant la détection de l'activité phosphatase alcaline dans les colonies (Sigma, AP0100-1KT).

Pour le traitement des cellules triées Fucci par la NTN1 recombinante, les cellules après tri ont étéensemencées dans un milieu contenant 0, 5 ou 10µg/mL de NTN1 recombinante. Le milieu a ensuite été changé tous les 2 jours pendant 7 jours avant la détection de l'activité phosphatase alcaline dans les colonies (Sigma, AP0100-1KT).

Cycle cellulaire

Les cellules ont été lavées dans du PBS avant d'être fixées par ajout d'éthanol glacial afin d'atteindre une concentration finale de 70%, et placées à -20°C pendant au moins 24h. Le jour de l'analyse, les cellules ont été centrifugées, réhydratées dans du PBS, centrifugées à nouveau et marquées avec une solution contenant 1mg/mL de RNase A (Sigma, R5503) et 20µg/mL d'iodure de propidium (Sigma, P4864) pendant 30 minutes.

Test du nombre de copies

L'ADN génomique a été purifié en utilisant un kit Nucleospin Tissue (Macherey-Nagel, 740952.250). Le nombre de copies a ensuite été analysé par RT-qPCR duplex avec une sonde TaqMan GFP, Neomycine ou Hygromycine (Life technologies, 4400291) ainsi qu'un contrôle de référence, contre le gène Tfrc murin (Life technologies, 4458366). Un échantillon de référence contenant un nombre de copies connu a également été utilisé pour chaque sonde. Le mélange a été fait avec le produit de génotypage TaqMan Mastermix (Life technologies, 4371355) en suivant le protocole « Copy Number Assay » disponible sur le site du fournisseur, avant d'être analysé sur un appareil QuantStudio Flex 7 (Thermofischer). Le nombre de copies a ensuite été analysé en utilisant le logiciel CopyCaller (Thermofischer).

Analyses protéiques et RT-qPCR

Les anticorps primaires utilisés dans cette étude sont détaillés dans la Table 4. Les principaux anticorps ont été validés par des approches gain et perte de fonction. Les western-blots et RT-

qPCR	séquence sens	séquence antisens
E2F1	TTAGCCCTGGGAAGACCTCA	CCGTGGCAATACTGCTTCTTG
E2F2	GGCGCATCTATGACATCACC	AAATAGTTCCTGCCTACCCAC
E2F3	CCCACCTCCAAAGACTTGGCT	AGGTTGGACGGGATTTGGTC
E2F4	TGAGCTCAAGGCAGAGATCG	CAAGGAGGGTATCTCCAGCAA
Rb	TGTATGGCATCTGCAAGGTGA	ACACGTTTAAAGGTCTCCTGGG
RbI1	TCCCTTTCATGGTATCGCC	GGGTTTGCTTACTCCGGTCA
RbI2	TGGAGCGGATACTCAGGTCA	GCAAAACGAAAATGTTTGTGGCA
Cdk1	GAGTGTACACACGAGGTAGT	TGGTGGCCAGTTCTGCAAAT
Ccnb1	GTGCCGCTGTACATAGGAT	TTCGACAACCTCCGTTAGCCT
Ccnf	CCTAGCTCAGGGGAGATCCA	GTTTTCTCGCTCCGTTTGCT
Gmnn	GCGGAGGTAATCGAGAGGC	CCTCATGTACACGGCCTAGC
Cdt1	GCACTGCTAGAGCGGATAAGG	CTCCGCTCAGACACGAAGA

Table 3

qPCR ont été réalisés comme décrits précédemment (Huyghe et al. 2020). Les séquences des amorces utilisées sont détaillées dans la Table 3.

Anticorps	Fournisseur	Référence	Dilution
ACTINE	Sigma	A3854	1/10000
CCNB1	Santa Cruz Biotechnologies	sc-245	1/1000
NANOG	Reprocells	RCAB002P	1/1000
NEO1	Cell Signaling	39447	1/1000
NTN1	Abcam	ab126729	1/1000
OTX2	Abcam	ab21990	1/1000
SOX2	Abcam	ab97959	1/1000
UNC5B	Cell Signaling	13851	1/1000

Table 4

Transcriptomique

Pour le séquençage d'ARN (RNA-seq), la qualité de l'ARN a été analysée avec un Bioanalyser (Agilent). Des duplicat ont été réalisés pour chaque condition. Les bibliothèques ont été construites et séquencées avec un illumina Hiseq 2000 (Beckman Coulter Genomics et Genewiz). Une analyse bioinformatique Illumina standard a été réalisée pour générer les fichiers fastq et suivis d'une évaluation qualité (MultiQC v1.7 <https://multiqc.info/>). Les volcano plot et carte thermique ont été réalisés avec Prism v9 (GraphPad Software). L'analyse GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) a été réalisée avec 'ClusterProfiler' (version 4.4.4), et le dot plot a été réalisé avec R/Bioconductor packages, R version 4.2.1 (2022-06-23).

FACS

Les analyses FACS ont été réalisées sur un appareil BD LSRFortessa en utilisant le logiciel BD FACSDiva. Les tris cellulaires ont été réalisés sur un appareil BD FACSAria. Les cellules ont été triées, lavées au PBS et centrifugées avant d'être directementensemencées, réanalysées, fixées ou lysées et stockées à -80°C avant analyse de leur expression. Les données FACS ont été analysées avec le logiciel BD FlowJo.

Statistiques

Les quantifications des Western-Blot ont été réalisées avec le logiciel ImageJ. Les analyses statistiques de moyenne et variance ont été réalisées avec le logiciel Prism v9 (GraphPad Software) en utilisant le test approprié en fonction de l'échantillon (t-test, Anova). Les nombres de réplicats réalisés sont indiqués en légende de chaque figure.

Bibliographie

- Abdullah, Ahmad, Carl Herdenberg, et Håkan Hedman. 2021. « Netrin-1 Functions as a Suppressor of Bone Morphogenetic Protein (BMP) Signaling ». *Scientific Reports* 11 (1): 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87949-7>.
- Abraham, R. T., et G. J. Wiederrecht. 1996. « Immunopharmacology of Rapamycin ». *Annual Review of Immunology* 14: 483-510. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.14.1.483>.
- Acampora, Dario, Luca G. Di Giovannantonio, et Antonio Simeone. 2013. « Otx2 Is an Intrinsic Determinant of the Embryonic Stem Cell State and Is Required for Transition to a Stable Epiblast Stem Cell Condition ». *Development (Cambridge, England)* 140 (1): 43-55. <https://doi.org/10.1242/dev.085290>.
- Acampora, Dario, Daniela Omodei, Giuseppe Petrosino, Arcomaria Garofalo, Marco Savarese, Vincenzo Nigro, Luca Giovanni Di Giovannantonio, Vincenzo Mercadante, et Antonio Simeone. 2016. « Loss of the Otx2-Binding Site in the Nanog Promoter Affects the Integrity of Embryonic Stem Cell Subtypes and Specification of Inner Cell Mass-Derived Epiblast ». *Cell Reports* 15 (12): 2651-64. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.05.041>.
- Aggarwal, Priya, Matthew D. Lessie, Douglas I. Lin, Laura Pontano, Andrew B. Gladden, Beth Nuskey, Ami Goradia, et al. 2007. « Nuclear Accumulation of Cyclin D1 during S Phase Inhibits Cul4-Dependent Cdt1 Proteolysis and Triggers P53-Dependent DNA Rereplication ». *Genes & Development* 21 (22): 2908-22. <https://doi.org/10.1101/gad.1586007>.
- Ahn, Eun Hee, Seong Su Kang, Qi Qi, Xia Liu, et Keqiang Ye. 2020. « Netrin1 Deficiency Activates MST1 via UNC5B Receptor, Promoting Dopaminergic Apoptosis in Parkinson's Disease ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117 (39): 24503-13. <https://doi.org/10.1073/pnas.2004087117>.
- Aktas, H, H Cai, et G M Cooper. 1997. « Ras links growth factor signaling to the cell cycle machinery via regulation of cyclin D1 and the Cdk inhibitor p27KIP1. » *Molecular and Cellular Biology* 17 (7): 3850-57.
- Alberts, Bruce, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, et Peter Walter. 2002. « An Overview of the Cell Cycle ». *Molecular Biology of the Cell. 4th Edition*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26869/>.
- Allègre, Nicolas, Sabine Chauveau, Cynthia Dennis, Yoan Renaud, Dimitri Meistermann, Lorena Valverde Estrella, Pierre Pouchin, Michel Cohen-Tannoudji, Laurent David, et Claire Chazaud. 2022. « NANOG Initiates Epiblast Fate through the Coordination of Pluripotency Genes Expression ». *Nature Communications* 13 (1): 3550. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30858-8>.
- Álvarez-Fernández, Mónica, et Marcos Malumbres. 2014. « Preparing a Cell for Nuclear Envelope Breakdown: Spatio-Temporal Control of Phosphorylation during Mitotic Entry ». *BioEssays* 36 (8): 757-65. <https://doi.org/10.1002/bies.201400040>.
- Amano, Kenji, Morimitsu Fujii, Satoru Arata, Takuro Tojima, Masaharu Ogawa, Noriyuki Morita, Atsushi Shimohata, et al. 2009. « DSCAM Deficiency Causes Loss of Pre-Inspiratory Neuron Synchronicity and Perinatal Death ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 29 (9): 2984-96. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3624-08.2009>.
- Amit, Sharon, Ada Hatzubai, Yaara Birman, Jens S. Andersen, Etti Ben-Shushan, Matthias Mann, Yinon Ben-Neriah, et Irit Alkalay. 2002. « Axin-Mediated CKI Phosphorylation

- of Beta-Catenin at Ser 45: A Molecular Switch for the Wnt Pathway ». *Genes & Development* 16 (9): 1066-76. <https://doi.org/10.1101/gad.230302>.
- Anani, Shihadeh, Shivani Bhat, Nobuko Honma-Yamanaka, Dayana Krawchuk, et Yojiro Yamanaka. 2014. « Initiation of Hippo signaling is linked to polarity rather than to cell position in the pre-implantation mouse embryo ». *Development* 141 (14): 2813-24. <https://doi.org/10.1242/dev.107276>.
- Andrusiak, Matthew G., Kelly A. McClellan, Delphie Dugal-Tessier, Lisa M. Julian, Sonia P. Rodrigues, David S. Park, Timothy E. Kennedy, et Ruth S. Slack. 2011. « Rb/E2F Regulates Expression of Neogenin during Neuronal Migration ». *Molecular and Cellular Biology* 31 (2): 238-47. <https://doi.org/10.1128/MCB.00378-10>.
- Ang, Yen-Sin, Su-Yi Tsai, Dung-Fang Lee, Jonathan Monk, Jie Su, Kajan Ratnakumar, Junjun Ding, et al. 2011. « Wdr5 Mediates Self-Renewal and Reprogramming via the Embryonic Stem Cell Core Transcriptional Network ». *Cell* 145 (2): 183-97. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.03.003>.
- Antonin, Wolfram, et Heinz Neumann. 2016. « Chromosome Condensation and Decondensation during Mitosis ». *Current Opinion in Cell Biology* 40 (juin): 15-22. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2016.01.013>.
- Aoki, Fugaku, Diane M. Worrada, et Richard M. Schultz. 1997. « Regulation of Transcriptional Activity during the First and Second Cell Cycles in the Preimplantation Mouse Embryo ». *Developmental Biology* 181 (2): 296-307. <https://doi.org/10.1006/dbio.1996.8466>.
- Arakawa, Hirofumi. 2004. « Netrin-1 and Its Receptors in Tumorigenesis ». *Nature Reviews Cancer* 4 (12): 978-87. <https://doi.org/10.1038/nrc1504>.
- Arias, Alfonso Martinez, Jennifer Nichols, et Christian Schröter. 2013. « A molecular basis for developmental plasticity in early mammalian embryos ». *Development* 140 (17): 3499-3510. <https://doi.org/10.1242/dev.091959>.
- Arnold, Sebastian J., et Elizabeth J. Robertson. 2009. « Making a Commitment: Cell Lineage Allocation and Axis Patterning in the Early Mouse Embryo ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 10 (2): 91-103. <https://doi.org/10.1038/nrm2618>.
- Asenjo, Helena G., Amador Gallardo, Lourdes López-Onieva, Irene Tejada, Jordi Martorell-Marugán, Pedro Carmona-Sáez, et David Landeira. 2020. « Polycomb regulation is coupled to cell cycle transition in pluripotent stem cells ». *Science Advances* 6 (10): eaay4768. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aay4768>.
- Attwooll, Claire, Eros Lazzerini Denchi, et Kristian Helin. 2004. « The E2F Family: Specific Functions and Overlapping Interests ». *The EMBO Journal* 23 (24): 4709-16. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600481>.
- Avilion, Ariel A., Silvia K. Nicolis, Larisa H. Pevny, Lidia Perez, Nigel Vivian, et Robin Lovell-Badge. 2003. « Multipotent Cell Lineages in Early Mouse Development Depend on SOX2 Function ». *Genes & Development* 17 (1): 126-40. <https://doi.org/10.1101/gad.224503>.
- Bachvarova, R. 1985. « Gene Expression during Oogenesis and Oocyte Development in Mammals ». *Developmental Biology (New York, N.Y.: 1985)* 1: 453-524. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6814-8_11.
- Bae, Gyu-Un, Youn-Joo Yang, Guoying Jiang, Mingi Hong, Hye-Jin Lee, Marc Tessier-Lavigne, Jong-Sun Kang, et Robert S. Krauss. 2009. « Neogenin Regulates Skeletal Myofiber Size and Focal Adhesion Kinase and Extracellular Signal-Regulated Kinase Activities in

- Vivo and in Vitro ». *Molecular Biology of the Cell* 20 (23): 4920-31.
<https://doi.org/10.1091/mbc.e09-06-0491>.
- Barallobre, María J., Marta Pascual, José A. Del Río, et Eduardo Soriano. 2005. « The Netrin Family of Guidance Factors: Emphasis on Netrin-1 Signalling ». *Brain Research Reviews* 49 (1): 22-47. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.11.003>.
- Barker, Nick, Rachel A. Ridgway, Johan H. van Es, Marc van de Wetering, Harry Begthel, Maaïke van den Born, Esther Danenberg, Alan R. Clarke, Owen J. Sansom, et Hans Clevers. 2009. « Crypt Stem Cells as the Cells-of-Origin of Intestinal Cancer ». *Nature* 457 (7229): 608-11. <https://doi.org/10.1038/nature07602>.
- Barrett, Camilla, et Sarah Guthrie. 2001. « Expression Patterns of the Netrin Receptor UNC5H1 among Developing Motor Neurons in the Embryonic Rat Hindbrain ». *Mechanisms of Development* 106 (1): 163-66. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(01\)00415-4](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(01)00415-4).
- Bartek, Jiri, Jirina Bartkova, et Jiri Lukas. 1996. « The Retinoblastoma Protein Pathway and the Restriction Point ». *Current Opinion in Cell Biology* 8 (6): 805-14.
[https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(96\)80081-0](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(96)80081-0).
- Bartscherer, Kerstin, Nadège Pelte, Dierk Ingelfinger, et Michael Boutros. 2006. « Secretion of Wnt Ligands Requires Evi, a Conserved Transmembrane Protein ». *Cell* 125 (3): 523-33. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.04.009>.
- Becker, Klaus A., Prachi N. Ghule, Jaclyn A. Therrien, Jane B. Lian, Janet L. Stein, Andre J. van Wijnen, et Gary S. Stein. 2006. « Self-Renewal of Human Embryonic Stem Cells Is Supported by a Shortened G1 Cell Cycle Phase ». *Journal of Cellular Physiology* 209 (3): 883-93. <https://doi.org/10.1002/jcp.20776>.
- Beddington, R.S., et E.J. Robertson. 1989. « An assessment of the developmental potential of embryonic stem cells in the midgestation mouse embryo ». *Development* 105 (4): 733-37. <https://doi.org/10.1242/dev.105.4.733>.
- Bedzhov, Ivan, Chuen Yan Leung, Monika Bialecka, et Magdalena Zernicka-Goetz. 2014. « In Vitro Culture of Mouse Blastocysts beyond the Implantation Stages ». *Nature Protocols* 9 (12): 2732-39. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.186>.
- Bedzhov, Ivan, et Magdalena Zernicka-Goetz. 2014. « Self-Organizing Properties of Mouse Pluripotent Cells Initiate Morphogenesis upon Implantation ». *Cell* 156 (5): 1032-44. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.023>.
- Beppu, Hideyuki, Masahiro Kawabata, Toshiaki Hamamoto, Anna Chytil, Osamu Minowa, Tetsuo Noda, et Kohei Miyazono. 2000. « BMP Type II Receptor Is Required for Gastrulation and Early Development of Mouse Embryos ». *Developmental Biology* 221 (1): 249-58. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9670>.
- Berg, Debbie L. C. van den, Wensheng Zhang, Adam Yates, Erik Engelen, Katalin Takacs, Karel Bezstarosti, Jeroen Demmers, Ian Chambers, et Raymond A. Poot. 2008. « Estrogen-Related Receptor Beta Interacts with Oct4 to Positively Regulate Nanog Gene Expression ». *Molecular and Cellular Biology* 28 (19): 5986-95.
<https://doi.org/10.1128/MCB.00301-08>.
- Bernet, Agnès, Laetitia Mazelin, Marie-May Coissieux, Nicolas Gadot, Susan L. Ackerman, Jean-Yves Scoazec, et Patrick Mehlen. 2007. « Inactivation of the UNC5C netrin-1 receptor is associated with tumor progression in colorectal malignancies ». *Gastroenterology* 133 (6): 1840-48. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.08.009>.
- Bernstein, Bradley E., Tarjei S. Mikkelsen, Xiaohui Xie, Michaela Kamal, Dana J. Huebert, James Cuff, Ben Fry, et al. 2006. « A Bivalent Chromatin Structure Marks Key

- Developmental Genes in Embryonic Stem Cells ». *Cell* 125 (2): 315-26.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.041>.
- Betschinger, Joerg, Jennifer Nichols, Sabine Dietmann, Philip D. Corrin, Patrick J. Paddison, et Austin Smith. 2013. « Exit from Pluripotency Is Gated by Intracellular Redistribution of the bHLH Transcription Factor Tfe3 ». *Cell* 153 (2): 335-47.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.012>.
- Betto, Riccardo M., Linda Diamante, Valentina Perrera, Matteo Audano, Stefania Rapelli, Andrea Lauria, Danny Incarnato, et al. 2021. « Metabolic Control of DNA Methylation in Naive Pluripotent Cells ». *Nature Genetics* 53 (2): 215-29.
<https://doi.org/10.1038/s41588-020-00770-2>.
- Bhat, Sameer Ahmed, Sumrati Gurtoo, Sayali Chandrashekhar Deolankar, Khalid Majid Fazili, Jayshree Advani, Rohan Shetty, T. S. Keshava Prasad, Shaida Andrabi, et Yashwanth Subbannayya. 2019. « A network map of netrin receptor UNC5B-mediated signaling ». *Journal of Cell Communication and Signaling* 13 (1): 121-27.
<https://doi.org/10.1007/s12079-018-0485-z>.
- Biase, Fernando H., Xiaoyi Cao, et Sheng Zhong. 2014. « Cell Fate Inclination within 2-Cell and 4-Cell Mouse Embryos Revealed by Single-Cell RNA Sequencing ». *Genome Research* 24 (11): 1787-96. <https://doi.org/10.1101/gr.177725.114>.
- Bilodeau, Steve, Michael H. Kagey, Garrett M. Frampton, Peter B. Rahl, et Richard A. Young. 2009. « SetDB1 Contributes to Repression of Genes Encoding Developmental Regulators and Maintenance of ES Cell State ». *Genes & Development* 23 (21): 2484-89. <https://doi.org/10.1101/gad.1837309>.
- Blobel, Gerd A., Stephan Kadauke, Eric Wang, Alan W. Lau, Johannes Zuber, Margaret M. Chou, et Christopher R. Vakoc. 2009. « A Reconfigured Pattern of MLL Occupancy within Mitotic Chromatin Promotes Rapid Transcriptional Reactivation Following Mitotic Exit ». *Molecular Cell* 36 (6): 970-83.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.12.001>.
- Boheler, Kenneth R., Jaroslaw Czyz, David Tweedie, Huang-Tian Yang, Sergey V. Anisimov, et Anna M. Wobus. 2002. « Differentiation of Pluripotent Embryonic Stem Cells into Cardiomyocytes ». *Circulation Research* 91 (3): 189-201.
<https://doi.org/10.1161/01.res.0000027865.61704.32>.
- Bornens, Michel. 2021. « Centrosome Organization and Functions ». *Current Opinion in Structural Biology*, Centrosomal Organization and Assemblies • Folding and Binding, 66 (février): 199-206. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2020.11.002>.
- Boroviak, Thorsten, Remco Loos, Patrick Lombard, Junko Okahara, Rüdiger Behr, Erika Sasaki, Jennifer Nichols, Austin Smith, et Paul Bertone. 2015. « Lineage-Specific Profiling Delineates the Emergence and Progression of Naive Pluripotency in Mammalian Embryogenesis ». *Developmental Cell* 35 (3): 366-82.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.10.011>.
- Boward, Ben, Tianming Wu, et Stephen Dalton. 2016. « Concise Review: Control of Cell Fate Through Cell Cycle and Pluripotency Networks ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 34 (6): 1427-36. <https://doi.org/10.1002/stem.2345>.
- Boyé, Kevin, Luiz Henrique Geraldo, Jessica Furtado, Laurence Pibouin-Fragner, Mathilde Poulet, Doyeun Kim, Bryce Nelson, et al. 2022. « Endothelial Unc5B Controls Blood-Brain Barrier Integrity ». *Nature Communications* 13 (1): 1169.
<https://doi.org/10.1038/s41467-022-28785-9>.

- Boyer, Laurie A., Tong Ihn Lee, Megan F. Cole, Sarah E. Johnstone, Stuart S. Levine, Jacob P. Zucker, Matthew G. Guenther, et al. 2005. « Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells ». *Cell* 122 (6): 947-56. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.020>.
- Boyer, Laurie A., Kathrin Plath, Julia Zeitlinger, Tobias Brambrink, Lea A. Medeiros, Tong Ihn Lee, Stuart S. Levine, et al. 2006. « Polycomb Complexes Repress Developmental Regulators in Murine Embryonic Stem Cells ». *Nature* 441 (7091): 349-53. <https://doi.org/10.1038/nature04733>.
- Boyer, Nicholas P., et Stephanie L. Gupton. 2018. « Revisiting Netrin-1: One Who Guides (Axons) ». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 12. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2018.00221>.
- Bracken, Adrian P., Nikolaj Dietrich, Diego Pasini, Klaus H. Hansen, et Kristian Helin. 2006. « Genome-Wide Mapping of Polycomb Target Genes Unravels Their Roles in Cell Fate Transitions ». *Genes & Development* 20 (9): 1123-36. <https://doi.org/10.1101/gad.381706>.
- Bradley, Allan, Martin Evans, Matthew H. Kaufman, et Elizabeth Robertson. 1984. « Formation of Germ-Line Chimaeras from Embryo-Derived Teratocarcinoma Cell Lines ». *Nature* 309 (5965): 255-56. <https://doi.org/10.1038/309255a0>.
- Bragdon, Beth, Oleksandra Moseychuk, Sven Saldanha, Daniel King, Joanne Julian, et Anja Nohe. 2011. « Bone Morphogenetic Proteins: A Critical Review ». *Cellular Signalling* 23 (4): 609-20. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.10.003>.
- Brandeis, M., I. Rosewell, M. Carrington, T. Crompton, M. A. Jacobs, J. Kirk, J. Gannon, et T. Hunt. 1998. « Cyclin B2-Null Mice Develop Normally and Are Fertile Whereas Cyclin B1-Null Mice Die in Utero ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (8): 4344-49. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.8.4344>.
- Braude, P., V. Bolton, et S. Moore. 1988. « Human Gene Expression First Occurs between the Four- and Eight-Cell Stages of Preimplantation Development ». *Nature* 332 (6163): 459-61. <https://doi.org/10.1038/332459a0>.
- Brehm, Alexander, Eric A. Miska, Dennis J. McCance, Juliet L. Reid, Andrew J. Bannister, et Tony Kouzarides. 1998. « Retinoblastoma Protein Recruits Histone Deacetylase to Repress Transcription ». *Nature* 391 (6667): 597-601. <https://doi.org/10.1038/35404>.
- Brickman, Joshua M., et Palle Serup. 2017. « Properties of Embryoid Bodies ». *WIREs Developmental Biology* 6 (2): e259. <https://doi.org/10.1002/wdev.259>.
- Brinster, R. L. 1974. « The Effect of Cells Transferred into the Mouse Blastocyst on Subsequent Development ». *The Journal of Experimental Medicine* 140 (4): 1049-56. <https://doi.org/10.1084/jem.140.4.1049>.
- Brons, I. Gabrielle M., Lucy E. Smithers, Matthew W. B. Trotter, Peter Rugg-Gunn, Bowen Sun, Susana M. Chuva de Sousa Lopes, Sarah K. Howlett, et al. 2007. « Derivation of Pluripotent Epiblast Stem Cells from Mammalian Embryos ». *Nature* 448 (7150): 191-95. <https://doi.org/10.1038/nature05950>.
- Bruin, Alain de, Baidehi Maiti, Laszlo Jakoi, Cynthia Timmers, Robin Buerki, et Gustavo Leone. 2003. « Identification and Characterization of E2F7, a Novel Mammalian E2F Family Member Capable of Blocking Cellular Proliferation* ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (43): 42041-49. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308105200>.
- Buehr, Mia, Stephen Meek, Kate Blair, Jian Yang, Janice Ure, Jose Silva, Renee McLay, John Hall, Qi-Long Ying, et Austin Smith. 2008. « Capture of Authentic Embryonic Stem

- Cells from Rat Blastocysts ». *Cell* 135 (7): 1287-98.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.12.007>.
- Bui, Duyen T., et Joachim J. Li. 2019. « DNA Rereplication Is Susceptible to Nucleotide-Level Mutagenesis ». *Genetics* 212 (2): 445-60.
<https://doi.org/10.1534/genetics.119.302194>.
- Bulut-Karslioglu, Aydan, Steffen Biechele, Hu Jin, Trisha A. Macrae, Miroslav Hejna, Marina Gertsenstein, Jun S. Song, et Miguel Ramalho-Santos. 2016. « Inhibition of MTOR Induces a Paused Pluripotent State ». *Nature* advance online publication (novembre).
<https://doi.org/10.1038/nature20578>.
- Bulut-Karslioglu, Aydan, Trisha A. Macrae, Juan A. Oses-Prieto, Sergio Covarrubias, Michelle Percharde, Gregory Ku, Aaron Diaz, Michael T. McManus, Alma L. Burlingame, et Miguel Ramalho-Santos. 2018. « The Transcriptionally Permissive Chromatin State of Embryonic Stem Cells Is Acutely Tuned to Translational Output ». *Cell Stem Cell* 22 (3): 369-383.e8. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.02.004>.
- Burgess, Robert W., Thomas J. Jucius, et Susan L. Ackerman. 2006. « Motor Axon Guidance of the Mammalian Trochlear and Phrenic Nerves: Dependence on the Netrin Receptor *Unc5c* and Modifier Loci ». *Journal of Neuroscience* 26 (21): 5756-66.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0736-06.2006>.
- Burgoyne, Paul S., Shantha K. Mahadevaiah, et James M.A. Turner. 2007. « The Management of DNA Double-Strand Breaks in Mitotic G2, and in Mammalian Meiosis Viewed from a Mitotic G2 Perspective ». *BioEssays* 29 (10): 974-86.
<https://doi.org/10.1002/bies.20639>.
- Burke, Jason R., Greg L. Hura, et Seth M. Rubin. 2012. « Structures of Inactive Retinoblastoma Protein Reveal Multiple Mechanisms for Cell Cycle Control ». *Genes & Development* 26 (11): 1156-66. <https://doi.org/10.1101/gad.189837.112>.
- Burke, Jason R., Tyler J. Liban, Tamara Restrepo, Hsiau-Wei Lee, et Seth M. Rubin. 2014. « Multiple Mechanisms for E2F Binding Inhibition by Phosphorylation of the Retinoblastoma Protein C-Terminal Domain ». *Journal of Molecular Biology* 426 (1): 245-55. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.09.031>.
- Burkhart, Deborah L., Stacey E. Wirt, Anne-Flore Zmoos, Michael S. Kareta, et Julien Sage. 2010. « Tandem E2F Binding Sites in the Promoter of the P107 Cell Cycle Regulator Control P107 Expression and Its Cellular Functions ». *PLoS Genetics* 6 (6): e1001003.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001003>.
- Buta, Christiane, Robert David, Ralf Dressel, Mia Emgård, Christiane Fuchs, Ulrike Gross, Lyn Healy, et al. 2013. « Reconsidering Pluripotency Tests: Do We Still Need Teratoma Assays? ». *Stem Cell Research* 11 (1): 552-62.
<https://doi.org/10.1016/j.scr.2013.03.001>.
- Calegari, Federico, et Wieland B. Huttner. 2003. « An Inhibition of Cyclin-Dependent Kinases That Lengthens, but Does Not Arrest, Neuroepithelial Cell Cycle Induces Premature Neurogenesis ». *Journal of Cell Science* 116 (Pt 24): 4947-55.
<https://doi.org/10.1242/jcs.00825>.
- Campàs, Otger. 2016. « A Toolbox to Explore the Mechanics of Living Embryonic Tissues ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 55 (juillet): 119-30.
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.03.011>.
- Camus, Anne, Aitana Perea-Gomez, Anne Moreau, et Jérôme Collignon. 2006. « Absence of Nodal Signaling Promotes Precocious Neural Differentiation in the Mouse Embryo ». *Developmental Biology* 295 (2): 743-55. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.03.047>.

- Canham, Maurice A., Alexei A. Sharov, Minoru S. H. Ko, et Joshua M. Brickman. 2010. « Functional Heterogeneity of Embryonic Stem Cells Revealed through Translational Amplification of an Early Endodermal Transcript ». *PLOS Biology* 8 (5): e1000379. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000379>.
- Cantley, Lewis C. 2002. « The Phosphoinositide 3-Kinase Pathway ». *Science* 296 (5573): 1655-57. <https://doi.org/10.1126/science.296.5573.1655>.
- Cao, Lihuan, Fang Chen, Xianmei Yang, Weijin Xu, Jun Xie, et Long Yu. 2014. « Phylogenetic Analysis of CDK and Cyclin Proteins in Premetazoan Lineages ». *BMC Evolutionary Biology* 14 (janvier): 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-14-10>.
- Capo-chichi, Callinice D., Malgorzata E. Rula, Jennifer L. Smedberg, Lisa Vanderveer, Michael S. Parmacek, Edward E. Morrisey, Andrew K. Godwin, et Xiang-Xi Xu. 2005. « Perception of Differentiation Cues by GATA Factors in Primitive Endoderm Lineage Determination of Mouse Embryonic Stem Cells ». *Developmental Biology* 286 (2): 574-86. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.07.037>.
- Cappell, Steven D., Mingyu Chung, Ariel Jaimovich, Sabrina L. Spencer, et Tobias Meyer. 2016. « Irreversible APCCdh1 Inactivation Underlies the Point of No Return for Cell-Cycle Entry ». *Cell* 166 (1): 167-80. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.077>.
- Carlson, Bruce M. 2019. « Cleavage and Implantation ». In *Human Embryology and Developmental Biology*, 6th éd.
- Castets, Marie, Marie-May Coissieux, Céline Delloye-Bourgeois, Laure Bernard, Jean-Guy Delcros, Agnès Bernet, Vincent Laudet, et Patrick Mehlen. 2009. « Inhibition of Endothelial Cell Apoptosis by Netrin-1 during Angiogenesis ». *Developmental Cell* 16 (4): 614-20. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.02.006>.
- Chambers, Ian, Douglas Colby, Morag Robertson, Jennifer Nichols, Sonia Lee, Susan Tweedie, et Austin Smith. 2003. « Functional Expression Cloning of Nanog, a Pluripotency Sustaining Factor in Embryonic Stem Cells ». *Cell* 113 (5): 643-55. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00392-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00392-1).
- Chambers, Ian, Jose Silva, Douglas Colby, Jennifer Nichols, Bianca Nijmeijer, Morag Robertson, Jan Vrana, Ken Jones, Lars Grotewold, et Austin Smith. 2007. « Nanog Safeguards Pluripotency and Mediates Germline Development ». *Nature* 450 (7173): 1230-34. <https://doi.org/10.1038/nature06403>.
- Chan, S. S. -Y., H. Zheng, M. -W. Su, R. Wilk, M. T. Killeen, E. M. Hedgecock, et J. G. Culotti. 1996. « UNC-40, a C. Elegans Homolog of DCC (Deleted in Colorectal Cancer), Is Required in Motile Cells Responding to UNC-6 Netrin Cues ». *Cell* 87 (2): 187-95. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81337-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81337-9).
- Chazaud, Claire, Yojiro Yamanaka, Tony Pawson, et Janet Rossant. 2006. « Early Lineage Segregation between Epiblast and Primitive Endoderm in Mouse Blastocysts through the Grb2-MAPK Pathway ». *Developmental Cell* 10 (5): 615-24. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.02.020>.
- Chellappan, S. P., S. Hiebert, M. Mudryj, J. M. Horowitz, et J. R. Nevins. 1991. « The E2F Transcription Factor Is a Cellular Target for the RB Protein ». *Cell* 65 (6): 1053-61. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90557-f](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90557-f).
- Chen, Haixia, Rempeng Guo, Qian Zhang, Hongchao Guo, Meng Yang, Zhenfeng Wu, Shan Gao, Lin Liu, et Lingyi Chen. 2015. « Erk signaling is indispensable for genomic stability and self-renewal of mouse embryonic stem cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (44): E5936-43. <https://doi.org/10.1073/pnas.1516319112>.

