



**HAL**  
open science

# Bases moléculaires du contrôle de l'équilibre entre autorenouvellement et différenciation

Camila Mejia Perez Pous

► **To cite this version:**

Camila Mejia Perez Pous. Bases moléculaires du contrôle de l'équilibre entre autorenouvellement et différenciation. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2010. Français. NNT : 2010LYO10130 . tel-00834216

**HAL Id: tel-00834216**

**<https://theses.hal.science/tel-00834216>**

Submitted on 14 Jun 2013

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

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

THÈSE DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

Délivrée par  
L'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON 1

ÉCOLE DOCTORALE BMIC  
« BIOLOGIE MOLÉCULAIRE INTEGRÉE ET CELLULAIRE »

DIPLÔME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

Soutenue publiquement le vendredi 3 septembre 2010

Par

**MME CAMILA MEJÍA - POUS**

---

**BASES MOLÉCULAIRES DU CONTRÔLE DE  
L'ÉQUILIBRE ENTRE  
AUTORENOUVELLEMENT ET DIFFÉRENCIATION**

---

DIRECTEUR DE RECHERCHE : **Dr. Olivier GANDRILLON**

JURY : Pr. Jérôme LAMARTINE  
Dr. Patrick MAYEUX  
Dr. Christine TRAN-QUANG



---

# REMERCIEMENTS

---

Ecrire les remerciements est un exercice difficile... Pas par manque d'inspiration, bien au contraire : j'ai peur de recommencer un nouveau manuscrit si je devais dire tout le bien que je pense des personnes qui m'ont entourée au cours de ces dernières années. Je vais donc essayer de faire court (et ceux qui me connaissent savent à quel point cela m'est difficile !)

Tout d'abord, je tiens à remercier Christine Tran-Quang et Patrick Mayeux d'avoir accepté de réviser mon manuscrit, ainsi que Jérôme Lamartine de faire partie de mon Jury.

Je remercie bien évidemment mon directeur, Olivier Gandrillon, sans qui je n'aurais pas tant avancé au cours de ces années passées dans son équipe. Merci de m'avoir soutenu, encouragé, cadré, encadré, recadré. Impossible de dire tout ce que ces années m'ont apporté sur le plan professionnel, relationnel et, même, « politico-militantiel ». Les leçons que j'ai tirées, j'en suis persuadée, m'aideront tout au long de mon parcours en orientant mes choix de chercheur, ma relation avec mes collègues et ma curiosité scientifique.

Je remercie également Sandrine, un pilier de l'équipe, mais avant tout une personne ouverte, attentive, gentille... Bref, une source de force et de réconfort que j'ai toujours appréciée. Merci de m'avoir aidé à franchir des étapes clés, parfois difficiles, au cours de ces années. Merci d'avoir cru en moi quand moi-même je doutais, et merci de m'avoir donné la motivation et le courage quand j'ai du rebondir.

J'hésite à remercier Corinne Bresson... Pourquoi remercier quelqu'un qui m'est absolument indispensable et qui m'a laissé finir ma thèse toute seule ? J'espère juste que ce paragraphe n'est pas nécessaire pour qu'elle sache à quel point son amitié m'est précieuse et à quel point je la remercie de m'avoir aidé, que ce soit au labo, au cours de mes premières années de thèse, ou en assistance 24h/24 7j/7 par la suite.

Chère équipe BM2A, je te remercie aussi. Je suis reconnaissante d'avoir fait partie de ce que je considère comme « une manipe qui marche bien » : on met un tas de choses différentes dedans, on peut changer certains réactifs, ajouter ou enlever des catalyseurs, on improvise parfois ; selon la RT (*room temperature*) on n'obtient pas les mêmes choses (la bio, quoi !) ; mais j'ai l'impression que, de manière générale, quelque chose de bien sort toujours de tout ça. Parfois ça ne marche pas comme on l'attendait, mais il suffit de changer l'eau et hop ! C'est reparti ! Merci aussi au CGMC, ce grand incubateur qui m'a modelée. C'est un laboratoire où je me suis toujours très bien sentie et je suis persuadée que le quitter ne me sera pas facile.

Merci à mes amis ; j'ai la chance de ne pas pouvoir énumérer toutes ces personnes incroyables. J'espère vous garder auprès de moi un bon bout de temps. Vous me ressourcez.

Je remercie ma famille, grâce à qui j'en suis là. Je suis fière et honorée d'arborer leurs gènes et leurs valeurs. J'espère en faire le meilleur usage possible.

Enfin, je remercie mon plus grand collaborateur. De toute évidence, notre binôme marche, puisqu'il a décidé de me garder après ma thèse. Je me suis construite et reconstruite dans cet équilibre qui rend tout possible. Merci à lui.



## TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES.....	I
TABLE DES ILLUSTRATIONS .....	III
INTRODUCTION.....	1
<b>1 CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>5</b>
1.1 LA CELLULE SOUCHE .....	5
1.1.1 Définition et Modèles .....	5
1.1.1.1 Cellule souche et autorenouvellement .....	5
1.1.1.2 Les cellules souches embryonnaires .....	8
1.1.1.3 Les cellules souches adultes ou somatiques .....	9
1.1.1.3.1 Les cellules souches nerveuses.....	9
1.1.1.3.2 Les cellules souches hématopoïétiques .....	10
1.1.2 Autorenouvellement et Homéostasie.....	11
1.1.2.1 Mécanismes et facteurs intrinsèques.....	11
1.1.2.1.1 Contrôle du cycle cellulaire .....	12
1.1.2.1.2 Maintien de l'intégrité génomique .....	14
1.1.2.2 Autorenouvellement et différenciation.....	17
1.1.2.2.1 Les divisions asymétriques .....	18
1.1.2.2.2 Cellule souche et différenciation .....	20
1.1.3 Le Concept de « Niche ».....	21
1.1.3.1 La niche : un mécanisme de contrôle extrinsèque et local.....	21
1.1.3.2 Interactions avec d'autres cellules .....	22
1.1.3.3 Facteurs sécrétés.....	23
1.1.3.4 Interactions avec la matrice extracellulaire .....	23
1.2 LES PROGENITEURS .....	25
1.2.1 Pertinence et Avantages des Progéniteurs.....	25
1.2.1.1 L'autorenouvellement : exclusivité des cellules souches ? .....	26
1.2.1.2 Progéniteurs et autorenouvellement .....	27
1.2.1.3 Les progéniteurs : un modèle pertinent et avantageux.....	28
1.2.2 L'érythropoïèse : Une Source de Progéniteurs Diversifiée.....	29
1.2.2.1 Les différents stades de l'érythropoïèse .....	30
1.2.2.1.1 Le stade CFU-GEMM .....	30
1.2.2.1.2 Le stade BFU-e .....	30
1.2.2.1.3 Le stade CFU-e.....	31
1.2.2.2 L'érythropoïétine et son récepteur .....	31
1.2.2.3 L'érythropoïèse de stress .....	31
1.2.3 Les Progéniteurs et l'Etude de l'Autorenouvellement .....	32
1.2.3.1 Modèles <i>in vitro</i> .....	32
1.2.3.1.1 Les lignées humaines .....	33
1.2.3.1.2 Les lignées murines .....	34
1.2.3.1.3 Les lignées aviaires .....	35
1.2.3.2 Les T2ECs : un modèle <i>ex vivo</i> .....	35
1.2.3.2.1 Les modèles <i>ex vivo</i> : avantages et difficultés.....	35
1.2.3.2.2 Les T2ECs .....	36
1.3 LES BASES MOLECULAIRES DE L'AUTORENOUVELLEMENT .....	39
1.3.1 A la Recherche du Master Switch .....	39
1.3.1.1 Le transcriptome : le premier pas.....	40
1.3.1.2 La « signature moléculaire » des cellules souches.....	41
1.3.1.3 Les « gènes souche » : une recherche inutile ? .....	43
1.3.2 La « Souchitude » : Etat ou Entité ?.....	45

## TABLE DES MATIERES

1.3.2.1	La plasticité des cellules souches : une ou plusieurs cellules souches ? .....	45
1.3.2.2	Une autre vision de la souchitude ?.....	48
1.3.2.3	Rôle de la stochasticité de l'expression génique dans la différenciation cellulaire .....	51
1.3.3	<i>Vers la Compréhension des Réseaux et des Fonctions Cellulaires</i> .....	54
1.3.3.1	Réseaux de régulation et voies de signalisation .....	55
1.3.3.2	Classes de gènes et grandes fonctions .....	58
1.4	CONCLUSION.....	60
<b>2</b>	<b>RESULTATS</b> .....	<b>63</b>
2.1	SYSTEMES DE GENETIQUE FONCTIONNELLE.....	63
2.1.1	<i>Optimisation des Conditions de Transfection</i> .....	63
2.1.1.1	Programme de nucléofection et milieu de reprise .....	63
2.1.1.2	Volume de reprise.....	65
2.1.2	<i>Système de Sous-expression d'un Gène Candidat par RNAi</i> .....	65
2.1.2.1	Principe .....	65
2.1.2.2	Un exemple d'utilisation : l'inhibition de l'OSC/LSS.....	67
2.1.2.3	Mise en place d'un contrôle pertinent et pratique pour les approches shRNA .....	68
2.1.3	<i>Mise en Place d'un Système d'Expression Stable</i> .....	71
2.1.3.1	Présentation du système mis en place.....	71
2.1.3.2	Publication : Association Tol2 et MACS : Mise en place et validation .....	72
2.2	OSC & EQUILIBRE ENTRE AUTORENOUVELLEMENT & DIFFERENCIATION .....	86
2.2.1	<i>La Synthèse du Cholestérol : Une Fonction Dans l'Autorenouvellement ?</i> .....	86
2.2.1.1	Contrôle de l'homéostasie du cholestérol cellulaire.....	88
2.2.1.2	Le cholestérol : un organisateur des membranes.....	89
2.2.1.3	Cholestérol & contrôle de l'autorenouvellement.....	91
2.2.1.3.1	Cholestérol, radeaux lipidiques & signalisation .....	91
2.2.1.3.2	Cholestérol & signalisation Hedgehog.....	92
2.2.1.3.3	Cholestérol & apoptose.....	93
2.2.2	<i>Présentation des Résultats Obtenus</i> .....	94
2.2.2.1	Rôle de l'OSC dans le choix autorenouvellement vs. différenciation .....	94
2.2.2.2	Utilisation du système Tol2/MACS pour la sur-expression de l'OSC .....	95
2.2.2.2.1	Matériel et Méthodes .....	96
2.2.2.2.2	Résultats .....	98
2.2.2.2.3	Conclusion.....	100
2.2.3	<i>Publication : OSC, Synthèse du Cholestérol et Contrôle de l'Autorenouvellement</i> .....	101
2.3	DIFFERENCIATION & STOCHASTICITE .....	129
2.3.1	<i>Différenciation &amp; Stochasticité : deux observations intrigantes.</i> .....	129
2.3.1.1	Effet de la température sur la différenciation de T2ECs.....	129
2.3.1.2	Mesure d'un indicateur de stochasticité lors de la différenciation .....	131
2.3.2	<i>Suivi de l'Expression Génique en Temps Réel</i> .....	134
2.3.2.1	Visualisation des rapporteurs fluorescents.....	135
2.3.2.1.1	Matériel et Méthodes .....	135
2.3.2.1.2	Résultats .....	135
2.3.2.2	Individualisation des cellules uniques.....	139
2.3.2.3	Validation des outils mis en place.....	142
2.3.3	<i>Publication : Bases Moléculaires de la Stochasticité de l'Expression Génique</i> .....	143
<b>3</b>	<b>DISCUSSION &amp; CONCLUSIONS</b> .....	<b>165</b>
3.1	CHOLESTEROL, OSC & AUTORENOUVELLEMENT .....	165
3.2	STOCHASTICITE, AUTORENOUVELLEMENT & DIFFERENCIATION .....	170
3.3	CONCLUSION.....	174
<b>4</b>	<b>REFERENCES</b> .....	<b>177</b>
<b>5</b>	<b>ANNEXES</b> .....	<b>201</b>
5.1	GLOSSAIRE .....	201
5.2	LISTE DES ABREVIATIONS .....	203

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURE 1-1 : CELLULES SOUCHES : ORIGINE ET POTENTIEL DIFFERENCIATION .....	7
FIGURE 1-2 : CONTROLE DU CYCLE CELLULAIRE .....	13
FIGURE 1-3 : LES DIVISIONS ASYMETRIQUES.....	20
FIGURE 1-4 : COMPARAISON DES ETUDES ANALYSANT LE TRANSCRIPTOME .....	43
FIGURE 1-5 : LE DEVENIR D'UNE CELLULE SOUCHE .....	48
FIGURE 1-6 : DEUX VISIONS ALTERNATIVES DE LA DETERMINATION DU POTENTIEL D'UNE CELLULE SOUCHE.....	49
FIGURE 1-7 : DEUX MODELES DE DIFFERENCIATION CELLULAIRE .....	53
FIGURE 2-1 : TEST DU PROGRAMME DE NUCLEOFECTON ET DU MILIEU DE REPRISE.....	64
FIGURE 2-2 : TEST DU VOLUME ET DU MILIEU DE REPRISE .....	65
FIGURE 2-3 : PRINCIPE DE L'INTERFERENCE A L'ARN.....	66
FIGURE 2-4 : INHIBITION DE L'OSC/LSS INDUITE PAR L'EXPRESSION DES SHRNA.....	68
FIGURE 2-5 : EFFET DU SHRNA DIRIGE CONTRE LA GFP EXOGENE.....	69
FIGURE 2-6 : TEST DES SHRNA DIRIGES CONTRE LA LUCIFERASE .....	70
FIGURE 2-7 : VOIE DE LA BIOSYNTHESE DU CHOLESTEROL ET VOIE ALTERNATIVE DE LA SYNTHESE DU OXYSTEROL.....	87
FIGURE 2-8 : DETECTION DE L'EXPRESSION DE L'OSC.FLAG PAR WESTERN BLOT ET PAR QPCR.....	99
FIGURE 2-9 : ANALYSE PAR FACS DE L'EXPRESSION DU MARQUEUR ΔHCD4 ET/OU DE LA EGFP.....	100
FIGURE 2-10 : EFFET DE LA TEMPERATURE SUR LA DIFFERENCIATION DES T2ECs.....	130
FIGURE 2-11 : EVOLUTION DE L'EXPRESSION DES MARQUEURS CELLULAIRES AU COURS DE LA DIFFERENCIATION. ....	133
FIGURE 2-12 : SPECTRES CARACTERISANT LES PROTEINES FLUORESCENTES UTILISEES.....	136
FIGURE 2-13 : STRATEGIE DE COMPENSATION UTILISEE POUR DISTINGUER LES SIGNAUX FLUORESCENTS DETECTES .....	138
FIGURE 2-14 : CULTURE EN PUIITS MOULES DANS DU PDMS.....	140
FIGURE 2-15 : MODELE DE PUIITS MOULES EN PDMS ADAPTES AU T2ECs .....	141
FIGURE 2-16 : MORPHOLOGIE DES TECS.....	141
FIGURE 3-1 : CONTROLE DU DEVENIR DES CELLULES EN ETAT D'AUTORENOUVELLEMENT. ....	169
FIGURE 3-2 : LA DIFFERENCIATION COMME UN PROCESSUS D'ADAPTATION .....	176





## INTRODUCTION

Le terme « cellule souche » apparaît dans la littérature scientifique dès 1868, dans les travaux du biologiste allemand Ernst Haeckel. Partisan de la théorie de l'évolution de Darwin, Haeckel a dessiné un certain nombre d'arbres représentant l'évolution des organismes par filiation à partir d'ancêtres communs. Il a appelé ces arbres « *Stammbaume* » (« arbres souche » en allemand ou arbres généalogiques) et, dans ce contexte, Haeckel a utilisé le terme « *Stammzelle* » (cellule souche en allemand), pour décrire l'ancêtre unicellulaire à partir duquel auraient évolué tous les organismes multicellulaires (Haeckel, 1868a; Haeckel, 1868b). En 1877, Haeckel va plus loin et, de manière analogue à sa théorie de la phylogénie de l'évolution, il propose en embryologie que l'ovule fécondé donnant lieu à l'ensemble des cellules de l'organisme peut également être appelé « *Stammzelle* » (Haeckel, 1877). A la même époque, la recherche sur le développement et la régénération du système sanguin (ou hématopoïétique) a soulevé la question de l'existence d'un précurseur commun des différents types de cellules du sang. Ainsi, dès 1896, Pappenheim a repris le terme « *Stammzelle* » pour décrire une cellule susceptible d'être à l'origine à la fois des globules rouges et des globules blancs (Pappenheim, 1896). Au début du 20<sup>ème</sup> siècle, certains hématologistes, dont Alexander Maximow (Maximow, 1909), vont plus loin et proposent l'existence d'un précurseur commun qui serait à l'origine de toutes les cellules du système sanguin.

Cependant, en raison des limitations liées aux méthodes expérimentales disponibles à l'époque, le débat sur l'existence d'une cellule souche hématopoïétique (CSH) commune a continué pendant plusieurs décennies. Ce n'est que soixante ans plus tard que les CSH ont été mises en évidence expérimentalement chez la souris, par les travaux de James Till et Ernest McCulloch, entre autres (Becker, McCulloch & Till, 1963; Till & McCulloch, 1961; Till, McCulloch & Siminovitch, 1964). Des cellules souches ont ensuite été caractérisées dans de nombreux tissus adultes (nerveux, intestinal, épithélial, *etc.*), ainsi que les cellules souches embryonnaires (Evans & Kaufman, 1981).