- Chen, Hui-Zi, Shih-Yin Tsai, et Gustavo Leone. 2009. « Emerging Roles of E2Fs in Cancer: An Exit from Cell Cycle Control ». *Nature Reviews Cancer* 9 (11): 785-97. <https://doi.org/10.1038/nrc2696>.
- Chen, X., V. B. Vega, et H.-H. Ng. 2008. « Transcriptional Regulatory Networks in Embryonic Stem Cells ». *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 73: 203-9. <https://doi.org/10.1101/sqb.2008.73.026>.
- Chen, Xi, Han Xu, Ping Yuan, Fang Fang, Mikael Huss, Vinsensius B. Vega, Eleanor Wong, et al. 2008. « Integration of External Signaling Pathways with the Core Transcriptional Network in Embryonic Stem Cells ». *Cell* 133 (6): 1106-17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.04.043>.
- Choi, Hyun Woo, Jin Young Joo, Yean Ju Hong, Jong Soo Kim, Hyuk Song, Jeong Woong Lee, Guangming Wu, Hans R. Schöler, et Jeong Tae Do. 2016. « Distinct Enhancer Activity of Oct4 in Naive and Primed Mouse Pluripotency ». *Stem Cell Reports* 7 (5): 911-26. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.09.012>.
- Christodoulou, Neophytos, Christos Kyprianou, Antonia Weberling, Ran Wang, Guizhong Cui, Guangdun Peng, Naihe Jing, et Magdalena Zernicka-Goetz. 2018. « Sequential Formation and Resolution of Multiple Rosettes Drive Embryo Remodelling after Implantation ». *Nature Cell Biology* 20 (11): 1278-89. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0211-3>.
- Chung, Mingyu, Chad Liu, Hee Won Yang, Marielle S. Köberlin, Steven D. Cappell, et Tobias Meyer. 2019. « Transient Hysteresis in CDK4/6 Activity Underlies Passage of the Restriction Point in G1 ». *Molecular Cell* 76 (4): 562-573.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.08.020>.
- Cicchillitti, Lucia, Pasquale Fasanaro, Paolo Biglioli, Maurizio C. Capogrossi, et Fabio Martelli. 2003. « Oxidative Stress Induces Protein Phosphatase 2A-Dependent Dephosphorylation of the Pocket Proteins PRb, P107, and P130 ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (21): 19509-17. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300511200>.
- Cirera-Salinas, Daniel, Jian Yu, Maxime Bodak, Richard P. Ngondo, Kristina M. Herbert, et Constance Ciaudo. 2017. « Noncanonical function of DGCR8 controls mESC exit from pluripotency ». *Journal of Cell Biology* 216 (2): 355-66. <https://doi.org/10.1083/jcb.201606073>.
- Cirulli, Vincenzo, et Mayra Yebra. 2007. « Netrins: Beyond the Brain ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8 (4): 296-306. <https://doi.org/10.1038/nrm2142>.
- Classon, Marie, et Ed Harlow. 2002. « The Retinoblastoma Tumour Suppressor in Development and Cancer ». *Nature Reviews Cancer* 2 (12): 910-17. <https://doi.org/10.1038/nrc950>.
- Clevers, Hans. 2006. « Wnt/ β -Catenin Signaling in Development and Disease ». *Cell* 127 (3): 469-80. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.018>.
- Colamarino, S. A., et M. Tessier-Lavigne. 1995. « The Axonal Chemoattractant Netrin-1 Is Also a Chemorepellent for Trochlear Motor Axons ». *Cell* 81 (4): 621-29. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90083-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90083-7).
- Cole, Megan F., Sarah E. Johnstone, Jamie J. Newman, Michael H. Kagey, et Richard A. Young. 2008. « Tcf3 Is an Integral Component of the Core Regulatory Circuitry of Embryonic Stem Cells ». *Genes & Development* 22 (6): 746-55. <https://doi.org/10.1101/gad.1642408>.
- Cole, Stacey J., DanaKai Bradford, et Helen M. Cooper. 2007. « Neogenin: A Multi-Functional Receptor Regulating Diverse Developmental Processes ». *The International Journal of*

- Biochemistry & Cell Biology* 39 (9): 1569-75.
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.11.009>.
- Coller, Hilary A., Liyun Sang, et James M. Roberts. 2006. « A New Description of Cellular Quiescence ». *PLOS Biology* 4 (3): e83.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040083>.
- Cong, Feng, et Harold Varmus. 2004. « Nuclear-cytoplasmic shuttling of Axin regulates subcellular localization of β -catenin ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (9): 2882-87. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307344101>.
- Corish, P., et C. Tyler-Smith. 1999. « Attenuation of Green Fluorescent Protein Half-Life in Mammalian Cells ». *Protein Engineering* 12 (12): 1035-40.
<https://doi.org/10.1093/protein/12.12.1035>.
- Coronado, Diana, Murielle Godet, Pierre-Yves Bourillot, Yann Tapponnier, Agnieszka Bernat, Maxime Petit, Marielle Afanassieff, et al. 2013. « A Short G1 Phase Is an Intrinsic Determinant of Naïve Embryonic Stem Cell Pluripotency ». *Stem Cell Research* 10 (1): 118-31. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2012.10.004>.
- Corset, Véronique, Kim Tuyen Nguyen-Ba-Charvet, Christelle Forcet, Emmanuel Moysé, Alain Chédotal, et Patrick Mehlen. 2000. « Netrin-1-Mediated Axon Outgrowth and CAMP Production Requires Interaction with Adenosine A2b Receptor ». *Nature* 407 (6805): 747-50. <https://doi.org/10.1038/35037600>.
- Cross, James C. 2000. « Genetic Insights into Trophoblast Differentiation and Placental Morphogenesis ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 11 (2): 105-13.
<https://doi.org/10.1006/scdb.2000.0156>.
- Czechanski, Anne, Candice Byers, Ian Greenstein, Nadine Schrode, Leah Rae Donahue, Anna-Katerina Hadjantonakis, et Laura G. Reinholdt. 2014. « Derivation and Characterization of Mouse Embryonic Stem Cells from Permissive and Nonpermissive Strains ». *Nature Protocols* 9 (3): 559-74. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.030>.
- Dalton, Stephen. 2015. « Linking the Cell Cycle to Cell Fate Decisions ». *Trends in Cell Biology* 25 (10): 592-600. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.07.007>.
- Dalvin, Sussie, Mark A. Anselmo, Parthak Prodhon, Katsumi Komatsuzaki, Jay J. Schnitzer, et T. Bernard Kinane. 2003. « Expression of Netrin-1 and Its Two Receptors DCC and UNC5H2 in the Developing Mouse Lung ». *Gene Expression Patterns: GEP* 3 (3): 279-83. [https://doi.org/10.1016/s1567-133x\(03\)00047-4](https://doi.org/10.1016/s1567-133x(03)00047-4).
- Danielian, P. S., L. B. Friesenhahn, A. M. Faust, J. C. West, A. M. Caron, R. T. Bronson, et J. A. Lees. 2008. « E2f3a and E2f3b Make Overlapping but Different Contributions to Total E2f3 Activity ». *Oncogene* 27 (51): 6561-70. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.253>.
- Dannenberg, Jan-Hermen, Agnes van Rossum, Leontine Schuijff, et Hein te Riele. 2000. « Ablation of the Retinoblastoma Gene Family Deregulates G1 Control Causing Immortalization and Increased Cell Turnover under Growth-Restricting Conditions ». *Genes & Development* 14 (23): 3051-64. <https://doi.org/10.1101/gad.847700>.
- Davidson, Gary, et Christof Niehrs. 2010. « Emerging Links between CDK Cell Cycle Regulators and Wnt Signaling ». *Trends in Cell Biology* 20 (8): 453-60.
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2010.05.002>.
- Davidson, Gary, Jinlong Shen, Ya-Lin Huang, Yi Su, Emil Karaulanov, Kerstin Bartscherer, Christine Hassler, Peter Stanek, Michael Boutros, et Christof Niehrs. 2009. « Cell Cycle Control of Wnt Receptor Activation ». *Developmental Cell* 17 (6): 788-99.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.11.006>.

- Davis, Robert L., Harold Weintraub, et Andrew B. Lassar. 1987. « Expression of a Single Transfected CDNA Converts Fibroblasts to Myoblasts ». *Cell* 51 (6): 987-1000. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90585-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90585-X).
- De Breuck, S., J. Lardon, I. Rومان, et L. Bouwens. 2003. « Netrin-1 Expression in Fetal and Regenerating Rat Pancreas and Its Effect on the Migration of Human Pancreatic Duct and Porcine Islet Precursor Cells ». *Diabetologia* 46 (7): 926-33. <https://doi.org/10.1007/s00125-003-1125-5>.
- Defossez, Gautier, Sandra Le Guyader-Peyrou, Zoé Uhry, Pascale Grosclaude, Marc Colonna, Emmanuelle Dantony, Patricia Delafosse, et al. 2019. « Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018 - Tumeurs solides : Étude à partir des registres des cancers du réseau Francim ». <https://www.santepubliquefrance.fr/import/estimations-nationales-de-l-incidence-et-de-la-mortalite-par-cancer-en-france-metropolitaine-entre-1990-et-2018-tumeurs-solides-etude-a-partir>.
- Delloye-Bourgeois, Céline, Elisabeth Brambilla, Marie-May Coissieux, Céline Guenebeaud, Rémy Pedoux, Virginie Firlej, Florence Cabon, Christian Brambilla, Patrick Mehlen, et Agnès Bernet. 2009. « Interference with Netrin-1 and Tumor Cell Death in Non-Small Cell Lung Cancer ». *Journal of the National Cancer Institute* 101 (4): 237-47. <https://doi.org/10.1093/jnci/djn491>.
- Dent, Erik W., Aileen M. Barnes, Fangjun Tang, et Katherine Kalil. 2004. « Netrin-1 and Semaphorin 3A Promote or Inhibit Cortical Axon Branching, Respectively, by Reorganization of the Cytoskeleton ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 24 (12): 3002-12. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4963-03.2004>.
- Deshpande, Amit, Peter Sicinski, et Philip W. Hinds. 2005. « Cyclins and Cdks in Development and Cancer: A Perspective ». *Oncogene* 24 (17): 2909-15. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208618>.
- Devault, A., J. C. Cavadore, D. Fesquet, J. C. Labbé, T. Lorca, A. Picard, U. Strausfeld, et M. Dorée. 1991. « Concerted Roles of Cyclin A, Cdc25+ Mitotic Inducer, and Type 2A Phosphatase in Activating the Cyclin B/Cdc2 Protein Kinase at the G2/M Phase Transition ». *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 56: 503-13. <https://doi.org/10.1101/sqb.1991.056.01.057>.
- Dey, Gautam, et Buzz Baum. 2021. « Nuclear Envelope Remodelling during Mitosis ». *Current Opinion in Cell Biology* 70 (juin): 67-74. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2020.12.004>.
- Díaz-Díaz, Covadonga, Laura Fernandez de Manuel, Daniel Jimenez-Carretero, María Concepción Montoya, Cristina Clavería, et Miguel Torres. 2017. « Pluripotency Surveillance by Myc-Driven Competitive Elimination of Differentiating Cells ». *Developmental Cell* 42 (6): 585-599.e4. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.08.011>.
- Dick, Frederick A., et Seth M. Rubin. 2013. « Molecular Mechanisms Underlying RB Protein Function ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14 (5): 297-306. <https://doi.org/10.1038/nrm3567>.
- Dietrich, Jens-Erik, et Takashi Hiragi. 2007. « Stochastic patterning in the mouse pre-implantation embryo ». *Development* 134 (23): 4219-31. <https://doi.org/10.1242/dev.003798>.
- Dominici, Chloé, Juan Antonio Moreno-Bravo, Sergi Roig Puiggros, Quentin Rappeneau, Nicolas Rama, Pauline Vieugue, Agnès Bernet, Patrick Mehlen, et Alain Chédotal. 2017.

- « Floor-Plate-Derived Netrin-1 Is Dispensable for Commissural Axon Guidance ». *Nature* 545 (7654): 350-54. <https://doi.org/10.1038/nature22331>.
- Duchartre, Yann, Yong-Mi Kim, et Michael Kahn. 2016. « The Wnt Signaling Pathway in Cancer ». *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 99 (mars): 141-49. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.12.005>.
- Dvash, Tamar, Dalit Ben-Yosef, et Rachel Eiges. 2006. « Human Embryonic Stem Cells as a Powerful Tool for Studying Human Embryogenesis ». *Pediatric Research* 60 (2): 111-17. <https://doi.org/10.1203/01.pdr.0000228349.24676.17>.
- Efroni, Sol, Radharani Duttagupta, Jill Cheng, Hesam Dehghani, Daniel J. Hoepfner, Chandravanu Dash, David P. Bazett-Jones, et al. 2008. « Global Transcription in Pluripotent Embryonic Stem Cells ». *Cell Stem Cell* 2 (5): 437-47. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.03.021>.
- Ema, Masatsugu, Daisuke Mori, Hitoshi Niwa, Yoshikazu Hasegawa, Yojiro Yamanaka, Seiji Hitoshi, Junsei Mimura, et al. 2008. « Krüppel-like Factor 5 Is Essential for Blastocyst Development and the Normal Self-Renewal of Mouse ESCs ». *Cell Stem Cell* 3 (5): 555-67. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.09.003>.
- Engelkamp, Dieter. 2002. « Cloning of Three Mouse Unc5 Genes and Their Expression Patterns at Mid-Gestation ». *Mechanisms of Development* 118 (1-2): 191-97. [https://doi.org/10.1016/s0925-4773\(02\)00248-4](https://doi.org/10.1016/s0925-4773(02)00248-4).
- Erlebacher, Adrian. 2013. « Immunology of the Maternal-Fetal Interface ». *Annual Review of Immunology* 31: 387-411. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-100003>.
- Evans, M. J. 1972. « The Isolation and Properties of a Clonal Tissue Culture Strain of Pluripotent Mouse Teratoma Cells ». *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 28 (1): 163-76.
- Evans, M. J., et M. H. Kaufman. 1981. « Establishment in Culture of Pluripotential Cells from Mouse Embryos ». *Nature* 292 (5819): 154-56.
- Faast, Renate, Josephine White, Peter Cartwright, Lesley Crocker, Boris Sarcevic, et Stephen Dalton. 2004. « Cdk6–Cyclin D3 Activity in Murine ES Cells Is Resistant to Inhibition by P16INK4A ». *Oncogene* 23 (2): 491-502. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207133>.
- Fazeli, A., S. L. Dickinson, M. L. Hermiston, R. V. Tighe, R. G. Steen, C. G. Small, E. T. Stoeckli, et al. 1997. « Phenotype of Mice Lacking Functional Deleted in Colorectal Cancer (Dcc) Gene ». *Nature* 386 (6627): 796-804. <https://doi.org/10.1038/386796a0>.
- Fearon, E. R., K. R. Cho, J. M. Nigro, S. E. Kern, J. W. Simons, J. M. Ruppert, S. R. Hamilton, A. C. Preisinger, G. Thomas, et K. W. Kinzler. 1990. « Identification of a Chromosome 18q Gene That Is Altered in Colorectal Cancers ». *Science (New York, N.Y.)* 247 (4938): 49-56. <https://doi.org/10.1126/science.2294591>.
- Feinstein, Jordyn, et Bhama Ramkhalawon. 2017. « Netrins & Semaphorins: novel regulators of the immune response ». *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease* 1863 (12): 3183-89. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.09.010>.
- Feldman, B., W. Poueymirou, V. E. Papaioannou, T. M. DeChiara, et M. Goldfarb. 1995. « Requirement of FGF-4 for Postimplantation Mouse Development ». *Science (New York, N.Y.)* 267 (5195): 246-49. <https://doi.org/10.1126/science.7809630>.
- Felipe, Pablo de, Garry A. Luke, Lorraine E. Hughes, David Gani, Claire Halpin, et Martin D. Ryan. 2006. « E Unum Pluribus: Multiple Proteins from a Self-Processing Polyprotein ». *Trends in Biotechnology* 24 (2): 68-75. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2005.12.006>.

- Ferrer-Vaquero, Anna, et Anna-Katerina Hadjantonakis. 2013. « Birth Defects Associated with Perturbations in Pre-implantation, Gastrulation & Axis Extension: from Conjoined Twinning to Caudal Dysgenesis ». *Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology* 2 (4): 427-42. <https://doi.org/10.1002/wdev.97>.
- Festuccia, Nicola, Rodrigo Osorno, Florian Halbritter, Violetta Karwacki-Neisius, Pablo Navarro, Douglas Colby, Frederick Wong, Adam Yates, Simon R. Tomlinson, et Ian Chambers. 2012. « Esrrb Is a Direct Nanog Target Gene That Can Substitute for Nanog Function in Pluripotent Cells ». *Cell Stem Cell* 11 (4): 477-90. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.08.002>.
- Fingar, Diane C., et John Blenis. 2004. « Target of Rapamycin (TOR): An Integrator of Nutrient and Growth Factor Signals and Coordinator of Cell Growth and Cell Cycle Progression ». *Oncogene* 23 (18): 3151-71. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207542>.
- Fingar, Diane C., Sofie Salama, Christina Tsou, Ed Harlow, et John Blenis. 2002. « Mammalian Cell Size Is Controlled by MTOR and Its Downstream Targets S6K1 and 4EBP1/EIF4E ». *Genes & Development* 16 (12): 1472-87. <https://doi.org/10.1101/gad.995802>.
- Fitamant, Julien, Céline Guenebeaud, Marie-May Coissieux, Catherine Guix, Isabelle Treilleux, Jean-Yves Scoazec, Thomas Bachelot, Agnès Bernet, et Patrick Mehlen. 2008. « Netrin-1 Expression Confers a Selective Advantage for Tumor Cell Survival in Metastatic Breast Cancer ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (12): 4850-55. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709810105>.
- Fitzgerald, Daniel P., Clare Seaman, et Helen M. Cooper. 2006. « Localization of Neogenin Protein during Morphogenesis in the Mouse Embryo ». *Developmental Dynamics* 235 (6): 1720-25. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20744>.
- Friend, S. H., R. Bernards, S. Rogelj, R. A. Weinberg, J. M. Rapaport, D. M. Albert, et T. P. Dryja. 1986. « A Human DNA Segment with Properties of the Gene That Predisposes to Retinoblastoma and Osteosarcoma ». *Nature* 323 (6089): 643-46. <https://doi.org/10.1038/323643a0>.
- Friman, Elias T, Cédric Deluz, Antonio CA Meireles-Filho, Subashika Govindan, Vincent Gardeux, Bart Deplancke, et David M Suter. 2019. « Dynamic regulation of chromatin accessibility by pluripotency transcription factors across the cell cycle ». Édité par Deborah Bourc'his, Jessica K Tyler, Hamish King, et Ken Zaret. *eLife* 8 (décembre): e50087. <https://doi.org/10.7554/eLife.50087>.
- Gad, J. M., S. L. Keeling, A. F. Wilks, S. S. Tan, et H. M. Cooper. 1997. « The Expression Patterns of Guidance Receptors, DCC and Neogenin, Are Spatially and Temporally Distinct throughout Mouse Embryogenesis ». *Developmental Biology* 192 (2): 258-73. <https://doi.org/10.1006/dbio.1997.8756>.
- Garcia, José Mauricio, Luisa Mendonça, Rodrigo Brant, Murilo Abud, Caio Regatieri, et Bruno Diniz. 2015. « Stem Cell Therapy for Retinal Diseases ». *World Journal of Stem Cells* 7 (1): 160-64. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v7.i1.160>.
- Gardner, Nicola J., Peter J. Gillespie, Jamie T. Carrington, Emma J. Shanks, Stuart P. McElroy, Emma J. Haagenen, Julie A. Frearson, Andrew Woodland, et J. Julian Blow. 2017. « The High-Affinity Interaction between ORC and DNA That Is Required for Replication Licensing Is Inhibited by 2-Arylquinolin-4-Amines ». *Cell Chemical Biology* 24 (8): 981-992.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.06.019>.

- Geng, Y., E. N. Eaton, M. Picón, J. M. Roberts, A. S. Lundberg, A. Gifford, C. Sardet, et R. A. Weinberg. 1996. « Regulation of Cyclin E Transcription by E2Fs and Retinoblastoma Protein ». *Oncogene* 12 (6): 1173-80.
- George, Aswathi A., Janet Franklin, Keith Kerkof, Ami J. Shah, Mary Price, Eleanor Tsark, David Bockstoce, et al. 2001. « Detection of leukemic cells in the CD34+CD38- bone marrow progenitor population in children with acute lymphoblastic leukemia ». *Blood* 97 (12): 3925-30. <https://doi.org/10.1182/blood.V97.12.3925>.
- Gheghiani, Lilia, Damaris Loew, Bérange Lombard, Jörg Mansfeld, et Olivier Gavet. 2017. « PLK1 Activation in Late G2 Sets Up Commitment to Mitosis ». *Cell Reports* 19 (10): 2060-73. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.05.031>.
- Ghule, Prachi N., Ricardo Medina, Chris J. Lengner, Matthew Mandeville, Meng Qiao, Zbigniew Dominski, Jane B. Lian, Janet L. Stein, Andre J. van Wijnen, et Gary S. Stein. 2011. « Reprogramming the pluripotent cell cycle: restoration of an abbreviated G1 phase in human induced pluripotent stem (iPS) cells ». *Journal of cellular physiology* 226 (5): 1149-56. <https://doi.org/10.1002/jcp.22440>.
- Giacomelli, Chiara, Simona Daniele, Chiara Romei, Laura Tavanti, Tommaso Neri, Ilaria Piano, Alessandro Celi, Claudia Martini, et Maria L. Trincavelli. 2018. « The A2B Adenosine Receptor Modulates the Epithelial- Mesenchymal Transition through the Balance of cAMP/PKA and MAPK/ERK Pathway Activation in Human Epithelial Lung Cells ». *Frontiers in Pharmacology* 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2018.00054>.
- Gillich, Astrid, Siqin Bao, Nils Grabole, Katsuhiko Hayashi, Matthew W. B. Trotter, Vincent Pasque, Erna Magnúsdóttir, et M. Azim Surani. 2012. « Epiblast Stem Cell-Based System Reveals Reprogramming Synergy of Germline Factors ». *Cell Stem Cell* 10 (4): 425-39. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.01.020>.
- Goetz, Regina, et Moosa Mohammadi. 2013. « Exploring Mechanisms of FGF Signalling through the Lens of Structural Biology ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14 (3): 166-80. <https://doi.org/10.1038/nrm3528>.
- Goldschneider, D., et P. Mehlen. 2010. « Dependence Receptors: A New Paradigm in Cell Signaling and Cancer Therapy ». *Oncogene* 29 (13): 1865-82. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.13>.
- Gonzales, Kevin Andrew Uy, Hongqing Liang, Yee-Siang Lim, Yun-Shen Chan, Jia-Chi Yeo, Cheng-Peow Tan, Bin Gao, et al. 2015. « Deterministic Restriction on Pluripotent State Dissolution by Cell-Cycle Pathways ». *Cell* 162 (3): 564-79. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.001>.
- Gonzalez, Michael A., Kiku-e K. Tachibana, David J. Adams, Louise van der Weyden, Myriam Hemberger, Nicholas Coleman, Allan Bradley, et Ronald A. Laskey. 2006. « Geminin is essential to prevent endoreduplication and to form pluripotent cells during mammalian development ». *Genes & Development* 20 (14): 1880-84. <https://doi.org/10.1101/gad.379706>.
- Gopinathan, Lakshmi, Chandrahas Koumar Ratnacaram, et Philipp Kaldis. 2011. « Established and Novel Cdk/Cyclin Complexes Regulating the Cell Cycle and Development ». *Results and Problems in Cell Differentiation* 53: 365-89. https://doi.org/10.1007/978-3-642-19065-0_16.
- Grady, William M. 2007. « Making the Case for DCC and UNC5C as Tumor-Suppressor Genes in the Colon ». *Gastroenterology* 133 (6): 2045-49. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.10.034>.

- Graf, Thomas, et Matthias Stadtfeld. 2008. « Heterogeneity of Embryonic and Adult Stem Cells ». *Cell Stem Cell* 3 (5): 480-83. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.10.007>.
- Graham, Sarah J. L., Krzysztof B. Wicher, Agnieszka Jedrusik, Guoji Guo, Wishva Herath, Paul Robson, et Magdalena Zernicka-Goetz. 2014. « BMP Signalling Regulates the Pre-Implantation Development of Extra-Embryonic Cell Lineages in the Mouse Embryo ». *Nature Communications* 5 (décembre): 5667. <https://doi.org/10.1038/ncomms6667>.
- Grandin, Mélodie, Markus Meier, Jean Guy Delcros, Denise Nikodemus, Raphael Reuten, Trushar R. Patel, David Goldschneider, et al. 2016. « Structural Decoding of the Netrin-1/UNC5 Interaction and Its Therapeutical Implications in Cancers ». *Cancer Cell* 29 (2): 173-85. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.01.001>.
- Grealish, Shane, Elsa Diguët, Agnete Kirkeby, Bengt Mattsson, Andreas Heuer, Yann Bramouille, Nadja Van Camp, et al. 2014. « Human ESC-Derived Dopamine Neurons Show Similar Preclinical Efficacy and Potency to Fetal Neurons When Grafted in a Rat Model of Parkinson's Disease ». *Cell Stem Cell* 15 (5): 653-65. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.09.017>.
- Guan, K., H. Chang, A. Rolletschek, et A. M. Wobus. 2001. « Embryonic Stem Cell-Derived Neurogenesis. Retinoic Acid Induction and Lineage Selection of Neuronal Cells ». *Cell and Tissue Research* 305 (2): 171-76. <https://doi.org/10.1007/s004410100416>.
- Guo, Ge, Jian Yang, Jennifer Nichols, John Simon Hall, Isobel Eyres, William Mansfield, et Austin Smith. 2009. « Klf4 reverts developmentally programmed restriction of ground state pluripotency ». *Development* 136 (7): 1063-69. <https://doi.org/10.1242/dev.030957>.
- Guo, Wenjing, Baixia Hao, Qian Wang, Yingying Lu, et Jianbo Yue. 2013. « Requirement of B-Raf, C-Raf, and A-Raf for the Growth and Survival of Mouse Embryonic Stem Cells ». *Experimental Cell Research* 319 (18): 2801-11. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.09.006>.
- Hackett, Jamie A., et M. Azim Surani. 2014. « Regulatory Principles of Pluripotency: From the Ground State Up ». *Cell Stem Cell* 15 (4): 416-30. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.09.015>.
- Hadjihannas, Michel V, Dominic B Bernkopf, Martina Brückner, et Jürgen Behrens. 2012. « Cell cycle control of Wnt/ β -catenin signalling by conductin/axin2 through CDC20 ». *EMBO Reports* 13 (4): 347-54. <https://doi.org/10.1038/embor.2012.12>.
- Håland, T. W., E. Boye, T. Stokke, B. Grallert, et R. G. Syljuåsen. 2015. « Simultaneous Measurement of Passage through the Restriction Point and MCM Loading in Single Cells ». *Nucleic Acids Research* 43 (22): e150. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv744>.
- Hall, John, Ge Guo, Jason Wray, Isobel Eyres, Jennifer Nichols, Lars Grotewold, Sofia Morfopoulou, et al. 2009. « Oct4 and LIF/Stat3 Additively Induce Krüppel Factors to Sustain Embryonic Stem Cell Self-Renewal ». *Cell Stem Cell* 5 (6): 597-609. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.11.003>.
- Hamilton, William B., et Joshua M. Brickman. 2014. « Erk Signaling Suppresses Embryonic Stem Cell Self-Renewal to Specify Endoderm ». *Cell Reports* 9 (6): 2056-70. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.11.032>.
- Han, Dong Wook, Boris Greber, Guangming Wu, Natalia Tapia, Marcos J. Araúzo-Bravo, Kinarm Ko, Christof Bernemann, Martin Stehling, et Hans R. Schöler. 2011. « Direct Reprogramming of Fibroblasts into Epiblast Stem Cells ». *Nature Cell Biology* 13 (1): 66-71. <https://doi.org/10.1038/ncb2136>.

- Han, Dong Wook, Natalia Tapia, Jin Young Joo, Boris Greber, Marcos J. Araúzo-Bravo, Christof Bernemann, Kinarm Ko, et al. 2010. « Epiblast Stem Cell Subpopulations Represent Mouse Embryos of Distinct Pregastrulation Stages ». *Cell* 143 (4): 617-27. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.10.015>.
- Hand, Randal A., et Alex L. Kolodkin. 2017. « Netrin-Mediated Axon Guidance to the CNS Midline Revisited ». *Neuron* 94 (4): 691-93. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.05.012>.
- Hanlon, Stacey L., et Joachim J. Li. 2015. « Re-Replication of a Centromere Induces Chromosomal Instability and Aneuploidy ». *PLoS Genetics* 11 (4): e1005039. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005039>.
- Hanna, Jacob, Styliani Markoulaki, Maisam Mitalipova, Albert W. Cheng, John P. Cassady, Judith Staerk, Bryce W. Carey, et al. 2009. « Metastable Pluripotent States in NOD-Mouse-Derived ESCs ». *Cell Stem Cell* 4 (6): 513-24. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.04.015>.
- Hanna, Jacob, Marius Wernig, Styliani Markoulaki, Chiao-Wang Sun, Alexander Meissner, John P. Cassady, Caroline Beard, et al. 2007. « Treatment of Sickle Cell Anemia Mouse Model with iPS Cells Generated from Autologous Skin ». *Science* 318 (5858): 1920-23. <https://doi.org/10.1126/science.1152092>.
- Hara, Kentaro, Keiichi I. Nakayama, et Keiko Nakayama. 2006. « Geminin Is Essential for the Development of Preimplantation Mouse Embryos ». *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms* 11 (11): 1281-93. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2006.01019.x>.
- Harbour, J. William, Robin X Luo, Angeline Dei Santi, Antonio A Postigo, et Douglas C Dean. 1999. « Cdk Phosphorylation Triggers Sequential Intramolecular Interactions That Progressively Block Rb Functions as Cells Move through G1 ». *Cell* 98 (6): 859-69. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81519-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81519-6).
- Hastreiter, Simon, Stavroula Skylaki, Dirk Loeffler, Andreas Reimann, Oliver Hilsenbeck, Philipp S. Hoppe, Daniel L. Coutu, et al. 2018. « Inductive and Selective Effects of GSK3 and MEK Inhibition on Nanog Heterogeneity in Embryonic Stem Cells ». *Stem Cell Reports* 11 (1): 58-69. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.04.019>.
- Hayashi, Katsuhiko, Hiroshi Ohta, Kazuki Kurimoto, Shinya Aramaki, et Mitinori Saitou. 2011. « Reconstitution of the Mouse Germ Cell Specification Pathway in Culture by Pluripotent Stem Cells ». *Cell* 146 (4): 519-32. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.052>.
- Hayashi, Katsuhiko, Susana M Chuva de Sousa Lopes, Fuchou Tang, Kaiqin Lao, et M Azim Surani. 2008. « Dynamic equilibrium and heterogeneity of mouse pluripotent stem cells with distinct functional and epigenetic states ». *Cell stem cell* 3 (4): 10.1016/j.stem.2008.07.027. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.07.027>.
- Hayward, Daniel, Tatiana Alfonso-Pérez, et Ulrike Gruneberg. 2019. « Orchestration of the Spindle Assembly Checkpoint by CDK1-Cyclin B1 ». *FEBS Letters* 593 (20): 2889-2907. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13591>.
- He, Jing, Yan Zhao, Wang Deng, et Dao-xin Wang. 2014. « Netrin-1 Promotes Epithelial Sodium Channel-Mediated Alveolar Fluid Clearance via Activation of the Adenosine 2B Receptor in Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury ». *Respiration* 87 (5): 394-407. <https://doi.org/10.1159/000358066>.
- Healey, Eleanor G., Benjamin Bishop, Jonathan Elegheert, Christian H. Bell, Sergi Padilla-Parra, et Christian Siebold. 2015. « Repulsive Guidance Molecule Is a Structural

- Bridge between Neogenin and Bone Morphogenetic Protein ». *Nature Structural & Molecular Biology* 22 (6): 458-65. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3016>.
- Hedgecock, E. M., J. G. Culotti, et D. H. Hall. 1990. « The Unc-5, Unc-6, and Unc-40 Genes Guide Circumferential Migrations of Pioneer Axons and Mesodermal Cells on the Epidermis in *C. Elegans* ». *Neuron* 4 (1): 61-85. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(90\)90444-k](https://doi.org/10.1016/0896-6273(90)90444-k).
- Herreros-Villanueva, M., J.-S. Zhang, A. Koenig, E. V. Abel, T. C. Smyrk, W. R. Bamlet, A. a.-M. de Narvajas, et al. 2013. « SOX2 Promotes Dedifferentiation and Imparts Stem Cell-like Features to Pancreatic Cancer Cells ». *Oncogenesis* 2 (8): e61-e61. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2013.23>.
- Hertig, A. T., J. Rock, et E. C. Adams. 1956. « A Description of 34 Human Ova within the First 17 Days of Development ». *The American Journal of Anatomy* 98 (3): 435-93. <https://doi.org/10.1002/aja.1000980306>.
- Heuvel, S. van den, et E. Harlow. 1993. « Distinct Roles for Cyclin-Dependent Kinases in Cell Cycle Control ». *Science (New York, N.Y.)* 262 (5142): 2050-54. <https://doi.org/10.1126/science.8266103>.
- Hirano, Tatsuya. 2006. « At the Heart of the Chromosome: SMC Proteins in Action ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 7 (5): 311-22. <https://doi.org/10.1038/nrm1909>.
- Ho, Y., K. Wigglesworth, J. J. Eppig, et R. M. Schultz. 1995. « Preimplantation Development of Mouse Embryos in KSOM: Augmentation by Amino Acids and Analysis of Gene Expression ». *Molecular Reproduction and Development* 41 (2): 232-38. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080410214>.
- Hochegger, Helfrid, Shunichi Takeda, et Tim Hunt. 2008. « Cyclin-Dependent Kinases and Cell-Cycle Transitions: Does One Fit All? ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9 (11): 910-16. <https://doi.org/10.1038/nrm2510>.
- Hofmann, K. 2000. « A Superfamily of Membrane-Bound O-Acyltransferases with Implications for Wnt Signaling ». *Trends in Biochemical Sciences* 25 (3): 111-12. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(99\)01539-x](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(99)01539-x).
- Hogan, Brigid, Rosa Beddington, et Frank Costantini. 1994. *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hong, K., L. Hinck, M. Nishiyama, M. M. Poo, M. Tessier-Lavigne, et E. Stein. 1999. « A Ligand-Gated Association between Cytoplasmic Domains of UNC5 and DCC Family Receptors Converts Netrin-Induced Growth Cone Attraction to Repulsion ». *Cell* 97 (7): 927-41. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80804-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80804-1).
- Hong, Mingi, Karen A. Schachter, Guoying Jiang, et Robert S. Krauss. 2012. « Neogenin Regulates Sonic Hedgehog Pathway Activity during Digit Patterning ». *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 241 (3): 627-37. <https://doi.org/10.1002/dvdy.23745>.
- Hsiung, Chris C.-S., Caroline R. Bartman, Peng Huang, Paul Ginart, Aaron J. Stonestrom, Cheryl A. Keller, Carolyne Face, et al. 2016. « A Hyperactive Transcriptional State Marks Genome Reactivation at the Mitosis–G1 Transition ». *Genes & Development* 30 (12): 1423-39. <https://doi.org/10.1101/gad.280859.116>.
- Hsu, Jenny, Julia Arand, Andrea Chaikovsky, Nancie A. Mooney, Janos Demeter, Caileen M. Brison, Romane Oliverio, et al. 2019. « E2F4 Regulates Transcriptional Activation in Mouse Embryonic Stem Cells Independently of the RB Family ». *Nature Communications* 10 (1): 2939. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10901-x>.