De nos jours, les propriétés biologiques et le potentiel clinique des cellules souches suscitent un intérêt scientifique, médical et commercial. Ces cellules peuvent se différencier vers plusieurs lignages cellulaires\*, pour engendrer les cellules spécialisées constituant les différents tissus. Mais

---

\* Les mots ou expressions marqués d'une étoile sont définis dans le glossaire, p.201, par ordre alphabétique

## INTRODUCTION

surtout, elles ont la capacité de s'autorenouveler, c'est-à-dire de proliférer en l'absence de marqueurs de différenciation et sans perte de leur potentiel de différenciation. Cette propriété d'autorenouvellement est en fait au cœur du concept de cellule souche. Cette définition est minimaliste : d'autres propriétés sont parfois attribuées aux cellules souches, mais celles-ci ne sont démontrées que dans des modèles spécifiques. La définition du concept de cellule souche est en fait largement débattue : il est difficile d'obtenir une définition universelle et invariable au fil des années et des découvertes dans ce domaine. De plus, à l'heure actuelle, les propriétés des cellules souches restent relativement mal connues, en raison de leur rareté dans les tissus, de leur hétérogénéité, et des difficultés techniques concernant leur identification et leur traçage. Ainsi, les mécanismes moléculaires intrinsèques qui caractérisent ces cellules ne sont que partiellement compris.

Chez les métazoaires\*, en conséquence de la spéciation des tissus, les choix possibles du devenir cellulaire\* d'une cellule souche sont les suivants : l'autorenouvellement, l'arrêt de la prolifération (ou quiescence), la spécialisation dans un lignage cellulaire donné, la différenciation, la mort cellulaire programmée (ou apoptose) et éventuellement la migration, si sa fonction est sollicitée ailleurs par l'organisme. Entre la cellule souche et sa descendance différenciée, on trouve des populations cellulaires intermédiaires composées de progéniteurs, lesquels peuvent également être confrontés, à des degrés plus ou moins similaires, aux mêmes choix. La régulation du choix entre ces différents devenir possibles d'une cellule souche est essentielle à la spécialisation et l'homéostasie\* tissulaire. En effet, les choix du devenir cellulaire des cellules multipotentes\*, y compris entre la survie et l'apoptose et entre l'autorenouvellement et la différenciation, sont des processus importants qui régissent le nombre et la durée de vie des cellules souches dans un hôte. Par conséquent, des irrégularités dans ces processus peuvent aboutir soit à des insuffisances, soit au développement de cancers (Reya *et al.*, 2001). Ainsi, à l'heure actuelle, un défi majeur dans l'étude des cellules souches est la compréhension des différents mécanismes de cette régulation, et leur coordination avec les fonctions cellulaires. Au delà du domaine de la recherche fondamentale, la compréhension de tels mécanismes pourrait avoir des retombées dans le domaine biomédical, allant de la compréhension des causes du cancer à l'utilisation des cellules souches dans la médecine régénérative.

Au cours de la première partie sera présenté le contexte bibliographique dans lequel s'inscrivent ces travaux de thèse, ainsi que la problématique qui s'en dégage : quelles sont les bases moléculaires du maintien de l'autorenouvellement vis-à-vis d'autres choix du devenir cellulaire ? Ces mécanismes dépendent de facteurs à la fois extrinsèques (environnement de la cellule) et intrinsèques (propres à la cellule). Partant de ce constat, et en

s'appuyant sur l'étude de l'expression des gènes des cellules souches, nous avons décidé d'explorer les mécanismes de régulation de l'équilibre entre l'autorenouvellement et la différenciation. L'ensemble des résultats obtenus dans le cadre de ces travaux de thèse sera présenté dans la deuxième partie, puis discuté dans la troisième partie.



# 1 CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE

Au cours de cette première partie, les cellules souches et leurs principales propriétés seront tout d'abord présentées (chapitre 1.1). Ensuite, seront discutés les modèles d'étude de l'autorenouvellement s'appuyant sur l'utilisation des progéniteurs (chapitre 1.2), puis quelques avancées et hypothèses dans l'étude des bases moléculaires de l'autorenouvellement (chapitre 1.3).

## 1.1 La Cellule Souche

Au cours de ce chapitre, bien qu'il existe des preuves montrant l'existence de cellules souches à l'origine de pratiquement tous les types cellulaires de l'organisme, les exemples et définitions s'appuieront principalement sur les connaissances relatives aux cellules souches embryonnaires (CSE) et aux cellules souches adultes du système nerveux (CSN) et hématopoïétique (CSH). D'une part, ces trois types de cellules souches sont de loin les plus étudiés : ils ont marqué certains moments de l'histoire de ce domaine. D'autre part, les études présentées dans ce manuscrit ont été réalisées sur des progéniteurs érythrocytaires, qui descendent de la CSH.

### 1.1.1 *Définition et Modèles*

#### 1.1.1.1 **Cellule souche et autorenouvellement**

Les cellules souches sont le plus souvent définies comme des cellules capables de s'autorenouveler, c'est à dire proliférer sans acquérir des marqueurs de différenciation, ce tout en gardant la capacité à s'engager dans au moins un lignage de différenciation - ou dont la descendance peut se différencier en au moins un type cellulaire (Watt & Hogan, 2000).

L'autorenouvellement est ainsi un processus par lequel une cellule peut se diviser pour générer des cellules filles qui ont un potentiel de développement similaire à celui de la cellule mère. Ainsi, la capacité à s'autorenouveler est essentielle aux cellules souches pour l'amplification de leur nombre au cours du développement, mais également pour leur maintien dans les tissus adultes, où elles participent à l'homéostasie de ces

derniers. De nombreux progrès ont été accomplis au cours de la dernière décennie dans l'identification et la compréhension des mécanismes moléculaires qui contrôlent l'autorenouvellement. Cependant, malgré la découverte de certaines signatures moléculaires des cellules souches (détaillé dans le Chapitre 1.3), les bases moléculaires responsables du choix entre l'autorenouvellement et la différenciation sont encore mal comprises. L'élucidation des mécanismes sous-jacents offre ainsi un potentiel d'avancées fondamentales dans les domaines s'intéressant au développement, au cancer et au vieillissement, en améliorant la compréhension des mécanismes régulant le développement embryonnaire, la différenciation cellulaire et le maintien des organes.

En termes fonctionnels, il a été suggéré qu'une preuve définitive de la capacité d'autorenouvellement des cellules souches doit être apportée par deux observations. D'une part, leur capacité à coloniser un tissu en y arborant les caractéristiques et phénotypes appropriés ; et d'autre part, leur capacité à reconstituer la totalité du tissu considéré, de manière primaire et secondaire. D'un point de vue expérimental, ceci se traduit par des tests *in vivo* de reconstitution à long terme d'animaux déficients (receveurs primaires) par la greffe des cellules souches candidates. Le test de reconstitution secondaire est ensuite réalisé en greffant les cellules générées dans le receveur primaire, dans un receveur secondaire (Weissman, 2000a). Cette approche est possible pour certains tissus, comme le sang (injection de cellules souches à un animal dont la moelle osseuse a été détruite), mais reste techniquement impossible (ou quasiment) pour d'autres tissus comme le cerveau. Dans ces derniers cas, la preuve d'autorenouvellement peut toutefois être apportée *in vitro* par la mise en culture prolongée des cellules candidates.

Bien que les deux processus dépendent de la division cellulaire, l'autorenouvellement et la prolifération ne sont pas tout à fait équivalents. En effet, la prolifération est un terme plus général, qui comprend tous les types de division des cellules souches et des progéniteurs, mais aussi éventuellement de leur descendance différenciée. L'autorenouvellement, quant à lui, exige que parmi les deux cellules filles au moins l'une des deux ait un potentiel de développement similaire à celui de la cellule mère (détaillé dans §1.1.2, p.11). Ainsi, pour la plupart des cellules souches adultes, dont les CSH, cela signifie que l'autorenouvellement est la division cellulaire permettant le maintien d'un certain potentiel de différenciation\* (Figure 1-1). Pour les cellules souches donnant deux cellules filles souches, comme par exemple les cellules souches germinales, l'autorenouvellement est la division qui permet le maintien de l'état indifférencié. Certains des mécanismes impliqués dans l'autorenouvellement contrôlent aussi globalement la prolifération de nombreuses autres cellules. Cependant, une accumulation de preuves suggère à l'heure actuelle qu'un nombre surprenant de ces mécanismes de régulation contrôle préférentiellement

l'autorenouvellement ((Molofsky *et al.*, 2003; Nishino *et al.*, 2008) et détaillé plus loin, §1.1.2.1.1, p. 12).

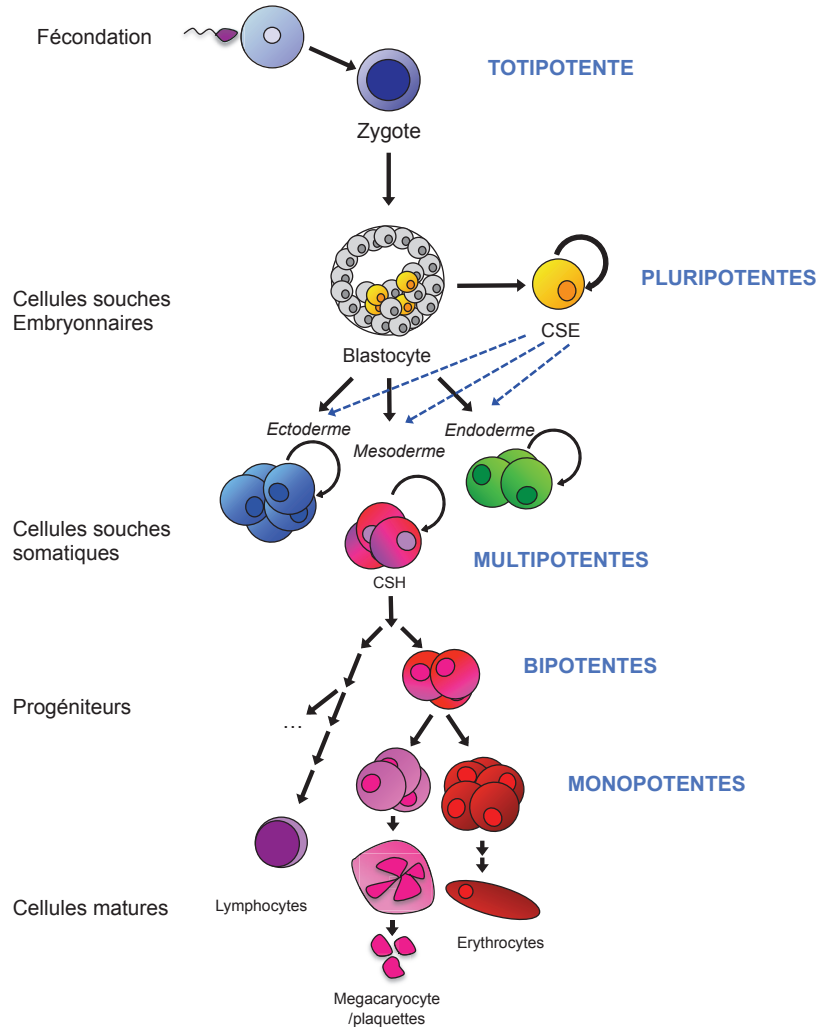


Figure 1-1 : Cellules souches : origine et potentiel différenciation

Le potentiel de différenciation des cellules souches est déterminé par l'ensemble des types cellulaires trouvés dans leur descendance. Au cours du développement, le zygote est la seule cellule totipotente : il est capable de générer la totalité d'un organisme. Les cellules souches pluripotentes\* peuvent générer des cellules appartenant aux trois feuillets embryonnaires (le mésoderme, l'endoderme et l'ectoderme), sans pour autant générer l'organisme en entier. Les cellules souches embryonnaires (CSE) sont établies par culture à partir des cellules de la masse interne du stade embryonnaire blastocyste. Une cellule souche peut générer soit des cellules souches en s'autorenouvelant (∞), soit des cellules engagées dans un processus de différenciation. Les progéniteurs sont déjà engagés dans la différenciation et constituent une population de transition, aboutissant à une descendance différenciée (cellules matures). Selon leur potentiel, les cellules souches ou progéniteurs, peuvent être multipotents\*, bipotents\* ou monopotents\*. Pour simplifier le schéma, seul un type de cellules souches somatiques est représenté : les cellules souches hématopoïétiques (CSH). Ces dernières peuvent donner naissance à l'ensemble des cellules du système hématopoïétique (seuls quelques exemples de cellules hématopoïétiques sont représentés).



Par ailleurs, la capacité d'autorenouvellement des cellules souches diminue progressivement au cours de leur différenciation. En effet, entre la cellule souche et sa descendance différenciée, il existe une population de progéniteurs dont le potentiel de différenciation est plus restreint et la capacité proliférative semble limitée dans le temps (Figure 1-1), mais présente tout de même des propriétés d'autorenouvellement (détaillées dans le chapitre 1.2, p.25).

A l'heure actuelle, il est très difficile d'arriver à une définition universelle de l'autorenouvellement. En particulier, les différences inhérentes aux types cellulaires ou aux modèles étudiés, rendent les comparaisons ou généralisations délicates. En effet, les différents types de cellules souches peuvent être très différentes entre elles en termes de potentiel de différenciation, d'environnement (matrice cellulaire, cellules voisines, *etc.*) ou du rôle dans la mise en place ou dans le maintien d'un organisme (embryonnaires ou adultes). Ainsi, en raison de cette hétérogénéité des propriétés spécifiques sont parfois attribuées à un type de cellule souche, mais impossible à démontrer pour un autre. Afin d'avoir un aperçu de certaines de ces propriétés plus spécifiques, nous nous pencherons sur trois types de cellules souches : les cellules souches embryonnaires (CSE), nerveuses (CSN) et hématopoïétiques (CSH), lesquelles seront brièvement décrites ci-dessous.

#### 1.1.1.2 Les cellules souches embryonnaires

La recherche sur les cellules souches embryonnaires (CSE) trouve son origine dans l'étude des tératocarcinomes\*, à partir desquels des lignées de cellules de carcinomes embryonnaires ont été établies (Jakob *et al.*, 1973).

Les CSE sont obtenues par la mise en culture de cellules de la masse interne des blastocytes (Figure 1-1 et (Evans & Kaufman, 1981)). Elles sont capables de proliférer indéfiniment *in vitro* en présence de facteurs appropriés (comme le LIF pour les CSE murines ou le FGF pour les CSE humaines). Les CSE peuvent s'autorenouveler tout en conservant leur potentiel de différenciation et un caryotype intact lorsqu'elles sont cultivées dans un milieu conditionné par une sous-couche nutritive, formée le plus souvent de cellules nourricières (généralement des lignées de fibroblastes embryonnaires). Sans cette sous-couche nutritive, les CSE se différencient spontanément. Dans la perspective d'utilisations thérapeutiques des CSE humaines, des méthodes de culture des CSE humaines en absence de cellules murines ont été proposées, en utilisant des cellules nourricières humaines ou des substrats synthétiques (Rao & Zandstra, 2005). Cependant, la plupart du temps les CSE humaines sont encore actuellement cultivées en présence de lignées de fibroblastes embryonnaires murins (Wobus & Boheler, 2005).

Par ailleurs, les CSE peuvent se différencier en cellules des trois feuillets embryonnaires, elles sont donc pluripotentes\* (Figure 1-1). En effet, lors de la réimplantation dans un blastocyte récepteur, elles peuvent contribuer à la formation de tous les tissus de l'adulte, conduisant à des animaux chimériques (Wobus & Boheler, 2005), et incluant la lignée germinale (Bradley *et al.*, 1984), d'où leur intérêt en transgénèse. De plus, cette pluripotence est conservée *in vitro* et leur différenciation en structures précoces du développement embryonnaire peut être induite par l'acide rétinoïque (Doetschman *et al.*, 1985). Précisément, en se différenciant, les CSE forment des agrégats appelés corps embryoïdes. Ces corps embryoïdes sont constitués d'un ensemble non organisé de cellules différenciées ou partiellement différenciées dérivées des trois feuillets embryonnaires (Smith, 2001). De plus, transférés dans des conditions de culture spécifiques, les corps embryoïdes peuvent se différencier dans un très grand nombre de types cellulaires différents, provenant des trois feuillets embryonnaires (Wobus & Boheler, 2005). Enfin, plus récemment, il a été montré, d'une part, qu'il est possible de reprogrammer des cellules somatiques en cellules souches pluripotentes (iPS, pour *induced pluripotent stem*) par l'expression ectopique des facteurs OCT4 et SOX2, clés dans la régulation des CSE (détaillé dans §1.3.1.1 p. 40) et, d'autre part, que celles-ci partagent certaines caractéristiques des CSE, dont leur pluripotence, mais ne peuvent toutefois pas générer des animaux chimères (Jaenisch & Young, 2008).