- Hsu, Yu-Chih. 1971. « Post-Blastocyst Differentiation in Vitro ». *Nature* 231 (5298): 100-102. <https://doi.org/10.1038/231100a0>.
- . 1972. « Differentiation in Vitro of Mouse Embryos beyond the Implantation Stage ». *Nature* 239 (5369): 200-202. <https://doi.org/10.1038/239200a0>.
- Hu, Xinyi, Yunsong Liu, Min Zhang, Yuejun Wang, Longwei Lv, Xiao Zhang, Ping Zhang, et Yongsheng Zhou. 2018. « UNC-5 Netrin Receptor B Mediates Osteogenic Differentiation by Modulating Bone Morphogenetic Protein Signaling in Human Adipose-Derived Stem Cells ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 495 (1): 1167-74. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.11.104>.
- Huang, Guanyi, Hexin Yan, Shoudong Ye, Chang Tong, et Qi-Long Ying. 2014. « STAT3 Phosphorylation at Tyrosine 705 and Serine 727 Differentially Regulates Mouse ESC Fates ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 32 (5): 1149-60. <https://doi.org/10.1002/stem.1609>.
- Huang, Yali, Rodrigo Osorno, Anestis Tsakiridis, et Valerie Wilson. 2012. « In Vivo Differentiation Potential of Epiblast Stem Cells Revealed by Chimeric Embryo Formation ». *Cell Reports* 2 (6): 1571-78. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.10.022>.
- Huang, Zhihui, Dong Sun, Jin-Xia Hu, Fu-Lei Tang, Dae-Hoon Lee, Ying Wang, Guoqing Hu, et al. 2016. « Neogenin Promotes BMP2 Activation of YAP and Smad1 and Enhances Astrocytic Differentiation in Developing Mouse Neocortex ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 36 (21): 5833-49. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4487-15.2016>.
- Hume, Samuel, Grigory L Dianov, et Kristijan Ramadan. 2020. « A unified model for the G1/S cell cycle transition ». *Nucleic Acids Research* 48 (22): 12483-501. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1002>.
- Hurford, R. K., D. Cobrinik, M. H. Lee, et N. Dyson. 1997. « PRB and P107/P130 Are Required for the Regulated Expression of Different Sets of E2F Responsive Genes ». *Genes & Development* 11 (11): 1447-63. <https://doi.org/10.1101/gad.11.11.1447>.
- Hustedt, Nicole, et Daniel Durocher. 2016. « The Control of DNA Repair by the Cell Cycle ». *Nature Cell Biology* 19 (1): 1-9. <https://doi.org/10.1038/ncb3452>.
- Huurne, Menno ter, et Hendrik G. Stunnenberg. 2021. « G1-Phase Progression in Pluripotent Stem Cells ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 78 (10): 4507-19. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03797-8>.
- Huyghe, Aurélia, G. Furlan, J. Schroeder, E. Cascales, A. Trajkova, M. Ruel, F. Stüder, et al. 2022. « Comparative Roadmaps of Reprogramming and Oncogenic Transformation Identify Bcl11b and Atoh8 as Broad Regulators of Cellular Plasticity ». *Nature Cell Biology*, septembre, 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41556-022-00986-w>.
- Huyghe, Aurélia, Giacomo Furlan, Duygu Ozmadenci, Christina Galonska, Jocelyn Charlton, Xavier Gaume, Noémie Combémoré, et al. 2020. « Netrin-1 Promotes Naive Pluripotency through Neo1 and Unc5b Co-Regulation of Wnt and MAPK Signalling ». *Nature Cell Biology* 22 (4): 389-400. <https://doi.org/10.1038/s41556-020-0483-2>.
- Hynes, R. O. 1992. « Integrins: Versatility, Modulation, and Signaling in Cell Adhesion ». *Cell* 69 (1): 11-25. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90115-s](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90115-s).
- Illich, Damir Jacob, Miao Zhang, Andrei Ursu, Rodrigo Osorno, Kee-Pyo Kim, Juyong Yoon, Marcos J. Araúzo-Bravo, et al. 2016. « Distinct Signaling Requirements for the Establishment of ESC Pluripotency in Late-Stage EpiSCs ». *Cell Reports* 15 (4): 787-800. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.03.073>.

- Inoki, Ken, Tianqing Zhu, et Kun-Liang Guan. 2003. « TSC2 Mediates Cellular Energy Response to Control Cell Growth and Survival ». *Cell* 115 (5): 577-90. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00929-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00929-2).
- Isaacs, Hart. 2004. « Perinatal (Fetal and Neonatal) Germ Cell Tumors1 1*For the Sake of Brevity, Only a Portion of the References Originally Submitted for This Review Is Listed. The Complete List of References Is Available from the Author. » *Journal of Pediatric Surgery* 39 (7): 1003-13. <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2004.03.045>.
- Jackson, Melany, Anna Krassowska, Nick Gilbert, Timothy Chevassut, Lesley Forrester, John Ansell, et Bernard Ramsahoye. 2004. « Severe Global DNA Hypomethylation Blocks Differentiation and Induces Histone Hyperacetylation in Embryonic Stem Cells ». *Molecular and Cellular Biology* 24 (20): 8862-71. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.20.8862-8871.2004>.
- Jarrin, Miguel, Tanushree Pandit, et Lena Gunhaga. 2012. « A balance of FGF and BMP signals regulates cell cycle exit and Equarín expression in lens cells ». *Molecular Biology of the Cell* 23 (16): 3266-74. <https://doi.org/10.1091/mbc.e12-01-0075>.
- Jenkinson, E. J., et I. B. Wilson. 1970. « In Vitro Support System for the Study of Blastocyst Differentiation in the Mouse ». *Nature* 228 (5273): 776-78. <https://doi.org/10.1038/228776a0>.
- Johnson, M. H., et C. A. Ziomek. 1981. « The Foundation of Two Distinct Cell Lineages within the Mouse Morula ». *Cell* 24 (1): 71-80. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(81\)90502-x](https://doi.org/10.1016/0092-8674(81)90502-x).
- Joo, Jin Young, Hyun Woo Choi, Min Jung Kim, Holm Zaehres, Natalia Tapia, Martin Stehling, Koo Sung Jung, Jeong Tae, et Hans R. Schöler. 2014. « Establishment of a primed pluripotent epiblast stem cell in FGF4-based conditions ». *Scientific Reports* 4 (décembre): 7477. <https://doi.org/10.1038/srep07477>.
- Kagey, Michael H., Jamie J. Newman, Steve Bilodeau, Ye Zhan, David A. Orlando, Nynke L. van Berkum, Christopher C. Ebmeier, et al. 2010. « Mediator and Cohesin Connect Gene Expression and Chromatin Architecture ». *Nature* 467 (7314): 430-35. <https://doi.org/10.1038/nature09380>.
- Kahan, B. W., et B. Ephrussi. 1970. « Developmental Potentialities of Clonal in Vitro Cultures of Mouse Testicular Teratoma ». *Journal of the National Cancer Institute* 44 (5): 1015-36.
- Kalkan, Tüzer, Nelly Olova, Mila Roode, Carla Mulas, Heather J. Lee, Isabelle Nett, Hendrik Marks, et al. 2017. « Tracking the Embryonic Stem Cell Transition from Ground State Pluripotency ». *Development (Cambridge, England)* 144 (7): 1221-34. <https://doi.org/10.1242/dev.142711>.
- Kalkan, Tüzer, et Austin Smith. 2014. « Mapping the Route from Naive Pluripotency to Lineage Specification ». *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 369 (1657): 20130540. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0540>.
- Kanai, Dai, Atsushi Ueda, Tadayuki Akagi, Takashi Yokota, et Hiroshi Koide. 2015. « Oct3/4 Directly Regulates Expression of E2F3a in Mouse Embryonic Stem Cells ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 459 (3): 374-78. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.02.105>.
- Kang, Jong-Sun, Min-Jeong Yi, Wei Zhang, Jessica L. Feinleib, Francesca Cole, et Robert S. Krauss. 2004. « Netrins and Neogenin Promote Myotube Formation ». *The Journal of Cell Biology* 167 (3): 493-504. <https://doi.org/10.1083/jcb.200405039>.

- Kang, Minjung, Vidur Garg, et Anna-Katerina Hadjantonakis. 2017. « Lineage Establishment and Progression within the Inner Cell Mass of the Mouse Blastocyst Requires FGFR1 and FGFR2 ». *Developmental Cell* 41 (5): 496-510.e5.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.05.003>.
- Kappler, J., S. Franken, U. Junghans, R. Hoffmann, T. Linke, H. W. Müller, et K. W. Koch. 2000. « Glycosaminoglycan-Binding Properties and Secondary Structure of the C-Terminus of Netrin-1 ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 271 (2): 287-91.
<https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2583>.
- Kareta, Michael S., Laura L. Gorges, Sana Hafeez, Bérénice A. Benayoun, Samuele Marro, Anne-Flore Zmoos, Matthew J. Cecchini, et al. 2015. « Inhibition of Pluripotency Networks by the Rb Tumor Suppressor Restricts Reprogramming and Tumorigenesis ». *Cell Stem Cell* 16 (1): 39-50.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.10.019>.
- Kareta, Michael S., Julien Sage, et Marius Wernig. 2015. « Crosstalk between Stem Cell and Cell Cycle Machineries ». *Current Opinion in Cell Biology* 37 (décembre): 68-74.
<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.10.001>.
- Kato, J., H. Matsushime, S. W. Hiebert, M. E. Ewen, et C. J. Sherr. 1993. « Direct Binding of Cyclin D to the Retinoblastoma Gene Product (PRb) and PRb Phosphorylation by the Cyclin D-Dependent Kinase CDK4 ». *Genes & Development* 7 (3): 331-42.
<https://doi.org/10.1101/gad.7.3.331>.
- Katsuno, Yuko, Ayumi Suzuki, Kazuto Sugimura, Katsuzumi Okumura, Doaa H. Zineldeen, Midori Shimada, Hiroyuki Niida, Takeshi Mizuno, Fumio Hanaoka, et Makoto Nakanishi. 2009. « Cyclin A-Cdk1 Regulates the Origin Firing Program in Mammalian Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (9): 3184-89. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809350106>.
- Keeling, S. L., J. M. Gad, et H. M. Cooper. 1997. « Mouse Neogenin, a DCC-like Molecule, Has Four Splice Variants and Is Expressed Widely in the Adult Mouse and during Embryogenesis ». *Oncogene* 15 (6): 691-700.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201225>.
- Kefeli, Umut, Aysegul Ucuncu Kefeli, Devrim Cabuk, Ulas Isik, Alper Sonkaya, Ozgur Acikgoz, Ercan Ozden, et Kazim Uygun. 2017. « Netrin-1 in Cancer: Potential Biomarker and Therapeutic Target? ». *Tumor Biology* 39 (4): 1010428317698388.
<https://doi.org/10.1177/1010428317698388>.
- Keino-Masu, Kazuko, Masayuki Masu, Lindsay Hinck, E. David Leonardo, Shirley S. -Y Chan, Joseph G Culotti, et Marc Tessier-Lavigne. 1996. « Deleted in Colorectal Cancer (DCC) Encodes a Netrin Receptor ». *Cell* 87 (2): 175-85. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81336-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81336-7).
- Kennedy, T. E., T. Serafini, J. R. de la Torre, et M. Tessier-Lavigne. 1994. « Netrins Are Diffusible Chemotropic Factors for Commissural Axons in the Embryonic Spinal Cord ». *Cell* 78 (3): 425-35.
- Khoronenkova, Svetlana V., et Grigory L. Dianov. 2015. « ATM Prevents DSB Formation by Coordinating SSB Repair and Cell Cycle Progression ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (13): 3997-4002.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1416031112>.
- Kim, Youngjo, et Edward T. Kipreos. 2007. « Cdt1 degradation to prevent DNA re-replication: conserved and non-conserved pathways ». *Cell Division* 2 (1): 18.
<https://doi.org/10.1186/1747-1028-2-18>.

- Kim, Yung Su, et Ivan Bedzhov. 2022. « Mechanisms of Formation and Functions of the Early Embryonic Cavities ». *Seminars in Cell & Developmental Biology*, mai, S1084-9521(22)00146-X. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2022.04.020>.
- Kim, Yung Su, Rui Fan, Ludmila Kremer, Nannette Kuempel-Rink, Karina Mildner, Dagmar Zeuschner, Liesbeth Hekking, Martin Stehling, et Ivan Bedzhov. 2021. « Deciphering epiblast lumenogenesis reveals proamniotic cavity control of embryo growth and patterning ». *Science Advances* 7 (11): eabe1640. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abe1640>.
- Kinoshita, Masaki, Michael Barber, William Mansfield, Yingzhi Cui, Daniel Spindlow, Giuliano Giuseppe Stirparo, Sabine Dietmann, Jennifer Nichols, et Austin Smith. 2020. « Capture of Mouse and Human Stem Cells with Features of Formative Pluripotency ». *Cell Stem Cell*, décembre. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.11.005>.
- Klein, Allon M., Linas Mazutis, Ilke Akartuna, Naren Tallapragada, Adrian Veres, Victor Li, Leonid Peshkin, David A. Weitz, et Marc W. Kirschner. 2015. « Droplet Barcoding for Single-Cell Transcriptomics Applied to Embryonic Stem Cells ». *Cell* 161 (5): 1187-1201. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.04.044>.
- Kleinsmith, Lewis J., et G. Barry Pierce Jr. 1964. « Multipotentiality of Single Embryonal Carcinoma Cells* ». *Cancer Research* 24 (9): 1544-51.
- Kobayashi, Taeko, Hiroaki Mizuno, Itaru Imayoshi, Chikara Furusawa, Katsuhiko Shirahige, et Ryoichiro Kageyama. 2009. « The Cyclic Gene Hes1 Contributes to Diverse Differentiation Responses of Embryonic Stem Cells ». *Genes & Development* 23 (16): 1870-75. <https://doi.org/10.1101/gad.1823109>.
- Kojima, Yoji, Keren Kaufman-Francis, Joshua B. Studdert, Kirsten A. Steiner, Melinda D. Power, David A. F. Loebel, Vanessa Jones, et al. 2014. « The Transcriptional and Functional Properties of Mouse Epiblast Stem Cells Resemble the Anterior Primitive Streak ». *Cell Stem Cell* 14 (1): 107-20. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.09.014>.
- Kolodziejczyk, Aleksandra A., Jong Kyoung Kim, Jason C.H. Tsang, Tomislav Ilicic, Johan Henriksson, Kedar N. Natarajan, Alex C. Tuck, et al. 2015. « Single Cell RNA-Sequencing of Pluripotent States Unlocks Modular Transcriptional Variation ». *Cell Stem Cell* 17 (4): 471-85. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.09.011>.
- Kolupaeva, Victoria, et Veerle Janssens. 2013. « PP1 and PP2A Phosphatases--Cooperating Partners in Modulating Retinoblastoma Protein Activation ». *The FEBS Journal* 280 (2): 627-43. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08511.x>.
- Kraushaar, Daniel C., Sumit Rai, Eduard Condac, Alison Nairn, Siyuan Zhang, Yu Yamaguchi, Kelley Moremen, Stephen Dalton, et Lianchun Wang. 2012. « Heparan Sulfate Facilitates FGF and BMP Signaling to Drive Mesoderm Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 287 (27): 22691-700. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.368241>.
- Kraushaar, Daniel C., Yu Yamaguchi, et Lianchun Wang. 2010. « Heparan Sulfate Is Required for Embryonic Stem Cells to Exit from Self-Renewal ». *The Journal of Biological Chemistry* 285 (8): 5907-16. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.066837>.
- Kubo, Atsushi, Katsunori Shinozaki, John M. Shannon, Valerie Kouskoff, Marion Kennedy, Savio Woo, Hans Joerg Fehling, et Gordon Keller. 2004. « Development of Definitive Endoderm from Embryonic Stem Cells in Culture ». *Development (Cambridge, England)* 131 (7): 1651-62. <https://doi.org/10.1242/dev.01044>.

- Kulesa, H., J. Frampton, et T. Graf. 1995. « GATA-1 Reprograms Avian Myelomonocytic Cell Lines into Eosinophils, Thromboblats, and Erythroblats. » *Genes & Development* 9 (10): 1250-62. <https://doi.org/10.1101/gad.9.10.1250>.
- Kumar, Roshan M., Patrick Cahan, Alex K. Shalek, Rahul Satija, AJay DaleyKeyser, Hu Li, Jin Zhang, et al. 2014. « Deconstructing transcriptional heterogeneity in pluripotent stem cells ». *Nature* 516 (7529): 56-61. <https://doi.org/10.1038/nature13920>.
- Kunath, Tilo, Marc K. Saba-El-Leil, Marwa Almousailleakh, Jason Wray, Sylvain Meloche, et Austin Smith. 2007. « FGF Stimulation of the Erk1/2 Signalling Cascade Triggers Transition of Pluripotent Embryonic Stem Cells from Self-Renewal to Lineage Commitment ». *Development (Cambridge, England)* 134 (16): 2895-2902. <https://doi.org/10.1242/dev.02880>.
- Kurek, Dorota, Alex Neagu, Melodi Tastemel, Nesrin Tüysüz, Johannes Lehmann, Harmen J. G. van de Werken, Sjaak Philipsen, et al. 2015. « Endogenous WNT Signals Mediate BMP-Induced and Spontaneous Differentiation of Epiblast Stem Cells and Human Embryonic Stem Cells ». *Stem Cell Reports* 4 (1): 114-28. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.11.007>.
- Lai Wing Sun, Karen, James P. Correia, et Timothy E. Kennedy. 2011. « Netrins: Versatile Extracellular Cues with Diverse Functions ». *Development (Cambridge, England)* 138 (11): 2153-69. <https://doi.org/10.1242/dev.044529>.
- Lambert, Arthur W., Diwakar R. Pattabiraman, et Robert A. Weinberg. 2017. « Emerging Biological Principles of Metastasis ». *Cell* 168 (4): 670-91. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.037>.
- Larijani, Banafshé, et Dominic L. Poccia. 2009. « Nuclear Envelope Formation: Mind the Gaps ». *Annual Review of Biophysics* 38: 107-24. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.050708.133625>.
- Latif, Christine, Nicole R. den Elzen, et Matthew J. O'Connell. 2004. « DNA damage checkpoint maintenance through sustained Chk1 activity ». *Journal of Cell Science* 117 (16): 3489-98. <https://doi.org/10.1242/jcs.01204>.
- Latil, Alain, Laurent Chêne, Béatrix Cochant-Priollet, Philippe Mangin, Georges Fournier, Philippe Berthon, et Olivier Cussenot. 2003. « Quantification of Expression of Netrins, Slits and Their Receptors in Human Prostate Tumors ». *International Journal of Cancer* 103 (3): 306-15. <https://doi.org/10.1002/ijc.10821>.
- Lavon, Neta, Ofra Yanuka, et Nissim Benvenisty. 2004. « Differentiation and Isolation of Hepatic-like Cells from Human Embryonic Stem Cells ». *Differentiation; Research in Biological Diversity* 72 (5): 230-38. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2004.07205002.x>.
- Lee, Changwook, BumSoo Hong, Jung Min Choi, Y Eugene Kim, Saori Watanabe, Yukio Ishimi, Takemi Enomoto, Shusuke Tada, Youngchang Kim, et Yunje Cho. 2004. « Structural Basis for Inhibition of the Replication Licensing Factor Cdt1 by Geminin ». *Nature* 430 (7002): 913-17. <https://doi.org/10.1038/nature02813>.
- Lee, Dae-Hoon, Li-Juan Zhou, Zheng Zhou, Jian-Xin Xie, Ji-Ung Jung, Yu Liu, Cai-Xia Xi, Lin Mei, et Wen-Cheng Xiong. 2010. « Neogenin inhibits HJV secretion and regulates BMP-induced hepcidin expression and iron homeostasis ». *Blood* 115 (15): 3136-45. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-11-251199>.
- Lee, Jungwoon, Yeorim Go, Inyoung Kang, Yong-Mahn Han, et Jungho Kim. 2010. « Oct-4 controls cell-cycle progression of embryonic stem cells ». *Biochemical Journal* 426 (2): 171-81. <https://doi.org/10.1042/BJ20091439>.

- Lee, Kian Leong, Sandy Keat Lim, Yuriy Lvovich Orlov, Le Yau Yit, Henry Yang, Lay Teng Ang, Lorenz Poellinger, et Bing Lim. 2011. « Graded Nodal/Activin Signaling Titrates Conversion of Quantitative Phospho-Smad2 Levels into Qualitative Embryonic Stem Cell Fate Decisions ». *PLOS Genetics* 7 (6): e1002130. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002130>.
- Lee, Sei-Jung, Young Hyun Jung, Sang Yub Oh, Min Sik Yong, Jung Min Ryu, et Ho Jae Han. 2014. « Netrin-1 Induces MMP-12-Dependent E-Cadherin Degradation Via the Distinct Activation of PKC α and FAK/Fyn in Promoting Mesenchymal Stem Cell Motility ». *Stem Cells and Development* 23 (16): 1870-82. <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0632>.
- Leeb, Martin, Diego Pasini, Maria Novatchkova, Markus Jaritz, Kristian Helin, et Anton Wutz. 2010. « Polycomb Complexes Act Redundantly to Repress Genomic Repeats and Genes ». *Genes & Development* 24 (3): 265-76. <https://doi.org/10.1101/gad.544410>.
- Lefebvre, Véronique, Bogdan Dumitriu, Alfredo Penzo-Méndez, Yu Han, et Bhattaram Pallavi. 2007. « Control of Cell Fate and Differentiation by Sry-Related High-Mobility-Group Box (Sox) Transcription Factors ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39 (12): 2195-2214. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.05.019>.
- Lei, H., S.P. Oh, M. Okano, R. Juttermann, K.A. Goss, R. Jaenisch, et E. Li. 1996. « De novo DNA cytosine methyltransferase activities in mouse embryonic stem cells ». *Development* 122 (10): 3195-3205. <https://doi.org/10.1242/dev.122.10.3195>.
- Leitch, Harry G., Kirsten R. McEwen, Aleksandra Turp, Vesela Encheva, Tom Carroll, Nils Grabole, William Mansfield, et al. 2013. « Naive Pluripotency Is Associated with Global DNA Hypomethylation ». *Nature Structural & Molecular Biology* 20 (3): 311-16. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2510>.
- Lemieux, Maxime, Louise Thiry, Olivier D. Laflamme, et Frédéric Bretzner. 2021. « Role of DSCAM in the Development of Neural Control of Movement and Locomotion ». *International Journal of Molecular Sciences* 22 (16): 8511. <https://doi.org/10.3390/ijms22168511>.
- Leonardo, E. D., L. Hinck, M. Masu, K. Keino-Masu, S. L. Ackerman, et M. Tessier-Lavigne. 1997. « Vertebrate Homologues of C. Elegans UNC-5 Are Candidate Netrin Receptors ». *Nature* 386 (6627): 833-38. <https://doi.org/10.1038/386833a0>.
- Li, Jing, Cong Ran, Edward Li, Faye Gordon, Grant Comstock, Hasan Siddiqui, Whitney Cleghorn, et al. 2008. « Synergistic Function of E2F7 and E2F8 Is Essential for Cell Survival and Embryonic Development ». *Developmental Cell* 14 (1): 62-75. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.10.017>.
- Li, Julia Su Zhou, et Eros Lazzerini Denchi. 2018. « How Stem Cells Keep Telomeres in Check ». *Differentiation* 100 (mars): 21-25. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2018.01.004>.
- Li, Lei, Juanjuan Wang, Jie Hou, Zhaojia Wu, Yuan Zhuang, Mengxue Lu, Yiran Zhang, et al. 2012. « Cdk1 Interplays with Oct4 to Repress Differentiation of Embryonic Stem Cells into Trophoblast ». *FEBS Letters* 586 (23): 4100-4107. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.10.030>.
- Li, Victor C., Andrea Ballabeni, et Marc W. Kirschner. 2012. « Gap 1 Phase Length and Mouse Embryonic Stem Cell Self-Renewal ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (31): 12550-55. <https://doi.org/10.1073/pnas.1206740109>.

- Li, Xianqiang, Xiaoning Zhao, Yu Fang, Xin Jiang, Tommy Duong, Connie Fan, Chiao-Chain Huang, et Steven R. Kain. 1998. « Generation of Destabilized Green Fluorescent Protein as a Transcription Reporter ». *Journal of Biological Chemistry* 273 (52): 34970-75. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.52.34970>.
- Li, Yanxin, Haizhong Feng, Haihui Gu, Dale W. Lewis, Youzhong Yuan, Lei Zhang, Hui Yu, et al. 2013. « The P53-PUMA Axis Suppresses iPSC Generation ». *Nature Communications* 4: 2174. <https://doi.org/10.1038/ncomms3174>.
- Li, Zhongwei, Teng Fei, Jianping Zhang, Gaoyang Zhu, Lu Wang, Danyu Lu, Xiaochun Chi, et al. 2012. « BMP4 Signaling Acts via Dual-Specificity Phosphatase 9 to Control ERK Activity in Mouse Embryonic Stem Cells ». *Cell Stem Cell* 10 (2): 171-82. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.12.016>.
- Liang, Jiancong, Ma Wan, Yi Zhang, Peili Gu, Huawei Xin, Sung Yun Jung, Jun Qin, et al. 2008. « Nanog and Oct4 Associate with Unique Transcriptional Repression Complexes in Embryonic Stem Cells ». *Nature Cell Biology* 10 (6): 731-39. <https://doi.org/10.1038/ncb1736>.
- Lim, Shuhui, et Philipp Kaldis. 2012. « Loss of Cdk2 and Cdk4 Induces a Switch from Proliferation to Differentiation in Neural Stem Cells ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 30 (7): 1509-20. <https://doi.org/10.1002/stem.1114>.
- . 2013. « Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation ». *Development* 140 (15): 3079-93. <https://doi.org/10.1242/dev.091744>.
- Lin, X., E. M. Buff, N. Perrimon, et A. M. Michelson. 1999. « Heparan Sulfate Proteoglycans Are Essential for FGF Receptor Signaling during Drosophila Embryonic Development ». *Development (Cambridge, England)* 126 (17): 3715-23. <https://doi.org/10.1242/dev.126.17.3715>.
- Lindenberg, Svend, Poul Hyttel, Anita Sjøgren, et Torben Greve. 1989. « A comparative study of attachment of human, bovine and mouse blastocysts to uterine epithelial monolayer ». *Human Reproduction* 4 (4): 446-56. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a136925>.
- Liskay, R M. 1977. « Absence of a measurable G2 phase in two Chinese hamster cell lines. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74 (4): 1622-25. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.4.1622>.
- Liu, Chunming, Yiming Li, Mikhail Semenov, Chun Han, Gyeong Hun Baeg, Yi Tan, Zhuohua Zhang, Xinhua Lin, et Xi He. 2002. « Control of Beta-Catenin Phosphorylation/Degradation by a Dual-Kinase Mechanism ». *Cell* 108 (6): 837-47. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00685-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00685-2).
- Liu, Guofa, Weiquan Li, Lei Wang, Amar Kar, Kun-Liang Guan, Yi Rao, et Jane Y. Wu. 2009. « DSCAM Functions as a Netrin Receptor in Commissural Axon Pathfinding ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (8): 2951-56. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811083106>.
- Liu, Lijun, Wojciech Michowski, Aleksandra Kolodziejczyk, et Piotr Sicinski. 2019. « The Cell Cycle in Stem Cell Proliferation, Pluripotency and Differentiation ». *Nature Cell Biology* 21 (9): 1060-67. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0384-4>.
- Liu, Xiaodong, Jia Ping Tan, Jan Schröder, Asma Aberkane, John F. Ouyang, Monika Mohenska, Sue Mei Lim, et al. 2021. « Modelling Human Blastocysts by Reprogramming Fibroblasts into iBlastoids ». *Nature* 591 (7851): 627-32. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03372-y>.

- Liu, Yuru, Elke Stein, Timothy Oliver, Yong Li, William J Brunken, Manuel Koch, Marc Tessier-Lavigne, et Brigid L. M Hogan. 2004. « Novel Role for Netrins in Regulating Epithelial Behavior during Lung Branching Morphogenesis ». *Current Biology* 14 (10): 897-905. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.05.020>.
- Lobjois, Valérie, Bertrand Benazeraf, Nicolas Bertrand, François Medevielle, et Fabienne Pituello. 2004. « Specific Regulation of Cyclins D1 and D2 by FGF and Shh Signaling Coordinates Cell Cycle Progression, Patterning, and Differentiation during Early Steps of Spinal Cord Development ». *Developmental Biology* 273 (2): 195-209. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.05.031>.
- Loh, Yui-Han, Qiang Wu, Joon-Lin Chew, Vinsensius B. Vega, Weiwei Zhang, Xi Chen, Guillaume Bourque, et al. 2006. « The Oct4 and Nanog Transcription Network Regulates Pluripotency in Mouse Embryonic Stem Cells ». *Nature Genetics* 38 (4): 431-40. <https://doi.org/10.1038/ng1760>.
- Lourenço, F. C., V. Galvan, J. Fombonne, V. Corset, F. Llambi, U. Müller, D. E. Bredesen, et P. Mehlen. 2009. « Netrin-1 Interacts with Amyloid Precursor Protein and Regulates Amyloid- β Production ». *Cell Death & Differentiation* 16 (5): 655-63. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.191>.
- Lowry, William E. 2012. « Does Transcription Factor Induced Pluripotency Accurately Mimic Embryo Derived Pluripotency? » *Current Opinion in Genetics & Development, Cell reprogramming*, 22 (5): 429-34. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2012.07.003>.
- Lu, Xiaowei, Ferdinand Le Noble, Li Yuan, Qingjian Jiang, Benjamin De Lafarge, Daisuke Sugiyama, Christiane Bréant, et al. 2004. « The Netrin Receptor UNC5B Mediates Guidance Events Controlling Morphogenesis of the Vascular System ». *Nature* 432 (7014): 179-86. <https://doi.org/10.1038/nature03080>.
- Lunn, Cara L., John C. Chrivia, et Joseph J. Baldassare. 2010. « Activation of Cdk2/Cyclin E Complexes Is Dependent on the Origin of Replication Licensing Factor Cdc6 in Mammalian Cells ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 9 (22): 4533-41. <https://doi.org/10.4161/cc.9.22.13789>.
- Luo, Zhuojuan, Xin Gao, Chengqi Lin, Edwin R. Smith, Stacy A. Marshall, Selene K. Swanson, Laurence Florens, Michael P. Washburn, et Ali Shilatifard. 2015. « Zic2 Is an Enhancer-Binding Factor Required for Embryonic Stem Cell Specification ». *Molecular Cell* 57 (4): 685-94. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.01.007>.
- Lv, Jianwei, Xiaolei Sun, Jianxiong Ma, Xinlong Ma, Yang Zhang, Fengbo Li, Yanjun Li, et Zhihu Zhao. 2015. « Netrin-1 Induces the Migration of Schwann Cells via P38 MAPK and PI3K-Akt Signaling Pathway Mediated by the UNC5B Receptor ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 464 (1): 263-68. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.06.140>.
- Ly, Alice, Anatoly Nikolaev, Geetha Suresh, Yufang Zheng, Marc Tessier-Lavigne, et Elke Stein. 2008. « DSCAM Is a Netrin Receptor That Collaborates with DCC in Mediating Turning Responses to Netrin-1 ». *Cell* 133 (7): 1241-54. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.05.030>.
- Ma, Wen-ge, Haengseok Song, Sanjoy K. Das, Bibhash C. Paria, et Sudhansu K. Dey. 2003. « Estrogen is a critical determinant that specifies the duration of the window of uterine receptivity for implantation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (5): 2963-68. <https://doi.org/10.1073/pnas.0530162100>.
- MacArthur, Ben D., Ana Sevilla, Michel Lenz, Franz-Josef Müller, Bernhard M. Schuldt, Andreas A. Schuppert, Sonya J. Ridden, et al. 2012. « Nanog-Dependent Feedback

- Loops Regulate Murine Embryonic Stem Cell Heterogeneity ». *Nature Cell Biology* 14 (11): 1139-47. <https://doi.org/10.1038/ncb2603>.
- Machida, Yuichi J., Jamie K. Teer, et Anindya Dutta. 2005. « Acute Reduction of an Origin Recognition Complex (ORC) Subunit in Human Cells Reveals a Requirement of ORC for Cdk2 Activation ». *The Journal of Biological Chemistry* 280 (30): 27624-30. <https://doi.org/10.1074/jbc.M502615200>.
- Macklon, N. S., J. P. M. Geraedts, et B. C. J. M. Fauser. 2002. « Conception to Ongoing Pregnancy: The “black Box” of Early Pregnancy Loss ». *Human Reproduction Update* 8 (4): 333-43. <https://doi.org/10.1093/humupd/8.4.333>.
- Magenta, Alessandra, Pasquale Fasanaro, Sveva Romani, Valeria Di Stefano, Maurizio C. Capogrossi, et Fabio Martelli. 2008. « Protein Phosphatase 2A Subunit PR70 Interacts with PRb and Mediates Its Dephosphorylation ». *Molecular and Cellular Biology* 28 (2): 873-82. <https://doi.org/10.1128/MCB.00480-07>.
- Maherali, Nimet, Rupa Sridharan, Wei Xie, Jochen Utikal, Sarah Eminli, Katrin Arnold, Matthias Stadtfeld, et al. 2007. « Directly Reprogrammed Fibroblasts Show Global Epigenetic Remodeling and Widespread Tissue Contribution ». *Cell Stem Cell* 1 (1): 55-70. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.05.014>.
- Maiti, Baidehi, Jing Li, Alain de Bruin, Faye Gordon, Cynthia Timmers, Rene Opavsky, Kaustubha Patil, John Tuttle, Whitney Cleghorn, et Gustavo Leone. 2005. « Cloning and Characterization of Mouse E2F8, a Novel Mammalian E2F Family Member Capable of Blocking Cellular Proliferation ». *The Journal of Biological Chemistry* 280 (18): 18211-20. <https://doi.org/10.1074/jbc.M501410200>.
- Malumbres, Marcos. 2014. « Cyclin-Dependent Kinases ». *Genome Biology* 15 (6): 1-10. <https://doi.org/10.1186/gb4184>.
- Marión, Rosa M., Isabel López de Silanes, Lluc Mosteiro, Benjamin Gamache, María Abad, Carmen Guerra, Diego Megías, Manuel Serrano, et Maria A. Blasco. 2017. « Common Telomere Changes during In Vivo Reprogramming and Early Stages of Tumorigenesis ». *Stem Cell Reports* 8 (2): 460-75. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.01.001>.
- Marión, Rosa M., Katerina Strati, Han Li, Matilde Murga, Raquel Blanco, Sagrario Ortega, Oscar Fernandez-Capetillo, Manuel Serrano, et Maria A. Blasco. 2009. « A P53-Mediated DNA Damage Response Limits Reprogramming to Ensure IPS Cell Genomic Integrity ». *Nature* 460 (7259): 1149-53. <https://doi.org/10.1038/nature08287>.
- Marion, Rosa M., Katerina Strati, Han Li, Agueda Tejera, Stefan Schoeftner, Sagrario Ortega, Manuel Serrano, et Maria A. Blasco. 2009. « Telomeres Acquire Embryonic Stem Cell Characteristics in Induced Pluripotent Stem Cells ». *Cell Stem Cell* 4 (2): 141-54. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.12.010>.
- Marks, Hendrik, Tüzer Kalkan, Roberta Menafra, Sergey Denissov, Kenneth Jones, Helmut Hofemeister, Jennifer Nichols, et al. 2012. « The Transcriptional and Epigenomic Foundations of Ground State Pluripotency ». *Cell* 149 (3): 590-604. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.026>.
- Martello, Graziano, Toshimi Sugimoto, Evangelia Diamanti, Anagha Joshi, Rebecca Hannah, Satoshi Ohtsuka, Berthold Göttgens, Hitoshi Niwa, et Austin Smith. 2012. « Esrrb Is a Pivotal Target of the Gsk3/Tcf3 Axis Regulating Embryonic Stem Cell Self-Renewal ». *Cell Stem Cell* 11 (4): 491-504. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.06.008>.
- Martin, G. R. 1980. « Teratocarcinomas and Mammalian Embryogenesis ». *Science (New York, N.Y.)* 209 (4458): 768-76. <https://doi.org/10.1126/science.6250214>.