### 1.1.1.3 Les cellules souches adultes ou somatiques

Outre les CSE, il existe d'autres types de cellules souches, que l'on trouve dans différents tissus fœtaux ou adultes. Parmi ces cellules souches somatiques, les premières à avoir été caractérisées sont les CSH, mais c'est la découverte des CSN qui a été l'une des plus étonnantes.

#### 1.1.1.3.1 Les cellules souches nerveuses

La découverte de l'existence de CSN dans le cerveau adulte était inattendue et a été difficilement acceptée pendant plusieurs années (Gage, Ray & Fisher, 1995). En effet, cette découverte contredisait le dogme de l'absence de régénération du tissu nerveux. Les CSN sont obtenues par la mise en culture de cellules de plusieurs régions des zones ventriculaire et sous-ventriculaire du cerveau, en présence des facteurs de croissance appropriés – à savoir, EGF et FGF-2 – (Reynolds & Weiss, 1996). Elles sont clonogéniques, donnant naissance aux neurosphères (colonies de cellules indifférenciées) et sont capables de générer les trois principaux types cellulaires nerveux, à savoir neurone, astrocyte et oligodendrocyte (Reynolds & Weiss, 1996).

### 1.1.1.3.2 Les cellules souches hématopoïétiques

Au cours du développement, les organes hématopoïétiques doivent être colonisés par les CSH. Leur émission se produit de manière plus ou moins continue pendant une certaine période du développement, dans des sites parallèles ou successifs. Ces CSH constituent ensuite une réserve, d'où elles se mobilisent lors des besoins physiologiques tout au long de la vie de l'organisme. En effet, les CSH permettent le constant renouvellement des cellules sanguines et, de manière ponctuelle, leur remplacement, en cas de blessure ou de pathologie affectant le système hématopoïétique. Ainsi, les CSH sont responsables du maintien de l'homéostasie\* du système sanguin (Figure 1-1, p. 7).

Les CSH sont de loin les cellules souches les mieux caractérisées. En effet, dès le début du 20<sup>ème</sup> siècle, certains hématologistes, dont Alexander Maximow (Maximow, 1909), ont proposé l'existence d'un précurseur commun qui serait à l'origine de l'ensemble des cellules du système sanguin. Cependant, en raison des limitations des méthodes expérimentales disponibles à l'époque, ce n'est que soixante ans plus tard que les CSH ont été mises en évidence expérimentalement chez la souris (Till & McCulloch, 1961). A partir de souris irradiées, James Till, Ernest McCulloch, et ses collaborateurs ont montré que l'injection de moelle osseuse extraite de souris saines, permet de reconstituer l'ensemble des tissus hématopoïétiques et de restaurer l'homéostasie à long terme de l'animal irradié. Ils ont montré par la suite que les nodules de cellules ayant recolonisé la rate des souris irradiées, provenaient d'une seule et unique cellule, mettant ainsi en évidence l'existence de CSH (Becker *et al.*, 1963; Till *et al.*, 1964). De plus, ces études de reconstitution ont également démontré la principale caractéristique des CSH : elles sont multipotentes\*. En effet, elles peuvent générer tous les types cellulaires lympho-hématopoïétiques (érythrocytes, plaquettes, granulocytes, neutrophiles, éosinophiles, mastocytes, macrophages, cellules B et cellules T), soit une dizaine de lignages cellulaires.

D'un point de vue expérimental, les CSH sont extrêmement rares : environ une cellule sur  $10^4$  ou  $10^5$  cellules de la moelle osseuse serait une CSH (Harrison & Astle, 1997). Cependant, ces cellules peuvent être isolées à partir de la moelle osseuse adulte sur la base des marqueurs moléculaires exprimés à leur surface. D'une part, n'étant pas engagées dans un lignage en particulier, les CSH sont caractérisées par l'absence de tous les marqueurs spécifiques aux 10 lignages hématopoïétiques ( $Lin^-$ ). D'autre part, elles sont caractérisées par la présence de certains marqueurs, différant d'une espèce à l'autre. Ainsi chez la souris, les CSH se retrouvent dans la fraction  $c\text{-Kit}^+ \text{Thy-1}^{\text{low}} \text{Sca-1}^+$  (Spangrude, Heimfeld & Weissman, 1988), tandis que chez l'homme elles sont isolées à partir des cellules  $CD34^+ CD38^-$  pour les CSH à long terme (capables de s'autorenouveler

pendant toute la vie d'un individu) et à partir des cellules CD34<sup>+</sup> CD38<sup>low</sup> pour les CSH à court terme (qui ne peuvent s'autorenouveler que pendant une durée déterminée) (Weissman, 2000a). Depuis plus récemment, le marqueur CD133 humain est utilisé ; voir par exemple (Toren *et al.*, 2005). Par ailleurs, la capacité à expulser des fluorochromes, tels que le Hoechst 33342 et la Rhodamine-123, est actuellement prise en compte (Akashi *et al.*, 2003).

### 1.1.2 Autorenouvellement et Homéostasie

La mise en évidence de l'existence, dans certains tissus adultes, de cellules souches spécifiques à ces tissus a permis de déterminer que ces cellules sont responsables de la réparation des tissus endommagés, et/ou du maintien de l'homéostasie de certains tissus nécessitant une régénération permanente, comme le sang (Weissman, 2000a).

Le lien étroit entre cellules souches et homéostasie des tissus soulève ainsi l'importance de la régulation de l'autorenouvellement. En effet, bien que les cellules souches aient un potentiel d'autorenouvellement conséquent, notamment dans certaines conditions pathologiques, cela ne signifie pas nécessairement que ces cellules s'autorenouvèlent indéfiniment dans des conditions physiologiques basales. Les exigences régénératives dans certaines conditions pathologiques ou suite à une blessure, sont effectivement beaucoup plus élevées que celles rencontrées dans des conditions physiologiques normales. Par exemple, suite à leur injection dans des souris irradiées, les CSH présentent un pouvoir d'autorenouvellement très conséquent, alors que dans les conditions physiologiques, la plupart des ces cellules sont au repos (on parle alors de quiescence) et le nombre de divisions est limité (Cheshier *et al.*, 1999; Foudi *et al.*, 2009; Kiel *et al.*, 2007; Wilson *et al.*, 2008). Par ailleurs, *in vivo*, les CSN subissent un nombre limité de divisions avant de se différencier (Fraser & Bronner-Fraser, 1991; Morrison *et al.*, 1999), malgré l'énorme potentiel d'autorenouvellement de ces cellules en culture (Kruger *et al.*, 2002). Ces études suggèrent donc l'existence d'un équilibre entre le potentiel réel d'autorenouvellement (en conditions pathologiques), et celui effectivement utilisé dans les conditions physiologiques. Ainsi, des défauts dans les mécanismes contrôlant cet équilibre peuvent conduire à des défauts de développement, un vieillissement prématuré ou encore des processus cancéreux.

#### 1.1.2.1 Mécanismes et facteurs intrinsèques

Le contrôle du cycle cellulaire et le maintien de l'intégrité génomique sont des processus cellulaires nécessaires au fonctionnement de n'importe quelle cellule – souche ou différenciée – d'un organisme. Cependant, en raison des

propriétés particulières conférées aux cellules souches (fréquence de divisions élevée, persistance possible tout au long de la vie de l'organisme, maintien d'un potentiel de différenciation, *etc.*), ces processus doivent être soutenus par des mécanismes de régulation et de contrôle intrinsèques, différents de ceux des autres cellules de l'organisme.

#### 1.1.2.1.1 Contrôle du cycle cellulaire

Chez les eucaryotes, dans la plupart des cellules somatiques, le taux de prolifération est contrôlé par la vitesse à laquelle les cellules progressent à travers la phase G1 du cycle cellulaire (Figure 1-2). Le plus souvent, les cellules qui prolifèrent passent environ 70% de leur temps à travers cette phase. La décision d'entrer ou pas dans un nouveau cycle de synthèse d'ADN (transition G1 → S) est régi par l'inactivation – *via* phosphorylation – de la protéine du rétinoblastome (Rb), entraînant la libération d'E2F, un facteur clé de la transcription des gènes facilitant la transition G1 → S. La phosphorylation de Rb est à son tour contrôlée par les cyclines de type D, les cyclines D1-3 (ou CCDN1-3), et par des kinases cycline-dépendantes (CDK) spécifiques, les CDKs 4 et 6. Ainsi, la signalisation mitogène est relayée par ces dernières, à travers de leur action sur des cibles tels que Rb (Sherr & Roberts, 1999). L'activité de ces cyclines et kinases est quant à elle en grande partie régulée par p16<sup>INK4a</sup> et p53, qui constituent des points de contrôle permettant ou bloquant la progression dans le cycle cellulaire (Figure 1-2).

Contrairement à la plupart des cellules somatiques, les CSE murines passent environ 75% de leur temps dans la phase S du cycle cellulaire (Stead *et al.*, 2002). Cette cinétique particulière est marquée par une Rb peu ou pas phosphorylée (Burdon, Smith & Savatier, 2002; Savatier *et al.*, 2002; Stead *et al.*, 2002) et on pense que le cycle cellulaire de ces cellules n'est pas réglementé au point de contrôle G1 → S, expliqué ci-dessus (Stead *et al.*, 2002). En effet, il a été proposé que cette hypophosphorylation de Rb rend les CSE insensibles au contrôle *via* les cyclines D et les CDKs (Burdon *et al.*, 2002; Jirmanova *et al.*, 2002; Savatier *et al.*, 2002) et à l'inhibiteur des CDKs, p16<sup>INK4a</sup> (Faast *et al.*, 2004; Savatier *et al.*, 1996), un des principaux acteurs du point de contrôle G1 → S (Figure 1-2). Par ailleurs, les CSE ne subissent pas d'arrêt du cycle cellulaire dépendant de p53 en réponse aux dommages à l'ADN (Aladjem *et al.*, 1998; Prost *et al.*, 1998). Il semblerait donc que ces cellules ne soient pas soumises aux mêmes mécanismes de contrôle du cycle cellulaire que les autres cellules de l'organisme.

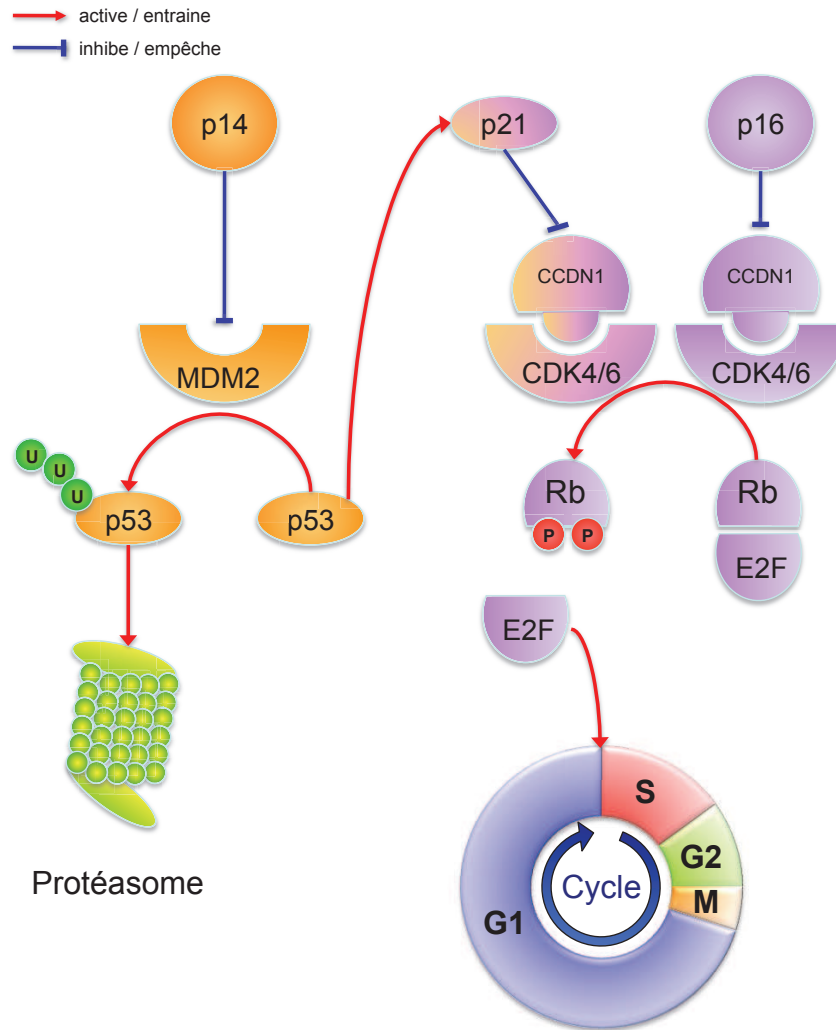


Figure 1-2 : Contrôle du cycle cellulaire

Les phases du cycle de division cellulaire, ainsi que les différents acteurs moléculaires intervenant dans le contrôle de la transition  $G1 \rightarrow S$  sont représentés. Les CDK sont des kinases capables de phosphoryler la protéine du rétinoblastome (Rb). p14, p16, p21 et p53 sont des régulateurs clé du cycle cellulaire. MDM2 est une ubiquitine ligase qui promeut l'ubiquitination de p53 et donc son adressage vers le protéasome où elle est dégradée.

Bien que – contrairement aux CSE – le cycle des cellules souches spécifiques à certains tissus présente les points de contrôle évoqués plus haut, celui-ci diffère tout de même de celui d'autres cellules de l'organisme. Par exemple, il a été montré que CDK2, un régulateur majeur de l'entrée en phase S, n'est pas requis pour la prolifération et la différenciation des CSH *in vivo* (Berthet *et al.*, 2007). D'autre part, une particularité remarquable des CSH est leur capacité d'entrer en quiescence, sans pour autant rentrer en sénescence\*. Or, il a été montré que p53 régule la taille

du compartiment\* de cellules souches dans les conditions basales, en interférant avec cette quiescence. En effet, un déficit en p53 augmente légèrement la taille du compartiment des CSH et des CSN (Meletis *et al.*, 2006; TeKippe, Harrison & Chen, 2003), probablement en diminuant leur quiescence (Liu *et al.*, 2009). Symétriquement, des niveaux élevés de p53, entraînant une sur-activation de Rb, conduisent à la sénescence et à l'épuisement prématuré du compartiment de ces mêmes cellules souches (Levi & Morrison, 2008). Enfin, il a été montré que les CSH provenant de souris dans lesquelles le gène *Bmi-1* a été inactivé, présentent des défauts d'autorenouvellement. Concrètement, ces défauts entraînent l'épuisement des CSH et la perte de leur capacité à coloniser les organes hématopoïétiques lorsqu'elles sont greffées dans un receveur normal (Lessard & Sauvageau, 2003; Molofsky *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2003). De plus, il semblerait que la protéine BMI-1 cible les régulateurs du cycle cellulaire, dont p16<sup>INK4a</sup> (Bracken *et al.*, 2007; Lessard & Sauvageau, 2003). Récemment, ces observations ont été confirmées par une étude démontrant que *Bmi-1* joue également un rôle dans l'autorenouvellement des CSN et indiquant que le contrôle du cycle cellulaire par BMI-1 dans ces cellules est relayé par p16<sup>INK4a</sup> (Molofsky *et al.*, 2003).

Le rôle de p53 est central dans le fonctionnement d'une cellule, en effet, p53 peut induire l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. Cependant, cette protéine, souvent qualifiée de « surveillante moléculaire » peut aussi promouvoir la réparation de l'ADN. L'importance de p53 dans l'autorenouvellement des cellules souches pourrait donc être également liée à sa participation dans le maintien à long terme de l'intégrité du génome.

#### 1.1.2.1.2 Maintien de l'intégrité génomique

Les cellules souches, notamment celles qui sont maintenues tout au long de la vie d'un organisme, doivent subir un nombre important de divisions cellulaires. Cela contraste avec le cas d'une grande partie des cellules différenciées, qui le plus souvent ne prolifèrent ou, si oui, font l'objet d'une prolifération limitée. Les cellules souches n'auront pas, par conséquent, le même comportement face à la sénescence. Ainsi, la capacité à s'autorenouveler *in vivo* semble être en corrélation avec la capacité à contourner la sénescence *in vitro* (Rubin, 2002). D'autre part, préserver l'intégrité du génome est une fonction encore plus cruciale pour les cellules souches que pour les cellules différenciées, car ces premières peuvent transmettre des éventuelles mutations à un grand nombre de descendants, augmentant ainsi le risque d'oncogenèse. Plusieurs mécanismes importants pour le maintien de l'intégrité du génome, en contournant la sénescence, ont ainsi été identifiés. Il s'agit notamment de la réparation de l'ADN, de la protection contre les mutagènes (endogènes ou exogènes), de la régulation de la longueur des télomères, et de la régulation des voies de l'apoptose.

#### 1.1.2.1.2.1 Réponse aux dommages de l'ADN

En raison, à la fois, de leur longue durée de vie et du nombre élevé de divisions cellulaires subies, les cellules souches sont particulièrement sensibles à l'accumulation de mutations. Par conséquent, bien que la réparation de l'ADN soit une fonction essentielle pour maintenir l'intégrité du génome dans toutes les cellules, elle est particulièrement importante dans les cellules souches (Sharpless & DePinho, 2007).