- . 1981. « Isolation of a Pluripotent Cell Line from Early Mouse Embryos Cultured in Medium Conditioned by Teratocarcinoma Stem Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78 (12): 7634-38. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.12.7634>.
- Martin, G. R., et M. J. Evans. 1975. « Differentiation of Clonal Lines of Teratocarcinoma Cells: Formation of Embryoid Bodies in Vitro ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72 (4): 1441-45. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.4.1441>.
- Martin, Gail R., et Martin J. Evans. 1974. « The Morphology and Growth of a Pluripotent Teratocarcinoma Cell Line and Its Derivatives in Tissue Culture ». *Cell* 2 (3): 163-72. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(74\)90090-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(74)90090-7).
- Martínez-Alonso, Diego, et Marcos Malumbres. 2020. « Mammalian Cell Cycle Cyclins ». *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 1. Cyclins edited by Josep Clotet, 107 (novembre): 28-35. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.03.009>.
- Matsuda, Kazunari, Tomoyuki Mikami, Shinya Oki, Hideaki Iida, Munazah Andrabi, Jeremy M. Boss, Katsushi Yamaguchi, Shuji Shigenobu, et Hisato Kondoh. 2017. « ChIP-seq analysis of genomic binding regions of five major transcription factors highlights a central role for ZIC2 in the mouse epiblast stem cell gene regulatory network ». *Development* 144 (11): 1948-58. <https://doi.org/10.1242/dev.143479>.
- Mauro, Michael J., et Brian J. Druker. 2001. « Chronic Myelogenous Leukemia ». *Current Opinion in Oncology* 13 (1): 3-7.
- McDole, Katie, Yuan Xiong, Pablo A. Iglesias, et Yixian Zheng. 2011. « Lineage Mapping the Pre-Implantation Mouse Embryo by Two-Photon Microscopy, New Insights into the Segregation of Cell Fates ». *Developmental Biology* 355 (2): 239-49. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.04.024>.
- McIntosh, J. Richard. 2021. « Anaphase A ». *Seminars in Cell & Developmental Biology*, Mitosis, 117 (septembre): 118-26. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2021.03.009>.
- McKeown, Caroline R., et Hollis T. Cline. 2019. « Nutrient Restriction Causes Reversible G2 Arrest in Xenopus Neural Progenitors ». *Development (Cambridge, England)* 146 (20): dev178871. <https://doi.org/10.1242/dev.178871>.
- Mehlen, P., S. Rabizadeh, S. J. Snipas, N. Assa-Munt, G. S. Salvesen, et D. E. Bredesen. 1998. « The DCC Gene Product Induces Apoptosis by a Mechanism Requiring Receptor Proteolysis ». *Nature* 395 (6704): 801-4. <https://doi.org/10.1038/27441>.
- Meijers, Rob, Robert G. Smock, Yan Zhang, et Jia-Huai Wang. 2020. « Netrin Synergizes Signaling and Adhesion through DCC ». *Trends in Biochemical Sciences* 45 (1): 6-12. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2019.10.005>.
- Menasché, Philippe, Valérie Vanneaux, Albert Haguège, Alain Bel, Bernard Cholley, Isabelle Cacciapuoti, Alexandre Parouchev, et al. 2015. « Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiac Progenitors for Severe Heart Failure Treatment: First Clinical Case Report ». *European Heart Journal* 36 (30): 2011-17. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv189>.
- Mintz, B., et K. Illmensee. 1975. « Normal Genetically Mosaic Mice Produced from Malignant Teratocarcinoma Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72 (9): 3585-89. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.9.3585>.
- Mishina, Y., A. Suzuki, N. Ueno, et R. R. Behringer. 1995. « Bmpr Encodes a Type I Bone Morphogenetic Protein Receptor That Is Essential for Gastrulation during Mouse Embryogenesis. » *Genes & Development* 9 (24): 3027-37. <https://doi.org/10.1101/gad.9.24.3027>.

- Mitsui, Kaoru, Yoshimi Tokuzawa, Hiroaki Itoh, Kohichi Segawa, Mirei Murakami, Kazutoshi Takahashi, Masayoshi Maruyama, Mitsuyo Maeda, et Shinya Yamanaka. 2003. « The Homeoprotein Nanog Is Required for Maintenance of Pluripotency in Mouse Epiblast and ES Cells ». *Cell* 113 (5): 631-42. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00393-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00393-3).
- Miyanari, Yusuke, et Maria-Elena Torres-Padilla. 2012. « Control of Ground-State Pluripotency by Allelic Regulation of Nanog ». *Nature* 483 (7390): 470-73. <https://doi.org/10.1038/nature10807>.
- Moberg, K., M. A. Starz, et J. A. Lees. 1996. « E2F-4 Switches from P130 to P107 and PRB in Response to Cell Cycle Reentry ». *Molecular and Cellular Biology* 16 (4): 1436-49. <https://doi.org/10.1128/MCB.16.4.1436>.
- Molè, Matteo A., Antonia Weberling, et Magdalena Zernicka-Goetz. 2020. « Chapter Four - Comparative Analysis of Human and Mouse Development: From Zygote to Pre-Gastrulation ». In *Current Topics in Developmental Biology*, édité par Lilianna Solnica-Krezel, 136:113-38. Gastrulation: From Embryonic Pattern to Form. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2019.10.002>.
- Morgan, David O. 2010. *Le cycle cellulaire: Principles of Control*. De Boeck Supérieur.
- Morgani, Sophie, Jennifer Nichols, et Anna-Katerina Hadjantonakis. 2017. « The many faces of Pluripotency: in vitro adaptations of a continuum of in vivo states ». *BMC Developmental Biology* 17 (1): 7. <https://doi.org/10.1186/s12861-017-0150-4>.
- Muñoz, Sergio, Sabela Búa, Sara Rodríguez-Acebes, Diego Megías, Sagrario Ortega, Alba de Martino, et Juan Méndez. 2017. « In Vivo DNA Re-Replication Elicits Lethal Tissue Dysplasias ». *Cell Reports* 19 (5): 928-38. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.04.032>.
- Munro, S., S. M. Carr, et N. B. La Thangue. 2012. « Diversity within the PRb Pathway: Is There a Code of Conduct? ». *Oncogene* 31 (40): 4343-52. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.603>.
- Muramoto, Tetsuya, Iris Müller, Giles Thomas, Andrew Melvin, et Jonathan R. Chubb. 2010. « Methylation of H3K4 Is Required for Inheritance of Active Transcriptional States ». *Current Biology* 20 (5): 397-406. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.01.017>.
- Musiątek, Marcelina W., et Dorota Rybaczek. 2015. « Behavior of Replication Origins in Eukaryota - Spatio-Temporal Dynamics of Licensing and Firing ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 14 (14): 2251-64. <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1056421>.
- Nagy, A., E. Gocza, E.M. Diaz, V.R. Prideaux, E. Ivanyi, M. Markkula, et J. Rossant. 1990. « Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse ». *Development* 110 (3): 815-21. <https://doi.org/10.1242/dev.110.3.815>.
- Nagy, A., J. Rossant, R. Nagy, W. Abramow-Newerly, et J. C. Roder. 1993. « Derivation of Completely Cell Culture-Derived Mice from Early-Passage Embryonic Stem Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (18): 8424-28. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.18.8424>.
- Nakashiba, Toshiaki, Sachiko Nishimura, Toshio Ikeda, et Shigeyoshi Itoharu. 2002. « Complementary Expression and Neurite Outgrowth Activity of Netrin-G Subfamily Members ». *Mechanisms of Development* 111 (1-2): 47-60. [https://doi.org/10.1016/s0925-4773\(01\)00600-1](https://doi.org/10.1016/s0925-4773(01)00600-1).
- Nakayama, Hironao, Chiaki Kusumoto, Masako Nakahara, Akira Fujiwara, et Shigeki Higashiyama. 2018. « Semaphorin 3F and Netrin-1: The Novel Function as a Regulator

- of Tumor Microenvironment ». *Frontiers in Physiology* 9: 1662.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01662>.
- Narsinh, Kazim H., Ning Sun, Veronica Sanchez-Freire, Andrew S. Lee, Patricia Almeida, Shijun Hu, Taha Jan, et al. 2011. « Single cell transcriptional profiling reveals heterogeneity of human induced pluripotent stem cells ». *The Journal of Clinical Investigation* 121 (3): 1217-21. <https://doi.org/10.1172/JCI44635>.
- Neagu, Alex, Emiel van Genderen, Irene Escudero, Lucas Verwegen, Dorota Kurek, Johannes Lehmann, Jente Stel, et al. 2020. « In Vitro Capture and Characterization of Embryonic Rosette-Stage Pluripotency between Naive and Primed States ». *Nature Cell Biology* 22 (5): 534-45. <https://doi.org/10.1038/s41556-020-0508-x>.
- Nguyen, Andrew, et Hua Cai. 2006. « Netrin-1 induces angiogenesis via a DCC-dependent ERK1/2-eNOS feed-forward mechanism ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (17): 6530-35. <https://doi.org/10.1073/pnas.0511011103>.
- Nichols, Jennifer, et Austin Smith. 2009. « Naive and Primed Pluripotent States ». *Cell Stem Cell* 4 (6): 487-92. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.05.015>.
- Nichols, Jennifer, Branko Zevnik, Konstantinos Anastasiadis, Hitoshi Niwa, Daniela Klewe-Nebenius, Ian Chambers, Hans Schöler, et Austin Smith. 1998. « Formation of Pluripotent Stem Cells in the Mammalian Embryo Depends on the POU Transcription Factor Oct4 ». *Cell* 95 (3): 379-91. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81769-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81769-9).
- Nigg, Erich A. 2001. « Mitotic Kinases as Regulators of Cell Division and Its Checkpoints ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2 (1): 21-32.
<https://doi.org/10.1038/35048096>.
- Nishitani, Hideo, Zoi Lygerou, et Takeharu Nishimoto. 2004. « Proteolysis of DNA Replication Licensing Factor Cdt1 in S-Phase Is Performed Independently of Geminin through Its N-Terminal Region* ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (29): 30807-16.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M312644200>.
- Nishitani, Hideo, Stavros Taraviras, Zoi Lygerou, et Takeharu Nishimoto. 2001. « The Human Licensing Factor for DNA Replication Cdt1 Accumulates in G1 and Is Destabilized after Initiation of S-Phase* ». *Journal of Biological Chemistry* 276 (48): 44905-11.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M105406200>.
- Nishiyama, Atsuya, Lori Frappier, et Marcel Méchali. 2011. « MCM-BP Regulates Unloading of the MCM2-7 Helicase in Late S Phase ». *Genes & Development* 25 (2): 165-75.
<https://doi.org/10.1101/gad.614411>.
- Niwa, Hitoshi, Jun-ichi Miyazaki, et Austin G. Smith. 2000. « Quantitative Expression of Oct-3/4 Defines Differentiation, Dedifferentiation or Self-Renewal of ES Cells ». *Nature Genetics* 24 (4): 372-76. <https://doi.org/10.1038/74199>.
- Niwa, Hitoshi, Kazuya Ogawa, Daisuke Shimosato, et Kenjiro Adachi. 2009. « A Parallel Circuit of LIF Signalling Pathways Maintains Pluripotency of Mouse ES Cells ». *Nature* 460 (7251): 118-22. <https://doi.org/10.1038/nature08113>.
- Niwa, Tetsuo, Yasunori Akaike, Kaichi Watanabe, et Taku Chibazakura. 2021. « Hyperactivation of Cyclin A-CDK Induces Centrosome Overduplication and Chromosome Tetraploidization in Mouse Cells ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 549 (avril): 91-97.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.02.079>.
- Nowotschin, Sonja, Manu Setty, Ying-Yi Kuo, Vincent Liu, Vidur Garg, Roshan Sharma, Claire S. Simon, et al. 2019. « The Emergent Landscape of the Mouse Gut Endoderm at

- Single-Cell Resolution ». *Nature* 569 (7756): 361-67. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1127-1>.
- Nugent, J.H., C.E. Alfa, T. Young, et J.S. Hyams. 1991. « Conserved structural motifs in cyclins identified by sequence analysis ». *Journal of Cell Science* 99 (3): 669-74. <https://doi.org/10.1242/jcs.99.3.669>.
- Nusse, R., et H. E. Varmus. 1982. « Many Tumors Induced by the Mouse Mammary Tumor Virus Contain a Provirus Integrated in the Same Region of the Host Genome ». *Cell* 31 (1): 99-109. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(82\)90409-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90409-3).
- Nusse, Roel, et Hans Clevers. 2017. « Wnt/ β -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities ». *Cell* 169 (6): 985-99. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.016>.
- Nüsslein-Volhard, Christiane, et Eric Wieschaus. 1980. « Mutations Affecting Segment Number and Polarity in Drosophila ». *Nature* 287 (5785): 795-801. <https://doi.org/10.1038/287795a0>.
- O'Connell, M. J., N. C. Walworth, et A. M. Carr. 2000. « The G2-Phase DNA-Damage Checkpoint ». *Trends in Cell Biology* 10 (7): 296-303. [https://doi.org/10.1016/s0962-8924\(00\)01773-6](https://doi.org/10.1016/s0962-8924(00)01773-6).
- O'Connell, Matthew J., et Karlene A. Cimprich. 2005. « G2 damage checkpoints: what is the turn-on? ». *Journal of Cell Science* 118 (1): 1-6. <https://doi.org/10.1242/jcs.01626>.
- O'Connor, Michael D., Melanie D. Kardel, Ioulia Iosfina, David Youssef, Min Lu, Michael M. Li, Suzanne Vercauteren, Andras Nagy, et Connie J. Eaves. 2008. « Alkaline Phosphatase-Positive Colony Formation Is a Sensitive, Specific, and Quantitative Indicator of Undifferentiated Human Embryonic Stem Cells ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 26 (5): 1109-16. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0801>.
- Ogawa, Kazuya, Akira Saito, Hisanori Matsui, Hiroshi Suzuki, Satoshi Ohtsuka, Daisuke Shimosato, Yasuyuki Morishita, Tetsuro Watabe, Hitoshi Niwa, et Kohei Miyazono. 2007. « Activin-Nodal signaling is involved in propagation of mouse embryonic stem cells ». *Journal of Cell Science* 120 (1): 55-65. <https://doi.org/10.1242/jcs.03296>.
- Ohtsuka, Satoshi, Yoko Nakai-Futatsugi, et Hitoshi Niwa. 2015. « LIF signal in mouse embryonic stem cells ». *JAK-STAT* 4 (2): e1086520. <https://doi.org/10.1080/21623996.2015.1086520>.
- Okano, Masaki, Daphne W Bell, Daniel A Haber, et En Li. 1999. « DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for De Novo Methylation and Mammalian Development ». *Cell* 99 (3): 247-57. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81656-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81656-6).
- Onishi, Kento, et Peter W. Zandstra. 2015. « LIF signaling in stem cells and development ». *Development* 142 (13): 2230-36. <https://doi.org/10.1242/dev.117598>.
- Orkin, S. H., J. Wang, J. Kim, J. Chu, S. Rao, T. W. Theunissen, X. Shen, et D. N. Levasseur. 2008. « The Transcriptional Network Controlling Pluripotency in ES Cells ». *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 73: 195-202. <https://doi.org/10.1101/sqb.2008.72.001>.
- Orlando, V., E. P. Jane, V. Chinwalla, P. J. Harte, et R. Paro. 1998. « Binding of Trithorax and Polycomb Proteins to the Bithorax Complex: Dynamic Changes during Early Drosophila Embryogenesis ». *The EMBO Journal* 17 (17): 5141-50. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.17.5141>.
- Ornitz, David M., et Nobuyuki Itoh. 2015. « The Fibroblast Growth Factor Signaling Pathway ». *Wiley Interdisciplinary Reviews. Developmental Biology* 4 (3): 215-66. <https://doi.org/10.1002/wdev.176>.

- Osborne, P. B., G. M. Halliday, H. M. Cooper, et J. R. Keast. 2005. « Localization of Immunoreactivity for Deleted in Colorectal Cancer (DCC), the Receptor for the Guidance Factor Netrin-1, in Ventral Trier Dopamine Projection Pathways in Adult Rodents ». *Neuroscience* 131 (3): 671-81. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.11.043>.
- Oshimori, Naoki, et Elaine Fuchs. 2012. « The Harmonies Played by TGF- β in Stem Cell Biology ». *Cell Stem Cell* 11 (6): 751-64. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.11.001>.
- Ouyang, Juan, Wei Yu, Jing Liu, Nian Zhang, Laurence Florens, Jiekai Chen, He Liu, Michael Washburn, Duanqing Pei, et Ting Xie. 2015. « Cyclin-Dependent Kinase-Mediated Sox2 Phosphorylation Enhances the Ability of Sox2 to Establish the Pluripotent State ». *The Journal of Biological Chemistry* 290 (37): 22782-94. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.658195>.
- Ozmadenci, Duygu, Olivier Féraud, Suzy Markossian, Elsa Kress, Benjamin Ducarouge, Benjamin Gibert, Jian Ge, et al. 2015. « Netrin-1 regulates somatic cell reprogramming and pluripotency maintenance ». *Nature Communications* 6 (juillet). <https://doi.org/10.1038/ncomms8398>.
- Pack, Lindsey R, Leighton H Daigh, et Tobias Meyer. 2019. « Putting the Brakes on the Cell Cycle: Mechanisms of Cellular Growth Arrest ». *Current Opinion in Cell Biology, Cell Dynamics*, 60 (octobre): 106-13. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2019.05.005>.
- Palmer, N., et P. Kaldis. 2016. « Chapter One - Regulation of the Embryonic Cell Cycle During Mammalian Preimplantation Development ». In *Current Topics in Developmental Biology*, édité par Melvin L. DePamphilis, 120:1-53. Mammalian Preimplantation Development. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2016.05.001>.
- Palmesino, Elena, Patrick C. G. Haddick, Marc Tessier-Lavigne, et Artur Kania. 2012. « Genetic Analysis of DSCAM's Role as a Netrin-1 Receptor in Vertebrates ». *The Journal of Neuroscience* 32 (2): 411-16. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3563-11.2012>.
- Palmqvist, Lars, Clive H. Glover, Lien Hsu, Min Lu, Bolette Bossen, James M. Piret, R. Keith Humphries, et Cheryl D. Helgason. 2005. « Correlation of Murine Embryonic Stem Cell Gene Expression Profiles with Functional Measures of Pluripotency ». *STEM CELLS* 23 (5): 663-80. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0157>.
- Panning, B., et R. Jaenisch. 1996. « DNA Hypomethylation Can Activate Xist Expression and Silence X-Linked Genes. » *Genes & Development* 10 (16): 1991-2002. <https://doi.org/10.1101/gad.10.16.1991>.
- Papanayotou, Costis, et Jérôme Collignon. 2014. « Activin/Nodal signalling before implantation: setting the stage for embryo patterning ». *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 369 (1657): 20130539. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0539>.
- Pardee, Arthur B. 1974. « A Restriction Point for Control of Normal Animal Cell Proliferation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 71 (4): 1286-90. <https://doi.org/10.1073/pnas.71.4.1286>.
- Park, Kye Won, Dana Crouse, Mark Lee, Satyajit K. Karnik, Lise K. Sorensen, Kelly J. Murphy, Calvin J. Kuo, et Dean Y. Li. 2004. « The Axonal Attractant Netrin-1 Is an Angiogenic Factor ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (46): 16210-15. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405984101>.
- Parness, J., et S. B. Horwitz. 1981. « Taxol Binds to Polymerized Tubulin in Vitro ». *The Journal of Cell Biology* 91 (2 Pt 1): 479-87. <https://doi.org/10.1083/jcb.91.2.479>.

- Patra, Samir Kumar. 2020. « Roles of OCT4 in Pathways of Embryonic Development and Cancer Progression ». *Mechanisms of Ageing and Development* 189 (juillet): 111286. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2020.111286>.
- Pauklin, Siim, et Ludovic Vallier. 2014. « The Cell-Cycle State of Stem Cells Determines Cell Fate Propensity ». *Cell* 156 (6): 1338. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.044>.
- . 2015. « Activin/Nodal signalling in stem cells ». *Development* 142 (4): 607-19. <https://doi.org/10.1242/dev.091769>.
- Pavin, Nenad, et Iva M. Tolić. 2021. « Mechanobiology of the Mitotic Spindle ». *Developmental Cell* 56 (2): 192-201. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.11.003>.
- Pavletich, N. P. 1999. « Mechanisms of Cyclin-Dependent Kinase Regulation: Structures of Cdks, Their Cyclin Activators, and Cip and INK4 Inhibitors ». *Journal of Molecular Biology* 287 (5): 821-28. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.2640>.
- Paweletz, N. 2001. « Walther Flemming: Pioneer of Mitosis Research ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2 (1): 72-75. <https://doi.org/10.1038/35048077>.
- Pease, Shirley, Paola Braghetta, David Gearing, Dianne Grail, et R. Lindsay Williams. 1990. « Isolation of Embryonic Stem (ES) Cells in Media Supplemented with Recombinant Leukemia Inhibitory Factor (LIF) ». *Developmental Biology* 141 (2): 344-52. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(90\)90390-5](https://doi.org/10.1016/0012-1606(90)90390-5).
- Pekkanen-Mattila, Mari, Markku Pelto-Huikko, Ville Kujala, Riitta Suuronen, Heli Skottman, Katriina Aalto-Setälä, et Erja Kerkelä. 2010. « Spatial and Temporal Expression Pattern of Germ Layer Markers during Human Embryonic Stem Cell Differentiation in Embryoid Bodies ». *Histochemistry and Cell Biology* 133 (5): 595-606. <https://doi.org/10.1007/s00418-010-0689-7>.
- Perera, Marta, Silas Boye Nissen, Martin Proks, Sara Pozzi, Rita S Monteiro, Ala Trusina, et Joshua M Brickman. 2022. « Transcriptional heterogeneity and cell cycle regulation as central determinants of Primitive Endoderm priming ». Édité par Carole LaBonne et Marianne E Bronner. *eLife* 11 (août): e78967. <https://doi.org/10.7554/eLife.78967>.
- Pesce, Maurizio, et Hans R. Schöler. 2000. « Oct-4: Control of Totipotency and Germline Determination ». *Molecular Reproduction and Development* 55: 452-57. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(200004\)55:4<452::AID-MRD14>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(200004)55:4<452::AID-MRD14>3.0.CO;2-S).
- Peters, Jan-Michael. 2006. « The Anaphase Promoting Complex/Cyclosome: A Machine Designed to Destroy ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7 (9): 644-56. <https://doi.org/10.1038/nrm1988>.
- Pines, J, et T Hunter. 1991. « Human cyclins A and B1 are differentially located in the cell and undergo cell cycle-dependent nuclear transport. » *Journal of Cell Biology* 115 (1): 1-17. <https://doi.org/10.1083/jcb.115.1.1>.
- Plusa, Berenika, Anna Piliszek, Stephen Frankenberg, Jérôme Artus, et Anna-Katerina Hadjantonakis. 2008. « Distinct sequential cell behaviours direct primitive endoderm formation in the mouse blastocyst ». *Development* 135 (18): 3081-91. <https://doi.org/10.1242/dev.021519>.
- Pollard, Thomas D., et Ben O'Shaughnessy. 2019. « Molecular Mechanism of Cytokinesis ». *Annual Review of Biochemistry* 88 (juin): 661-89. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-012530>.
- Posfai, Eszter, Oliver H. Tam, et Janet Rossant. 2014. « Chapter One - Mechanisms of Pluripotency In Vivo and In Vitro ». In *Current Topics in Developmental Biology*, édité par Michael Rendl, 107:1-37. Stem Cells in Development and Disease. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416022-4.00001-9>.

- Power, M. A., et P. P. Tam. 1993. « Onset of Gastrulation, Morphogenesis and Somitogenesis in Mouse Embryos Displaying Compensatory Growth ». *Anatomy and Embryology* 187 (5): 493-504. <https://doi.org/10.1007/BF00174425>.
- Priest, Catherine A., Nathan C. Manley, Jerrod Denham, Edward D. Wirth, et Jane S. Lebkowski. 2015. « Preclinical Safety of Human Embryonic Stem Cell-Derived Oligodendrocyte Progenitors Supporting Clinical Trials in Spinal Cord Injury ». *Regenerative Medicine* 10 (8): 939-58. <https://doi.org/10.2217/rme.15.57>.
- Prieto, Catalina P., María Carolina Ortiz, Andrea Villanueva, Cynthia Villarroel, Sandra S. Edwards, Matías Elliott, José Lattus, et al. 2017. « Netrin-1 acts as a non-canonical angiogenic factor produced by human Wharton's jelly mesenchymal stem cells (WJ- MSC) ». *Stem Cell Research & Therapy* 8 (1): 43. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0494-5>.
- Pucci, Fabio, Laura Gardano, et Lea Harrington. 2013. « Short Telomeres in ESCs Lead to Unstable Differentiation ». *Cell Stem Cell* 12 (4): 479-86. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.01.018>.
- Puisieux, Alain, Roxane M. Pommier, Anne-Pierre Morel, et Fabrice Laval. 2018. « Cellular Pliancy and the Multistep Process of Tumorigenesis ». *Cancer Cell* 33 (2): 164-72. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.01.007>.
- Qu, Hengyi, Huabo Sun, et Xueping Wang. 2018. « Neogenin-1 Promotes Cell Proliferation, Motility, and Adhesion by Up-Regulation of Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1 Via Activating the Rac1/PI3K/AKT Pathway in Gastric Cancer Cells ». *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology* 48 (4): 1457-67. <https://doi.org/10.1159/000492255>.
- Quenby, Siobhan, Ioannis D. Gallos, Rima K. Dhillon-Smith, Marcelina Podeseck, Mary D. Stephenson, Joanne Fisher, Jan J. Brosens, et al. 2021. « Miscarriage Matters: The Epidemiological, Physical, Psychological, and Economic Costs of Early Pregnancy Loss ». *The Lancet* 397 (10285): 1658-67. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00682-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00682-6).
- Racowsky, Catherine, Catherine MH Combelles, Aida Nureddin, Yuying Pan, Alison Finn, Lyndon Miles, Sarah Gale, Thomas O'Leary, et Katharine V Jackson. 2003. « Day 3 and Day 5 Morphological Predictors of Embryo Viability ». *Reproductive BioMedicine Online* 6 (3): 323-31. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)61852-4](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61852-4).
- Rajagopalan, Srikanth, Lutz Deitinghoff, Denise Davis, Sabine Conrad, Thomas Skutella, Alain Chedotal, Bernhard K. Mueller, et Stephen M. Strittmatter. 2004. « Neogenin Mediates the Action of Repulsive Guidance Molecule ». *Nature Cell Biology* 6 (8): 756-62. <https://doi.org/10.1038/ncb1156>.
- Rajasekharan, Sathyanath, K. Adam Baker, Katherine E. Horn, Andrew A. Jarjour, Jack P. Antel, et Timothy E. Kennedy. 2009. « Netrin 1 and Dcc Regulate Oligodendrocyte Process Branching and Membrane Extension via Fyn and RhoA ». *Development (Cambridge, England)* 136 (3): 415-26. <https://doi.org/10.1242/dev.018234>.
- Rajasekharan, Sathyanath, et Timothy E Kennedy. 2009. « The netrin protein family ». *Genome Biology* 10 (9): 239. <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-9-239>.
- Rama, Nicolas, David Goldschneider, Véronique Corset, Jérémy Lambert, Laurent Pays, et Patrick Mehlen. 2012. « Amyloid Precursor Protein Regulates Netrin-1-Mediated Commissural Axon Outgrowth ». *The Journal of Biological Chemistry* 287 (35): 30014-23. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.324780>.

- Ran, F. Ann, Patrick D. Hsu, Jason Wright, Vineeta Agarwala, David A. Scott, et Feng Zhang. 2013. « Genome Engineering Using the CRISPR-Cas9 System ». *Nature Protocols* 8 (11): 2281-2308. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>.
- Reddington, Amy E., Anne E. Rosser, et Stephen B. Dunnett. 2014. « Differentiation of Pluripotent Stem Cells into Striatal Projection Neurons: A Pure MSN Fate May Not Be Sufficient ». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8: 398. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00398>.
- Remus, Dirk, et John F. X. Diffley. 2009. « Eukaryotic DNA Replication Control: Lock and Load, Then Fire ». *Current Opinion in Cell Biology* 21 (6): 771-77. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.08.002>.
- Ren, Xiu-rong, Guo-li Ming, Yi Xie, Yan Hong, Dong-mei Sun, Zhong-qiu Zhao, Zhu Feng, et al. 2004. « Focal Adhesion Kinase in Netrin-1 Signaling ». *Nature Neuroscience* 7 (11): 1204-12. <https://doi.org/10.1038/nn1330>.
- Renders, Simon, Arthur Flohr Svendsen, Jasper Panten, Nicolas Rama, Maria Maryanovich, Pia Sommerkamp, Luisa Ladel, et al. 2021. « Niche Derived Netrin-1 Regulates Hematopoietic Stem Cell Dormancy via Its Receptor Neogenin-1 ». *Nature Communications* 12 (1): 608. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20801-0>.
- Reya, Tannishtha, Sean J. Morrison, Michael F. Clarke, et Irving L. Weissman. 2001. « Stem Cells, Cancer, and Cancer Stem Cells ». *Nature* 414 (6859): 105-11. <https://doi.org/10.1038/35102167>.
- Reyes de Mochel, Nabora Soledad, Mui Luong, Michael Chiang, Anna L. Javier, Elizabeth Luu, Fujimori Toshihiko, Grant R. MacGregor, Olivier Cinquin, et Ken W. Y. Cho. 2015. « BMP Signaling Is Required for Cell Cleavage in Preimplantation-Mouse Embryos ». *Developmental Biology* 397 (1): 45-55. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.10.001>.
- Risteski, Patrik, Mihaela Jagrić, Nenad Pavin, et Iva M. Tolić. 2021. « Biomechanics of Chromosome Alignment at the Spindle Midplane ». *Current Biology: CB* 31 (10): R574-85. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.03.082>.
- Rivera-Mulia, Juan Carlos, et David M. Gilbert. 2016. « Replicating Large Genomes: Divide and Conquer ». *Molecular Cell* 62 (5): 756-65. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.05.007>.
- Roccio, Marta, Daniel Schmitter, Marlen Knobloch, Yuya Okawa, Daniel Sage, et Matthias P. Lutolf. 2013. « Predicting stem cell fate changes by differential cell cycle progression patterns ». *Development* 140 (2): 459-70. <https://doi.org/10.1242/dev.086215>.
- Rodda, David J., Joon-Lin Chew, Leng-Hiong Lim, Yui-Han Loh, Bei Wang, Huck-Hui Ng, et Paul Robson. 2005. « Transcriptional Regulation of Nanog by OCT4 and SOX2 * ». *Journal of Biological Chemistry* 280 (26): 24731-37. <https://doi.org/10.1074/jbc.M502573200>.
- Rodrigues, S., O. De Wever, E. Bruyneel, R. J. Rooney, et C. Gespach. 2007. « Opposing Roles of Netrin-1 and the Dependence Receptor DCC in Cancer Cell Invasion, Tumor Growth and Metastasis ». *Oncogene* 26 (38): 5615-25. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210347>.
- Rompolas, Panteleimon, Elizabeth R. Deschene, Giovanni Zito, David G. Gonzalez, Ichiko Saotome, Ann M. Haberman, et Valentina Greco. 2012. « Live Imaging of Stem Cell and Progeny Behaviour in Physiological Hair-Follicle Regeneration ». *Nature* 487 (7408): 496-99. <https://doi.org/10.1038/nature11218>.
- Rosenberger, Peter, Jan M. Schwab, Valbona Mirakaj, Eva Masekowsky, Alice Mager, Julio C. Morote-Garcia, Klaus Unertl, et Holger K. Eltzschig. 2009. « Hypoxia-Inducible Factor–