Les dommages de l'ADN se produisent lors de la réplication de l'ADN au cours du cycle cellulaire ou lors de l'exposition aux rayonnements ionisants, ou à des mutagènes. Ces dommages peuvent entraîner la sénescence ou l'apoptose, réduire le potentiel d'autorenouvellement, ou encore engendrer un processus cancéreux. Toutes ces conséquences sont ainsi préjudiciables pour le fonctionnement des cellules souches, en réduisant la taille de leur compartiment et en diminuant ainsi leur capacité de régénération des tissus. Il a été montré que la vitesse à laquelle s'accumulent les dommages de l'ADN est limitée dans les cellules souches au cours du vieillissement (Rossi *et al.*, 2007). D'autre part, les cellules souches semblent être plus sensibles aux radiations que les autres cellules somatiques. Par exemple, après une exposition aux UV des cellules somatiques, le point de contrôle régulé par p53 retarde la transition G1 → S (Figure 1-2), entraînant un arrêt dans la phase G1 (Lee, Mayer-Proschel & Rao, 2000). En revanche, dans les CSE, p53 va plutôt induire leur apoptose (Sabapathy *et al.*, 1997; Ziegler *et al.*, 1994). De plus, il a été constaté que l'expression des gènes associés à la machinerie de réparation de l'ADN est élevée dans les cellules souches (Ginis *et al.*, 2004).

Le lien entre la machinerie de surveillance et de réparation de l'ADN et le fonctionnement des cellules souches a été montré par de nombreuses études. Par exemple chez la souris, l'inactivation conditionnelle dans tous les tissus adultes du gène *Atr* – essentiel dans la réparation de l'ADN – conduit à un appauvrissement général en cellules souches, accompagné de défauts dans la capacité de régénération des tissus et à un phénotype qui ressemble à un vieillissement prématuré (Ruzankina *et al.*, 2007). De plus, il a été montré que le maintien des CSH est dépendant d'un grand nombre de facteurs de réparation de l'ADN (Bender *et al.*, 2002; Ito *et al.*, 2004; Navarro *et al.*, 2006; Nijnik *et al.*, 2007; Prasher *et al.*, 2005; Reese, Liu & Gerson, 2003; Rossi *et al.*, 2007). Le lien entre la réparation de l'ADN et leur fonctionnement a également été décrit dans les CSE (Corbet *et al.*, 1999; Van Sloun *et al.*, 1999).

#### 1.1.2.1.2.2 Les dérivés réactifs de l'oxygène

Les dérivés réactifs de l'oxygène (DROs, pour *Reactive oxygen species*, ROS), ou radicaux libres) sont des espèces chimiques à très forte réactivité,



capables d'oxyder les protéines, l'ADN et les membranes des cellules. Bien que les DROs soient importants pour certains processus physiologiques, tels que la transduction du signal intracellulaire ou la lutte contre les agents pathogènes, ils constituent une source potentielle de mutagènes endogènes. Ainsi, des niveaux excessifs peuvent altérer le fonctionnement cellulaire et entraîner la sénescence de la cellule (Beckman *et al.*, 1990; Myers *et al.*, 1977; Niemczyk *et al.*, 2004).

Les cellules possèdent un certain nombre de moyens de défense contre les DROs, mettant en jeu des enzymes comme les superoxyde dismutases, les catalases, la glutathion peroxydase et la glutathion réductase. Les facteurs de transcription de la famille FoxO activent l'expression des gènes codant certaines de ces enzymes, ainsi que des gènes favorisant la quiescence (Tothova & Gilliland, 2007). Ainsi, ces facteurs protègent les cellules contre les dommages oxydatifs, ce qui réduit la mutagenèse et prolonge la durée de vie cellulaire (Paik *et al.*, 2007). L'inactivation des trois membres de la famille FoxO (FoxO1, 3 et 4) dans les CSH de souris entraîne une augmentation des niveaux de DROs, à l'origine d'une augmentation de la prolifération et l'épuisement à terme de ces cellules (Miyamoto *et al.*, 2007; Tothova & Gilliland, 2007). Ces effets négatifs s'accompagnent d'une réduction de l'expression de la superoxyde dismutase et de la catalase, et peuvent être partiellement inversés par un traitement avec un antioxydant. Par ailleurs, il a été démontré que l'ATM, une kinase impliquée dans la réponse aux dommages de l'ADN, est nécessaire pour protéger la cellule contre le stress oxydatif (Barzilai, Rotman & Shiloh, 2002). En particulier, l'importance de la protection des cellules souches vis-à-vis des mutagènes endogènes – comme les DROs – a été démontrée en inactivant le gène codant cette kinase dans les CSH, ce qui entraîne leur épuisement (Ito *et al.*, 2004; Ito *et al.*, 2006). De même, le fonctionnement des CSN requiert l'expression de l'ATM pour éviter l'instabilité génomique, la prolifération anormale, et l'épuisement de ces cellules (Allen *et al.*, 2001).

#### 1.1.2.1.2.3 *Maintien des télomères*

Les extrémités des chromosomes eucaryotes, connues sous le nom de télomères, sont des complexes ADN/protéine, constitués de séquences d'ADN répétées (des milliers de répétitions du motif TTAGGG). Les télomères sont nécessaires pour empêcher la fusion entre deux chromosomes différents et protègent ces derniers de la dégradation (McClintock, 1938; Sandell & Zakian, 1993; van Steensel, Smogorzewska & de Lange, 1998). Lors de chaque cycle de réplication de l'ADN, 50 à 150 paires de bases sont perdues à partir des extrémités des chromosomes. Ce phénomène entraîne, par conséquent, un raccourcissement des télomères à chaque division cellulaire, et constitue un point de contrôle du cycle cellulaire (Verdun & Karlseder, 2006). En effet, ce raccourcissement conduit à la sénescence cellulaire lorsque les télomères atteignent une longueur

critique, limitant ainsi le nombre de divisions qu'une cellule peut subir (Counter *et al.*, 1992). Etant donné que les cellules souches se divisent pendant des très longues périodes – voire tout au long de la vie d'un organisme – le maintien des télomères est une fonction essentielle, qui garantit la stabilité génétique et la capacité à subir un nombre indéterminé de divisions cellulaires.

Certaines cellules expriment la télomérase, une transcriptase inverse endogène qui permet d'allonger les télomères en ajoutant des motifs TTAGGG additionnels et en compensant ainsi leur raccourcissement (Greider & Blackburn, 1985). De ce fait, des perturbations dans le fonctionnement de cette enzyme accélèrent ou ralentissent la perte des télomères (en particulier dans les tissus hautement réplicatifs), et conduisent à la sénescence, l'instabilité génomique, et peuvent même entraîner des processus oncogènes (Blasco *et al.*, 1997; Rudolph *et al.*, 1999). Il a été montré que les cellules souches expriment la télomérase (Lee *et al.*, 1998; Morrison *et al.*, 1996; Vaziri *et al.*, 1994). De plus, il semblerait qu'une perte de son activité diminue l'autorenouvellement des cellules souches, comme il a été montré dans les CSH (Allsopp *et al.*, 2003) et leur capacité fonctionnelle au cours du vieillissement (Rossi *et al.*, 2007). Aussi, dans les CSN, l'absence d'activité télomérase diminue leur capacité proliférative et augmente l'instabilité génomique *in vitro* et *in vivo* (Ferron *et al.*, 2004). Ce lien entre l'activité de la télomérase et la capacité de régénération a également été montré dans d'autres tissus (Herrera, Samper & Blasco, 1999; Lee *et al.*, 1998). Ces résultats soulignent ainsi l'importance de la télomérase pour maintenir l'intégrité du génome et l'autorenouvellement des cellules souches (Smith, Coller & Roberts, 2003). Cependant, il a été montré que le niveau d'activité de la télomérase ne suffit pas à maintenir la longueur des télomères au cours du vieillissement. Il a été ainsi proposé que le maintien à long terme des cellules souches repose sur une action conjointe – spécifique de ces cellules – de la télomérase, des mécanismes de réponse aux dommages de l'ADN et des points de contrôle du cycle cellulaire (Ju & Rudolph, 2006).

### 1.1.2.2 Autorenouvellement et différenciation

Le potentiel de différenciation d'une cellule souche est évalué par l'ensemble des types cellulaires trouvés dans sa descendance. Par ailleurs, en se différenciant, la descendance des cellules souches donne naissance aux progéniteurs, une population intermédiaire entre la cellule souche et sa descendance différenciée. Les cellules souches ou progéniteurs sont dits multipotent(e)s\* lorsque leur descendance comprend des cellules engagées dans différents lignages, ou unipotent(e)s\* lorsque leur descendance ne peut se différencier que dans un seul lignage (Figure 1-1, p. 7). Depuis plus d'une décade, deux visions s'opposent quant à l'évolution du potentiel de

différenciation, notamment par rapport à sa réversibilité et elles seront discutées plus en détail dans le chapitre 1.3 (§1.3.2, p. 45).

Une fonction essentielle des cellules souches consiste ainsi à générer un nombre approprié de cellules différenciées, tout en maintenant une réserve suffisante de leur propre population. Ceci soulève donc une question primordiale : qu'est ce qui détermine si une division sera « autorenouvelante » ou « différenciative » ? Il a été suggéré que l'autorenouvellement, permettant le maintien des cellules souches, est contrôlé intrinsèquement *via* des divisions asymétriques, par une ségrégation asymétrique des facteurs déterminant le devenir cellulaire dans les cellules filles (Watt & Hogan, 2000). Une cellule souche donnera ainsi une cellule engagée dans un processus de différenciation, mais également une autre cellule souche.

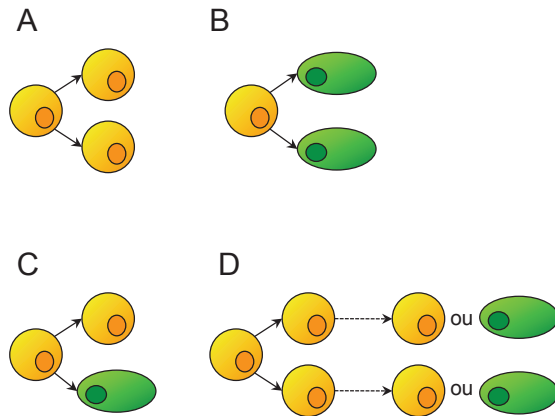
#### 1.1.2.2.1 Les divisions asymétriques

L'hypothèse d'un mécanisme reposant sur des divisions asymétriques est soutenue par la mise en évidence de produits de gènes qui sont localisés de manière asymétrique dans les cellules souches avant la division, et qui sont répartis différemment entre les deux cellules filles après la mitose. Dans certains invertébrés tels que *Caenorhabditis elegans* il a été montré que les cellules souches germinales subissent des divisions asymétriques produisant une cellule fille engagée dans la différenciation (progéniteur) et une cellule souche identique à la cellule mère. Cet événement est contrôlé par une distribution asymétrique dans les deux cellules filles de facteurs tels que PIE-1 (Mello *et al.*, 1996). Par ailleurs, toujours chez les invertébrés, les neuroblastes (associés au CSN mammifères) de drosophile se divisent de manière asymétrique en ségrégant la protéine kinase C dans les filles qui resteront par la suite des cellules souches et Numb, Prospero, et Brat dans les cellules filles, qui seront induites à se différencier (Knoblich, 2008; Lee, Robinson & Doe, 2006). Chez les mammifères, une corrélation a d'abord été montrée entre une distribution asymétrique de la protéine transmembranaire Notch1 et des divisions asymétriques de progéniteurs neuronaux dans la même région (Chenn & McConnell, 1995). Cependant, il n'a pas été montré que cette distribution soit responsable des divisions asymétriques. Par ailleurs, dans le système hématopoïétique, le suivi des deux cellules filles issues d'une même CSH, induite à se diviser *in vitro*, a montré que leur potentiel d'autorenouvellement diffère *in vivo* (entre les deux cellules filles de la même paire), une fois elles sont séparément injectées dans des souris irradiées, suggérant également que la CSH se divise de manière asymétrique (Ema *et al.*, 2000). Plus récemment, il a été montré que les cellules souches issues de mammifères utilisent des mécanismes similaires à ceux démontrés chez les invertébrés, notamment dans le système nerveux central (Huttner & Kosodo, 2005), la peau (Lechler & Fuchs, 2005), et le muscle squelettique (Kuang *et al.*, 2007).

L'ensemble de ces observations est donc en accord avec l'hypothèse d'un contrôle intrinsèque de l'autorenouvellement *via* des divisions asymétriques. Cependant, la taille d'une population de cellules proliférant strictement par des divisions asymétriques, ne peut pas être modulée (à chaque division, une cellule souche donnera une seule cellule souche). Or, chez les mammifères, nombreux sont les exemples de modulation de la taille des compartiments\* de cellules souches. Par exemple, chez l'embryon, le nombre de CSH présente des variations spatio-temporelles conséquentes au cours du développement (Morrison *et al.*, 1995). Une hypothèse alternative suggère que les divisions des cellules souches des mammifères sont asymétriques uniquement en apparence. Les divisions seraient en effet symétriques et le devenir des deux cellules filles, initialement identiques, serait déterminé soit stochastiquement (ou aléatoirement), soit en réponse aux signaux environnementaux par des facteurs extrinsèques favorisant un devenir cellulaire ou l'autre (cellule souche ou cellule différenciée), influençant ainsi la probabilité des divisions « autorenouvelantes » *vs.* « différenciatives » (Potten & Loeffler, 1990). Suite à une division symétrique, des contraintes spatiales ou temporelles peuvent entraîner les cellules filles à se retrouver dans des environnements différents et à acquérir de la sorte des devenirs cellulaires\* différents. L'orientation du fuseau mitotique, en particulier, permet de déterminer les positions des deux cellules filles après division. Notamment, chez la drosophile, les fuseaux mitotiques des cellules souches germinales mâles (également appelées spermatogonies) sont orientés perpendiculairement à une couche adjacente de cellules somatiques (appelée *hub* en anglais), de sorte que – après division – une seule des deux cellules filles restera en contact avec de cette couche (Fuller & Spradling, 2007). Par conséquent, des deux cellules filles, seule cette dernière restera indifférenciée, conservant ainsi les caractéristiques de cellule souche, tandis que la cellule fille ayant perdu le contact avec la couche nourricière sera induite à se différencier (Fuller & Spradling, 2007; Kiger *et al.*, 2001; Tulina & Matunis, 2001). L'orientation du fuseau mitotique quant à lui est déterminée par l'orientation du centrosome (Yamashita, Jones & Fuller, 2003; Yamashita *et al.*, 2007). En effet, les cellules souches spermatogoniales sont incapables de se diviser tant que le positionnement des centrosomes ne s'est pas fait correctement (Cheng *et al.*, 2008). Cependant, ce mécanisme n'a pas encore été élucidé chez les mammifères.

Ainsi, un mécanisme basé sur des divisions symétriques et asymétriques permettrait de réguler le compartiment des cellules souches (Figure 1-3). D'une part, à l'état basal, les divisions asymétriques des cellules souches permettent de maintenir un équilibre entre les cellules souches et cellules différenciées (Figure 1-3C). D'autre part, les divisions symétriques prédomineraient dans les circonstances dans lesquelles le nombre de cellules souches doit être augmenté (Figure 1-3A), comme au cours du

développement et après lésion, ou doit être réduit (Figure 1-3B). En termes de régulation, il a été montré, par exemple, que p53 – dont nous avons présenté l'importance dans le fonctionnement des cellules souches (§1.1.2.1, p. 11) – induit la division asymétrique par un mécanisme dépendant de la guanine (Sherley, Stadler & Johnson, 1995).



**Figure 1-3 : Les divisions asymétriques**

**A.** Division symétrique à l'origine de deux cellules souches.

**B.** Division symétrique à l'origine de deux cellules différenciées.

**C.** Division asymétrique à l'origine d'une cellule souche et d'une cellule différenciée.

**D.** Division symétrique (flèches pleines) suivie d'un devenir différent de chaque cellule souche (flèches pointillées).

#### 1.1.2.2.2 Cellule souche et différenciation

Le phénomène de différenciation implique, d'une part, la sortie de l'état d'autorenouvellement et, d'autre part, l'initiation du processus de différenciation proprement dit. Des études réalisées chez le nématode montrent que ces deux étapes sont régulées indépendamment. En effet, l'absence du répresseur transcriptionnel à doigts de zinc, PIE-1, entraîne l'arrêt de l'autorenouvellement des cellules souches germinales, mais n'est pas suffisante pour entraîner leur différenciation (Mello *et al.*, 1996). Le programme de différenciation est quant à lui déclenché par l'activation de facteurs de transcription spécifiques aux différents types cellulaires, tels que SKN-1, protéine nucléaire appartenant à la famille bZIP et nécessaire à la différenciation somatique (Bowerman *et al.*, 1993). Chez les mammifères, cette indépendance n'a pas été démontrée de façon concluante dans les cellules souches. Cependant, les données obtenues à partir de progéniteurs érythrocytaires penchent à faveur d'une dissociation des deux étapes (détaillé dans §1.2.2.2, p. 31). Concernant le processus de différenciation proprement dit, deux hypothèses peuvent être étudiées. Soit la différenciation est le devenir par défaut, auquel cas ce devenir est le résultat de la levée de son inhibition. Soit la différenciation est un processus qui doit être activement déclenché. Dans les deux cas, le microenvironnement (ou niche) où se trouve la cellule souche semble ainsi jouer un rôle essentiel, en apportant des facteurs extrinsèques contenant l'information

nécessaire au devenir de la cellule souche (Potten & Loeffler, 1990; Watt & Hogan, 2000).

### 1.1.3 Le Concept de « Niche »

#### 1.1.3.1 La niche : un mécanisme de contrôle extrinsèque et local

Afin de contrôler la taille d'une population de cellules souches, ainsi que le devenir de chaque cellule souche (autorenouvellement, différenciation ou apoptose), plusieurs études ont montré que ces cellules ne peuvent exister dans chaque tissu que dans un microenvironnement particulier et spécifique, appelé « niche », (Morrison & Spradling, 2008). Cette niche est composée de tous les éléments environnant les cellules souches : autres cellules, facteurs sécrétés et matrice extracellulaire. Elle fournit des signaux locaux qui favorisent le maintien des cellules souches et écartent ceux induisant la différenciation. Ainsi, le devenir des cellules qui résident dans cette niche diffère de celui des cellules qui en sont exclues et ces dernières sont souvent amenées à se différencier. En particulier, si la quantité de niches est limitée, le nombre de cellules souches sera limité au nombre de cellules que peuvent contenir ces niches.

D'autre part, dans certaines circonstances, la descendance se trouvant à l'extérieur de la niche peut la réoccuper, afin d'assurer l'homéostasie du compartiment des cellules souches. Par exemple, si les cellules souches germinales de drosophile sont retirées, les cellules filles à l'extérieur de la niche – normalement destinées à se différencier – peuvent réoccuper l'espace libéré et compenser le manque de cellules souches (Brawley & Matunis, 2004; Kai & Spradling, 2003). Depuis, un mécanisme similaire a également été proposé dans le maintien des cellules souches germinales chez la souris (Nakagawa, Nabeshima & Yoshida, 2007).

Chez les mammifères, les caractéristiques et le fonctionnement des niches sont moins bien comprises à l'heure actuelle, par rapport aux avancées sur des modèles invertébrés. Ceci est dû, en partie, à la difficulté à identifier et à suivre *in situ* les cellules souches (et les différencier avec certitude des autres cellules de la niche) dans les tissus des mammifères, parfois plus complexes que ceux des invertébrés (Morrison & Spradling, 2008). De plus, les études basées sur des tests de génétique fonctionnelle ciblant les facteurs nécessaires au maintien des cellules souches, ainsi que les cellules produisant ces facteurs, sont moins nombreuses. Par conséquent, les modèles de niche de cellules souches mammifères sont souvent provisoires et certaines questions clés demeurent sans réponse. Par exemple, certaines cellules souches donc les CSH ont besoin de périodes intermittentes de quiescence et ce mécanisme serait essentiel pour assurer leur maintien (Ficara *et al.*, 2008; Jude *et al.*, 2007; McMahon *et al.*, 2007; Yilmaz *et al.*,

2006). Les études démontrant que la quiescence des CSH dépend d'une série de facteurs extrinsèques, présents dans la niche de la moelle osseuse, montre que les signaux de la niche promeuvent et contrôlent cette quiescence (ces signaux sont détaillés dans le §1.1.3.3, p.23). Cependant, les cellules à l'origine de ces facteurs restent à l'heure actuelle inconnues.

Les études s'intéressant à l'importance des facteurs extrinsèques dans le devenir de la cellule souche sont très nombreuses. Cependant, seuls quelques exemples ont été choisis afin de d'illustrer le concept de niche.

### 1.1.3.2 Interactions avec d'autres cellules

Les preuves les plus directes de l'importance des cellules de la niche pour le maintien des cellules souches sont probablement celles obtenues sur des modèles invertébrés. Dans l'exemple évoqué précédemment chez la drosophile, le devenir asymétrique des deux cellules filles issues d'une cellule souche germinale, est déterminé par l'interaction avec les cellules somatiques de la couche adjacente (§1.1.2.2.1, p. 18). Chez *C.elegans*, il a été prouvé que l'autorenouvellement des cellules souches germinales requiert l'activation du récepteur GLP-1, associé à la voie Notch (Crittenden *et al.*, 1994; Henderson *et al.*, 1994; Kimble & Crittenden, 2007), laquelle est une des principales voies de l'interaction cellule-cellule.

L'importance du rôle des cellules souches au cours du développement embryonnaire des tissus est indéniable. A ce stade, où les structures ne sont pas encore mises en place, la communication et l'interaction cellule-cellule sont essentielles pour assurer la coordination des différentes populations de cellules (souches et somatiques). Remarquablement, on retrouve ces mécanismes dans les niches des cellules souches chez l'individu adulte. Les jonctions *gap* (« trou » en anglais), par exemple, relie le cytoplasme de deux cellules adjacentes, permettant l'échange direct de petites molécules entre ces deux cellules (Alexander & Goldberg, 2003). Ces jonctions représentent ainsi une voie de communication cellule-cellule privilégiée. Les jonctions *gap* jouent un rôle important lors du développement embryonnaire, avant que d'autres mécanismes de signalisation n'entrent en jeu (Rozental *et al.*, 1998), ainsi que dans la progression tumorale (Levin, 2002). Remarquablement, l'expression des marqueurs des jonctions *gap* a aussi été mise en évidence dans les CSE (Ginis *et al.*, 2004), les CSN (Bannerman *et al.*, 2000; Cai *et al.*, 2002; Rozental *et al.*, 1998) et les CSH (Durig *et al.*, 2000; Ploemacher *et al.*, 2000). De plus, il a été montré que ces jonctions sont nécessaires au fonctionnement, par exemple, des CSN (Bannerman *et al.*, 2000) et des CSE (Ginis *et al.*, 2004; Oyamada *et al.*, 1996).

### 1.1.3.3 Facteurs sécrétés

Des preuves plus ou moins directes ont permis de déterminer des facteurs clé qui peuvent réguler (induire ou inhiber) l'autorenouvellement de façon très localisée ou globale. Cependant, les cellules produisant ces facteurs – et donc à l'origine de ces signaux constituant la niche – n'ont pas toujours été identifiées avec précision (Kiel *et al.*, 2007).

Dans le système hématopoïétique des mammifères, par exemple, il a été montré que la quiescence des CSH dépend d'une série de facteurs extrinsèques présents dans la niche de la moelle osseuse. Parmi ces facteurs, on trouve, entre autres, le facteur Steel (Thoren *et al.*, 2008), SDF-1/CXCL12 (Nie, Han & Zou, 2008; Sugiyama *et al.*, 2006), la thrombopoïétine (Qian *et al.*, 2007; Yoshihara *et al.*, 2007), et l'angiopoïétine-1 (Arai *et al.*, 2004; Puri & Bernstein, 2003). En effet, la perte de la signalisation par les récepteurs de l'un de ces facteurs conduit à une prolifération accrue des CSH et, par conséquent, à leur épuisement. Il a été proposé que SDF-1 – probablement l'un des facteurs les plus étudiés dans le domaine des CSH – est exprimé par des cellules périvasculaires et endo-osseuses (Kollet *et al.*, 2006; Sacchetti *et al.*, 2007; Sugiyama *et al.*, 2006). L'angiopoïétine-1, soupçonnée de contrôler la quiescence des CSH (Arai *et al.* 2004), serait quant à elle exprimée par les ostéoblastes (Arai *et al.*, 2004) et/ou par des progéniteurs mésenchymateux (Sacchetti *et al.*, 2007). Cependant, l'absence d'études sur l'effet d'une inactivation de l'expression de tels facteurs, spécifiquement dans ces types cellulaires, empêche de déterminer de manière précise la ou les cellules somatiques constituant la niche des CSH.

La situation est similaire pour les niches d'autres cellules souches de mammifères telles que la région de la zone sous-ventriculaire du cerveau. En effet, bien que le facteur EGF ait été identifié comme nécessaire à la prolifération des CSN il y a plus d'une décade (Reynolds & Weiss, 1996), l'éventuelle source *in vivo* de ce facteur reste toujours incertaine (Riquelme, Drapeau & Doetsch, 2008).

### 1.1.3.4 Interactions avec la matrice extracellulaire

Lors de son identification, la matrice extracellulaire fût décrite comme un tissu de support ou de remplissage. Cependant, il est clair aujourd'hui que cette structure est loin d'être passive : elle intervient dans la modulation des interactions avec les cellules, la séquestration de facteurs, *etc.* La matrice extracellulaire est ainsi un élément clé de la niche, et les données illustrant son influence sur le devenir des cellules souches ne cessent de s'accumuler. En particulier, la matrice peut contrôler la géométrie de la cellule par des interactions physiques avec celles-ci (Folkman & Moscona, 1978). En culture, il est possible d'utiliser des matrices synthétiques avec



des propriétés spécifiques en termes de composition, contraintes physiques et nanotopographie. Il a été récemment montré que les marqueurs de différenciation exprimés par la descendance des CSE diffèrent selon la composition de la matrice, probablement en raison d'une différence de forme tridimensionnelle induite par celle-ci (Hwang, Varghese & Elisseeff, 2007; Hwang *et al.*, 2006). Concernant les contraintes physiques, il a été démontré, d'une part, que la déformation mécanique inhibe la différenciation des CSE, tout en favorisant leur autorenewement (Saha *et al.*, 2006) et, d'autre part, que la rigidité du substrat régule la différenciation des CSN (Saha *et al.*, 2008). Enfin, en termes de nanotopographie (propriétés au niveau nanoscopique), il a été démontré que celle-ci peut modifier la morphologie et la prolifération des CSE à travers des mécanismes relayés par le cytosquelette, en induisant, par exemple, leur alignement (Gerecht *et al.*, 2007).

Par ailleurs, certaines molécules à la surface cellulaire, permettant l'interaction entre la cellule et la matrice, peuvent internaliser un signal en jouant un rôle de récepteur. Par exemple, l'expression des  $\alpha$ - et  $\beta$ -caténines, qui jouent un rôle central dans l'adhésion cellulaire relayée par la cadhérine, est particulièrement élevée dans les CSH (Reya *et al.*, 2003), les CNS (Zechner *et al.*, 2003), et autres cellules souches (Song & Xie, 2003). En particulier, la N-cadhérine et la  $\beta$ -caténine sont responsables de l'attachement des CSH à leur niche (Zhang *et al.*, 2003). De plus, la  $\beta$ -caténine est considéré comme un élément de lien entre l'adhésion à la matrice et la voie de signalisation Wnt, critique dans le contrôle de la prolifération et de l'expansion des cellules souches (voir §1.3.3.1, p.55). Enfin, il a été montré que la  $\beta$ -caténine régule la production de progéniteurs dans le système nerveux (Chenn & Walsh, 2002) et stimule la prolifération cellulaire (Stockinger *et al.*, 2001). La matrice extracellulaire est ainsi une structure active, pouvant influencer le devenir des cellules qui s'y trouvent.

## 1.2 Les Progéniteurs

Dans le chapitre 1.1, les cellules souches ont été définies comme des cellules subissant des divisions symétriques et asymétriques, leur permettant de s'autorenouveler ou de se différencier en au moins un lignage de différenciation. Certains chercheurs ont suggéré que la capacité à s'autorenouveler tout au long de la vie d'un organisme, ainsi que la contribution substantielle à la genèse d'un tissu, sont deux critères qui doivent être considérés comme nécessaires pour pouvoir qualifier une cellule de souche. Si cette définition – relativement drastique – était utilisée, la plupart des cellules actuellement considérées comme des cellules souches ne répondrait alors pas à ces critères, et seraient plutôt définies comme des progéniteurs. Par exemple, les CSN appartiennent à une population de transition (Murphy & Bartlett, 1993), et les blastocystes à partir desquels sont dérivées les CSE, ne présentent pas d'autorenouvellement prolongé pendant toute la vie de l'organisme (Stanton, Macgregor & Green, 2003). Enfin, pour la plupart des tissus solides, la contribution des cellules souches peut être localement limitée, de telle sorte qu'il n'y a pas une seule cellule souche ayant contribué à une partie majoritaire ou à la totalité de l'organe (Gage, 2000). Ainsi, dans l'état actuel des connaissances, les critères de maintien à vie et de contribution substantielle au développement des tissus excluent toutes les cellules souches, exceptées les CSH et éventuellement les cellules souches germinales de certains organismes.

Par ailleurs, entre la cellule souche et sa descendance différenciée, il existe une population de progéniteurs dont le potentiel de différenciation est plus restreint, et dont la capacité proliférative dans le temps semble parfois moindre que celle de la cellule souche (Figure 1-1, p. 7). Ainsi, bien que la capacité d'autorenouvellement des progéniteurs diminue progressivement au cours de leur différenciation, un grand nombre d'études montre qu'elle n'est toutefois pas perdue. Etant donné que les études présentées dans ce manuscrit ont été réalisées sur des progéniteurs érythrocytaires, différentes propriétés et données générales sur les progéniteurs seront d'abord présentées. On s'intéressera ensuite davantage au système hématopoïétique et, en particulier, au lignage érythrocytaire.

### 1.2.1 *Pertinence et Avantages des Progéniteurs*

Dans le système hématopoïétique, il a été initialement considéré que la CSH était la seule cellule sanguine capable de s'autorenouveler, et que cette capacité était très rapidement perdue dès que sa descendance s'engageait dans les différents lignages hématopoïétiques (Weissman, 2000b). Cette

exclusivité impliquait donc que les bases moléculaires de l'autorenewement ne pouvaient être comprises que par l'étude des CSH. Cependant, certaines particularités exposées par la suite permettent de remettre en question ce dogme : la CSH n'est pas la seule cellule sanguine capable de s'autoreneweler.

### 1.2.1.1 L'autorenewement : exclusivité des cellules souches ?

L'existence et la capacité fonctionnelle des CSH ont été établies à partir d'études fonctionnelles utilisant des cellules hématopoïétiques injectées à des souris irradiées de façon létale, ou à des patients gravement myelo-deprimés (Reya *et al.*, 2001; Verfaillie, 2002). Cependant, un individu irradié présente d'importantes anomalies, des perturbations majeures dans les systèmes de régulation, ainsi qu'une très forte demande en cellules matures, devant être fournies très rapidement. Dans ces conditions, il est par conséquent tout à fait possible qu'on sélectionne une fraction de cellules avec des capacités particulières de reconstitution, leur permettant de se maintenir dans des conditions pathologiques extrêmes, ou encore une fraction de cellules exprimant à un instant précis les marqueurs membranaires et les caractéristiques appropriés. Ainsi, en raison de leur caractère hautement contraignant (voire excessif), les tests de reconstitution peuvent ne pas détecter des cellules en mesure de s'autoreneweler dans les conditions moins exigeantes de l'hématopoïèse basale (Metcalf, 1999).

La remise en cause des tests de reconstitution est soutenue, par exemple, par des observations obtenues dans l'étude de l'hématopoïèse embryonnaire. En effet, l'utilisation de ces tests a indiqué que le sac vitellin (un site supposé pour l'émergence embryonnaire de la CSH) ne contient pas de CSH capables d'assurer l'hématopoïèse à long terme, mais uniquement de façon transitoire (Muller *et al.*, 1994). Il a été cependant montré par la suite que, contrairement au résultats obtenus chez l'animal adulte irradié, les cellules du sac vitellin peuvent reconstruire le système hématopoïétique à condition d'être greffées dans un receveur néonatal prétraité (Yoder & Hiatt, 1997). De même, des études sur le Xenope ont montré que les cellules dans les régions chez l'amphibien correspondant au sac vitellin chez les mammifères sont à l'origine de l'hématopoïèse définitive quand celles-ci sont placées dans un environnement embryonnaire approprié (Turpen *et al.*, 1997).

Les études basées sur des observations réalisées à partir d'animaux irradiés sont certes extrêmement pertinentes et utiles d'un point de vue clinique, car elles permettent de mimer certaines conditions pathologiques (comme, par exemple, le cas d'un patient ayant subi une chimiothérapie). Cependant, ces études ne permettent pas *a priori* de comprendre (et encore moins de manipuler) les processus liés aux choix du devenir cellulaire. Par

conséquent, ces tests sont donc moins pertinents dans la compréhension des mécanismes responsables de l'autorenouvellement, notamment dans les conditions physiologiques (Metcalf, 1999).

### 1.2.1.2 Progéniteurs et autorenewement

La plupart des cellules sanguines matures ont une courte durée de vie. Par conséquent, le système hématopoïétique est en constant renouvellement. De plus, il doit régulièrement s'adapter pour faire face aux exigences, éventuellement changeantes, de l'organisme. Or, l'autorenouvellement de la CSH ne peut pas rendre compte, par exemple, du nombre de globules rouges produits, soit dans les conditions physiologiques ( $2,5 \cdot 10^6$  globules rouges par seconde, soit  $200 \cdot 10^9$  globules rouges par jour (Hentze, Muckenthaler & Andrews, 2004)), soit dans des conditions pathologiques (Bauer *et al.*, 1999). Les progéniteurs n'ont, certes, pas les mêmes capacités d'autorenouvellement que les cellules souches, notamment en termes de potentiel de différenciation, mais ils conservent tout de même une certaine capacité à se maintenir dans l'organisme pendant un certain nombre – parfois très élevé – de générations cellulaires. Un nombre croissant de preuves expérimentales démontrent que, contrairement aux restrictions initialement établies, les progéniteurs sont capables de s'autorenouveler.