- Dependent Induction of Netrin-1 Dampens Inflammation Caused by Hypoxia ». *Nature Immunology* 10 (2): 195-202. <https://doi.org/10.1038/ni.1683>.
- Rosenthal, M. D., R. M. Wishnow, et G. H. Sato. 1970. « In Vitro Growth and Differentiation of Clonal Populations of Multipotential Mouse Clls Derived from a Transplantable Testicular Teratocarcinoma ». *Journal of the National Cancer Institute* 44 (5): 1001-14.
- Rossant, J., R. L. Gardner, et H. L. Alexandre. 1978. « Investigation of the Potency of Cells from the Postimplantation Mouse Embryo by Blastocyst Injection: A Preliminary Report ». *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 48 (décembre): 239-47.
- Rossant, J., et V. E. Papaioannou. 1985. « Outgrowth of Embryonal Carcinoma Cells from Injected Blastocysts in Vitro Correlates with Abnormal Chimera Development in Vivo ». *Experimental Cell Research* 156 (1): 213-20. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(85\)90275-7](https://doi.org/10.1016/0014-4827(85)90275-7).
- Rugg-Gunn, Peter. 2017. « Derivation and Culture of Epiblast Stem Cell (EpiSC) Lines ». *Cold Spring Harbor Protocols* 2017 (1). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot093971>.
- Sage, J., G. J. Mulligan, L. D. Attardi, A. Miller, S. Chen, B. Williams, E. Theodorou, et T. Jacks. 2000. « Targeted Disruption of the Three Rb-Related Genes Leads to Loss of G(1) Control and Immortalization ». *Genes & Development* 14 (23): 3037-50. <https://doi.org/10.1101/gad.843200>.
- Sakaue-Sawano, Asako, Hiroshi Kurokawa, Toshifumi Morimura, Aki Hanyu, Hiroshi Hama, Hatsuki Osawa, Saori Kashiwagi, et al. 2008. « Visualizing Spatiotemporal Dynamics of Multicellular Cell-Cycle Progression ». *Cell* 132 (3): 487-98. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.12.033>.
- Sakaue-Sawano, Asako, Masahiro Yo, Naoki Komatsu, Toru Hiratsuka, Takako Kogure, Tetsushi Hoshida, Naoki Goshima, Michiyuki Matsuda, Hiroyuki Miyoshi, et Atsushi Miyawaki. 2017. « Genetically Encoded Tools for Optical Dissection of the Mammalian Cell Cycle ». *Molecular Cell* 68 (3): 626-640.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.10.001>.
- Saldivar, Joshua C., Stephan Hamperl, Michael J. Bocek, Mingyu Chung, Thomas E. Bass, Fernanda Cisneros-Soberanis, Kumiko Samejima, et al. 2018. « An intrinsic S/G2 checkpoint enforced by ATR ». *Science (New York, N.Y.)* 361 (6404): 806-10. <https://doi.org/10.1126/science.aap9346>.
- Salomon, D. S., et M. I. Sherman. 1975. « Implantation and Invasiveness of Mouse Blastocysts on Uterine Monolayers ». *Experimental Cell Research* 90 (2): 261-68. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(75\)90315-8](https://doi.org/10.1016/0014-4827(75)90315-8).
- Salotti, Jacqueline, Matheus H. Dias, Marianna M. Koga, et Hugo A. Armelin. 2013. « Fibroblast Growth Factor 2 Causes G2/M Cell Cycle Arrest in Ras-Driven Tumor Cells through a Src-Dependent Pathway ». *PLOS ONE* 8 (8): e72582. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072582>.
- Santamaría, David, Cédric Barrière, Antonio Cerqueira, Sarah Hunt, Claudine Tardy, Kathryn Newton, Javier F. Cáceres, Pierre Dubus, Marcos Malumbres, et Mariano Barbacid. 2007. « Cdk1 Is Sufficient to Drive the Mammalian Cell Cycle ». *Nature* 448 (7155): 811-15. <https://doi.org/10.1038/nature06046>.
- Saqcena, Mahesh, Deepak Menon, Deven Patel, Suman Mukhopadhyay, Victor Chow, et David A. Foster. 2013. « Amino Acids and MTOR Mediate Distinct Metabolic

- Checkpoints in Mammalian G1 Cell Cycle ». *PLOS ONE* 8 (8): e74157. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074157>.
- Sarge, Kevin D., et Ok-Kyong Park-Sarge. 2005. « Gene Bookmarking: Keeping the Pages Open ». *Trends in Biochemical Sciences* 30 (11): 605-10. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2005.09.004>.
- Savatier, P., S. Huang, L. Szekely, K. G. Wiman, et J. Samarut. 1994. « Contrasting Patterns of Retinoblastoma Protein Expression in Mouse Embryonic Stem Cells and Embryonic Fibroblasts ». *Oncogene* 9 (3): 809-18.
- Schafer, K. A. 1998. « The Cell Cycle: A Review ». *Veterinary Pathology* 35 (6): 461-78. <https://doi.org/10.1177/030098589803500601>.
- Scheltens, Philip, Bart De Strooper, Miia Kivipelto, Henne Holstege, Gael Chételat, Charlotte E Teunissen, Jeffrey Cummings, et Wiesje M van der Flier. 2021. « Alzheimer's disease ». *Lancet (London, England)* 397 (10284): 1577-90. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32205-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32205-4).
- Schiff, P. B., et S. B. Horwitz. 1980. « Taxol Stabilizes Microtubules in Mouse Fibroblast Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77 (3): 1561-65. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.3.1561>.
- Schlafke, Sandra, et Allen C. Enders. 1975. « Cellular Basis of Interaction Between Trophoblast and Uterus at Implantation ». *Biology of Reproduction* 12 (1): 41-65. <https://doi.org/10.1095/biolreprod12.1.41>.
- Scholey, Jonathan M., Gul Civelekoglu-Scholey, et Ingrid Brust-Mascher. 2016. « Anaphase B ». *Biology* 5 (4): E51. <https://doi.org/10.3390/biology5040051>.
- Schulz, Thomas C., Holly Y. Young, Alan D. Agulnick, M. Josephine Babin, Emmanuel E. Baetge, Anne G. Bang, Anindita Bhounik, et al. 2012. « A Scalable System for Production of Functional Pancreatic Progenitors from Human Embryonic Stem Cells ». *PLoS One* 7 (5): e37004. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037004>.
- Serafini, T., S. A. Colamarino, E. D. Leonardo, H. Wang, R. Beddington, W. C. Skarnes, et M. Tessier-Lavigne. 1996. « Netrin-1 Is Required for Commissural Axon Guidance in the Developing Vertebrate Nervous System ». *Cell* 87 (6): 1001-14. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81795-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81795-x).
- Serafini, T., T. E. Kennedy, M. J. Galko, C. Mirzayan, T. M. Jessell, et M. Tessier-Lavigne. 1994. « The Netrins Define a Family of Axon Outgrowth-Promoting Proteins Homologous to *C. Elegans* UNC-6 ». *Cell* 78 (3): 409-24. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90420-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90420-0).
- She, Shiqi, Qucheng Wei, Bo Kang, et Ying-Jie Wang. 2017. « Cell Cycle and Pluripotency: Convergence on Octamer-binding Transcription Factor 4 (Review) ». *Molecular Medicine Reports* 16 (5): 6459-66. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7489>.
- Shi, Junchao, Qi Chen, Xin Li, Xiudeng Zheng, Ying Zhang, Jie Qiao, Fuchou Tang, Yi Tao, Qi Zhou, et Enkui Duan. 2015. « Dynamic transcriptional symmetry-breaking in pre-implantation mammalian embryo development revealed by single-cell RNA-seq ». *Development* 142 (20): 3468-77. <https://doi.org/10.1242/dev.123950>.
- Shi, Yigong, et Joan Massagué. 2003. « Mechanisms of TGF-Beta Signaling from Cell Membrane to the Nucleus ». *Cell* 113 (6): 685-700. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00432-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00432-x).
- Shin, Jihoon, Tae Wan Kim, Hyunsoo Kim, Hye Ji Kim, Min Young Suh, Sangho Lee, Han-Teo Lee, et al. 2016. « Aurkb/PP1-mediated resetting of Oct4 during the cell cycle

- determines the identity of embryonic stem cells ». Édité par George Q Daley. *eLife* 5 (février): e10877. <https://doi.org/10.7554/eLife.10877>.
- Singh, Amar M., James Chappell, Robert Trost, Li Lin, Tao Wang, Jie Tang, Hao Wu, Shaying Zhao, Peng Jin, et Stephen Dalton. 2013. « Cell-Cycle Control of Developmentally Regulated Transcription Factors Accounts for Heterogeneity in Human Pluripotent Cells ». *Stem Cell Reports* 1 (6): 532-44. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2013.10.009>.
- Singh, Amar M., Takashi Hamazaki, Katherine E. Hankowski, et Naohiro Terada. 2007. « A Heterogeneous Expression Pattern for Nanog in Embryonic Stem Cells ». *Stem Cells* 25 (10): 2534-42. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0126>.
- Smith, A. G., J. K. Heath, D. D. Donaldson, G. G. Wong, J. Moreau, M. Stahl, et D. Rogers. 1988. « Inhibition of Pluripotential Embryonic Stem Cell Differentiation by Purified Polypeptides ». *Nature* 336 (6200): 688-90. <https://doi.org/10.1038/336688a0>.
- Smith, Austin. 2013. « Nanog Heterogeneity: Tilting at Windmills? » *Cell Stem Cell* 13 (1): 6-7. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.06.016>.
- . 2017. « Formative pluripotency: the executive phase in a developmental continuum ». *Development* 144 (3): 365-73. <https://doi.org/10.1242/dev.142679>.
- Spencer, Sabrina L., Steven D. Cappell, Feng-Chiao Tsai, K. Wesley Overton, Clifford L. Wang, et Tobias Meyer. 2013. « The Proliferation-Quiescence Decision Is Controlled by a Bifurcation in CDK2 Activity at Mitotic Exit ». *Cell* 155 (2): 369-83. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.062>.
- Srinivasan, Karpagam, Phyllis Strickland, Ana Valdes, Grace C. Shin, et Lindsay Hinck. 2003. « Netrin-1/Neogenin Interaction Stabilizes Multipotent Progenitor Cap Cells during Mammary Gland Morphogenesis ». *Developmental Cell* 4 (3): 371-82. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(03\)00054-6](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(03)00054-6).
- Stamos, Jennifer L., et William I. Weis. 2013. « The β -Catenin Destruction Complex ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (1): a007898. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007898>.
- Stavoe, Andrea K. H., et Daniel A. Colón-Ramos. 2012. « Netrin Instructs Synaptic Vesicle Clustering through Rac GTPase, MIG-10, and the Actin Cytoskeleton ». *The Journal of Cell Biology* 197 (1): 75-88. <https://doi.org/10.1083/jcb.201110127>.
- Stavridis, Marios P., J. Simon Lunn, Barry J. Collins, et Kate G. Storey. 2007. « A Discrete Period of FGF-Induced Erk1/2 Signalling Is Required for Vertebrate Neural Specification ». *Development (Cambridge, England)* 134 (16): 2889-94. <https://doi.org/10.1242/dev.02858>.
- Stead, Elaine, Josephine White, Renate Faast, Simon Conn, Sherilyn Goldstone, Joy Rathjen, Urvashi Dhingra, Peter Rathjen, Duncan Walker, et Stephen Dalton. 2002. « Pluripotent Cell Division Cycles Are Driven by Ectopic Cdk2, Cyclin A/E and E2F Activities ». *Oncogene* 21 (54): 8320-33. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206015>.
- Štefková, Kateřina, Jiřina Procházková, et Jiří Pacherník. 2015. « Alkaline Phosphatase in Stem Cells ». *Stem Cells International* 2015: 628368. <https://doi.org/10.1155/2015/628368>.
- Stein, Elke, Yimin Zou, Mu-ming Poo, et Marc Tessier-Lavigne. 2001. « Binding of DCC by Netrin-1 to Mediate Axon Guidance Independent of Adenosine A2B Receptor Activation ». *Science* 291 (5510): 1976-82. <https://doi.org/10.1126/science.1059391>.

- Steinhart, Zachary, et Stephane Angers. 2018. « Wnt Signaling in Development and Tissue Homeostasis ». *Development (Cambridge, England)* 145 (11): dev146589. <https://doi.org/10.1242/dev.146589>.
- Stephens, L. E., A. E. Sutherland, I. V. Klimanskaya, A. Andrieux, J. Meneses, R. A. Pedersen, et C. H. Damsky. 1995. « Deletion of Beta 1 Integrins in Mice Results in Inner Cell Mass Failure and Peri-Implantation Lethality. » *Genes & Development* 9 (15): 1883-95. <https://doi.org/10.1101/gad.9.15.1883>.
- Stevens, Leroy C., et C. C. Little. 1954. « Spontaneous Testicular Teratomas in an Inbred Strain of Mice* ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 40 (11): 1080-87. <https://doi.org/10.1073/pnas.40.11.1080>.
- Stevenson, R. E., K. L. Jones, M. C. Phelan, M. C. Jones, M. Barr, C. Clericuzio, R. A. Harley, et K. Benirschke. 1986. « Vascular Steal: The Pathogenetic Mechanism Producing Sirenomelia and Associated Defects of the Viscera and Soft Tissues ». *Pediatrics* 78 (3): 451-57.
- Stewart, Colin L., Petr Kaspar, Lisa J. Brunet, Harshida Bhatt, Inder Gadi, Frank Köntgen, et Susan J. Abbondanzo. 1992. « Blastocyst Implantation Depends on Maternal Expression of Leukaemia Inhibitory Factor ». *Nature* 359 (6390): 76-79. <https://doi.org/10.1038/359076a0>.
- Strauss, Bernhard, Andrew Harrison, Paula Almeida Coelho, Keiko Yata, Magdalena Zernicka-Goetz, et Jonathon Pines. 2018. « Cyclin B1 is essential for mitosis in mouse embryos, and its nuclear export sets the time for mitosis ». *The Journal of Cell Biology* 217 (1): 179-93. <https://doi.org/10.1083/jcb.201612147>.
- Strumpf, Dan, Chai-An Mao, Yojiro Yamanaka, Amy Ralston, Kallayane Chawengsaksophak, Felix Beck, et Janet Rossant. 2005. « Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophoblast in the mouse blastocyst ». *Development* 132 (9): 2093-2102. <https://doi.org/10.1242/dev.01801>.
- Sudakin, V, D Ganoth, A Dahan, H Heller, J Hershko, F C Luca, J V Ruderman, et A Hershko. 1995. « The cyclosome, a large complex containing cyclin-selective ubiquitin ligase activity, targets cyclins for destruction at the end of mitosis. » *Molecular Biology of the Cell* 6 (2): 185-97. <https://doi.org/10.1091/mbc.6.2.185>.
- Sugioka, Kenji. 2022. « Symmetry-Breaking of Animal Cytokinesis ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 127 (juillet): 100-109. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2021.12.008>.
- Sun, Ying, et Pingbo Huang. 2016. « Adenosine A2B Receptor: From Cell Biology to Human Diseases ». *Frontiers in Chemistry* 4. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fchem.2016.00037>.
- Sung, Pei-Ju, Nicolas Rama, Jeromine Imbach, Stephany Fiore, Benjamin Ducarouge, David Neves, Huei-Wen Chen, et al. 2019. « Cancer-Associated Fibroblasts Produce Netrin-1 to Control Cancer Cell Plasticity ». *Cancer Research* 79 (14): 3651-61. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-2952>.
- Suski, Jan M., Marcin Braun, Vladislav Strmiska, et Piotr Sicinski. 2021. « Targeting Cell-Cycle Machinery in Cancer ». *Cancer Cell* 39 (6): 759-78. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2021.03.010>.
- Svoboda, P., P. Stein, H. Hayashi, et R. M. Schultz. 2000. « Selective Reduction of Dormant Maternal MRNAs in Mouse Oocytes by RNA Interference ». *Development (Cambridge, England)* 127 (19): 4147-56. <https://doi.org/10.1242/dev.127.19.4147>.

- Tai-Nagara, Ikue, Yusuke Yoshikawa, Naoko Numata, Tomofumi Ando, Keisuke Okabe, Yuki Sugiura, Masaki Ieda, et al. 2017. « Placental Labyrinth Formation in Mice Requires Endothelial FLRT2/UNC5B Signaling ». *Development (Cambridge, England)* 144 (13): 2392-2401. <https://doi.org/10.1242/dev.149757>.
- Tak, Eunyoung, Douglas Ridyard, Alexander Badulak, Antasia Giebler, Uladzimir Shabeka, Tilmann Werner, Eric Clambey, et al. 2013. « Protective Role for Netrin-1 during Diabetic Nephropathy ». *Journal of Molecular Medicine* 91 (9): 1071-80. <https://doi.org/10.1007/s00109-013-1041-1>.
- Takada, Yoshikazu, Xiaojing Ye, et Scott Simon. 2007. « The integrins ». *Genome Biology* 8 (5): 215. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-5-215>.
- Takahashi, Kazutoshi, et Shinya Yamanaka. 2006. « Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors ». *Cell* 126 (4): 663-76. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>.
- Takaki, Tohru, Kazuhiro Fukasawa, Ikuko Suzuki-Takahashi, et Hiroshi Hirai. 2004. « Cdk-Mediated Phosphorylation of PRB Regulates HDAC Binding in Vitro ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 316 (1): 252-55. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.02.044>.
- Takehara, Toshiyuki, Takeshi Teramura, Yuta Onodera, Chiaki Hamanishi, et Kanji Fukuda. 2012. « Reduced Oxygen Concentration Enhances Conversion of Embryonic Stem Cells to Epiblast Stem Cells ». *Stem Cells and Development* 21 (8): 1239-49. <https://doi.org/10.1089/scd.2011.0322>.
- Talluri, Srikanth, Christian E. Isaac, Mohammad Ahmad, Shauna A. Henley, Sarah M. Francis, Alison L. Martens, Rod Bremner, et Frederick A. Dick. 2010. « A G1 Checkpoint Mediated by the Retinoblastoma Protein That Is Dispensable in Terminal Differentiation but Essential for Senescence ». *Molecular and Cellular Biology* 30 (4): 948-60. <https://doi.org/10.1128/MCB.01168-09>.
- Tamai, K., M. Semenov, Y. Kato, R. Spokony, C. Liu, Y. Katsuyama, F. Hess, J. P. Saint-Jeannet, et X. He. 2000. « LDL-Receptor-Related Proteins in Wnt Signal Transduction ». *Nature* 407 (6803): 530-35. <https://doi.org/10.1038/35035117>.
- Tang, Xiaoling, Sung-Wuk Jang, Masashi Okada, Chi-Bun Chan, Yue Feng, Yu Liu, Shi-Wen Luo, et al. 2008. « Netrin-1 Mediates Neuronal Survival through PIKE-L Interaction with the Dependence Receptor UNC5B ». *Nature Cell Biology* 10 (6): 698-706. <https://doi.org/10.1038/ncb1732>.
- Tardat, Mathieu, Julien Brustel, Olivier Kirsh, Christine Lefevbre, Mary Callanan, Claude Sardet, et Eric Julien. 2010. « The Histone H4 Lys 20 Methyltransferase PR-Set7 Regulates Replication Origins in Mammalian Cells ». *Nature Cell Biology* 12 (11): 1086-93. <https://doi.org/10.1038/ncb2113>.
- Tarkowski, Andrzej K. 1961. « Mouse Chimæras Developed from Fused Eggs ». *Nature* 190 (4779): 857-60. <https://doi.org/10.1038/190857a0>.
- Tatum, Natalie J., et Jane A. Endicott. 2020. « Chatterboxes: The Structural and Functional Diversity of Cyclins ». *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 1. Cyclins edited by Josep Clotet, 107 (novembre): 4-20. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2020.04.021>.
- Tesar, Paul J., Josh G. Chenoweth, Frances A. Brook, Timothy J. Davies, Edward P. Evans, David L. Mack, Richard L. Gardner, et Ronald D. G. McKay. 2007. « New Cell Lines from Mouse Epiblast Share Defining Features with Human Embryonic Stem Cells ». *Nature* 448 (7150): 196-99. <https://doi.org/10.1038/nature05972>.

- Thiebault, Karine, Laetitia Mazelin, Laurent Pays, Fabien Llambi, Marie-Odile Joly, Jean-Yves Scoazec, Jean-Christophe Saurin, Giovanni Romeo, et Patrick Mehlen. 2003. « The Netrin-1 Receptors UNC5H Are Putative Tumor Suppressors Controlling Cell Death Commitment ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (7): 4173-78. <https://doi.org/10.1073/pnas.0738063100>.
- Thiery, Jean Paul. 2002. « Epithelial–Mesenchymal Transitions in Tumour Progression ». *Nature Reviews Cancer* 2 (6): 442-54. <https://doi.org/10.1038/nrc822>.
- Thowfeequ, Shifaan, Emily-Jane Myatt, et David Tosh. 2007. « Transdifferentiation in Developmental Biology, Disease, and in Therapy ». *Developmental Dynamics* 236 (12): 3208-17. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21336>.
- Tobey, R. A., et K. D. Ley. 1970. « Regulation of Initiation of DNA Synthesis in Chinese Hamster Cells. I. Production of Stable, Reversible G1-Arrested Populations in Suspension Culture ». *The Journal of Cell Biology* 46 (1): 151-57. <https://doi.org/10.1083/jcb.46.1.151>.
- Torres-Padilla, Maria-Elena, et Ian Chambers. 2014. « Transcription factor heterogeneity in pluripotent stem cells: a stochastic advantage ». *Development* 141 (11): 2173-81. <https://doi.org/10.1242/dev.102624>.
- Tosolini, Matteo, Vincent Brochard, Pierre Adenot, Martine Chebrou, Giacomo Grillo, Violette Navia, Nathalie Beaujean, Claire Francastel, Amélie Bonnet-Garnier, et Alice Jouneau. 2018. « Contrasting Epigenetic States of Heterochromatin in the Different Types of Mouse Pluripotent Stem Cells ». *Scientific Reports* 8 (1): 5776. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23822-4>.
- Toyooka, Yayoi, Daisuke Shimosato, Kazuhiro Murakami, Kadue Takahashi, et Hitoshi Niwa. 2008. « Identification and Characterization of Subpopulations in Undifferentiated ES Cell Culture ». *Development (Cambridge, England)* 135 (5): 909-18. <https://doi.org/10.1242/dev.017400>.
- Trimarchi, J. M., B. Fairchild, R. Verona, K. Moberg, N. Andon, et J. A. Lees. 1998. « E2F-6, a Member of the E2F Family That Can Behave as a Transcriptional Repressor ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (6): 2850-55. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.6.2850>.
- Trounson, Alan, et Natalie D. DeWitt. 2016. « Pluripotent Stem Cells Progressing to the Clinic ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 17 (3): 194-200. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.10>.
- Tsai, Shih-Yin, Rene Opavsky, Nidhi Sharma, Lizhao Wu, Shan Naidu, Eric Nolan, Enrique Feria-Arias, et al. 2008. « Mouse Development with a Single E2F Activator ». *Nature* 454 (7208): 1137-41. <https://doi.org/10.1038/nature07066>.
- Tsukamoto, Hidekazu, Hongyun She, Saswati Hazra, Jason Cheng, et Takeo Miyahara. 2006. « Anti-Adipogenic Regulation Underlies Hepatic Stellate Cell Transdifferentiation ». *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 21 Suppl 3 (octobre): S102-105. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2006.04573.x>.
- Tsumura, Akiko, Tomohiro Hayakawa, Yuichi Kumaki, Shin-ichiro Takebayashi, Morito Sakaue, Chisa Matsuoka, Kunitada Shimotohno, et al. 2006. « Maintenance of Self-Renewal Ability of Mouse Embryonic Stem Cells in the Absence of DNA Methyltransferases Dnmt1, Dnmt3a and Dnmt3b ». *Genes to Cells* 11 (7): 805-14. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2006.00984.x>.
- Tu, Tao, Chunxia Zhang, Huiwen Yan, Yongting Luo, Ruirui Kong, Pushuai Wen, Zhongde Ye, et al. 2015. « CD146 Acts as a Novel Receptor for Netrin-1 in Promoting Angiogenesis

- and Vascular Development ». *Cell Research* 25 (3): 275-87.
<https://doi.org/10.1038/cr.2015.15>.
- Vallier, Ludovic, Sasha Mendjan, Stephanie Brown, Zhenzhi Chng, Adrian Teo, Lucy E. Smithers, Matthew W. B. Trotter, et al. 2009. « Activin/Nodal signalling maintains pluripotency by controlling Nanog expression ». *Development* 136 (8): 1339-49.
<https://doi.org/10.1242/dev.033951>.
- Van Keymeulen, Alexandra, May Yin Lee, Marielle Ousset, Sylvain Brohée, Sandrine Rorive, Rajshekhar R. Giraddi, Aline Wuidart, et al. 2015. « Reactivation of Multipotency by Oncogenic PIK3CA Induces Breast Tumour Heterogeneity ». *Nature* 525 (7567): 119-23. <https://doi.org/10.1038/nature14665>.
- Veillard, Anne-Clémence, Hendrik Marks, Andreia Sofia Bernardo, Luc Jouneau, Denis Laloë, Laurent Boulanger, Anita Kaan, et al. 2014. « Stable Methylation at Promoters Distinguishes Epiblast Stem Cells from Embryonic Stem Cells and the In Vivo Epiblasts ». *Stem Cells and Development* 23 (17): 2014-29.
<https://doi.org/10.1089/scd.2013.0639>.
- Vielmetter, J, J F Kayyem, J M Roman, et W J Dreyer. 1994. « Neogenin, an avian cell surface protein expressed during terminal neuronal differentiation, is closely related to the human tumor suppressor molecule deleted in colorectal cancer. » *Journal of Cell Biology* 127 (6): 2009-20. <https://doi.org/10.1083/jcb.127.6.2009>.
- Vierbuchen, Thomas, Austin Ostermeier, Zhiping P. Pang, Yuko Kokubu, Thomas C. Südhof, et Marius Wernig. 2010. « Direct Conversion of Fibroblasts to Functional Neurons by Defined Factors ». *Nature* 463 (7284): 1035-41.
<https://doi.org/10.1038/nature08797>.
- Villanueva, Andrea A., Sofía Puvogel, Pablo Lois, Ernesto Muñoz-Palma, Manuel Ramírez Orellana, Fabiana Lubieniecki, Fernando Casco Claro, et al. 2019. « The Netrin-4/Laminin Γ 1/Neogenin-1 Complex Mediates Migration in SK-N-SH Neuroblastoma Cells ». *Cell Adhesion & Migration* 13 (1): 33-40.
<https://doi.org/10.1080/19336918.2018.1506652>.
- Villanueva, Andrea A., Pilar Sanchez-Gomez, Ernesto Muñoz-Palma, Sofía Puvogel, Bárbara S. Casas, Cecilia Arriagada, Isaac Peña-Villalobos, et al. 2021. « The Netrin-1-Neogenin-1 Signaling Axis Controls Neuroblastoma Cell Migration via Integrin-B1 and Focal Adhesion Kinase Activation ». *Cell Adhesion & Migration* 15 (1): 58-73.
<https://doi.org/10.1080/19336918.2021.1892397>.
- Visvader, Jane E. 2011. « Cells of Origin in Cancer ». *Nature* 469 (7330): 314-22.
<https://doi.org/10.1038/nature09781>.
- Vogelstein, Bert, Nickolas Papadopoulos, Victor E. Velculescu, Shibin Zhou, Luis A. Diaz, et Kenneth W. Kinzler. 2013. « Cancer Genome Landscapes ». *Science* 339 (6127): 1546-58. <https://doi.org/10.1126/science.1235122>.
- Voorhoeve, P. M., R. J. Watson, P. G. Farlie, R. Bernards, et E. W. Lam. 1999. « Rapid Dephosphorylation of P107 Following UV Irradiation ». *Oncogene* 18 (3): 679-88.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202289>.
- Waddington, Conrad Hal, et H. Kacser. 1957. *The Strategy of the Genes: A Discussion of Some Aspects of Theoretical Biology*. Allen & Unwin.
- Wang, H., N. G. Copeland, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins, et M. Tessier-Lavigne. 1999. « Netrin-3, a Mouse Homolog of Human NTN2L, Is Highly Expressed in Sensory Ganglia and Shows Differential Binding to Netrin Receptors ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 19 (12): 4938-47.

- Warecki, Brandt, et William Sullivan. 2022. « The Cell Biology of Heterochromatin ». *Cells* 11 (7): 1247. <https://doi.org/10.3390/cells11071247>.
- Wei, Daoyan, Liang Wang, Yongmin Yan, Zhiliang Jia, Mihai Gagea, Zhiwei Li, Xiangsheng Zuo, Xiangyu Kong, Suyun Huang, et Keping Xie. 2016. « KLF4 Is Essential for Induction of Cellular Identity Change and Acinar-to-Ductal Reprogramming during Early Pancreatic Carcinogenesis ». *Cancer Cell* 29 (3): 324-38. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.02.005>.
- Weinberg, Robert A. 1991. « Tumor Suppressor Genes ». *Science* 254 (5035): 1138-46. <https://doi.org/10.1126/science.1659741>.
- Weinberg, Robert A. 1995. « The Retinoblastoma Protein and Cell Cycle Control ». *Cell* 81 (3): 323-30. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90385-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90385-2).
- Weinberger, Leehee, Muneef Ayyash, Noa Novershtern, et Jacob H. Hanna. 2016. « Dynamic Stem Cell States: Naive to Primed Pluripotency in Rodents and Humans ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 17 (3): 155-69. <https://doi.org/10.1038/nrm.2015.28>.
- Wentworth, Lee E. 1984. « The Development of the Cervical Spinal Cord of the Mouse Embryo. I. A Golgi Analysis of Ventral Root Neuron Differentiation ». *Journal of Comparative Neurology* 222 (1): 81-95. <https://doi.org/10.1002/cne.902220108>.
- Wesselschmidt, Robin L. 2011. « The Teratoma Assay: An In Vivo Assessment of Pluripotency ». In *Human Pluripotent Stem Cells: Methods and Protocols*, édité par Philip H. Schwartz et Robin L. Wesselschmidt, 231-41. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-201-4_17.
- Wetering, Marc van de, Robert Cavallo, Dennis Dooijes, Moniek van Beest, Johan van Es, Joseph Loureiro, Arne Ypma, et al. 1997. « Armadillo Coactivates Transcription Driven by the Product of the Drosophila Segment Polarity Gene DTCF ». *Cell* 88 (6): 789-99. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81925-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81925-X).
- White, Josephine, et Stephen Dalton. 2005. « Cell Cycle Control of Embryonic Stem Cells ». *Stem Cell Reviews* 1 (2): 131-38. <https://doi.org/10.1385/SCR:1:2:131>.
- White, Josephine, Elaine Stead, Renate Faast, Simon Conn, Peter Cartwright, et Stephen Dalton. 2005. « Developmental Activation of the Rb-E2F Pathway and Establishment of Cell Cycle-regulated Cyclin-dependent Kinase Activity during Embryonic Stem Cell Differentiation ». *Molecular Biology of the Cell* 16 (4): 2018-27. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-12-1056>.
- Whitten, W. K. 1956. « Culture of Tubal Mouse Ova ». *Nature* 177 (4498): 96-96. <https://doi.org/10.1038/177096a0>.
- Wianny, F., F. X. Real, C. L. Mummery, M. Van Rooijen, J. Lahti, J. Samarut, et P. Savatier. 1998. « G1-Phase Regulators, Cyclin D1, Cyclin D2, and Cyclin D3: Up-Regulation at Gastrulation and Dynamic Expression during Neurulation ». *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 212 (1): 49-62. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0177\(199805\)212:1<49::AID-AJA5>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0177(199805)212:1<49::AID-AJA5>3.0.CO;2-2).
- Wianny, F., et M. Zernicka-Goetz. 2000. « Specific Interference with Gene Function by Double-Stranded RNA in Early Mouse Development ». *Nature Cell Biology* 2 (2): 70-75. <https://doi.org/10.1038/35000016>.
- Wiese, Katrin E., Roel Nusse, et Renée van Amerongen. 2018. « Wnt signalling: conquering complexity ». *Development* 145 (12): dev165902. <https://doi.org/10.1242/dev.165902>.

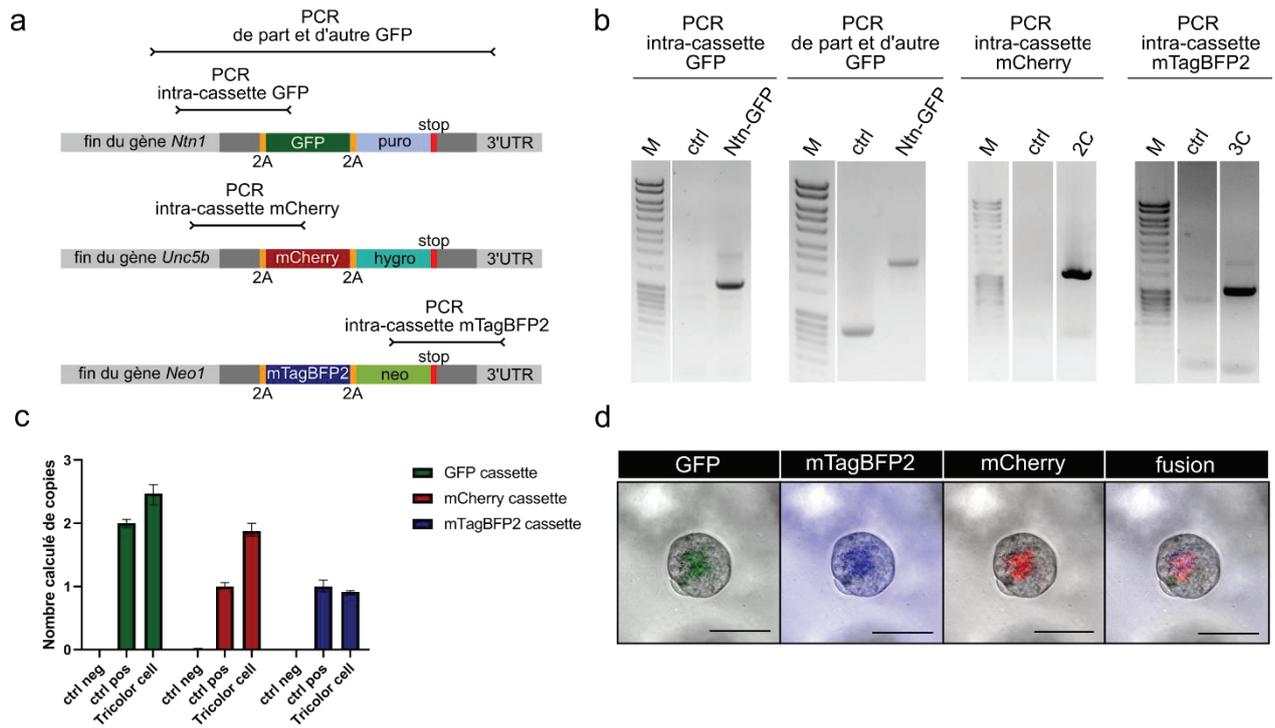
- Wilcox, Allen J., Clarice R. Weinberg, John F. O'Connor, Donna D. Baird, John P. Schlatterer, Robert E. Canfield, E. Glenn Armstrong, et Bruce C. Nisula. 1988. « Incidence of Early Loss of Pregnancy ». *New England Journal of Medicine* 319 (4): 189-94. <https://doi.org/10.1056/NEJM198807283190401>.
- Wiley, Lynn M. 1984. « Cavitation in the Mouse Preimplantation Embryo: NaK-ATPase and the Origin of Nascent Blastocoele Fluid ». *Developmental Biology* 105 (2): 330-42. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(84\)90290-2](https://doi.org/10.1016/0012-1606(84)90290-2).
- Williams, Megan E., Xiaowei Lu, William L. McKenna, Raesha Washington, Adam Boyette, Phyllis Strickland, Allison Dillon, Zaven Kaprielian, Marc Tessier-Lavigne, et Lindsay Hinck. 2006. « UNC5A Promotes Neuronal Apoptosis during Spinal Cord Development Independent of Netrin-1 ». *Nature Neuroscience* 9 (8): 996-98. <https://doi.org/10.1038/nn1736>.
- Williams, R. L., D. J. Hilton, S. Pease, T. A. Willson, C. L. Stewart, D. P. Gearing, E. F. Wagner, D. Metcalf, N. A. Nicola, et N. M. Gough. 1988. « Myeloid Leukaemia Inhibitory Factor Maintains the Developmental Potential of Embryonic Stem Cells ». *Nature* 336 (6200): 684-87. <https://doi.org/10.1038/336684a0>.
- Wilson, Brent D., Masaaki Ii, Kye Won Park, Arminda Suli, Lise K. Sorensen, Frédéric Larrieu-Lahargue, Lisa D. Urness, et al. 2006. « Netrins Promote Developmental and Therapeutic Angiogenesis ». *Science (New York, N.Y.)* 313 (5787): 640-44. <https://doi.org/10.1126/science.1124704>.
- Wilson, Nicole H., et Brian Key. 2006. « Neogenin Interacts with RGMa and Netrin-1 to Guide Axons within the Embryonic Vertebrate Forebrain ». *Developmental Biology* 296 (2): 485-98. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.06.018>.
- Winnier, G., M. Blessing, P. A. Labosky, et B. L. Hogan. 1995. « Bone Morphogenetic Protein-4 Is Required for Mesoderm Formation and Patterning in the Mouse ». *Genes & Development* 9 (17): 2105-16. <https://doi.org/10.1101/gad.9.17.2105>.
- Wohlschlegel, J. A., B. T. Dwyer, S. K. Dhar, C. Cvetic, J. C. Walter, et A. Dutta. 2000. « Inhibition of Eukaryotic DNA Replication by Geminin Binding to Cdt1 ». *Science (New York, N.Y.)* 290 (5500): 2309-12. <https://doi.org/10.1126/science.290.5500.2309>.
- Woodward, Anna M., Thomas Göhler, M. Gloria Luciani, Maren Oehlmann, Xinquan Ge, Anton Gartner, Dean A. Jackson, et J. Julian Blow. 2006. « Excess Mcm2-7 License Dormant Origins of Replication That Can Be Used under Conditions of Replicative Stress ». *The Journal of Cell Biology* 173 (5): 673-83. <https://doi.org/10.1083/jcb.200602108>.
- Wray, Jason, Tuzer Kalkan, et Austin G. Smith. 2010. « The Ground State of Pluripotency ». *Biochemical Society Transactions* 38 (4): 1027-32. <https://doi.org/10.1042/BST0381027>.
- Wu, Jun, et Juan Carlos Izpisua Belmonte. 2015. « Dynamic Pluripotent Stem Cell States and Their Applications ». *Cell Stem Cell* 17 (5): 509-25. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.10.009>.
- Wu, L., C. Timmers, B. Maiti, H. I. Saavedra, L. Sang, G. T. Chong, F. Nuckolls, et al. 2001. « The E2F1-3 Transcription Factors Are Essential for Cellular Proliferation ». *Nature* 414 (6862): 457-62. <https://doi.org/10.1038/35106593>.
- Wutz, Anton, et Rudolf Jaenisch. 2000. « A Shift from Reversible to Irreversible X Inactivation Is Triggered during ES Cell Differentiation ». *Molecular Cell* 5 (4): 695-705. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80248-8](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80248-8).