Les progéniteurs sanguins ont été initialement identifiés par leur capacité à former des colonies composées de cellules morphologiquement reconnaissables comme appartenant à un lignage sanguin donné dans des cultures semi-solides. En particulier, il est possible de réensemencer *in vitro* les cellules issues de ces colonies primaires pour déterminer si ces cellules peuvent donner émergence à des cultures secondaires (plus d'un passage en culture). L'observation et l'analyse des colonies secondaires est ainsi aujourd'hui considéré comme un test fonctionnel démontrant *in vitro* la capacité d'autorenouvellement (Humphries, Eaves & Eaves, 1981). Ce test a ainsi permis de démontrer la capacité à s'autorenouveler des progéniteurs sanguins engagés, comme le montrent, à titre d'exemple, les études réalisées sur des progéniteurs engagés dans le lignage des granulocytes/macrophages ou dans le lignage des érythrocytes (Gordon, 1993; Gordon *et al.*, 1998; Nakahata & Ogawa, 1982), ou encore les progéniteurs à l'origine des cellules B (Rolink *et al.*, 1991).

Par ailleurs, lors de la mise en évidence des CSH, l'injection des cellules de la moelle osseuse a entraîné la formation de nodules (ou colonies) dans la rate de l'animal receveur irradié. Il a été montré par la suite que certaines des cellules de ces colonies peuvent reconstituer le système hématopoïétique après une transplantation secondaire dans des souris irradiées (Wu *et al.*, 1967). Or, aujourd'hui il a été démontré que ces colonies sont constituées non pas de CSH, mais de cellules plus matures tels que les progéniteurs myéloïdes (Na Nakorn *et al.*, 2002).

Enfin, rappelons l'importance de l'activité de la télomérase dans le maintien des cellules souches, décrite (cf. §1.1.2.1, p.11); il semblerait que cette enzyme soit également exprimée par certains progéniteurs et pas uniquement par les cellules souches (Greider, 1998).

### 1.2.1.3 Les progéniteurs : un modèle pertinent et avantageux

Certes, les progéniteurs ne peuvent pas rendre compte de l'ensemble des propriétés des cellules souches et, ne peuvent en aucun cas représenter un modèle de substitution dans l'étude de ces dernières. Cependant, concernant l'étude des bases de l'autorenouvellement, les progéniteurs représentent un modèle non seulement pertinent mais aussi avantageux d'un point de vue expérimental. D'une part, étant donné que la balance entre le gain et la perte de cellules (par autorenouvellement et par apoptose/différenciation, respectivement) régit la taille du compartiment des progéniteurs, cet équilibre est essentiel pour le maintien de l'homéostasie du système hématopoïétique et, par conséquent, il est strictement régulé dans ces cellules. Les mécanismes de régulation du devenir cellulaire peuvent ainsi être aisément étudiés sur des populations de progéniteurs (Bauer *et al.*, 1998; Dolznig *et al.*, 2006; Gandrillon *et al.*, 1999; Pain *et al.*, 1991; Pardal, Clarke & Morrison, 2003).

Un point avantageux est que, contrairement à la rareté relative des CSH (1 à 10 cellules sur  $10^4$  ou  $10^5$  cellules de la moelle osseuse environ (Harrison & Astle, 1997)), les compartiments de progéniteurs sont souvent plus larges ( $10^3$  cellules pour  $10^5$  cellules de la moelle (Metcalf, 1999)). D'un point de vue expérimental, un plus grand nombre de cellules permet d'avoir à disposition une quantité de matériel biologique plus conséquente. Ainsi, l'utilisation de progéniteurs permettent une réalisation plus aisée de certaines études nécessitant une grande quantité de matériel de départ, telles que les études à grande échelle comme l'analyse du transcriptome (Bresson *et al.*, 2007; Damiola *et al.*, 2004; Dazy *et al.*, 2003). Aussi, ces progéniteurs sont souvent plus accessibles ou plus faciles à isoler que les cellules souches à partir desquelles ils sont issus, leur conférant un avantage indéniable. D'autre part, en termes de devenir cellulaire, les cellules souches sont soumises à des choix d'une grande complexité (autorenouvellement, quiescence, apoptose, migration, différenciation, choix de lignage, *etc.*). Ainsi, les mécanismes responsables de ces choix peuvent interférer avec les mécanismes contrôlant l'autorenouvellement. C'est notamment pour ces raisons que nous avons choisi d'utiliser des progéniteurs érythrocytaires aviaires : dans le cadre de ces travaux, on s'intéresse justement aux bases moléculaires de l'autorenouvellement, et en particulier le contrôle du choix autorenouvellement *vs.* différenciation.

### 1.2.2 L'érythropoïèse : Une Source de Progéniteurs Diversifiée

Au cours du développement, l'érythropoïèse se produit en deux vagues distinctes, à savoir l'érythropoïèse primitive et l'érythropoïèse définitive. La production et les propriétés de ces deux types de globules rouges reflètent la diversité des besoins physiologiques de l'embryon et l'adulte (Ottersbach *et al.*, 2010). Par ailleurs, dans certains cas pathologiques, entraînant une chute du nombre des érythrocytes dans le sang, un troisième type d'érythropoïèse, à savoir l'érythropoïèse de stress, peut être mise en œuvre.

L'érythropoïèse comprend l'émergence et la localisation tissulaire de la production des globules rouges au cours de la vie des vertébrés, assurées par une succession d'organes qui se relaient dans le temps et dans l'espace. Autrement dit, l'érythropoïèse est le processus par lequel la CSH conduit à des cellules différenciées – les érythrocytes – par la production de différents types de progéniteurs progressivement restreints dans leur potentiel de différenciation, et dont les capacités prolifératives et de régénération sont progressivement diminuées. L'érythropoïèse présente ainsi un ensemble de progéniteurs à des stades plus ou moins engagés dans le processus de différenciation érythrocytaire. Par ailleurs, dans les conditions physiologiques, l'érythropoïèse doit être strictement contrôlée afin de maintenir l'homéostasie du système érythropoïétique. Cependant, lors d'une chute du nombre d'érythrocytes, dans certains cas pathologiques (perte de sang, hypoxie ou anémie), l'érythropoïèse doit aussi assurer une production rapide de ces cellules. Cette flexibilité est possible grâce au contrôle de l'autorenouvellement des progéniteurs érythrocytaires, permettant l'étude de l'équilibre entre l'autorenouvellement et la différenciation sur des modèles composés de ces progéniteurs.

Les progéniteurs des stades précoces de l'érythropoïèse ne peuvent pas être identifiés uniquement sur des critères morphologiques. C'est la mise au point de cultures *in vitro* en milieu semi-solide à base de méthylcellulose qui a rendu possible l'identification de stades plus précoces de l'érythropoïèse (Iscove *et al.*, 1972). Ainsi, la présence des progéniteurs et l'identification de leur stade d'engagement sont déterminés rétrospectivement par l'analyse des colonies issues de ces progéniteurs. Pour l'essentiel, ces stades se distinguent par rapport à leur capacité proliférative et leur plus ou moins grande restriction dans le choix du lignage de différenciation.

### 1.2.2.1 Les différents stades de l'érythropoïèse

#### 1.2.2.1.1 Le stade CFU-GEMM

##### **(Colony Forming Unit Granulocyte Erythrocyte Macrophage Megakaryocyte)**

Les CFU-GEMM forment des amas cellulaires de grande taille, permettant de supposer une forte capacité proliférative, et peuvent être à l'origine de quatre lignages de différenciation sanguin. En effet, parmi leur descendance *in vitro* on peut trouver des granulocytes, des macrophages, des érythrocytes et des mégacaryocytes (Ash, Detrick & Zanjani, 1981; Fauser & Messner, 1979). Ainsi, cette multipotence les classe parmi les plus précoces des progéniteurs érythrocytaires identifiés. Le maintien de ces progéniteurs requiert la présence du facteur SCF, ainsi que de son récepteur c-kit. (Barker, 1994; Kapur *et al.*, 1998).

Il a été par la suite suggéré que les progéniteurs de type CFU-GEMM pourraient ne pas être limités au lignage myéloïde/érythrocytaire. En effet, les tests basés sur l'analyse des colonies disponibles à l'époque où ces progéniteurs ont été identifiés ne permettaient pas de détecter certains des lignages lymphoïdes. Ainsi, une deuxième preuve de l'existence d'un progéniteur commun, à l'origine de ces deux lignages, appelés CMPs (*Common Myeloid Progenitors*), a été publiée deux décades plus tard (Akashi *et al.*, 2000). Cependant, il n'a toujours pas été démontré de manière définitive que ces progéniteurs sont la principale source de cellules myéloïdes.

#### 1.2.2.1.2 Le stade BFU-e

##### **(Burst Forming Unit erythroid)**

Contrairement au stade CFU-GEMM, le progéniteur de type BFU-e est restreint au lignage érythrocytaire. Comme il correspond cependant à un stade assez précoce, il fait preuve d'une capacité proliférative considérable et peut ainsi proliférer davantage avant que sa descendance ne se différencie en érythrocytes (Clarke & Housman, 1977; Heath *et al.*, 1976; Iscove & Sieber, 1975). Ainsi, une BFU-e est capable de générer 64 à 1000 érythrocytes, correspondant au maximum à une dizaine de cycles de division cellulaire. Cette taille de colonie d'érythrocytes formée par une BFU-e est très caractéristique et permet de les différencier des stades plus matures, comme les CFU-e (ci-dessous). En pratique, il est nécessaire de cultiver plus longuement les cellules de la moelle osseuse en milieu semi-solide pour détecter le stade BFU-e. Chez l'homme, il faut environ 10 jours, chez la souris 5 jours et chez l'oiseau 6 jours (Dexter *et al.*, 1981; Eaves & Eaves, 1979; Samarut & Bouabdelli, 1980).

### 1.2.2.1.3 Le stade CFU-e

#### **(Colony Forming Unit Erythroid)**

Le stade CFU-e est le progéniteur précoce le plus engagé dans la voie érythrocytaire. En se différenciant, la descendance des CFU-e donne naissance à des colonies composées d'environ 8 à 32 érythrocytes en 2-3 jours, correspondant à une demi-douzaine de cycles de division au maximum (Heath *et al.*, 1976).

### 1.2.2.2 **L'érythropoïétine et son récepteur**

Le principal régulateur de l'érythropoïèse est l'érythropoïétine (Epo), une hormone dont le récepteur (EpoR) est exprimé par les cellules du lignage érythrocytaire (D'Andrea, Lodish & Wong, 1989; Lacombe & Mayeux, 1998). En l'occurrence, chez l'homme, dès le stade BFU-e, les cellules produisent à faible dose l'EpoR (Stopka *et al.*, 1998). De plus, la sensibilité aux signaux induites par l'Epo augmente avec la différenciation érythrocytaire, puisque les CFU-e présentent déjà une plus forte expression de EpoR que les BFU-e (Metcalf & Nicola, 1984). Il a ainsi été proposé que plus le stade de différenciation est avancé, plus la dépendance vis-à-vis de l'Epo est importante (Gregory & Eaves, 1978). De plus, l'inactivation des gènes codant l'Epo ou l'EpoR chez la souris a montré que la signalisation dépendante de l'Epo est essentielle pour la survie et la prolifération des progéniteurs érythrocytaires (Lin *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1995). En effet, il a été rapporté que l'Epo est nécessaire à la différenciation érythrocytaire terminale, par la protection des cellules se différenciant vis à vis de l'apoptose *via* l'activation des voies de survie (Koury & Bondurant, 1990; Lesault *et al.*, 2002). Par ailleurs, il a été montré que les BFU-e, tout comme les CFU-e, sont produites à des niveaux normaux chez les souris déficientes soit pour l'Epo, soit pour l'EpoR, suggérant que ces derniers ne sont pas nécessaires à l'engagement vers la lignée érythrocytaire (Lin *et al.*, 1996; Sato *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 1995). Ces observations ont d'ailleurs été confirmées par l'effet symétrique de la sur-expression de l'EpoR, qui n'entraîne pas d'augmentation de l'engagement vers le lignage érythrocytaire (Dubart *et al.*, 1994). Ainsi, même si ces signaux de survie sont requis pour les étapes tardives de l'érythropoïèse, il ne semblent pas nécessaires pour l'engagement (Dolznig *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 1995).

### 1.2.2.3 **L'érythropoïèse de stress**

Suite à certaines conditions pathologiques (hémorragies, anémies, hypoxie, *etc.*), entraînant un défaut du nombre ou de la fonction des érythrocytes, l'organisme nécessite une production urgente de nouveaux globules rouges. Contrairement à l'érythropoïèse basale (ou de maintien dans les conditions basales), qui a lieu dans la moelle osseuse chez la souris, cette



érythropoïèse d'urgence, aussi appelée érythropoïèse de stress, à lieu dans la rate chez la souris (Socolovsky, 2007). La nécessité de produire rapidement de nouveaux érythrocytes n'est possible qu'en stimulant fortement la capacité proliférative des progéniteurs érythrocytaires en aval de la CFU-e, les érythroblastes, sans pour autant promouvoir leur différenciation terminale au cours de cette prolifération accrue (Bozzini *et al.*, 1994; Bozzini *et al.*, 2003). Concernant les facteurs et voies de signalisation qui semblent essentiels à cette érythropoïèse, il a notamment été montré que le récepteur aux glucocorticoïdes (GR), en coopération avec le SCF et l'Epo, joue un rôle majeur dans l'expansion des progéniteurs érythrocytaires tant chez l'oiseau (Wessely *et al.*, 1997) que chez la souris (Bauer *et al.*, 1999). Plus récemment, il a été montré que cette érythropoïèse de stress extra-médullaire est aussi dépendante du morphogène BMP-4 (Lenox *et al.*, 2009; Subramanian *et al.*, 2008)

### 1.2.3 Les Progéniteurs et l'Etude de l'Autorenewement

Certains des avantages et la pertinence de l'utilisation des progéniteurs pour comprendre les bases moléculaires de l'autorenewement ont été présentés précédemment (§1.2.1, p. 25). Les progéniteurs érythrocytaires, en particulier, présentent des avantages additionnels, comme leur grand nombre, ou encore la possibilité d'étudier plusieurs stages d'engagement. De plus, selon les modèles, l'autorenewement pourra être étudié soit par rapport au processus de différenciation, soit par rapport à ses altérations dans les processus cancéreux.

#### 1.2.3.1 Modèles *in vitro*

L'étude de l'autorenewement et des mécanismes moléculaires sous-jacents *in vivo* reste un exercice difficile. En effet, l'identification et le suivi des cellules dans l'organisme entier est généralement impossible.

Au début des années 1970, Friend et ses collaborateurs ont montré que l'induction de la différenciation *in vitro* des cellules érythroleucémiques de souris (MEL pour *Murine Erythroleukemia*) ressemble à une différenciation érythrocytaire presque normale (Friend *et al.*, 1971). Cette découverte a ainsi incité l'utilisation de lignées cellulaires issues de cellules transformées (K-562, U937, TF-1, HEL, HL-60, ML-1, KG-1, entre autres) en tant que modèles cellulaires pour l'étude de la l'érythropoïèse, la granulopoïèse et la lymphopoïèse en culture dans le système hématopoïétique (Marks & Rifkind, 1978).

Travailler sur des cellules en culture implique certes une simplification vis-à-vis des mécanismes de régulation et des interactions existantes au niveau de l'organisme entier, entraînant ainsi une perte de l'ensemble de

l'information que l'on peut retrouver *in vivo*. Cependant cette simplification se fait au profit d'une maîtrise des conditions de culture et des possibilités de suivi du devenir d'une cellule et de sa descendance. En culture, les lignées cellulaires immortalisées gardent leur phénotype néoplasique\* et se comportent comme des populations de cellules relativement homogènes. Toutefois, en jouant sur les conditions de culture, on peut induire la différenciation de ces cellules. Cette dernière caractéristique permet ainsi de contrôler le passage d'un état indifférencié (assimilé à l'autorenouvellement) vers un état différencié, offrant ainsi une fenêtre d'observation pour analyser l'équilibre entre ces deux états. Par ailleurs, selon l'état, plus ou moins précoce dans l'érythropoïèse, dans lequel se trouvait la cellule initialement transformée, chaque lignée présente un potentiel spécifique (mono-, bi- ou multipotente). Ainsi, selon la question étudiée, ces lignées cellulaires peuvent être utilisées comme modèles cellulaires en fonction de leurs potentiels.

Etant donné que le nombre de modèles *in vitro* voit une progression exponentielle au cours des années, il est impossible de dresser une liste exhaustive de ceux-ci. Les lignées MEL (murine) et K562 (humaine), qui ont été le plus largement utilisées pour l'étude de l'érythropoïèse *in vitro* (Marks & Rifkind, 1978), seront tout d'abord brièvement décrites, afin de déterminer l'utilité et les limites de tels modèles. Nous décrirons ensuite quelques lignées aviaires : les travaux présentés dans ce manuscrit ayant été réalisés sur des cellules primaires de poulet, cela nous permettra de les comparer avec notre modèle primaire.

#### 1.2.3.1.1 Les lignées humaines

La plupart des lignées humaines proviennent de cellules isolées à partir d'une biopsie d'un patient souffrant d'un certain type de cancer, en l'occurrence des leucémies. Les caractéristiques de ces cellules vont ainsi dépendre du type et du stade de progression du cancer. Les cellules K562, par exemple, ont été dérivées des cellules d'un patient atteint d'une leucémie chronique myélogénique, et sont de loin les plus utilisées parmi les modèles humains en raison de leur multipotence (Lozzio & Lozzio, 1975). De plus, elles ont la particularité d'être bloquées dans leur différenciation et de pouvoir être facilement cultivées en suspension. D'autre part, la lignée K562 peut être amenée à produire de l'hémoglobine sous l'action de divers agents inducteurs (Tsiftoglou, Barnett & Sartorelli, 1979). Cependant, cette différenciation se traduit par une expression des globines embryonnaires et fœtales uniquement, mais pas des globines adultes (Rutherford *et al.*, 1981). Ainsi, Dans la plupart des études publiées à ce jour, les cellules K562 ont été utilisées comme un modèle pour comprendre le mécanisme d'action du complexe hème/hémine, un régulateur naturel de l'hématopoïèse (Tsiftoglou, Tsamadou & Papadopoulou, 2006).

### 1.2.3.1.2 Les lignées murines

L'établissement de lignées cellulaires à partir des cellules murines est un processus relativement courant. Chez la souris, l'établissement de ces lignées se fait soit spontanément après de longues périodes de culture, soit suite à des infections virales. Leur origine est ainsi assez diverse. Parmi les lignées couramment utilisées on trouve la lignée multipotente 32D, dérivée de CSE (Greenberger *et al.*, 1983), la lignée J2E, issue de progéniteurs transformés par le virus J2 à un stade tardif (Klinken, Nicola & Johnson, 1988), la lignée I/11, obtenue à partir de souris  $p53^{-/-}$  (Dolznig *et al.*, 2001), toutes les deux issues de progéniteurs érythrocytaires de foie fœtal, ou encore la lignée MEL. Les trois dernières sont monopotentes, et engagées dans le lignage érythrocytaire.

Les cellules MEL (ou de Friend), ont été obtenues suite à la maladie de Friend et sont à l'origine de plusieurs lignées érythroleucémiques (Tambourin, Wendling & Moreau-Gachelin, 1981). En effet, il existe de nombreux clones MEL, ce qui a permis d'établir et d'analyser plusieurs stades, comme les CFU-e, le long de la voie érythrocytaire. L'intérêt majeur des cellules MEL, réside dans leur capacité à pouvoir être induites *in vitro* à se différencier en présence de différents agents inducteurs tels le DMSO, le n-butyrate ou l'HMBA (Rovera & Surrey, 1978). L'engagement de la différenciation érythrocytaire active l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la biosynthèse des globines, le hème et les hémoprotéines (Tsiftoglou *et al.*, 1979). Il a été initialement établi que les cellules MEL étaient incapables de répondre à l'Epo, mais, par exemple, la sous-lignée SKT6 – dérivée des MEL – peut être induite à se différencier soit avec du DMSO soit avec de l'Epo (Kuramochi *et al.*, 1990).

En plus de lignées cellulaires immortalisées par transformation, l'essor du génie génétique a conduit à établir des lignées cellulaires hématopoïétiques, comme la lignée G1E, aujourd'hui utilisée pour étudier la régulation transcriptionnelle au cours de l'érythropoïèse. Les cellules G1E appartiennent à une lignée érythroblastique dérivée à partir des CSE issues des souris  $GATA-1^{-/-}$  (Weiss, Yu & Orkin, 1997). Ces cellules prolifèrent continuellement en culture et sont assimilées à des proérythroblastes (un stade tardif, en aval des CFU-e) et le rétablissement de l'activité de GATA-1 induit un ralentissement du cycle cellulaire et une maturation terminale, récapitulant ainsi une partie – les étapes tardives – de l'érythropoïèse normale (Gregory *et al.*, 1999).

### 1.2.3.1.3 Les lignées aviaires

Contrairement aux cellules murines précédemment décrites, il est particulièrement difficile de dériver des lignées aviaires. Les principales ont été établies par transformation rétrovirale avec des rétrovirus de type AEV (*Avian Erythroblastosis Virus*) ou E26.

L'ensemble des lignées hématopoïétiques produites à partir de l'AEV sont des lignées monopotentes et engagées dans la voie érythrocytaire. Elles ont permis l'étude de certains des mécanismes de la différenciation érythrocytaire. Par exemple, la lignée HD3 (Beug *et al.*, 1982) a été particulièrement utile pour étudier la vitesse d'irréversibilité du processus de différenciation érythrocytaire (Bartunek *et al.*, 2002). De même, la lignée HD4 - aussi appelée 6C2 - est très proche de la lignée HD3 et a été utilisée dans l'étude de la structure épigénétique du locus des globines  $\beta$  aviaires (Litt *et al.*, 2001).

Les lignées obtenues à partir de virus du type E26 sont multipotentes. La lignée HD57 a par exemple permis d'étudier les mécanismes d'engagement vers les différents lignages à un stade multipotent immature (Metz & Graf, 1991). En particulier, cette lignée a été très utile dans l'étude du choix contrôlant l'engagement dans la différenciation érythrocytaire (Sieweke & Graf, 1998). Par ailleurs, les lignées obtenues par des infections avec le rétrovirus E26 ont permis d'identifier l'ensemble des marqueurs membranaires définissant les principaux lignages hématopoïétiques chez le poulet (Schmidt *et al.*, 1986).

### 1.2.3.2 Les T2ECs : un modèle *ex vivo*

#### 1.2.3.2.1 Les modèles *ex vivo* : avantages et difficultés

Les lignées cellulaires permettent effectivement la caractérisation de nombreux mécanismes impliqués dans le contrôle du devenir cellulaire. Cependant, les cellules de ces lignées restent des cellules transformées et immortalisées ; leur cycle est donc par définition perturbé et leur génome éventuellement altéré. Par conséquent, les mécanismes mis en évidence en utilisant les lignées, doivent généralement être interprétés avec précautions, notamment quant à leur pertinence physiologique.

Contrairement aux lignées cellulaires, les cellules primaires sont des cellules normales et non altérées génétiquement. Leur durée de vie est limitée et la fenêtre de temps pendant laquelle on peut les étudier est donc réduite par rapport aux lignées cellulaires (Hayflick, 1965). Bien que cette caractéristique représente une des principales difficultés des modèles basés sur ces cellules, elle est aussi l'un de leurs principaux avantages. En effet,

n'étant pas transformées ni immortalisées, les cellules primaires permettant de valider certains mécanismes dans un contexte non oncogénique.

Afin d'obtenir une culture de cellules primaires le plus homogène possible, et phénotypiquement équivalentes aux cellules *in vivo*, un enjeu essentiel consiste à déterminer l'environnement cellulaire permettant leur maintien *in vivo* (les niches dans le cas des cellules souches et des progéniteurs, voir §1.1.3, p.21). Ces structures impliquent souvent plusieurs acteurs, locaux et distants, cellulaires, matriciels et moléculaires ; elles présentent donc souvent une grande complexité. Par exemple, les étapes tardives de l'érythropoïèse, à partir du stade érythroblaste (en aval des CFU-e), ont lieu dans des structures complexes appelées îlots érythroblastiques (Chasis & Mohandas, 2008). Bien que les conditions de culture ne puissent pas reconstruire à l'identique cet environnement cellulaire, pouvoir contrôler artificiellement la présence ou l'absence de certains facteurs dans cet environnement et étudier ainsi leur effet sur le devenir cellulaire (autorenouvellement *vs.* différenciation *vs.* apoptose, *etc.*), reste un avantage majeur des modèles en culture. Ainsi, les modèles *ex vivo*, basés sur la culture de cellules primaires, offrent un compromis entre la simplicité des modèles *in vitro* et la pertinence des modèles *in vivo*.

#### 1.2.3.2.2 Les T2ECs

Les T2ECs – pour *TGF- $\alpha$ /TGF- $\beta$ -induced Erythrocytic Cells* – sont des progéniteurs érythrocytaires issus de cultures primaires de moelle osseuse d'embryons de poulet. Les T2ECs peuvent être obtenues à partir de tous les stades de développement du poulet, à savoir de l'embryon de 48h (à partir du blastoderme), au poulet adulte de plus de 30 jours (Gandrillon *et al.*, 1999). En particulier, l'ensemble des travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisés sur des T2ECs provenant d'extractions de la moelle osseuse d'embryons de 19 jours.

En plus d'être des cellules primaires, les T2ECs offrent certains avantages par rapport aux modèles basés sur les lignées, décrits précédemment. L'atout majeur de ce modèle est probablement le découplage du processus de prolifération de celui de différenciation (Gandrillon *et al.*, 1999). En effet, les T2ECs peuvent être maintenues en suspension dans un état d'autorenouvellement pendant environ quatre semaines de culture en présence des facteurs de croissance TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  et de la Dexaméthasone. Dans ces conditions, les T2ECs prolifèrent en gardant un caractère immature sans jamais synthétiser d'hémoglobine. Ensuite, elles meurent vraisemblablement suite à un processus de sénescence (ce ne sont pas des cellules immortalisées). Le TGF- $\alpha$  active la voie de signalisation Ras/Raf/MEK/ERK dans les T2ECs. Cette voie a été identifiée comme essentielle dans l'autorenouvellement des progéniteurs érythrocytaires ; d'abord dans les T2ECs (Dazy *et al.*, 2003), puis dans les érythroblastes de

souris (Rubiolo *et al.*, 2006). Par ailleurs, bien que la voie de signalisation activée par le TGF- $\beta$  soit souvent considérée comme un signal induisant la différenciation plutôt que l'autorenewement dans le système hématopoïétique (Fortunel, Hatzfeld & Hatzfeld, 2000), il a été montré que cette voie est essentielle à l'autorenewement des T2ECs (Gonin-Giraud, Bresson-Mazet & Gandrillon, 2008).

Un autre avantage, lié à leurs remarquables capacités prolifératives (une division toutes les 18h-22h), est la possibilité d'amplifier en grande quantité des progéniteurs précoces primaires non transformés. La quantité de matériel biologique disponible n'est alors plus un obstacle à la réalisation de diverses analyses biochimiques ou d'études à haut débit, nécessitant souvent une très grande quantité de matériel biologique, et donc de cellules.

Concernant l'équilibre autorenewement/différenciation, à tout moment pendant la culture, les T2ECs peuvent être induites à se différencier en érythrocytes matures, ce qui montre que le processus d'autorenewement n'altère en rien le potentiel de différenciation érythrocytaire de ces progéniteurs précoces. En pratique, leur différenciation est induite en remplaçant le milieu de prolifération par un milieu à base de sérum de poulet anémié et d'insuline. En effet, suite à la disponibilité des données génomiques du poulet et des séquences des gènes murins et humains codant l'Epo et son récepteur, l'alignement de séquences pour chercher l'homologue aviaire de ces gènes suggère que ceux-ci soient absents, ou du moins très différents en séquence, chez le poulet. Par conséquent, l'utilisation de l'Epo seule – ajoutée dans le milieu de culture – afin de permettre la différenciation érythrocytaire n'est pas compatible avec notre système. Ainsi, l'obtention du facteur endogène nécessaire à la différenciation érythrocytaire chez le poulet, est possible par l'induction d'une anémie sévère chez le poulet adulte suite à l'injection de phénylhydrazine. Lors de la phase de récupération, le sérum sanguin est enrichi en facteurs promouvant l'érythropoïèse, analogues en fonctionnement à l'Epo. Ainsi, pour l'ensemble des études menées dans le modèle aviaire, le sérum de poulet anémié est utilisé comme équivalent de l'Epo des mammifères (Gandrillon & Samarut, 1998).

Par ailleurs, les T2ECs peuvent subir une transformation oncogénique, notamment grâce à l'utilisation de rétrovirus porteurs d'oncogènes tels que l'AEV. En effet, en tant que progéniteurs érythrocytaires, les T2ECs sont les cibles naturelles de ce dernier, lequel provoque *in vivo* des érythroleucémies chez le poulet (Mey *et al.*, 2002). Ainsi, la transformation des T2ECs bloque ces cellules dans un état d'autorenewement dérégulé, et entraîne, entre autres, une inhibition de leur différenciation.

Les T2ECs permettent donc d'étudier trois états : autorenewement

normal, autorenouvellement dérégulé et différenciation. Cependant, si l'on connaît les conditions de culture permettant de maintenir ces cellules en état d'autorenouvellement ou de les induire à se différencier, on ne connaît pas les mécanismes moléculaires sous-jacents. Bien que les T2ECs soient engagées dans le lignage érythrocytaire, ces cellules présentent un phénotype très immature, caractérisé par l'expression de marqueurs de surface cellulaire, qui sont également exprimés par des progéniteurs multipotents (Gandrillon *et al.*, 1999). En dépit de ce phénotype immature, ces cellules donnent après différenciation des populations presque pures d'érythrocytes matures. Enfin, les T2ECs présentent un très faible taux de différenciation spontanée.

Ces caractéristiques rendent ce modèle particulièrement intéressant pour l'étude des mécanismes moléculaires ayant lieu lors du passage des cellules de l'autorenouvellement vers la différenciation. D'ailleurs, leur monopotence peut également représenter un avantage étant donné que ces mécanismes de choix du devenir cellulaire (autorenouvellement *vs.* différenciation) ne sont pas « brouillés » par les processus moléculaires impliqués dans les choix de lignage.

### 1.3 Les Bases Moléculaires de l'Autorenewement

Malgré les spécificités des différents types de cellules souches et progéniteurs, ces cellules ont des propriétés communes: la capacité à s'autorenewer et à générer une descendance ayant un potentiel de différenciation plus restreint. Dans le système hématopoïétique, les CSH sont à l'origine de l'ensemble des lignées sanguines. Ainsi, afin de maintenir l'homéostasie du système sanguin, l'équilibre entre l'autorenewement, l'apoptose ou la différenciation de ces précurseurs hématopoïétiques est étroitement régulé. Le devenir des cellules souches semble ainsi être contrôlé par des facteurs intrinsèques et extrinsèques. Cependant, les mécanismes moléculaires à l'origine de ces propriétés sont encore mal connus.

Afin de déterminer les bases moléculaires des facteurs intrinsèques sur lesquels repose l'identité des cellules souches, des études se sont intéressées à l'analyse de l'expression de l'ensemble des gènes exprimés dans ces cellules (le transcriptome). En effet, si le génome des cellules souches est identique à celui de l'ensemble des cellules de l'organisme, l'expression des gènes est quant à elle différente. L'étude de l'expression des gènes dans des cellules souches pourrait ainsi permettre de mieux comprendre leurs spécificités par rapport aux autres cellules. En outre, l'existence de propriétés communes – partagées par l'ensemble des cellules souches – suggère qu'il pourrait y avoir des processus moléculaires communs. La comparaison de l'expression des gènes dans différents types de cellules souches est donc particulièrement intéressante pour apporter des éléments de réponse à cette question.

#### *1.3.1 A la Recherche du Master Switch*

Un modèle déterministe suggère que le contrôle de l'autorenewement (entrée, maintien et sortie) est autonome, et que l'environnement joue uniquement le rôle d'inducteur (Figure 1-7, p. 53 à gauche). Ainsi, le devenir d'une cellule souche dépendrait uniquement de mécanismes moléculaires intrinsèques. Selon une hypothèse séduisante, les mécanismes associés au choix autorenewement *vs.* différenciation impliqueraient la modulation sélective d'un ensemble défini de gènes. Ainsi, ces gènes seraient en amont des réseaux génétiques régulant le devenir de la cellule souche ; la modulation de cet ensemble (le « *Master Switch*\* ») entraînerait donc la régulation de l'ensemble du réseau génétique sous-jacent.



### 1.3.1.1 Le transcriptome : le premier pas

La transcription des gènes est le premier mécanisme moléculaire qui permet d'expliquer pourquoi deux cellules d'un même organisme, ayant un génome identique, sont pourtant différentes. En effet, l'utilisation de sites d'initiation de la transcription ou de polyadénylation alternatifs lors de la transcription, peuvent permettre d'obtenir des transcrits (ARNm) différents à partir d'un même gène. De plus, sous l'influence de différents facteurs de transcription ainsi que des modifications épigénétiques (notamment la méthylation de l'ADN et la structure de la chromatine) la quantité d'un ARNm obtenu à partir d'un même gène, peut varier d'un type cellulaire à l'autre. Enfin, après la transcription, des mécanismes de régulation post-transcriptionnelle peuvent également influencer la qualité (mécanismes d'épissage alternatif et d'édition) et/ou la quantité (stabilité) d'un même ARNm, selon le contexte moléculaire au sein de la cellule. Ainsi, la quantité d'ARNm présente à un instant donné, quantité qui correspond donc au produit de la transcription et de la dégradation de ces ARNm, rend compte – du moins pour une partie essentielle – du niveau d'expression d'un gène donné.