- Xia, Xueli, Zhigang Hu, Shengjun Wang, et Kai Yin. 2022. « Netrin-1: An Emerging Player in Inflammatory Diseases ». *Cytokine & Growth Factor Reviews* 64 (avril): 46-56. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2022.01.003>.
- Xie, Huafeng, Min Ye, Ru Feng, et Thomas Graf. 2004. « Stepwise Reprogramming of B Cells into Macrophages ». *Cell* 117 (5): 663-76. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00419-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00419-2).
- Xie, Meng, et Jin-ping Li. 2019. « Heparan Sulfate Proteoglycan – A Common Receptor for Diverse Cytokines ». *Cellular Signalling* 54 (février): 115-21. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2018.11.022>.
- Xu, Kai, Zhu hao Wu, Nicolas Renier, Alexander Antipenko, Dorothea Tzvetkova-Robev, Yan Xu, Maria Minchenko, et al. 2014. « Neural Migration. Structures of Netrin-1 Bound to Two Receptors Provide Insight into Its Axon Guidance Mechanism ». *Science (New York, N.Y.)* 344 (6189): 1275-79. <https://doi.org/10.1126/science.1255149>.
- Yamagishi, Satoru, Kohei Yamada, Masato Sawada, Suguru Nakano, Norio Mori, Kazunobu Sawamoto, et Kohji Sato. 2015. « Netrin-5 is highly expressed in neurogenic regions of the adult brain ». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2015.00146>.
- Yamaji, Masashi, Jun Ueda, Katsuhiko Hayashi, Hiroshi Ohta, Yukihiro Yabuta, Kazuki Kurimoto, Ryuichiro Nakato, Yasuhiro Yamada, Katsuhiko Shirahige, et Mitinori Saitou. 2013. « PRDM14 Ensures Naive Pluripotency through Dual Regulation of Signaling and Epigenetic Pathways in Mouse Embryonic Stem Cells ». *Cell Stem Cell* 12 (3): 368-82. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.12.012>.
- Yamakawa, Kazuhiro, Yong-Kang Huo, Melissa A. Haendel, René Hubert, Xiao-Ning Chen, Gary E. Lyons, et Julie R. Korenberg. 1998. « DSCAM: A Novel Member of the Immunoglobulin Superfamily Maps in a Down Syndrome Region and is Involved in the Development of the Nervous System ». *Human Molecular Genetics* 7 (2): 227-37. <https://doi.org/10.1093/hmg/7.2.227>.
- Yamanaka, Shinya. 2010. « Patient-Specific Pluripotent Stem Cells Become Even More Accessible ». *Cell Stem Cell* 7 (1): 1-2. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.06.009>.
- Yang, Valerie S., Stephanie A. Carter, Sarah J. Hyland, Kikuë Tachibana-Konwalski, Ronald A. Laskey, et Michael A. Gonzalez. 2011. « Geminin Escapes Degradation in G1 of Mouse Pluripotent Cells and Mediates the Expression of Oct4, Sox2, and Nanog ». *Current Biology: CB* 21 (8): 692-99. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.03.026>.
- Yang, Yingzi. 2012. « Wnt signaling in development and disease ». *Cell & Bioscience* 2 (1): 14. <https://doi.org/10.1186/2045-3701-2-14>.
- Yao, Ling-Ling, Jin-Xia Hu, Qiang Li, Daehoon Lee, Xiao Ren, Jun-Shi Zhang, Dong Sun, et al. 2020. « Astrocytic Neogenin/Netrin-1 Pathway Promotes Blood Vessel Homeostasis and Function in Mouse Cortex ». *The Journal of Clinical Investigation* 130 (12): 6490-6509. <https://doi.org/10.1172/JCI132372>.
- Yebra, Mayra, Anthony M. P. Montgomery, Giuseppe R. Diaferia, Thomas Kaido, Steve Silletti, Brandon Perez, Margaret L. Just, et al. 2003. « Recognition of the Neural Chemoattractant Netrin-1 by Integrins Alpha6beta4 and Alpha3beta1 Regulates Epithelial Cell Adhesion and Migration ». *Developmental Cell* 5 (5): 695-707. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(03\)00330-7](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(03)00330-7).
- Yin, Kai, Linjun Wang, Yiwen Xia, Shengchun Dang, Xuan Zhang, Zhongyuan He, Jianghao Xu, Mengyuan Shang, et Zekuan Xu. 2019. « Netrin-1 Promotes Cell Neural Invasion in

- Gastric Cancer via Its Receptor Neogenin ». *Journal of Cancer* 10 (14): 3197-3207. <https://doi.org/10.7150/jca.30230>.
- Yin, Kai, Linjun Wang, Xuan Zhang, Zhongyuan He, Yiwen Xia, Jianghao Xu, Song Wei, et al. 2017. « Netrin-1 Promotes Gastric Cancer Cell Proliferation and Invasion via the Receptor Neogenin through PI3K/AKT Signaling Pathway ». *Oncotarget* 8 (31): 51177-89. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17750>.
- Yin, Y., J. R. Sanes, et J. H. Miner. 2000. « Identification and Expression of Mouse Netrin-4 ». *Mechanisms of Development* 96 (1): 115-19. [https://doi.org/10.1016/s0925-4773\(00\)00369-5](https://doi.org/10.1016/s0925-4773(00)00369-5).
- Ying, Qi-Long, Jennifer Nichols, Ian Chambers, et Austin Smith. 2003. « BMP Induction of Id Proteins Suppresses Differentiation and Sustains Embryonic Stem Cell Self-Renewal in Collaboration with STAT3 ». *Cell* 115 (3): 281-92. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00847-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00847-X).
- Ying, Qi-Long, Jason Wray, Jennifer Nichols, Laura Batlle-Morera, Bradley Doble, James Woodgett, Philip Cohen, et Austin Smith. 2008. « The Ground State of Embryonic Stem Cell Self-Renewal ». *Nature* 453 (7194): 519-23. <https://doi.org/10.1038/nature06968>.
- Ylivinkka, Irene, Harri Sihto, Olli Tynninen, Yizhou Hu, Aki Laakso, Riku Kivisaari, Pirjo Laakkonen, Jorma Keski-Oja, et Marko Hyytiäinen. 2017. « Motility of Glioblastoma Cells Is Driven by Netrin-1 Induced Gain of Stemness ». *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR* 36 (1): 9. <https://doi.org/10.1186/s13046-016-0482-0>.
- Young, Richard A. 2011. « Control of the Embryonic Stem Cell State ». *Cell* 144 (6): 940-54. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.01.032>.
- Yu, Leqian, Yulei Wei, Jialei Duan, Daniel A. Schmitz, Masahiro Sakurai, Lei Wang, Kunhua Wang, Shuhua Zhao, Gary C. Hon, et Jun Wu. 2021. « Blastocyst-like Structures Generated from Human Pluripotent Stem Cells ». *Nature* 591 (7851): 620-26. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03356-y>.
- Yung, Andrea R., Allison M. Nishitani, et Lisa V. Goodrich. 2015. « Phenotypic analysis of mice completely lacking netrin 1 ». *Development* 142 (21): 3686-91. <https://doi.org/10.1242/dev.128942>.
- Zalzman, Michal, Geppino Falco, Lioudmila V. Sharova, Akira Nishiyama, Marshall Thomas, Sung-Lim Lee, Carole A. Stagg, et al. 2010. « Zscan4 Regulates Telomere Elongation and Genomic Stability in ES Cells ». *Nature* 464 (7290): 858-63. <https://doi.org/10.1038/nature08882>.
- Zaninovic, Nikica, et Zev Rosenwaks. 2020. « Artificial Intelligence in Human in Vitro Fertilization and Embryology ». *Fertility and Sterility* 114 (5): 914-20. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2020.09.157>.
- Zaveri, Lamuk, et Jyotsna Dhawan. 2018. « Cycling to Meet Fate: Connecting Pluripotency to the Cell Cycle ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 6: 57. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00057>.
- Zeevaert, Kira, Mohamed H. Elsafi Mabrouk, Wolfgang Wagner, et Roman Goetzke. 2020. « Cell Mechanics in Embryoid Bodies ». *Cells* 9 (10): 2270. <https://doi.org/10.3390/cells9102270>.
- Zhang, Wei, et Hui Tu Liu. 2002. « MAPK Signal Pathways in the Regulation of Cell Proliferation in Mammalian Cells ». *Cell Research* 12 (1): 9-18. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290105>.

- Zhang, Xin, Irina Neganova, Stefan Przyborski, Chunbo Yang, Michael Cooke, Stuart P. Atkinson, George Anyfantis, et al. 2009. « A role for NANOG in G1 to S transition in human embryonic stem cells through direct binding of CDK6 and CDC25A ». *Journal of Cell Biology* 184 (1): 67-82. <https://doi.org/10.1083/jcb.200801009>.
- Zhao, Rui, Richard W. Deibler, Paul H. Lerou, Andrea Ballabeni, Garrett C. Heffner, Patrick Cahan, Juli J. Unternaehrer, Marc W. Kirschner, et George Q. Daley. 2014. « A nontranscriptional role for Oct4 in the regulation of mitotic entry ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (44): 15768-73. <https://doi.org/10.1073/pnas.1417518111>.
- Zhao, Rui, Tetsuya Nakamura, Yu Fu, Zsolt Lazar, et David L. Spector. 2011. « Gene Bookmarking Accelerates the Kinetics of Post-Mitotic Transcriptional Re-Activation ». *Nature Cell Biology* 13 (11): 1295-1304. <https://doi.org/10.1038/ncb2341>.
- Zhao, Suling, Jennifer Nichols, Austin G. Smith, et Meng Li. 2004. « SoxB Transcription Factors Specify Neuroectodermal Lineage Choice in ES Cells ». *Molecular and Cellular Neuroscience* 27 (3): 332-42. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2004.08.002>.
- Zhao, Xiao-yang, Wei Li, Zhuo Lv, Lei Liu, Man Tong, Tang Hai, Jie Hao, et al. 2009. « IPS Cells Produce Viable Mice through Tetraploid Complementation ». *Nature* 461 (7260): 86-90. <https://doi.org/10.1038/nature08267>.
- Zhong, Yun, Makoto Takemoto, Tsuyoshi Fukuda, Yuki Hattori, Fujio Murakami, Daisuke Nakajima, Manabu Nakayama, et Nobuhiko Yamamoto. 2004. « Identification of the Genes That Are Expressed in the Upper Layers of the Neocortex ». *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)* 14 (10): 1144-52. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhh074>.
- Zhu, Jianwei, Fan Liu, Quanming Wu, et Xiancheng Liu. 2015. « Activin A regulates proliferation, invasion and migration in osteosarcoma cells ». *Molecular Medicine Reports* 11 (6): 4501-7. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3284>.
- Zhu, Yuyan, Yuanyuan Li, Seiki Haraguchi, Meng Yu, Miki Ohira, Toshinori Ozaki, Atsuko Nakagawa, et al. 2013. « Dependence receptor UNC5D mediates nerve growth factor depletion–induced neuroblastoma regression ». *The Journal of Clinical Investigation* 123 (7): 2935-47. <https://doi.org/10.1172/JCI65988>.
- Ziomek, C. A., et M. H. Johnson. 1980. « Cell Surface Interaction Induces Polarization of Mouse 8-Cell Blastomeres at Compaction ». *Cell* 21 (3): 935-42. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(80\)90457-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(80)90457-2).

ANNEXES



Annexe 1 : Validation du système rapporteur tricolore.

(a) Représentation schématique des différentes PCR réalisées sur l'ADN génomique. *puro*, gène de résistance à la puromycine ; *hygro*, gène de résistance à l'hygromycine ; *neo*, gène de résistance à la neomycine ; 3'UTR, région non transcrite en 3'. (b) Photos des gels d'agarose dans lesquels l'ADN des PCR a été migré par électrophorèse. M, marqueur de poids moléculaire ; ctrl, contrôle ; 2C, cellules *Ntn-GFP/Unc5b-mCherry* ; 3C, cellules *Ntn-GFP/Unc5b-mCherry/Neo1-mTagBFP2*. (c) Quantification du nombre inséré de copies de chaque cassette. Ctrl neg, contrôle négatif ; ctrl pos, contrôle positif. (d) Photographies représentatives d'un sphéroïde de CSE 3C en GFP+lumière visible, mTagBFP2+lumière visible, mCherry+lumière visible et fusion. Barres d'échelle : 50 μ m.

Annexe 2 :

Molecular versatility during pluripotency progression

acceptée (Nature Communications)

Authors: Giacomo Furlan^{1,2,3}, Aurélie Huyghe^{1,2}, Noémie Combémoré¹ and Fabrice Laval^{1*}

Affiliations: ¹Cellular reprogramming, stem cells and oncogenesis laboratory - Equipe labellisée La Ligue Contre le Cancer – LabEx Dev2Can - Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, Centre Léon Bérard, Cancer Research Center of Lyon, Lyon, 69008, France.

²These authors contributed equally to this work.

³Present address: Lunenfeld-Tanenbaum Research Institute, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada.

*Correspondence: fabrice.laval@lyon.unicancer.fr (F.L.)

A critical challenge for developing organisms is to ensure lineage segregation while preserving a certain degree of plasticity. Here, using pluripotency progression as a paradigm, we review converging findings indicating how developmental transitions are coordinated by the redeployment, rather than the global resetting, of a large repertoire of intrinsic components of the embryonic cells. We highlight in particular how (i) the changes in response to extrinsic cues (FGF, WNT, Activin/Nodal, Netrin-1), (ii) the context- and stoichiometry-dependent action of transcription factors (Oct4, Nanog) and (iii) the reconfigurations of epigenetic regulators (enhancers, promoters, TrxG, PRC) may confer robustness to the transition from naïve to primed pluripotency. We propose the notion of Molecular Versatility to regroup these mechanisms by which molecules are repurposed to exert strikingly different, sometimes opposite, functions in closely-related stem cell configurations during development.

Keywords: Pluripotency, Naïve, Primed, Peri-implantation development, Versatility, Identity, Reprogramming.

Glossary:

Molecular Versatility: This notion regroups the mechanisms by which molecules (including members of signalling pathways, TFs and epigenetic regulators) exert strikingly different, sometimes opposite, functions in similar or closely-related stem cell configurations (continuum of cellular intermediate states, early progenitors). This notion differs from the concept that molecules exert different functions in completely unrelated cell types. Molecular Versatility rather relates to mechanisms occurring during cellular transitions in constrained time and space.

Cellular identity: Cellular identity can also be defined in multiple ways and recent advances in single-cell analyses have complicated this definition by unveiling substantial transcriptional heterogeneity among cells within traditionally defined cell types¹. Here, cellular identity describes the transcriptional and epigenetic programs that define a given cell type in homeostatic (non-injured, non-inflammatory) conditions.

In contrast to the all-or-none view of the unidirectional differentiation of a stem cell into terminally specialized derivatives, the development of multicellular organisms involves developmental transitions that often generate plastic and reversible cellular intermediate states. To achieve these transitions, embryonic cells need to integrate complex sets of external cues and respond by precise epigenetic/transcriptomic changes that ensure the stepwise and coordinated lineage segregation². Mouse peri-implantation development constitutes a prototypical example of such dynamic transitions during which the naïve pluripotent cells of the early epiblast transit to formative and primed pluripotent identities prior to differentiating. During this process, the reconfigurations of the epigenetic/transcriptional programs will permit the emergence of distinct molecular features, including the transient competence to form primordial germ cells (PGCs)³. However, the embryonic cells will also maintain their ability to self-renew and sustain the expression of certain core pluripotency transcription factors (TFs)^{3,4}. Therefore, a critical challenge for peri-implanting cells is to robustly acquire novel features while preserving their stemness in constrained developmental space and time. In this Perspective, we exploited recent findings in the pluripotency field to question whether these cellular transitions involve exclusively complete molecular resettings (– e.g. extinction of a full transcriptional/epigenetic program and induction of a non-overlapping new one), as traditionally proposed for differentiation processes⁵, or also alternative mechanisms. Hence, we herein compiled convergent findings depicting how a large battery of molecules are efficiently repurposed to exert strikingly different, sometimes opposite, functions in these closely-related stem cell configurations. We thus propose more broadly that pluripotency progression is also ensured by the fine-tuned redeployment, complementary to the resetting, of a large repertoire of intrinsic components of the cell, ranging from the plasma membrane to the chromatin. Far from a semantic argument, we propose the notion of Molecular Versatility (see glossary) to regroup these mechanisms that, we believe, might have been evolutionary co-opted to confer robustness to developmental transitions.

Pluripotency progression as a continuum of cell state transitions

During peri-implantation development, pluripotency does not correspond to a unique and fixed cellular state but rather encompasses multiple evolving cellular configurations (Fig. 1)⁶. These closely-related cellular states share the ability to self-renew and the expression of a set of core transcription factors, as reviewed elsewhere^{4,7}. Yet, they undergo profound changes in their ability to respond to extrinsic cues, that allow the establishment of the pluripotent compartment of the early and late epiblasts⁸. Before implantation (embryonic day E4.5), mouse epiblast cells reside in a naïve state, which progressively transitions to formative (E5.5-E6) and primed (E6.5–E7.5) configurations upon implantation (Fig. 1)⁹. These transitions, which are crucial for germ layer formation, prepare embryonic cells for lineage specification while maintaining stemness. The regulatory mechanisms controlling these transitions are

complex to decipher *in vivo* due to the limited access to and quantity of biological material at these embryonic stages. Yet they can be dissected using tractable and faithful *in vitro* models of embryo-derived stem cells. These models were initially classified dichotomously with mouse embryonic stem cells (ESCs) reflecting the naïve epiblast¹⁰, and epiblast stem cells (EpiSCs) resembling the primed epiblast of the anterior primitive streak^{11,12}. Intermediate cellular states were captured, such as the transient Epiblast-like cells (EpiLCs)¹³, and the recent Formative stem cells (FS)¹⁴⁻¹⁶ and Rosette-like stem cells (RSCs)¹⁷ (Fig. 1). Like their *in vivo* counterparts, these closely related cell types are characterized by distinct developmental properties, signalling requirements, transcriptomes and epigenomes. Notably, naïve ESCs are unresponsive to germ cell inductive stimuli, in contrast to EpiLCs/FS that acquired such competence. Yet, EpiSCs already lost responsiveness to PGC induction (Fig. 1). Of note, the transition from naïve to formative pluripotency can also be explored *in vitro* using fluorescent reporters of the naïve marker *Rex1/Zfp42* in ESCs¹⁸.

Therefore, during pluripotency progression, an apparently contradictory challenge for embryonic cells is to retain stemness while learning to respond accurately to lineage specifying cues⁴. A critical underlying question is how such challenge is addressed rapidly (in few days) and precisely at the molecular level. Recent attempts combining CRISPR/Cas9 gene disruption, large-scale transcriptomics and computational systems biology revealed that the transition from naïve to formative pluripotency is not based on the action of few master transcription factors but rather the product of multiple crosstalking components linking at least four signalling inputs with epigenetic and TF networks to rewire embryonic cells^{19,20}. Here, we selected in the recent literature a battery of molecular mechanisms by which signalling pathways, TFs and epigenetic regulators are repurposed to reach this objective. In addition to the established notion that molecules can exert strikingly different functions in unrelated cell types, we propose the notion of Molecular Versatility to regroup these molecular mechanisms that specifically take place in similar or closely related stem cell configurations during peri-implantation development.

Redeploy signalling pathways

The maintenance of the naïve, formative and primed pluripotent states *in vitro* heavily relies on signalling pathways²¹. It has to be noted that some of these signals may be dispensable for embryo development, except under certain conditions (diapause), as reported for LIF²². Naïve ESCs self-renew in a metastable state in the presence of LIF and BMP4²³ whereas the activation of the WNT pathway prevents their transition towards primed EpiSC²⁴. The combined use of chemical inhibitors (2i) to suppress FGF/MAPK (*via* MEK1/2) and activate WNT (*via* GSK3 α/β) signalling instructs a ground state of pluripotency²⁵ that can be partially mimicked by the Netrin-1 signalling pathway²⁶. In contrast, the combined inhibition of FGF/MAPK and WNT signalling results in the capture and maintenance of RSCs in a self-renewing intermediate naïve-primed state¹⁷. Moreover, EpiLCs, FS and EpiSCs rely on Activin/Nodal and FGF/MAPK to maintain their undifferentiated state^{11,13}(Fig. 1). In line with the

Molecular Versatility notion, we selected below key mechanisms that allow closely related embryonic cells to integrate differently these signalling molecules.

The FGF/MAPK signalling pathway: A tight control of ERK1/2 activity.

A first prototypical illustration of Molecular Versatility is associated with the FGF/MAPK pathway, and in particular with its receptors FGFR1/FGFR2 and its effectors ERK1/2. The activation of the pathway is initially instrumental for the emergence of the extraembryonic trophoderm (TE) and primitive endoderm (PrE) lineages²⁷. Of interest for the Perspective, the pathway is required for naïve ESCs to acquire competence to form somatic cell types^{13,28,29} but, in striking contrast, the pathway then sustains pluripotency in EpiLCs/FS/EpiSCs^{11,30}. Therefore, the response to FGF must be rapidly and efficiently modified in these closely-related stem cell configurations to ensure those strikingly different effects (Fig. 2a). Even if the precise molecular mechanisms are not known, we describe below some related findings that might contribute to the phenomenon.

A first element of response lies in the combined use of the FGF receptors on epiblast (Epi) and PrE progenitors. FGFR2 was long considered to be the main receptor actively promoting PrE emergence as the onset of its expression was detected by E3.5 in PrE-biased cells^{31,32}. However, this sole FGF4/FGFR2 axis was not sufficient to explain the different functions exerted by the pathway in PrE emergence and Epi maturation. Quantitative single-cell-resolution imaging, combined with gene expression profiling of FGFR mutant/knock-in embryos, elegantly revealed how the stoichiometry of the receptors FGFR1 and FGFR2 is at least partially responsible for these differential actions^{29,33}. While Epi-biased cells express solely FGFR1, PrE-biased blastomeres co-express FGFR1 and FGFR2. This variation ensures that apparently similar cells respond differently to the same ligand FGF4. The autocrine FGF4/FGFR1 axis is required for epiblast cells to mature toward the primed state while the paracrine FGF4/FGFR1/FGFR2 signalling stabilizes the fate of PrE cells. In line with this, the activation of FGF/MAPK signalling in PrE- and Epi-biased cells was described to trigger the activation of different sets of target genes²⁹. Accordingly, the recent development of ERK-kinase translocation reporter (KTR), enabling live quantification of ERK1/2 activity at the single-cell resolution *in vivo*, revealed that, prior to lineage specification, PrE progenitors already harbor higher ERK1/2 activity than Epi progenitors³⁴. Of note, the sensitivity of embryonic cells to FGFs can also be mediated by the differential expression of FGF/MAPK inhibitors such as Dusp4, Dusp6, and Spred1, and the induction of negative feedback loops³⁵ (Fig. 2a). The modulation of FGF availability and engagement on its receptors *via* heparan sulphate proteoglycans³⁶ constitute other regulatory mechanisms, as well as the distinct usage of intracellular pathways (Jak/Stat, PLC γ , PI3K and MAPK), as reviewed elsewhere^{37,38}.

Another interesting example of Molecular Versatility comes from works on the MEK/ERK factors that were found to exert dual functions in naïve ESCs, respectively promoting (i) self-renewal and (ii) lineage commitment. On one hand, the chemical inhibition of MEK/ERK is known to constrain ESCs differentiation and to be instrumental for sustaining the ground state of naïve pluripotency²⁵. However,

on the other hand, Chen and colleagues demonstrated, using an inducible KO of both ERK1 and ERK2, that such complete depletion led to rapid genomic instability and compromised ESC self-renewal³⁹. In line with this, the prolonged MEK inhibition was also shown to alter ground state ESC genomic stability⁴⁰. Therefore, a precise dosage of ERK1/2 activity (intensity, duration) seems to dictate very different outcomes in naïve cells. An alternative way to tightly control the effect of ERK1/2 activity in ESCs came from an elegant study from the Brickman lab. The authors reported that the pro-lineage commitment activity of ERK1/2 is reversible, to a certain extent. Following stimulation, ERK1/2 was found to regulate first the transcription and enhancer activity of genes without inducing any changes in the binding of pluripotency TFs but rather by modifying the association of RNA polymerase II and cofactors such as Mediator components with the chromatin. Later on, if the stimulation persists, ERK1/2 finally dismantles pluripotency by directly phosphorylating/destabilizing TFs such as Klf4/Nanog and RNA polymerase II at Ser5 residue. In contrast, if stimulation stops, the reduced ERK1/2 activity restores the normal expression of pluripotency proteins. This mode of regulation indicates how the activation of ERK1/2 activity induces a transient window of lineage commitment during which reversion to naïve pluripotency is preserved⁴¹. Altogether, these examples underline various ways by which embryonic cells may modulate their response to FGF signals.

The WNT signalling pathway: bi-functional properties of β -catenin.

The WNT signalling pathway also exerts strikingly different functions in naïve and primed pluripotent stem cells. While its activation contributes to maintaining naïve pluripotency in ESCs⁴², it subsequently triggers exit from primed pluripotency and mesendoderm differentiation in EpiSCs⁴³. We highlight below some molecular mechanisms that may allow embryonic cells to precisely modulate their responsiveness to Wnt during pluripotency progression.

First, the bi-functional nature of the effector β -catenin *per se* allows it to exert dual functions in promoting (i) self-renewal but also (ii) priming for differentiation (Fig. 2b). β -catenin harbors transactivating functions in the nucleus but it is also a component of adherens junctions in the cytoplasm. In the nucleus, β -catenin contributes to sustaining naïve pluripotency by triggering TCF3 inactivation by a plethora of mechanisms, ranging from the control of TCF3 protein binding/stability to the epigenetic regulation of its promoter or transcript by miRNA^{44,45}. More recently, nuclear β -catenin was also found to strengthen the robustness of the transcriptional apparatus by supplying transcriptional co-regulators (such as BRD4, CDK9, Mediator, Cohesin and p300) at pluripotency loci⁴⁶. In contrast in the cytoplasm, β -catenin contributes to controlling cell adhesion by connecting cadherins through α -catenin to the actin cytoskeleton^{47,48}. The use of a TCF-signalling-defective- β -catenin variant demonstrated that its cell-adhesion functions are critical for endodermal and neuronal differentiation⁴⁷.

Additional layers of regulation contribute to the Molecular Versatility of the Wnt pathway, such as the repertoire of the TCFs transcription factors. In ESCs, TCF1 and TCF3 were shown to exert opposite

functions, respectively promoting and destabilizing the pluripotent network by competing for DNA binding through virtually identical HMG domains^{44,49,50}. In addition, the noncanonical Wnt ligand Wnt5a was shown to exert opposite actions, namely activating or repressing β -catenin/TCF signalling, depending on the receptor it bound to (Ror2 or Frizzled4), indicating that the repertoire of receptors controls the response to WNT pathway⁵¹. This phenomenon will be discussed in more detail in the Netrin-1 signalling pathway section. Finally, the secretion of WNT antagonists, such as Dkk1 by the primitive endoderm¹⁷, and the existence of auto-activating loops, constitute alternative strategies to modulate response to WNT signalling⁵².

The Activin/Nodal signalling pathway: a dose-dependent switch of Smad binding.

Activin and Nodal are morphogens of the TGF β superfamily that direct differential stem cell fate decisions in a dose- and distance-dependent manner⁵³. During early embryonic development, the pathway is responsible for the specification of mesoderm, endoderm, node, and mesendoderm. In contradiction to this function in differentiation, the pathway also plays important roles in ESCs and EpiSCs (Fig. 2c). Indeed, recombinant Activin A is used *in vitro* for the continued propagation and expansion of EpiSC^{11,30} and Activin/Nodal were found to promote ESC proliferation^{54,55}. In that context, Lee and Colleagues proposed a fascinating model of how ESCs interpret and respond differentially to Activin/Nodal dosage⁵⁶. They reported that, whereas the endogenous level of Activin/Nodal signaling is required for ESC self-renewal, its perturbation leads to an exit from pluripotency towards different paths: mesendoderm induction at high signalling level and trophectoderm differentiation at low signalling level. Mechanistically, phospho-Smad2, the primary downstream transcriptional effector of the Activin/Nodal pathway, was found to bind and regulate in a dose-dependent manner distinct subsets of target genes, including the Oct4 promoter. This dose-dependent switch of binding by phospho-Smad2 provides a molecular basis for the versatile functions of Activin/Nodal in ESCs⁵⁶.

The Netrin-1 signalling pathway: modulating ligand and receptors stoichiometry

The Netrin-1 signalling pathway also permits to highlight Molecular Versatility during embryonic development. Netrins are a conserved family of laminin-related molecules that act chiefly through receptors of two distinct families: the deleted in colorectal cancer (DCC) and UNC-5 families⁵⁷. We recently revealed that the ligand Netrin-1, initially described as an axon guidance cue, exerts opposite effects on naïve ESC self-renewal, by activating or repressing ERK1/2, when the relative stoichiometry of its receptors Neogenin1 (Neo1) and Unc5b is experimentally modulated (Fig. 2d)²⁶. Therefore, the repertoire of receptors allows the same ligand to trigger different responses in ESCs. Interestingly, the same receptor can also exert alternative functions depending on the ligand it binds to. Indeed, in the same settings, the Neo1 receptor was found to induce chemoattraction *via* Netrin-1 but chemorepulsion *via* the ligand repulsive guidance molecule a (Rgma)⁵⁸.

More generally, these results questioned why, rather than using single ligand and receptor couples to dictate different outcomes, signalling pathways comprise multiple ligand and receptor variants that interact promiscuously to generate large sets of distinct signalling complexes. The use of redundant ligands and receptors was proposed to confer regulatory flexibility⁵⁹ or robustness to biological processes⁶⁰ but this apparent redundancy recently appeared as a strong way to generate diverse and specific cellular responses. As an example, in an attempt to understand how the ligands Netrin-1 and Rgma cross-talk to transduce their signals, Robinson and colleagues reported that their simultaneous binding to Neo1 does not lead to competition for binding but to the formation of a ternary super-complex that globally diminishes their functional outputs⁶¹. Moreover, by combining theoretical and experimental approaches, the Elowitz laboratory showed how cells perceive absolute but also relative concentrations of multiple ligands to compute multi-dimensional response profiles. In this model, by modifying the stoichiometry of receptors, cells modulate the computations to perform, and therefore the responses to provide to the same combination of ligands⁶². Mathematical modelling even revealed that such multi ligand/receptor system outperforms seemingly more specific one-to-one signalling architectures in terms of diversity and specificity of responses⁶³. This section highlights different mechanisms by which embryonic cells modulate their response to their surrounding signals.

Redirect transcription factors

Naïve, formative and primed stem cells are characterized by the shared expression of TFs such as Oct4 and Sox2^{11,13,17}, raising fascinating questions about how distinctive properties can be established in the presence of an overlapping set of master TFs. In line with the Molecular Versatility notion, a large fraction of pluripotency TFs were initially found to exert opposite functions in ESCs by promoting (i) self-renewal at endogenous levels but (ii) germ layer formation when ectopically expressed, including Sox2 (neurectoderm)⁶⁴ and Esrrb/Tbx3 (endoderm)^{65,66}. A limitation of these studies is that overexpression may show non-physiological activity of TFs as a result of non-specific binding and/or sequestration of factors. However, in the case of Oct4, its endogenous level was also reported to destabilize self-renewal, as illustrated by the fact that Oct4 +/- ESCs harbor a more robust pluripotent state than WT ESCs⁶⁷. Therefore, based on these findings, Loh and Lim proposed to consider naïve pluripotency TFs as “pure lineage specifiers” and pluripotency as an inherently precarious condition in which these TFs compete to generate mutually exclusive lineages. This intriguing concept was slightly contrasting with the model proposed by A. Smith of a “ground” state of pluripotency in which pluripotency TFs rather cooperate to constrain the fluctuations provided by opposing differentiation programs^{25,68-70}. Of note, this notion of TF battles was initially described in the hematopoietic system where single multipotent cells activate distinct lineage-affiliated gene expression programs prior to exclusive lineage commitment⁷¹.

Recently, computational systems biology approaches conducted on the transition from naïve to formative pluripotency rather proposed that pluripotency progression does not rely solely upon

instructions delivered by few master TFs. It rather appears that a cloud of activity involving multiple coordinated and partially redundant inputs operates to destabilize the existing and self-reinforced naïve gene regulatory network (GRN)²⁰. In that context, the notion of “Molecular Versatility” presented herein might also provide a basis for unifying those principles. We propose that, during pluripotency transition, the stepwise dismantling of the robust naïve TF network, combined with epigenetic remodeling, allows pluripotency TFs to start exerting alternative functions. Therefore, rather than genuine lineage specifiers, pluripotency TFs may be considered as Molecular Versatile actors, and this intrinsic property leads them to exert both pro-self-renewal and pro-lineage commitment functions in closely-related cellular configurations. We detailed this notion below for Oct4 and Nanog.

The TF **Oct4** (octamer-binding transcription factor 4), also known as POU5F1, promotes (i) self-renewal but also (ii) exit from pluripotency and (iii) endoderm/mesoderm formation during early development^{67,72-74}. The comparative analysis of Oct4 genome-wide binding revealed its redistribution on distinct enhancers with and by specific cofactors in ESCs (Klf4, Nanog, Ctf) and EpiLCs (Otx2, Zic3) but also during endodermal specification (Sox17), indicating how cofactors modulate Oct4 binding and function⁷⁵⁻⁷⁸. In addition, Oct4 levels need to be tightly controlled, at both transcriptional and post-transcriptional levels, because slight differences can profoundly alter its function⁷⁹. Reduced Oct4 expression in ESCs was unexpectedly shown to trigger the establishment of a robust self-renewing state in which the Oct4 protein is redistributed on the genome and increasingly bound to enhancer regulatory regions with Nanog^{67,72}. However, in a primed context in EpiSCs, reduced Oct4 levels destabilizes the pluripotent state and promotes the reversion to a naïve state, indicating differential functions for the same Oct4 dosage⁶⁷. In contrast, at physiological levels, Oct4 triggers the generation of a Nanog-low subpopulation of ESCs that is highly responsive to differentiation cues⁶⁷, in agreement with findings of exogenous Oct4 expression triggering differentiation⁸⁰. The Crispr/Cas9 technology, combined with the recent advances of single-cell approaches, will offer a unique opportunity to revisit these concepts by generating knock-in reporter ESCs for multiple pluripotency TFs and analysing the behavior of single cells harboring differential endogenous levels of them. In that sense, a recent report indicated that endogenous elevated OCT4 levels strongly biased ESCs towards both neuroectodermal and mesendodermal fates by increasing chromatin accessibility at differentiation-associated enhancers⁸¹. Of note, recent evidence also demonstrated the versatility of Oct4 during reprogramming to pluripotency. Silva and colleagues showed first that distinct molecular trajectories to pluripotency all required to reach a very precise Oct4 level to be successful⁸². In line with this view, Schöler’s lab refuted the long-standing dogma of a uniquely essential role of Oct4 during reprogramming. Oct4 overexpression was indeed shown to divert cells from a direct route to pluripotency by triggering aberrant gene activation and also, more importantly, to reduce significantly the developmental potential of iPS cells (Fig. 3)⁸³.

The TF **Nanog** also harbors strikingly different functions during peri-implantation development. It is well-characterized for its role in the formation of the naïve pluripotent epiblast and the repression of the PrE fate^{84,85}. However, it also represses anterior epiblast identity during mouse gastrulation⁸⁶. In addition, Nanog is re-expressed in PGCs and required for germline development *in vivo*⁸⁷. An elegant study from Surani and colleagues dissected the Molecular Versatility of Nanog. While its exogenous expression triggers naïve ESC self-renewal and resistance to differentiation, it was shown to trigger PGC specification when conducted in primed EpiLCs. Molecularly, the epigenetic resetting occurring in EpiLCs combined with cofactor modifications (reduced Sox2 expression), were proposed to allow Nanog to bind and activate enhancers of different sets of genes including the germ cell genes Prdm1 and Prdm14⁸⁸.

Of note, alternative splicing (AS) constitutes another mechanism that allows to redirect transcription factors during pluripotency progression. A large program of ESC specific-AS events, controlled by the RNA-binding proteins MBNL1 and MBNL2, was described to orchestrate pluripotency progression⁸⁹. Blencowe and colleagues identified in particular a conserved AS event in the Foxp1 transcripts, specifically activated in pluripotent cells, that modifies critical amino acid residues within the forkhead domain and alters its DNA-binding specificity. The two resulting FoxP1 isoforms exert opposite effects by activating pluripotency or differentiation genes, respectively⁸⁹⁻⁹¹.

Altogether, these data indicate a battery of mechanisms by which TFs exert different functions during pluripotency progression.

Repurpose epigenetic determinants

Epigenetic determinants play a fundamental role during early development and pluripotency progression, as reviewed elsewhere⁹². Recent multiomics profiling of the transition from naïve ESCs to EpiLCs revealed for example major waves of protein phosphorylations but also epigenetic modifications⁹³. Moreover, the 3D organization of the chromatin is largely modified during the naïve to primed transition, with the appearance of long-range intra- and inter-chromosomal interactions between H3K27me3 marked genes⁹⁴. Here we present more specifically how epigenetic regulators are repurposed during pluripotency progression. We focus in particular on enhancer and promoter rewiring as well as Trithorax and Polycomb complexes.

Enhancer reconfigurations.

One of the crucial effectors of cell fate transitions is the sequence-dependent binding of TFs to enhancers to regulate gene expression in a cell type-specific manner^{95,96}. This is particularly true in the context of pluripotency progression, where the differences in transcriptional output between naïve ESCs and primed EpiSCs are less dramatic than the alterations observed in chromatin profiles at enhancers^{75,97,98}. In line with this, different classes of enhancers have been defined in ESCs and EpiSCs, based on varying levels of H3K4me1, H3K27ac, H3K36me3 and pSer2/5 forms of RNA polymerase II⁹⁹. Therefore, a

critical challenge for embryonic cells is to ensure a coordinated rewiring of enhancers. We detailed below how Molecular Versatility applies to this process.

As a first example, the FoxD3 TF has emerged as a versatile regulator that orchestrates enhancer reconfigurations during exit from naïve pluripotency and progression to the EpiLC state¹⁰⁰. Foxd3 was initially reported as a repressor that decommissions active enhancers of naïve pluripotency genes *via* the recruitment of Lsd1 and the reduced binding of co-activators like p300 (Fig. 4a). However, in addition to its repressive role on naïve enhancers, FoxD3 was found to exert other dual functions. It was indeed reported to (i) initiate the activity of newly bound EpiLC-specific enhancers while simultaneously (ii) repress their maximal activation. Molecularly, this is achieved by the co-recruitment of the SWI/SNF chromatin remodeling complex ATPase Brg1 to promote nucleosome removal on enhancers but also of histone deacetylases 1/2 to inhibit their optimal activation⁹⁸(Fig. 4a).

Interestingly, a complex enhancer switching program was also evidenced during pluripotency progression for genes that are expressed at identical levels in ESCs and EpiSCs, such as Oct4^{11,101}. This type of genes was shown to harbor at least 2 classes of enhancers driving their expression in naïve and primed cellular configurations, respectively. Molecularly, this enhancer switching program is controlled by the redistribution of core (Oct4 and Sox2) and stage-specific (Klf4, Prdm14, and Otx2) pluripotency TFs¹⁰². In more detail, an elegant study by Blelloch and colleagues reported how the TF Grhl2 orchestrates such enhancer switching to partition the pluripotency network and sustain the expression of a subnetwork of epithelial genes during pluripotency progression, notably by regulating Cohesin localization¹⁰². As depicted in Fig. 4b, the expression level of the corresponding genes are similar in naïve and primed stem cells but the robustness of the activation is reduced in primed cells to ensure a rapid and efficient silencing later on.

Even if still restricted, these examples highlight how enhancers are rewired during pluripotency progression.

Promoter reconfigurations.

Promoter switching constitutes an additional way to generate Molecular Versatility during pluripotency progression. The use of two alternative promoters led for example to the production of two isoforms of the protein SET (SET α and SET β) that were found to exert differential effects on stem cell self-renewal and commitment. SET α has beneficial effects on proliferation and linker chaperone activities without interfering with differentiation, while SET β is essential for proper differentiation (Fig. 4c)¹⁰³. A complex switch between the distal (pLiz) and proximal (pZdbf2) promoters of the Zdbf2 gene has also been described during the naïve-primed transition¹⁰⁴. The Zdbf2 gene is expressed transiently in the early embryo (and in naïve ESCs) *via* its pLiz promoter and then from pZdbf2 in somatic cells. Even if the precise function of the protein remains largely unknown, this transient transcription was found to set up an epigenetic state that is required later on and programs postnatal growth. Indeed, mouse embryos deficient for the distal pLiz promoter develop normally but completely fail to activate Zdbf2 in the

postnatal brain and show reduced growth. Therefore, even if this promoter switch appears dispensable for embryogenesis, it signals essential regulatory information in the adult¹⁰⁵. At the molecular level, the transient transcription from pLiz promotes *de novo* DNA methylation upstream of the pZdbf2 promoter, which antagonizes Polycomb-mediated repression. Interestingly, the two promoters use similar enhancers but their respective activity in ESCs and EpiLCs is mediated by contacts mediated by the CTCF protein. The alternative usage of enhancers/promoters represents an elegant example of Molecular Versatility that contributes to sustain stemness but prepares the genome for a robust and coordinated progression toward gastrulation.

Trithorax (TrxG) complexes.

TrxG complexes mediate the deposition of the active histone mark H3K4 methylation *via* their catalytic subunits, the histone methyltransferases SET/MLL¹⁰⁶. TrxG complexes display versatile functions in ESCs, namely coordinating (i) self-renewal or (ii) lineage commitment, depending on the composition of subunits. The core member subunit Wdr5 was described to promote naïve ESCs self-renewal by maintaining global H3K4me3 levels and by cooperating with the Oct4/Nanog/Sox2 circuitry, sharing target genes and regulatory functions¹⁰⁷. Ash2l, another core subunit, is also required for pluripotency: Ash2l knockdown in ESCs leads to differentiation and derepression of mesodermal markers¹⁰⁸. Conversely, the depletion of the subunit Dpy-30 does not impact ESCs self-renewal but rather impairs their differentiation, particularly along the neural lineage. This phenotype is largely mediated by the erasure of the H3K4me3 mark at bivalent promoters that induces the dissolution of their poised state¹⁰⁹. Interestingly, the MLL1 subunit was on the contrary reported to maintain the identity of primed EpiSCs. MLL1 inhibition leads to a global redistribution of the H3K4me1 mark and therefore to a profound rewiring of the enhancer landscape, leading to the spontaneous reversion of primed EpiSCs into naïve ESCs¹¹⁰.

The Polycomb repressive complexes.

The PRC complexes (PRC2 and PRC1), formed by Polycomb group proteins, play essential roles in pluripotency and development by mediating chromatin modifications. PRC2 is recruited to specific genomic locations and catalyzes deposition of H3K27me3, which in turn recruits PRC1, resulting in the generation of H2AK119ub1 and transcriptional repression. In ESCs, PRC1/2 co-occupy indeed regions marked with H3K27me3, with a large proportion of these sites being proximal to genes of lineage commitment^{111,112}. Accordingly, PRC2- (Eed KO) and PRC1- (Ring1A/B KO) deficient ESCs showed increased expression of differentiation genes^{111,113}. However, PRC function is far more broad and versatile during pluripotency progression than initially established¹¹⁴.

First, recent integrative proteomic profiling of ground state ESCs revealed a critical function for PRC2 in globally shaping the pluripotent epigenome to avoid the acquisition of primed features such as DNA

methylation¹¹⁵. In ground state ESCs, PRC2 and H3K27me3 are indeed widely distributed on both euchromatin and heterochromatin, when compared with Serum/LIF ESCs.

Second, a recent body of work demonstrated the versatile functions exerted by the different subunits of PRC2. By combining single-cell transcriptomics and embryoid body formation, Loh et al. showed that the depletion of the two distinct PRC2 subunits MTF2 and JARID2 led to different phenotypes during exit to naïve pluripotency. MTF2 absence enhanced and accelerated differentiation toward the three lineages, as expected, but JARID2 null ESCs struggled to turn off pluripotency genes and were predominantly converted into early differentiating precursors, with reduced efficiency towards the mesendoderm lineages (Fig. 4d)¹¹⁶.

Moreover, another study highlighted the critical role of PRC2 in sustaining the self-renewal and in guiding differentiation of primed stem cells¹¹⁷. The attempts to convert PRC2-deficient naïve ESCs into primed EpiSCs failed and rather led to spontaneous differentiation. Even if the precise molecular mechanisms remain to be elucidated, these versatile functions of PRC2 might be attributable to (i) the coordinated relocation of various PRC2 complexes and to (ii) different thresholds for activation of various classes of genes.

PRC1 was also reported to promote both (i) self-renewal and (ii) lineage commitment in ESCs, with reports highlighting the importance of the composition of its subunits in these versatile functions^{118,119}. In naïve ESC, Cbx7, which is the main PRC1-associated Cbx protein, is required to maintain the undifferentiated state in a robust manner. This Cbx7-containing PRC1 complex represses the transcription of differentiation genes and of the other subunits Cbx2 and Cbx4. Once induced during differentiation, Cbx2- and Cbx4-containing complexes are redistributed to repress a large set of genes, including pluripotency-related loci. In addition, Cbx2/4 deficiency was demonstrated to skew *in vivo* teratoma differentiation toward the endodermal fate, indicating a specific function in germ layer formation, as also revealed for the other PRC1 subunits Ring1B and Pcgf6^{120,121}. Thus, Cbx proteins confer distinct target selectivity and functions to the canonical PRC1 complex. In addition, variant PRC1 complexes, that are recruited to target genes mainly independently of PRC2 and H3K27me3, were found recently to be mainly responsible for gene repression in ESCs^{122,123}.

Moreover, although PRCs are known to exert a repressive effect, interestingly, the cohort of PRC-bound genes contains not only silent genes, but also genes with intermediate and high expression¹²⁴. Recent single-cell RNA-seq analyses showed that active genes bound by PRC in ESCs are subjected to a switch between active and PRC-repressed states and harbor therefore greater cell-to-cell variation than classical active genes. This phenomenon, by favoring stochastic expression of genes, may play a key role in stem cell physiology (Fig. 4e)^{125,126}. In the same line, PRC1 complexes containing Cbx8 are recruited transiently on differentiation genes to facilitate their activation¹²⁷. Similarly, the PRC1 subunit Mel18, crucial for the repression of differentiation genes in ESCs, facilitates the expression of TFs essential for cardiac differentiation in progenitors¹²⁸. Altogether, these findings support the versatile functions and modes of action of PRC during early development.

A tight control of Molecular Versatility

Altogether, the previous sections highlighted how molecules are accurately redeployed to exert different, sometimes opposite, functions in closely-related stem cell configurations. However, in order for the changes to occur at the correct time and place, Molecular Versatility must be tightly regulated and connected with the microenvironment to ensure channelling and robustness of pluripotency progression⁵. Signalling pathways are known for long to be directly connected to pluripotency TFs. Effectors such as Stat3 and Smad2/3 co-occupy the ESC genome with the TFs Oct4, Nanog and Sox2, providing a direct rationale for the connection between extrinsic cues, signalling and the TF network¹²⁹⁻¹³¹. However, certain signalling pathways were recently found to directly control the Molecular Versatility of TFs. For instance, the TF Etv5 was reported to undergo a switch in its function depending on ERK1/2 signalling activity. Indeed, Etv5 supports ESC self-renewal when ERK1/2 is inhibited but promotes exit from naïve pluripotency when ERK1/2 is active¹⁸. As another example, the EMT-TF Snail1 was found to control metabolic cascades in ESCs in a WNT-independent manner. However, during ESC commitment, Snail1 is induced by WNT to regulate exit from primed pluripotency and neuroectodermal fate emergence¹³².

In order to be precisely regulated, the activity of versatile factors was also found to be controlled by multiple signals. As a first example, we reported that the Netrin-1 signalling pathway regulates naïve pluripotency by modulating the responsiveness of embryonic cells to both FGF and WNT signals^{26,133}. This dual function is achieved *via* the induction of complex signalling cascades downstream of the two Netrin-1 receptors Unc5b and Neo1. However, the expression of the *Netrin-1* transcript itself is also directly and antagonistically controlled by the WNT and FGF/MAPK pathways, positioning this molecule as an integrated molecular sensor for the embryonic cell.

The activity of basic helix-loop-helix (bHLH) TFs is also controlled by multiple signals during pluripotency progression. For instance, Tcf15 was described to prime pluripotent cells for differentiation in response to FGF/MAPK signalling¹³⁴. However, while Tcf15 transcription is directly induced by FGF/MAPK, its biological activity is suppressed by Id proteins that are under the control of BMP signalling²³. Therefore, Tcf15 is able to molecularly sense multiple external cues (FGF/BMP) to finely tune its activity and to confer accuracy to the naïve-primed transition. Consistently, Tcf15 expression is transient in the early embryo, readily detectable at E4.5 but turned off by E5.5. The bHLH TF Tfe3, that promotes naïve pluripotency, is rapidly excluded from the nucleus of ESCs by the mTORC1 and lysosome signalling^{135,136}, highlighting an alternative way to precisely integrate signalling cues.

Another elegant study from Lowell and colleagues deciphered how the BHLH TF Id1 preserves pluripotency and avoids premature differentiation during the naïve-primed transition by being multiply regulated. Id1 expression is induced when embryonic cells lose Nanog expression but have not yet acquired Nodal activity. The Id1 protein suppresses FGF/MAPK signalling in order to protect these Nanog-negative cells from differentiation. Then, once Nodal activity is operating in these transitioning

cells, Nodal itself suppresses Id1 expression and leads to a rise in to FGF activity contributing to sustaining pluripotency in primed cells¹³⁷.

Concluding remarks

This perspective presents converging findings demonstrating that a large repertoire of molecules are repurposed to exert different, sometimes opposite, functions in closely-related stem cell configurations during pluripotency progression. We propose to regroup these multiple molecular mechanisms by which signalling pathways, TFs and epigenetic regulators are rapidly rewired with the notion of Molecular Versatility, as summarized in Figure 5. We believe that these redeployments, by acting in concert with profound transcriptomic and epigenomic rewiring, contribute to ensure a robust and coordinated programming of embryonic stem cell fate in response to extrinsic signals. In addition, we propose that Molecular Versatility may confer a certain degree of reversibility and flexibility to the developmental transition processes by involving molecules already present within the embryonic cells. Because the examples used in this Perspective are mainly based on the comparison of naïve ESCs and primed EpiLCs/EpiSCs, it remains to be investigated whether and how Molecular Versatility takes place dynamically in truly transitioning cells. The recent capture of intermediate states such as Rosette and Formative stem cells RSC and FS respectively), combined with the power of computational biology, will certainly help in better defining these relatively underexplored layers of regulation. Moreover, the advances in the development of single cell-based approaches will also permit to address precisely how these mechanisms take place in transitioning cells. In that sense, pluripotency progression provides an amenable experimental system for dissection of stem cell fate transition paradigm, that will surely bring highly valuable concepts for the biology of embryonic but also adult and cancer stem cells.

Acknowledgements:

We are grateful to Brigitte Manship for proofreading of the manuscript. This work was supported by institutional grants from INSERM/CNRS, La ligue contre le cancer nationale et régionale (F.L.), Labex Dev2Can (F.L), Fondation Bettencourt Schueller (Impulscience)(F.L.), INCa (F.L.), ANR (F.L.), Labex DEV2CAN (F.L.), Fondation ARC (F.L., A.H.), Centre Léon Bérard (F.L., A.H.), Fondation pour la recherche médicale (N.C., G.F., F.L.) and Institut Convergence PLAsCAN, ANR-17-CONV-0002.

Declaration of interests:

The authors declare no competing interests.

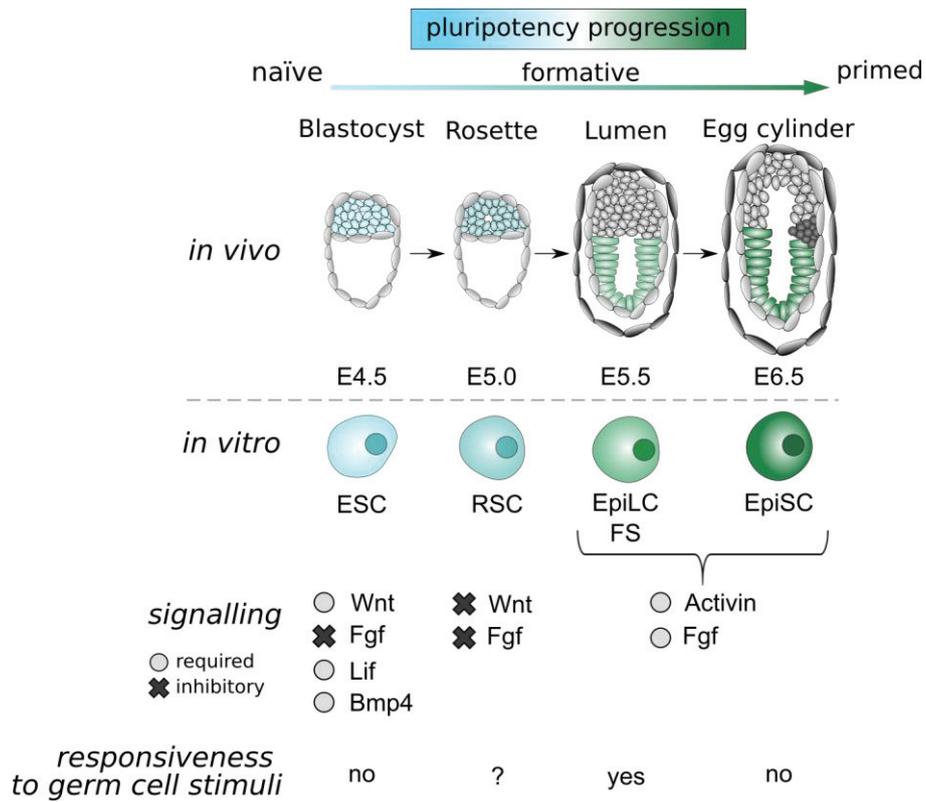


Figure 1. A continuum of transitional states defines pluripotency progression. The schematic diagram depicts the embryonic stages and the corresponding embryo-derived cell types. It also summarizes the signalling pathways that sustain the embryo-derived stem cells *in vitro* and their ability to respond to germ cell inductive signals. ESC: Embryonic Stem Cell; RSC: Rosette Stem Cells; EpiLC: Epiblast-like Cells; FS: Formative Stem cells; EpiSC: Epiblast Stem Cells.

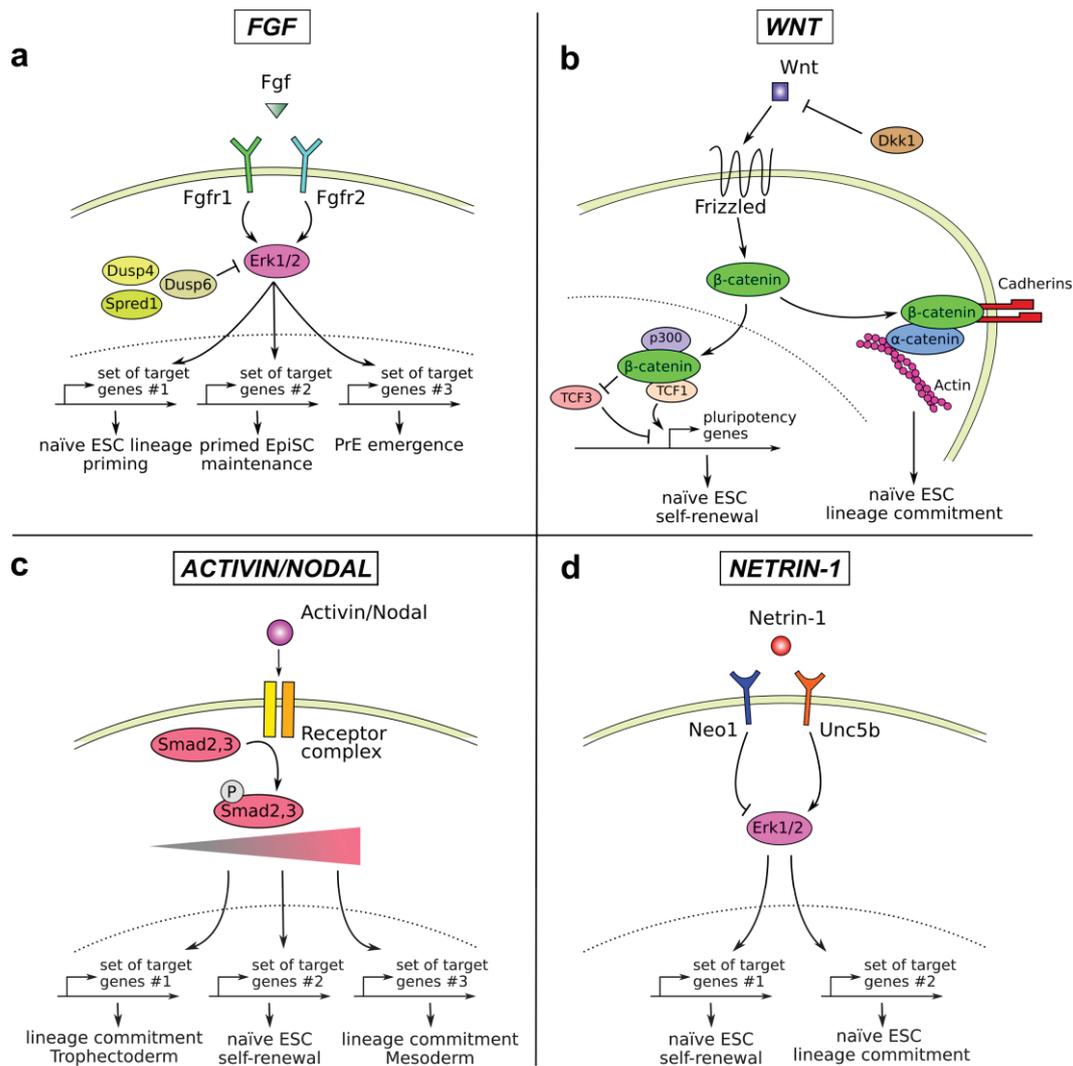


Figure 2. Molecular Versatility of signalling pathways. (a) FGF/MAPK signalling. The integration of the FGF signal is modulated by the nature of the ligand (FGF4, FGF2) and by the differential expression of FGFR1 and FGFR2 receptors. Such integration will lead to various degrees of ERK1/2 activation that will subsequently activate different sets of target genes. (b) Wnt signalling. The activation of the pathway will promote stem cell self-renewal or lineage commitment. These versatile functions are related to the bifunctional function of β -catenin in the nucleus and in the cytoplasm. It has to be noted that TCF1 and TCF3 also behave antagonistically on pluripotency genes and ESC self-renewal. (c) Activin/Nodal signalling. Activin/Nodal signalling leads to a various degree of Smad2 activation. This precise degree triggers the regulation of different set of genes and therefore of different cell fate decisions in ESCs. (d) Netrin-1 signalling. The Netrin-1 molecule has opposite effects on ESC fate by promoting self-renewal or lineage commitment. This Molecular Versatility is controlled by the stoichiometry of its receptors Neo1 and Unc5b that will lead to ERK1/2 activity induction or repression.

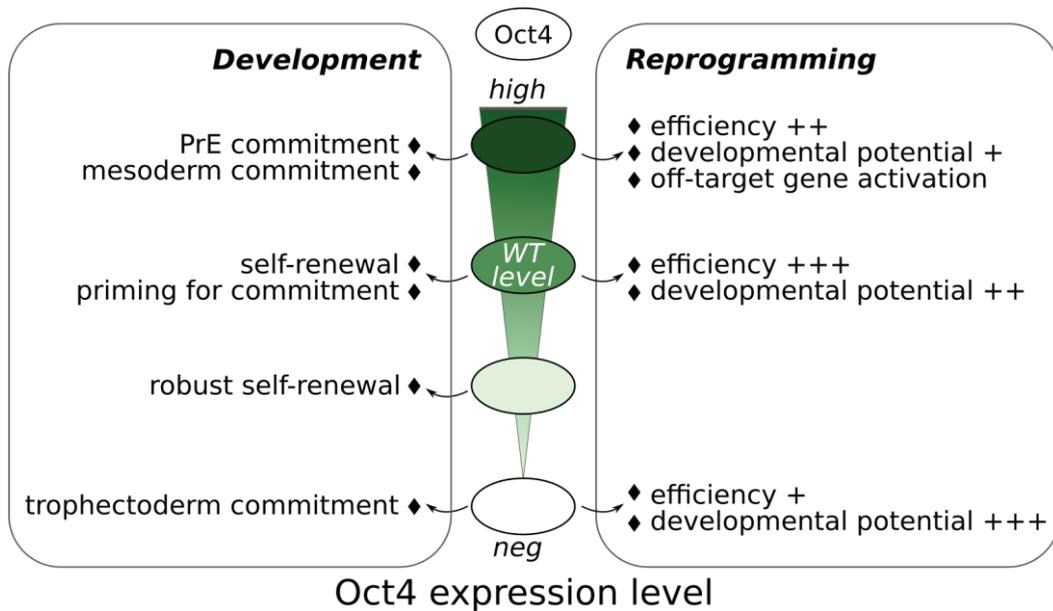


Figure 3. Molecular Versatility of Oct4 during development and reprogramming. The schematic diagram depicts the different functions exerted by the TF Oct4 depending on its expression level. The expression of Oct4 is tightly regulated because gain and loss-of expression respectively triggering differentiation into primitive endoderm / mesoderm or trophectoderm derivatives in ESCs. Unexpectedly, its endogenous level sustains self-renewal but also primes embryonic stem cells for differentiation while a reduced Oct4 level ensures a robust self-renewal state. A precise Oct4 level is also crucial during reprogramming. Its overexpression triggers aberrant gene inductions while iPS cells generated in absence of Oct4 present an unexpected enhanced developmental potential. PrE: Primitive endoderm; WT level: Wild-type level.

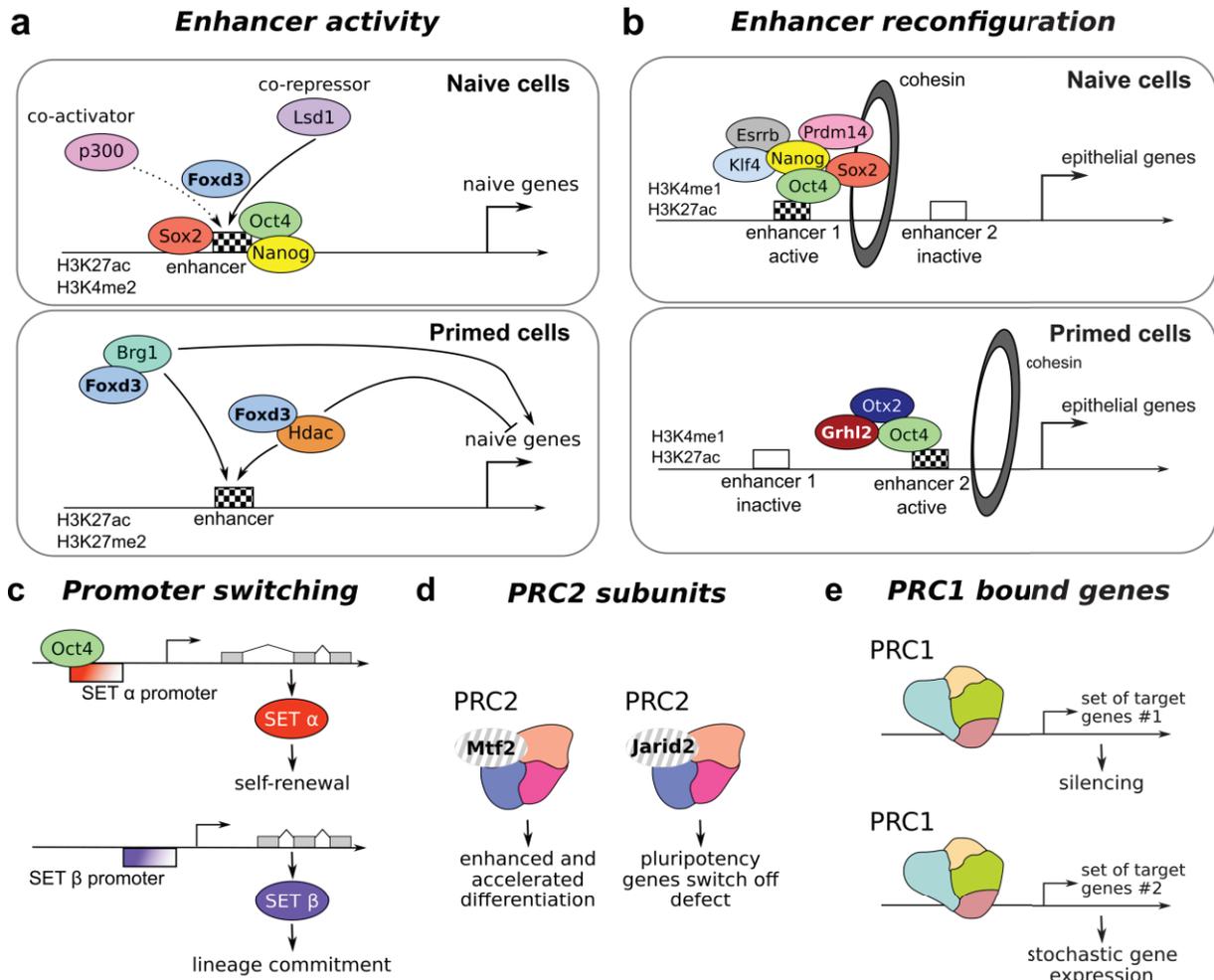


Figure 4. Molecular Versatility of epigenetic mechanisms. (a) The activity of enhancers is controlled by the versatile actions of the FoxD3 transcription factor. In naïve cells, FoxD3 act as a repressor that decommissions active enhancers of naïve pluripotency genes. In primed cells, FoxD3 exerts dual functions by initiating enhancer activity by recruiting Brg1 while simultaneously repressing their maximal activation by recruiting histone deacetylases, illustrating its molecular versatility. (b) The TF Grhl2 orchestrates an enhancer switching program during pluripotency progression. Grhl2 partitions the pluripotency network and sustain the expression of a subnetwork of epithelial genes during naïve-primed transition. (c) Promoter switching for the SET gene in ESCs. This switch leads to the generation of two protein isoforms, SET α and SET β , that play different functions in ESCs. (d) The subunits of PRC2 dictate different functions for the complex during exit from naïve pluripotency. MTF2 and JARID2 depletion leads to different outcomes during exit from naïve pluripotency. (e) PRC1 has versatile functions depending on the class of genes it binds to. PRC1-bound active genes showed greater cell-to-cell variation when compared with active genes.

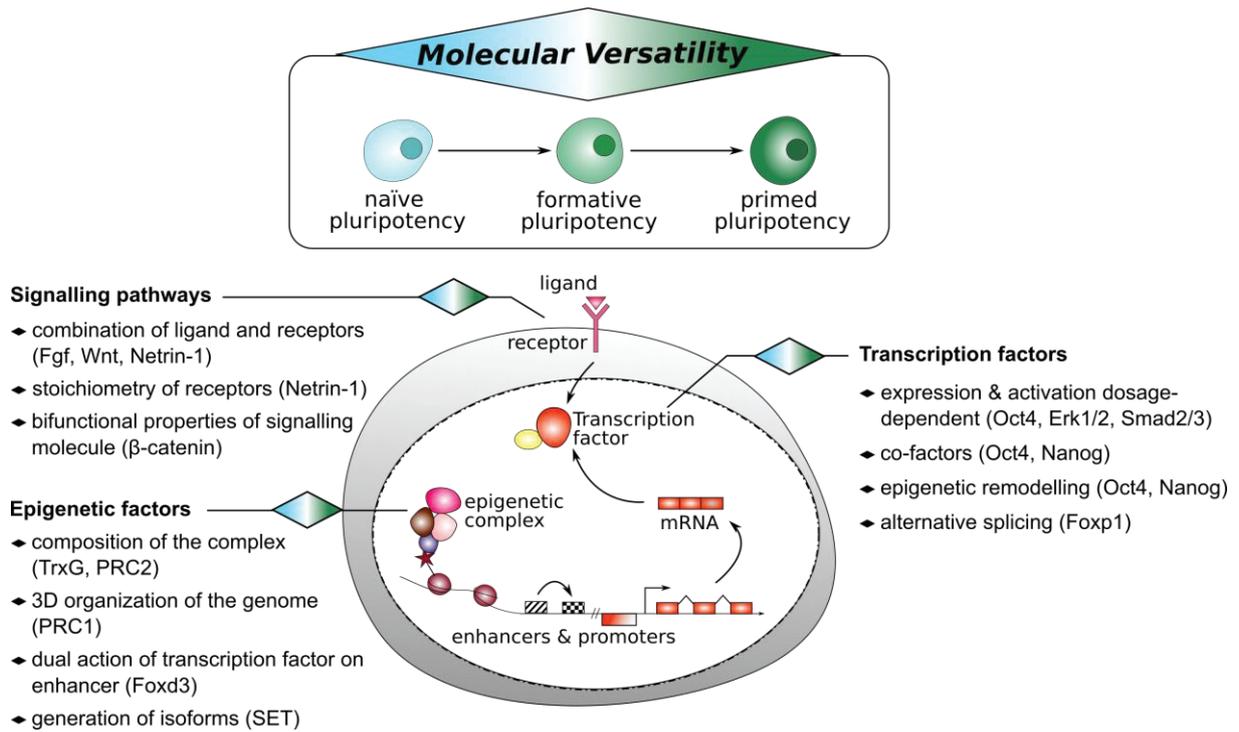


Figure 5. Molecular Versatility during pluripotency progression. The scheme summarizes the different mechanisms highlighted in the Perspective to allow molecules (signalling pathway, TF and epigenetic factors) to exert different functions in closely-related stem cell configurations.

References:

- 1 Mills, J. C., Stanger, B. Z. & Sander, M. Nomenclature for cellular plasticity: are the terms as plastic as the cells themselves? *EMBO J* **38**, e103148, doi:10.15252/embj.2019103148 (2019).
- 2 Zhu, M. & Zernicka-Goetz, M. Principles of Self-Organization of the Mammalian Embryo. *Cell* **183**, 1467-1478, doi:10.1016/j.cell.2020.11.003 (2020).
- 3 Kurimoto, K. *et al.* Quantitative Dynamics of Chromatin Remodeling during Germ Cell Specification from Mouse Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell* **16**, 517-532, doi:10.1016/j.stem.2015.03.002 (2015).
- 4 Kalkan, T. & Smith, A. Mapping the route from naive pluripotency to lineage specification. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **369**, doi:10.1098/rstb.2013.0540 (2014).
- 5 Waddington, C. H. Canalization of development and genetic assimilation of acquired characters. *Nature* **183**, 1654-1655, doi:10.1038/1831654a0 (1959).
- 6 Nichols, J. & Smith, A. Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell* **4**, 487-492, doi:10.1016/j.stem.2009.05.015 (2009).
- 7 Pera, M. F. & Rossant, J. The exploration of pluripotency space: Charting cell state transitions in peri-implantation development. *Cell Stem Cell* **28**, 1896-1906, doi:10.1016/j.stem.2021.10.001 (2021).
- 8 Rossant, J. & Tam, P. P. Blastocyst lineage formation, early embryonic asymmetries and axis patterning in the mouse. *Development* **136**, 701-713, doi:10.1242/dev.017178 (2009).
- 9 Smith, A. Formative pluripotency: the executive phase in a developmental continuum. *Development* **144**, 365-373, doi:10.1242/dev.142679 (2017).
- 10 Evans, M. J. & Kaufman, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**, 154-156, doi:10.1038/292154a0 (1981).
- 11 Tesar, P. J. *et al.* New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* **448**, 196-199, doi:10.1038/nature05972 (2007).
- 12 Kojima, Y. *et al.* The transcriptional and functional properties of mouse epiblast stem cells resemble the anterior primitive streak. *Cell Stem Cell* **14**, 107-120, doi:10.1016/j.stem.2013.09.014 (2014).
- 13 Hayashi, K., Ohta, H., Kurimoto, K., Aramaki, S. & Saitou, M. Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. *Cell* **146**, 519-532, doi:10.1016/j.cell.2011.06.052 (2011).
- 14 Kinoshita, M. *et al.* Capture of Mouse and Human Stem Cells with Features of Formative Pluripotency. *Cell Stem Cell* **28**, 453-471 e458, doi:10.1016/j.stem.2020.11.005 (2021).
- 15 Yu, L. *et al.* Derivation of Intermediate Pluripotent Stem Cells Amenable to Primordial Germ Cell Specification. *Cell Stem Cell* **28**, 550-567 e512, doi:10.1016/j.stem.2020.11.003 (2021).
- 16 Wang, X. *et al.* Formative pluripotent stem cells show features of epiblast cells poised for gastrulation. *Cell Res* **31**, 526-541, doi:10.1038/s41422-021-00477-x (2021).
- 17 Neagu, A. *et al.* In vitro capture and characterization of embryonic rosette-stage pluripotency between naive and primed states. *Nat Cell Biol* **22**, 534-545, doi:10.1038/s41556-020-0508-x (2020).
- 18 Kalkan, T. *et al.* Complementary Activity of ETV5, RBPJ, and TCF3 Drives Formative Transition from Naive Pluripotency. *Cell Stem Cell* **24**, 785-801 e787, doi:10.1016/j.stem.2019.03.017 (2019).
- 19 Dunn, S. J., Martello, G., Yordanov, B., Emmott, S. & Smith, A. G. Defining an essential transcription factor program for naive pluripotency. *Science* **344**, 1156-1160, doi:10.1126/science.1248882 (2014).
- 20 Lackner, A. *et al.* Cooperative genetic networks drive embryonic stem cell transition from naive to formative pluripotency. *EMBO J* **40**, e105776, doi:10.15252/embj.2020105776 (2021).
- 21 Weinberger, L., Ayyash, M., Novershtern, N. & Hanna, J. H. Dynamic stem cell states: naive to primed pluripotency in rodents and humans. *Nat Rev Mol Cell Biol* **17**, 155-169, doi:10.1038/nrm.2015.28 (2016).
- 22 Nichols, J., Chambers, I., Taga, T. & Smith, A. Physiological rationale for responsiveness of mouse embryonic stem cells to gp130 cytokines. *Development* **128**, 2333-2339, doi:10.1242/dev.128.12.2333 (2001).
- 23 Ying, Q. L., Nichols, J., Chambers, I. & Smith, A. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* **115**, 281-292, doi:10.1016/s0092-8674(03)00847-x (2003).
- 24 ten Berge, D. *et al.* Embryonic stem cells require Wnt proteins to prevent differentiation to epiblast stem cells. *Nat Cell Biol* **13**, 1070-1075, doi:10.1038/ncb2314 (2011).
- 25 Ying, Q. L. *et al.* The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* **453**, 519-523, doi:10.1038/nature06968 (2008).
- 26 Huyghe, A. *et al.* Netrin-1 promotes naive pluripotency through Neol and Unc5b co-regulation of Wnt and MAPK signalling. *Nat Cell Biol* **22**, 389-400, doi:10.1038/s41556-020-0483-2 (2020).
- 27 Yamanaka, Y., Lanner, F. & Rossant, J. FGF signal-dependent segregation of primitive endoderm and epiblast in the mouse blastocyst. *Development* **137**, 715-724, doi:10.1242/dev.043471 (2010).

- 28 Kunath, T. *et al.* FGF stimulation of the Erk1/2 signalling cascade triggers transition of pluripotent embryonic stem cells from self-renewal to lineage commitment. *Development* **134**, 2895-2902, doi:10.1242/dev.02880 (2007).
- 29 Kang, M., Garg, V. & Hadjantonakis, A. K. Lineage Establishment and Progression within the Inner Cell Mass of the Mouse Blastocyst Requires FGFR1 and FGFR2. *Dev Cell* **41**, 496-510 e495, doi:10.1016/j.devcel.2017.05.003 (2017).
- 30 Brons, I. G. *et al.* Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* **448**, 191-195, doi:10.1038/nature05950 (2007).
- 31 Boroviak, T. *et al.* Lineage-Specific Profiling Delineates the Emergence and Progression of Naive Pluripotency in Mammalian Embryogenesis. *Dev Cell* **35**, 366-382, doi:10.1016/j.devcel.2015.10.011 (2015).
- 32 Ohnishi, Y. *et al.* Cell-to-cell expression variability followed by signal reinforcement progressively segregates early mouse lineages. *Nat Cell Biol* **16**, 27-37, doi:10.1038/ncb2881 (2014).
- 33 Molotkov, A., Mazot, P., Brewer, J. R., Cinalli, R. M. & Soriano, P. Distinct Requirements for FGFR1 and FGFR2 in Primitive Endoderm Development and Exit from Pluripotency. *Dev Cell* **41**, 511-526 e514, doi:10.1016/j.devcel.2017.05.004 (2017).
- 34 Simon, C. S., Rahman, S., Raina, D., Schroter, C. & Hadjantonakis, A. K. Live Visualization of ERK Activity in the Mouse Blastocyst Reveals Lineage-Specific Signaling Dynamics. *Dev Cell* **55**, 341-353 e345, doi:10.1016/j.devcel.2020.09.030 (2020).
- 35 Lanner, F. *et al.* Heparan sulfation-dependent fibroblast growth factor signaling maintains embryonic stem cells primed for differentiation in a heterogeneous state. *Stem Cells* **28**, 191-200, doi:10.1002/stem.265 (2010).
- 36 Shimokawa, K. *et al.* Cell surface heparan sulfate chains regulate local reception of FGF signaling in the mouse embryo. *Dev Cell* **21**, 257-272, doi:10.1016/j.devcel.2011.06.027 (2011).
- 37 Vasudevan, H. N., Mazot, P., He, F. & Soriano, P. Receptor tyrosine kinases modulate distinct transcriptional programs by differential usage of intracellular pathways. *Elife* **4**, doi:10.7554/eLife.07186 (2015).
- 38 Lanner, F. & Rossant, J. The role of FGF/Erk signaling in pluripotent cells. *Development* **137**, 3351-3360, doi:10.1242/dev.050146 (2010).
- 39 Chen, H. *et al.* Erk signaling is indispensable for genomic stability and self-renewal of mouse embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, E5936-5943, doi:10.1073/pnas.1516319112 (2015).
- 40 Choi, J. *et al.* Prolonged Mek1/2 suppression impairs the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* **548**, 219-223, doi:10.1038/nature23274 (2017).
- 41 Hamilton, W. B. *et al.* Dynamic lineage priming is driven via direct enhancer regulation by ERK. *Nature* **575**, 355-360, doi:10.1038/s41586-019-1732-z (2019).
- 42 Sato, N., Meijer, L., Skaltsounis, L., Greengard, P. & Brivanlou, A. H. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med* **10**, 55-63, doi:10.1038/nm979 (2004).
- 43 Kurek, D. *et al.* Endogenous WNT signals mediate BMP-induced and spontaneous differentiation of epiblast stem cells and human embryonic stem cells. *Stem Cell Reports* **4**, 114-128, doi:10.1016/j.stemcr.2014.11.007 (2015).
- 44 Atlasi, Y. *et al.* Wnt signaling regulates the lineage differentiation potential of mouse embryonic stem cells through Tcf3 down-regulation. *PLoS Genet* **9**, e1003424, doi:10.1371/journal.pgen.1003424 (2013).
- 45 Shy, B. R. *et al.* Regulation of Tcf7l1 DNA binding and protein stability as principal mechanisms of Wnt/beta-catenin signaling. *Cell Rep* **4**, 1-9, doi:10.1016/j.celrep.2013.06.001 (2013).
- 46 Zhang, M. *et al.* beta-Catenin safeguards the ground state of mouse pluripotency by strengthening the robustness of the transcriptional apparatus. *Sci Adv* **6**, eaba1593, doi:10.1126/sciadv.aba1593 (2020).
- 47 Lyashenko, N. *et al.* Differential requirement for the dual functions of beta-catenin in embryonic stem cell self-renewal and germ layer formation. *Nat Cell Biol* **13**, 753-761, doi:10.1038/ncb2260 (2011).
- 48 Singh, A. M. *et al.* Signaling network crosstalk in human pluripotent cells: a Smad2/3-regulated switch that controls the balance between self-renewal and differentiation. *Cell Stem Cell* **10**, 312-326, doi:10.1016/j.stem.2012.01.014 (2012).
- 49 De Jaime-Soguero, A. *et al.* Wnt/Tcf1 pathway restricts embryonic stem cell cycle through activation of the Ink4/Arf locus. *PLoS Genet* **13**, e1006682, doi:10.1371/journal.pgen.1006682 (2017).
- 50 Chatterjee, S. S. *et al.* Inhibition of beta-catenin-TCF1 interaction delays differentiation of mouse embryonic stem cells. *J Cell Biol* **211**, 39-51, doi:10.1083/jcb.201503017 (2015).
- 51 van Amerongen, R., Fuerer, C., Mizutani, M. & Nusse, R. Wnt5a can both activate and repress Wnt/beta-catenin signaling during mouse embryonic development. *Dev Biol* **369**, 101-114, doi:10.1016/j.ydbio.2012.06.020 (2012).

- 52 Schuijers, J. *et al.* Ascl2 acts as an R-spondin/Wnt-responsive switch to control stemness in intestinal crypts. *Cell Stem Cell* **16**, 158-170, doi:10.1016/j.stem.2014.12.006 (2015).
- 53 Pauklin, S. & Vallier, L. Activin/Nodal signalling in stem cells. *Development* **142**, 607-619, doi:10.1242/dev.091769 (2015).
- 54 Ashida, Y., Nakajima-Koyama, M., Hirota, A., Yamamoto, T. & Nishida, E. Activin A in combination with ERK1/2 MAPK pathway inhibition sustains propagation of mouse embryonic stem cells. *Genes Cells* **22**, 189-202, doi:10.1111/gtc.12467 (2017).
- 55 Ogawa, K. *et al.* Activin-Nodal signaling is involved in propagation of mouse embryonic stem cells. *J Cell Sci* **120**, 55-65, doi:10.1242/jcs.03296 (2007).
- 56 Lee, K. L. *et al.* Graded Nodal/Activin signaling titrates conversion of quantitative phospho-Smad2 levels into qualitative embryonic stem cell fate decisions. *PLoS Genet* **7**, e1002130, doi:10.1371/journal.pgen.1002130 (2011).
- 57 Serafini, T. *et al.* The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell* **78**, 409-424, doi:10.1016/0092-8674(94)90420-0 (1994).
- 58 Rajagopalan, S. *et al.* Neogenin mediates the action of repulsive guidance molecule. *Nat Cell Biol* **6**, 756-762, doi:10.1038/ncb1156 (2004).
- 59 Llimargas, M. & Lawrence, P. A. Seven Wnt homologues in *Drosophila*: a case study of the developing tracheae. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 14487-14492, doi:10.1073/pnas.251304398 (2001).
- 60 Edson, M. A. *et al.* Granulosa cell-expressed BMPR1A and BMPR1B have unique functions in regulating fertility but act redundantly to suppress ovarian tumor development. *Mol Endocrinol* **24**, 1251-1266, doi:10.1210/me.2009-0461 (2010).
- 61 Robinson, R. A. *et al.* Simultaneous binding of Guidance Cues NET1 and RGM blocks extracellular NEO1 signaling. *Cell* **184**, 2103-2120 e2131, doi:10.1016/j.cell.2021.02.045 (2021).
- 62 Antebi, Y. E. *et al.* Combinatorial Signal Perception in the BMP Pathway. *Cell* **170**, 1184-1196 e1124, doi:10.1016/j.cell.2017.08.015 (2017).
- 63 Su, C. J. *et al.* Ligand-receptor promiscuity enables cellular addressing. *Cell Syst* **13**, 408-425 e412, doi:10.1016/j.cels.2022.03.001 (2022).
- 64 Corsinotti, A. *et al.* Distinct SoxB1 networks are required for naive and primed pluripotency. *Elife* **6**, doi:10.7554/eLife.27746 (2017).
- 65 Lu, R., Yang, A. & Jin, Y. Dual functions of T-box 3 (Tbx3) in the control of self-renewal and extraembryonic endoderm differentiation in mouse embryonic stem cells. *J Biol Chem* **286**, 8425-8436, doi:10.1074/jbc.M110.202150 (2011).
- 66 Herchcovici Levy, S. *et al.* Esrrb is a cell-cycle-dependent associated factor balancing pluripotency and XEN differentiation. *Stem Cell Reports* **17**, 1334-1350, doi:10.1016/j.stemcr.2022.04.016 (2022).
- 67 Karwacki-Neisius, V. *et al.* Reduced Oct4 expression directs a robust pluripotent state with distinct signaling activity and increased enhancer occupancy by Oct4 and Nanog. *Cell Stem Cell* **12**, 531-545, doi:10.1016/j.stem.2013.04.023 (2013).
- 68 Thomson, M. *et al.* Pluripotency factors in embryonic stem cells regulate differentiation into germ layers. *Cell* **145**, 875-889, doi:10.1016/j.cell.2011.05.017 (2011).
- 69 Loh, K. M. & Lim, B. A precarious balance: pluripotency factors as lineage specifiers. *Cell Stem Cell* **8**, 363-369, doi:10.1016/j.stem.2011.03.013 (2011).
- 70 Silva, J. & Smith, A. Capturing pluripotency. *Cell* **132**, 532-536, doi:10.1016/j.cell.2008.02.006 (2008).
- 71 Hu, M. *et al.* Multilineage gene expression precedes commitment in the hemopoietic system. *Genes Dev* **11**, 774-785, doi:10.1101/gad.11.6.774 (1997).
- 72 Radzisheuskaya, A. *et al.* A defined Oct4 level governs cell state transitions of pluripotency entry and differentiation into all embryonic lineages. *Nat Cell Biol* **15**, 579-590, doi:10.1038/ncb2742 (2013).
- 73 Osorno, R. *et al.* The developmental dismantling of pluripotency is reversed by ectopic Oct4 expression. *Development* **139**, 2288-2298, doi:10.1242/dev.078071 (2012).
- 74 Frum, T. *et al.* Oct4 cell-autonomously promotes primitive endoderm development in the mouse blastocyst. *Dev Cell* **25**, 610-622, doi:10.1016/j.devcel.2013.05.004 (2013).
- 75 Buecker, C. *et al.* Reorganization of enhancer patterns in transition from naive to primed pluripotency. *Cell Stem Cell* **14**, 838-853, doi:10.1016/j.stem.2014.04.003 (2014).
- 76 Yang, S. H. *et al.* Otx2 and Oct4 drive early enhancer activation during embryonic stem cell transition from naive pluripotency. *Cell Rep* **7**, 1968-1981, doi:10.1016/j.celrep.2014.05.037 (2014).
- 77 Galonska, C., Ziller, M. J., Karnik, R. & Meissner, A. Ground State Conditions Induce Rapid Reorganization of Core Pluripotency Factor Binding before Global Epigenetic Reprogramming. *Cell Stem Cell* **17**, 462-470, doi:10.1016/j.stem.2015.07.005 (2015).
- 78 Aksoy, I. *et al.* Oct4 switches partnering from Sox2 to Sox17 to reinterpret the enhancer code and specify endoderm. *EMBO J* **32**, 938-953, doi:10.1038/emboj.2013.31 (2013).

- 79 Sohn, E. J., Moon, H. J., Lim, J. K., Kim, D. S. & Kim, J. H. Regulation of the protein stability and transcriptional activity of OCT4 in stem cells. *Adv Biol Regul*, 100777, doi:10.1016/j.jbior.2020.100777 (2020).
- 80 Niwa, H., Miyazaki, J. & Smith, A. G. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* **24**, 372-376, doi:10.1038/74199 (2000).
- 81 Strebinger, D. *et al.* Endogenous fluctuations of OCT4 and SOX2 bias pluripotent cell fate decisions. *Mol Syst Biol* **15**, e9002, doi:10.15252/msb.20199002 (2019).
- 82 Stuart, H. T. *et al.* Distinct Molecular Trajectories Converge to Induce Naive Pluripotency. *Cell Stem Cell* **25**, 388-406 e388, doi:10.1016/j.stem.2019.07.009 (2019).
- 83 Velychko, S. *et al.* Excluding Oct4 from Yamanaka Cocktail Unleashes the Developmental Potential of iPSCs. *Cell Stem Cell* **25**, 737-753 e734, doi:10.1016/j.stem.2019.10.002 (2019).
- 84 Silva, J. *et al.* Nanog is the gateway to the pluripotent ground state. *Cell* **138**, 722-737, doi:10.1016/j.cell.2009.07.039 (2009).
- 85 Singh, A. M., Hamazaki, T., Hankowski, K. E. & Terada, N. A heterogeneous expression pattern for Nanog in embryonic stem cells. *Stem Cells* **25**, 2534-2542, doi:10.1634/stemcells.2007-0126 (2007).
- 86 Barral, A. *et al.* Nanog regulates Pou3f1 expression at the exit from pluripotency during gastrulation. *Biol Open* **8**, doi:10.1242/bio.046367 (2019).
- 87 Chambers, I. *et al.* Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature* **450**, 1230-1234, doi:10.1038/nature06403 (2007).
- 88 Murakami, K. *et al.* NANOG alone induces germ cells in primed epiblast in vitro by activation of enhancers. *Nature* **529**, 403-407, doi:10.1038/nature16480 (2016).
- 89 Han, H. *et al.* MBNL proteins repress ES-cell-specific alternative splicing and reprogramming. *Nature* **498**, 241-245, doi:10.1038/nature12270 (2013).
- 90 Gabut, M. *et al.* An alternative splicing switch regulates embryonic stem cell pluripotency and reprogramming. *Cell* **147**, 132-146, doi:10.1016/j.cell.2011.08.023 (2011).
- 91 Cirera-Salinas, D. *et al.* Noncanonical function of DGCR8 controls mESC exit from pluripotency. *J Cell Biol* **216**, 355-366, doi:10.1083/jcb.201606073 (2017).
- 92 Schlesinger, S. & Meshorer, E. Open Chromatin, Epigenetic Plasticity, and Nuclear Organization in Pluripotency. *Dev Cell* **48**, 135-150, doi:10.1016/j.devcel.2019.01.003 (2019).
- 93 Yang, P. *et al.* Multi-omic Profiling Reveals Dynamics of the Phased Progression of Pluripotency. *Cell Syst* **8**, 427-445 e410, doi:10.1016/j.cels.2019.03.012 (2019).
- 94 Joshi, O. *et al.* Dynamic Reorganization of Extremely Long-Range Promoter-Promoter Interactions between Two States of Pluripotency. *Cell Stem Cell* **17**, 748-757, doi:10.1016/j.stem.2015.11.010 (2015).
- 95 Calo, E. & Wysocka, J. Modification of enhancer chromatin: what, how, and why? *Mol Cell* **49**, 825-837, doi:10.1016/j.molcel.2013.01.038 (2013).
- 96 Shlyueva, D., Stampfel, G. & Stark, A. Transcriptional enhancers: from properties to genome-wide predictions. *Nat Rev Genet* **15**, 272-286, doi:10.1038/nrg3682 (2014).
- 97 Choi, H. W. *et al.* Distinct Enhancer Activity of Oct4 in Naive and Primed Mouse Pluripotency. *Stem Cell Reports* **7**, 911-926, doi:10.1016/j.stemcr.2016.09.012 (2016).
- 98 Krishnakumar, R. *et al.* FOXD3 Regulates Pluripotent Stem Cell Potential by Simultaneously Initiating and Repressing Enhancer Activity. *Cell Stem Cell* **18**, 104-117, doi:10.1016/j.stem.2015.10.003 (2016).
- 99 Zentner, G. E., Tesar, P. J. & Scacheri, P. C. Epigenetic signatures distinguish multiple classes of enhancers with distinct cellular functions. *Genome Res* **21**, 1273-1283, doi:10.1101/gr.122382.111 (2011).
- 100 Respuela, P. *et al.* Foxd3 Promotes Exit from Naive Pluripotency through Enhancer Decommissioning and Inhibits Germline Specification. *Cell Stem Cell* **18**, 118-133, doi:10.1016/j.stem.2015.09.010 (2016).
- 101 Factor, D. C. *et al.* Epigenomic comparison reveals activation of "seed" enhancers during transition from naive to primed pluripotency. *Cell Stem Cell* **14**, 854-863, doi:10.1016/j.stem.2014.05.005 (2014).
- 102 Chen, A. F. *et al.* GRHL2-Dependent Enhancer Switching Maintains a Pluripotent Stem Cell Transcriptional Subnetwork after Exit from Naive Pluripotency. *Cell Stem Cell* **23**, 226-238 e224, doi:10.1016/j.stem.2018.06.005 (2018).
- 103 Edupuganti, R. R. *et al.* Alternative SET/TAFI Promoters Regulate Embryonic Stem Cell Differentiation. *Stem Cell Reports* **9**, 1291-1303, doi:10.1016/j.stemcr.2017.08.021 (2017).
- 104 Greenberg, M., Teissandier, A., Walter, M., Noordermeer, D. & Bourc'his, D. Dynamic enhancer partitioning instructs activation of a growth-related gene during exit from naive pluripotency. *Elife* **8**, doi:10.7554/eLife.44057 (2019).
- 105 Greenberg, M. V. *et al.* Transient transcription in the early embryo sets an epigenetic state that programs postnatal growth. *Nat Genet* **49**, 110-118, doi:10.1038/ng.3718 (2017).
- 106 Schuettengruber, B., Martinez, A. M., Iovino, N. & Cavalli, G. Trithorax group proteins: switching genes on and keeping them active. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**, 799-814, doi:10.1038/nrm3230 (2011).

107 Ang, Y. S. *et al.* Wdr5 mediates self-renewal and reprogramming via the embryonic stem cell core
transcriptional network. *Cell* **145**, 183-197, doi:10.1016/j.cell.2011.03.003 (2011).

108 Wan, M. *et al.* The trithorax group protein Ash2l is essential for pluripotency and maintaining open
chromatin in embryonic stem cells. *J Biol Chem* **288**, 5039-5048, doi:10.1074/jbc.M112.424515 (2013).

109 Jiang, H. *et al.* Role for Dpy-30 in ES cell-fate specification by regulation of H3K4 methylation within
bivalent domains. *Cell* **144**, 513-525, doi:10.1016/j.cell.2011.01.020 (2011).

110 Zhang, H. *et al.* MLL1 Inhibition Reprograms Epiblast Stem Cells to Naive Pluripotency. *Cell Stem Cell*
18, 481-494, doi:10.1016/j.stem.2016.02.004 (2016).

111 Boyer, L. A. *et al.* Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem
cells. *Nature* **441**, 349-353, doi:10.1038/nature04733 (2006).

112 Ku, M. *et al.* Genomewide analysis of PRC1 and PRC2 occupancy identifies two classes of bivalent
domains. *PLoS Genet* **4**, e1000242, doi:10.1371/journal.pgen.1000242 (2008).

113 Endoh, M. *et al.* Polycomb group proteins Ring1A/B are functionally linked to the core transcriptional
regulatory circuitry to maintain ES cell identity. *Development* **135**, 1513-1524, doi:10.1242/dev.014340
(2008).

114 Camahort, R. & Cowan, C. A. Cbx proteins help ESCs walk the line between self-renewal and
differentiation. *Cell Stem Cell* **10**, 4-6, doi:10.1016/j.stem.2011.12.011 (2012).

115 van Mierlo, G. *et al.* Integrative Proteomic Profiling Reveals PRC2-Dependent Epigenetic Crosstalk
Maintains Ground-State Pluripotency. *Cell Stem Cell* **24**, 123-137 e128, doi:10.1016/j.stem.2018.10.017
(2019).

116 Loh, C. H., van Genesen, S., Perino, M., Bark, M. R. & Veenstra, G. J. C. Loss of PRC2 subunits primes
lineage choice during exit of pluripotency. *Nat Commun* **12**, 6985, doi:10.1038/s41467-021-27314-4
(2021).

117 Shan, Y. *et al.* PRC2 specifies ectoderm lineages and maintains pluripotency in primed but not naive
ESCs. *Nat Commun* **8**, 672, doi:10.1038/s41467-017-00668-4 (2017).

118 O'Loughlen, A. *et al.* MicroRNA regulation of Cbx7 mediates a switch of Polycomb orthologs during ESC
differentiation. *Cell Stem Cell* **10**, 33-46, doi:10.1016/j.stem.2011.12.004 (2012).

119 Morey, L. *et al.* Nonoverlapping functions of the Polycomb group Cbx family of proteins in embryonic
stem cells. *Cell Stem Cell* **10**, 47-62, doi:10.1016/j.stem.2011.12.006 (2012).

120 Leeb, M. *et al.* Polycomb complexes act redundantly to repress genomic repeats and genes. *Genes Dev*
24, 265-276, doi:10.1101/gad.544410 (2010).

121 Zdzienko, D. *et al.* Pcgf6, a polycomb group protein, regulates mesodermal lineage differentiation in
murine ESCs and functions in iPS reprogramming. *Stem Cells* **32**, 3112-3125, doi:10.1002/stem.1826
(2014).

122 Zepeda-Martinez, J. A. *et al.* Parallel PRC2/cPRC1 and vPRC1 pathways silence lineage-specific genes
and maintain self-renewal in mouse embryonic stem cells. *Sci Adv* **6**, eaax5692,
doi:10.1126/sciadv.aax5692 (2020).

123 Fursova, N. A. *et al.* Synergy between Variant PRC1 Complexes Defines Polycomb-Mediated Gene
Repression. *Mol Cell* **74**, 1020-1036 e1028, doi:10.1016/j.molcel.2019.03.024 (2019).

124 Brookes, E. *et al.* Polycomb associates genome-wide with a specific RNA polymerase II variant, and
regulates metabolic genes in ESCs. *Cell Stem Cell* **10**, 157-170, doi:10.1016/j.stem.2011.12.017 (2012).

125 Kar, G. *et al.* Flipping between Polycomb repressed and active transcriptional states introduces noise in
gene expression. *Nat Commun* **8**, 36, doi:10.1038/s41467-017-00052-2 (2017).

126 Eldar, A. & Elowitz, M. B. Functional roles for noise in genetic circuits. *Nature* **467**, 167-173,
doi:10.1038/nature09326 (2010).

127 Creppe, C., Palau, A., Malinverni, R., Valero, V. & Buschbeck, M. A Cbx8-containing polycomb
complex facilitates the transition to gene activation during ES cell differentiation. *PLoS Genet* **10**,
e1004851, doi:10.1371/journal.pgen.1004851 (2014).

128 Morey, L. *et al.* Polycomb Regulates Mesoderm Cell Fate-Specification in Embryonic Stem Cells through
Activation and Repression Mechanisms. *Cell Stem Cell* **17**, 300-315, doi:10.1016/j.stem.2015.08.009
(2015).

129 Chen, X. *et al.* Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in
embryonic stem cells. *Cell* **133**, 1106-1117, doi:10.1016/j.cell.2008.04.043 (2008).

130 Kagey, M. H. *et al.* Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture. *Nature*
467, 430-435, doi:10.1038/nature09380 (2010).

131 Senft, A. D. *et al.* Combinatorial Smad2/3 Activities Downstream of Nodal Signaling Maintain
Embryonic/Extra-Embryonic Cell Identities during Lineage Priming. *Cell Rep* **24**, 1977-1985 e1977,
doi:10.1016/j.celrep.2018.07.077 (2018).

132 Lin, Y. *et al.* Snail1-dependent control of embryonic stem cell pluripotency and lineage commitment. *Nat
Commun* **5**, 3070, doi:10.1038/ncomms4070 (2014).

- 133 Ozmadenci, D. *et al.* Netrin-1 regulates somatic cell reprogramming and pluripotency maintenance. *Nat Commun* **6**, 7398, doi:10.1038/ncomms8398 (2015).
- 134 Davies, O. R. *et al.* Tcf15 primes pluripotent cells for differentiation. *Cell Rep* **3**, 472-484, doi:10.1016/j.celrep.2013.01.017 (2013).
- 135 Betschinger, J. *et al.* Exit from pluripotency is gated by intracellular redistribution of the bHLH transcription factor Tfe3. *Cell* **153**, 335-347, doi:10.1016/j.cell.2013.03.012 (2013).
- 136 Villegas, F. *et al.* Lysosomal Signaling Licenses Embryonic Stem Cell Differentiation via Inactivation of Tfe3. *Cell Stem Cell* **24**, 257-270 e258, doi:10.1016/j.stem.2018.11.021 (2019).
- 137 Malaguti, M., Migueles, R. P., Blin, G., Lin, C. Y. & Lowell, S. Id1 Stabilizes Epiblast Identity by Sensing Delays in Nodal Activation and Adjusting the Timing of Differentiation. *Dev Cell* **50**, 462-477 e465, doi:10.1016/j.devcel.2019.05.032 (2019).