A l'échelle des populations de cellules, l'analyse de l'expression de certains gènes a permis de mettre en évidence leur importance pour l'autorenewement et/ou la différenciation des cellules souches. Par exemple, le devenir des CSE est différent selon le niveau d'expression du gène *Oct4* (Niwa, Miyazaki & Smith, 2000). Cependant, il ne s'agit que d'un exemple, et d'autres études ont montré que d'autres gènes étaient impliqués dans le maintien de l'autorenewement de ces cellules, ou dans leur différenciation vers certains lignages. Durant la dernière décade, les techniques d'analyse de l'expression des gènes ont évolué parallèlement à la caractérisation des cellules souches et on peut maintenant étudier simultanément l'expression d'un grand nombre de gènes. L'analyse de l'ensemble des ARNm dans une population de cellules à un instant donné (le transcriptome) permet donc d'avoir une vision globale de l'expression des gènes dans ces cellules. En l'occurrence, ces analyses ont permis d'établir le fonctionnement des facteurs OCT4, SOX2 et NANOG, identifiés comme étant trois facteurs clés dans les CSE. Précisément, ils sont au cœur d'un réseaux de régulation, qui, d'une part, active l'expression des gènes nécessaires à la signalisation des CSE – dont les propres *Oct4*, *Sox2* et *Nanog* – et, d'autre part, inhibe les gènes impliqués dans la différenciation (Jaenisch & Young, 2008).

L'analyse du transcriptome dans la caractérisation des cellules souches suppose que les mécanismes contrôlant leur devenir sont basés uniquement sur une régulation transcriptionnelle. Cependant, cette régulation n'est qu'un niveau parmi plusieurs contrôlant l'expression des gènes. En effet, un gène peut être transcrit sans que la protéine correspondante ne soit

déTECTABLE ou encore active. Par exemple, bien que les transcrits de la protéine CDK4 soient très abondants dans le transcriptome des CSE de souris (Anisimov *et al.*, 2002), l'activité kinase qui lui est associée est indéTECTABLE dans ces cellules, même si la protéine CDK4 est également présente (Savatier *et al.*, 1996). Ainsi, l'étude du transcriptome ne peut pas rendre compte de manière qualitative et quantitative des mécanismes impliquant une modulation de la traductibilité des ARNm. Des données récentes de la littérature montrent notamment que l'expression des ARN messagers contenus dans la fraction polyribosomique (ARNm associés à un grand nombre de ribosomes et donc fortement traduits) peuvent varier dans certains processus, physiologiques, comme la différenciation érythrocytaire (Kolbus *et al.*, 2003) ou pathologiques, comme le cancer (Rajasekhar & Holland, 2004; Rajasekhar *et al.*, 2003), soulignant l'importance de la régulation traductionnelle.

Par ailleurs, il existe des modifications épigénétiques, comme la méthylation de l'ADN ou l'acétylation des histones (protéines structurales de la chromatine), qui régulent l'accessibilité des facteurs de transcription aux gènes et donc l'expression de ces derniers. De plus, certaines de ces modifications sont conservées à travers la mitose fixant ainsi à un certain degré le devenir des cellules filles. L'essor de plus en plus portant de l'épigénétique, met en évidence l'importance de ces contrôles, notamment dans les cellules souches (Zwaka, 2006).

Comme toute technique, l'étude du transcriptome a donc ses limites et ne permet d'analyser qu'une partie des mécanismes contrôlant le maintien et le devenir des cellules souches. En effet, elle permet d'observer le transcriptome à un instant donné, sans pour autant rendre compte des mécanismes en amont (contrôles épigénétiques) ni en aval (régulations post-transcriptionnelles). Ce genre d'étude fournit donc un premier aperçu, pouvant indiquer de nouvelles pistes à suivre, et permettant parfois d'ouvrir des portes qui auraient été insoupçonnables dans les études gène à gène.

### 1.3.1.2 La « signature moléculaire » des cellules souches

Afin de ne pas se limiter à l'analyse des séquences déjà existantes dans les bases de données publiques (ce qui est le cas de puces à ADN), les premières tentatives d'obtention d'un profil exhaustif du transcriptome des cellules souches ont été réalisées par hybridation soustractive. Cette technique (Rubenstein *et al.*, 1990) aboutit à une librairie d'ADNc correspondant aux ARNm présents uniquement dans une population donnée, par rapport à une population de référence. Dans l'étude menée en 2000 par Phillips et ses collaborateurs, par exemple, 2119 produits de gènes sont différentiellement exprimés dans une population de cellules fœtales murines enrichie en CSH, par rapport à une population appauvrie.

Parmi ces gènes, presque la moitié correspondent ou sont homologues à des gènes caractérisés, parmi lesquels un grand nombre n'avait jamais été associé aux cellules souches. Concernant la moitié restante des gènes exprimés par les CSH, ceux-ci étaient à l'époque soit présents dans les bases de données mais pas caractérisés, soit vraiment nouveaux (Phillips *et al.*, 2000).

En 2001, Terskikh et ses collaborateurs ont utilisé cette même technique afin d'obtenir une librairie enrichie en ADNc correspondant aux gènes exclusivement exprimés dans des CSH adultes de souris, par rapport à ceux exprimés dans la moelle osseuse totale. Les auteurs ont ensuite démontré que de nombreux ARNm surreprésentés dans les bibliothèques des CSH présentent des similarités avec des transcrits présents dans le système nerveux central et périphérique. Ces résultats les ont conduits à étudier de manière plus systématique le recouvrement entre les transcriptomes des CSH et des CSN. Ils ont ainsi co-hybridé des ADNc provenant d'une population de CSH et de moelle osseuse totale sur une puce à ADN contenant des sondes correspondant à des transcrits spécifiquement exprimés dans des CSN. Ceci leur a ainsi permis d'obtenir un grand nombre de gènes spécifiquement exprimés à la fois dans les CSH et dans les CSN. Les auteurs suggèrent que ces gènes pourraient participer aux fonctions communes de ces deux types de cellules souches – voire des cellules souches en général – dont l'autorenewement (Terskikh *et al.*, 2001). Cette étude permet donc de se demander si ces cellules partagent des bases moléculaires communes, s'il existe une signature moléculaire des cellules souches.

En supposant qu'une signature moléculaire des cellules souches existe et que cet ensemble de gènes soit spécifique à ces cellules, il est donc nécessaire de comparer des cellules souches provenant de différents tissus, afin de déceler les similarités entre les transcriptomes de différents types de cellules souches. Cependant, les résultats obtenus par les analyses transcriptomiques se sont révélés très hétérogènes, notamment à cause de la forte disparité des démarches méthodologiques utilisées (conditions de culture, organismes, techniques, méthodes d'analyse, *etc.*) rendant toute comparaison peu pertinente. C'est donc en essayant de s'affranchir au maximum de ces limites qu'en 2002 deux groupes, dont l'un dirigé par le généticien A. Douglas Melton à Harvard et l'autre dirigé par Ihor R. Lemischka à Princeton, ont défini et comparé les transcriptomes des CSH, CSN et CSE avec la même technique de puce à ADN Affymetrix (Ivanova *et al.*, 2002; Ramalho-Santos *et al.*, 2002). Ces deux études – très similaires et publiées simultanément – ont rapporté chacune de façon indépendante une liste de gènes susceptible d'inclure l'ensemble des gènes expliquant les caractéristiques propres aux cellules souches, les gènes de la « souchitude »\*, et rendant ainsi compte de l'entité de ces cellules. Un an plus tard, en 2003, Fortunel et ses collaborateurs, en procédant de la même

façon que ses prédécesseurs, ont établi et comparé les transcriptomes des CSH, CSE et des progéniteurs rétinien, afin de proposer une troisième liste de gènes de la souchitude et la comparer avec les deux précédemment obtenues (**Figure 1-4A**). De manière surprenante, il est apparu que les trois listes obtenues de façon indépendante par le même procédé (puce ADN Affymetrix), n'avaient qu'un seul gène en commun (l'unité  $\alpha_6$  de l'intégrine, un récepteur cellulaire à certaines molécules de la matrice extracellulaire). Les auteurs affirment ainsi que trois études réalisées en utilisant la même technique et les mêmes algorithmes d'analyse, aboutissent à des résultats très discordants. Ils ont donc remis en cause l'existence d'un ensemble de gènes de souchitude, ou du moins la possibilité de les détecter avec des analyses transcriptomiques (en raison par exemple d'une expression transitoire et donc indétectable en comparant deux états statiques).

Pour aller encore plus loin, en 2005 Suárez-Fariñas *et al.*, dans une étude similaire à celle de Fortunel *et al.* mais sur d'autres données, ont comparé trois listes obtenues de façon indépendante à partir de CSE humaines. Cette étude montre qu'en affinant l'analyse statistique de ces trois études, on peut passer de 7 gènes communs (**Figure 1-4B**) à 111 gènes communs (**Figure 1-4C**), Un ensemble de gènes aurait donc été ignoré en comparant tout simplement les listes publiées dans les rapports.

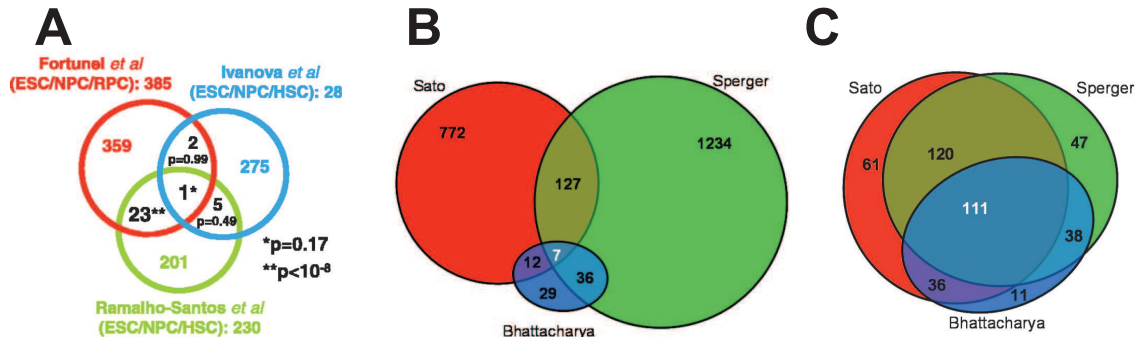


Figure 1-4 : Comparaison des études analysant le transcriptome

La comparaison de trois listes de gènes de « souchitude » générées par trois études indépendantes (A), montre une grande discordance entre ces trois dernières (un seul gène est commun aux trois listes). De même, la comparaison de trois listes des gènes sur-exprimés dans les CSE humaines, générées par trois études indépendantes (B), montre une grande discordance (seulement 7 gènes en commun). Cependant, si on considère les mêmes études mais en analysant toutes les données et non seulement les listes publiées (C), l'ensemble des gènes communs aux trois études est remarquablement plus grand (111 gènes). Figure adaptée (Fortunel *et al.*, 2003; Suarez-Farinas *et al.*, 2005).

### 1.3.1.3 Les « gènes souche » : une recherche inutile ?

Les études précédemment décrites ne permettent pas de trancher la question de l'existence d'un ensemble de gènes permettant d'expliquer les

caractéristiques propres aux cellules souches (ou la souchitude). Cependant, certaines différences peuvent expliquer l'apparent manque de cohérence entre ces trois études.

Premièrement, ces études diffèrent au niveau des critères de purification des populations de cellules souches, ainsi que des populations de référence. En effet, la purification des cellules souches est une étape cruciale pour permettre ensuite de mettre efficacement en évidence un ensemble de gènes sur-exprimés : si la population initiale de cellules contient une fraction de cellules différenciées, et que les variations de l'expression des gènes entre les « cellules souches » et la population de cellules différenciées sont faibles, alors elles ne vont pas pouvoir être mises en évidence. Si l'on est maintenant capable de purifier des CSH jusqu'à obtenir une quasi-homogénéité, ce n'est pas encore le cas pour les CSN, les CSE, ou encore les progéniteurs rétiniens utilisées par Fortunel et al. (2003). Dans ce sens, Ivanova et ses collaborateurs (2003) répondent au commentaire technique de Fortunel et ses collaborateurs (2003) en émettant de sérieux doutes quant à la pureté des progéniteurs rétiniens utilisées par ces derniers : leur ensemble de gènes spécifiques à ces progéniteurs contient, par exemple, la chaîne légère kappa de l'immunoglobuline, ainsi que six transcrits codant pour des hémoglobines (Ivanova *et al.*, 2003). De plus, bien qu'une puce à ADN Affymetrix ait été utilisée dans les trois cas de figure, ces puces différaient par leur version, et les algorithmes d'analyse des données n'étaient pas les mêmes (Ivanova *et al.*, 2003). Ces différences pourraient donc expliquer, du moins en partie, les discordances observées.

Les difficultés liées à l'identification des gènes de la souchitude semblent ainsi refléter les difficultés techniques des expériences plutôt que leur absence. En effet, il est généralement difficile d'obtenir des populations pures de cellules souches. En outre, les cellules souches peuvent subir des changements aléatoires lorsqu'elles sont cultivées *ex vivo*, mais également au cours du développement *in vivo*. Enfin, des différences entre espèces ont été mises en évidence (Ginis *et al.*, 2004; Sato *et al.*, 2003). Afin de pouvoir réaliser des comparaisons pertinentes, il serait donc nécessaire d'isoler des cellules pures, de les maintenir un minimum en culture, dans un état de développement défini et en quantité suffisante. Ceci devrait permettre de surmonter la variabilité inhérente aux techniques de comparaison elle-même.

Par ailleurs, une des caractéristiques communes entre les différents types de cellules souches est l'absence – ou la très faible expression – de marqueurs de différenciation par rapport aux cellules différenciées. Il est donc possible que ce qui différencie les cellules souches ne soit pas tellement ce qu'elles expriment, mais plutôt ce qu'elles *n'expriment pas*. En effet, les populations différenciées se caractérisent par l'expression d'un ensemble de facteurs et de récepteurs (ou marqueurs), dont certains sont

spécifiques d'un type cellulaire ou tissu donnés. Leur absence caractérise donc différents types de cellules souches. C'est le cas par exemple du gène *Thy1*, codant un antigène de surface absent dans les CSH (Cai, Weiss & Rao, 2004). Il est donc cohérent d'envisager qu'une comparaison systématique de l'ensemble des gènes sous-exprimés dans les différents types de cellules souches analysées pourrait mettre en évidence d'autres gènes tels que celui-ci. Ces cellules seraient donc caractérisées par la combinaison de sur-expressions et de sous-expressions de gènes qui, pris indépendamment, ne sont pas forcément spécifiques aux cellules souches, mais peuvent permettre de définir ensemble une signature transcriptionnelle des cellules souches.

Le concept de cellule souche ne peut peut-être pas se réduire à une liste de gènes sur-exprimés ; la souchitude serait plutôt le résultat cumulé de nombreux petits changements dans l'expression des gènes, qui seraient très difficiles à détecter en utilisant les techniques disponibles (Smith, Luong & Stein, 2009). Ainsi, les facteurs transcriptionnels et post-transcriptionnels pourraient jouer un rôle clé mais celui-ci serait spécifique à la niche des cellules souches *in vivo* (Moore & Lemischka, 2006). Au delà de ces considérations, on peut se demander si les informations apportées par les études transcriptomiques ne pourraient pas être appréhendées d'une autre manière.

### 1.3.2 La « Souchitude » : Etat ou Entité ?

#### 1.3.2.1 La plasticité des cellules souches : une ou plusieurs cellules souches ?

Le potentiel de différenciation d'une cellule souche est évalué par l'ensemble des types cellulaires trouvés dans sa descendance (Figure 1-1, p. 7). En particulier, pour les cellules souches adultes, ce potentiel a été traditionnellement considéré comme restreint au tissu dans lequel ces cellules résident. Parmi les données les plus convaincantes sur l'irréversibilité de l'engagement des progéniteurs, on trouve celles obtenues par l'étude des effets de l'expression ectopique de certains récepteurs cellulaires. Par exemple, lorsque l'EpoR est introduit dans les précurseurs macrophagiques, l'Epo stimule la formation de colonies à partir des progéniteurs, mais ces colonies sont composées de macrophages et non pas d'érythrocytes (McArthur *et al.*, 1995). Inversement, quand le récepteur du facteur stimulant la croissance des progéniteurs à l'origine des macrophages – le M-CSF – est introduit dans des progéniteurs érythrocytaires, il stimule la formation de colonies érythrocytaires (McArthur, Rohrschneider & Johnson, 1994). Ainsi, le devenir d'une cellule souche a été d'abord considéré comme quelque chose de prédéterminé et irréversible. Cependant, ces dernières années, il y a eu une accumulation

d'indices suggérant l'existence, chez l'adulte, de cellules pouvant générer des cellules appartenant à des tissus différents de celui dont elles proviennent.

Les premiers arguments suggérant que la différenciation n'entraîne pas nécessairement des modifications génétiques irréversibles chez les mammifères ont été avancés par les expériences de transfert de noyau (Wilmut *et al.*, 1997). En effet, cette étude décrit le clonage d'une brebis adulte en transférant le noyau de cellules somatiques adultes dans un ovocyte énucléé et non fertilisé. Aujourd'hui, des études suggèrent même que le transfert de noyau n'est pas nécessaire à la réactivation de programmes génétiques latents. En effet, malgré les différences entre les populations de cellules souches résidant dans des tissus différents (ou parfois même au sein d'un même tissu), une série d'études mettant en évidence des phénomènes de changement de lignage de différenciation suggère que ces différences peuvent être moins importantes qu'initialement supposées (Lakshmipathy & Verfaillie, 2005). Par exemple, Bjornson et ses collaborateurs ont montré, suite à une greffe de CSN génétiquement marquées, que celles-ci pouvaient coloniser la moelle osseuse et produire plusieurs types de cellules sanguines (Bjornson *et al.*, 1999). Enfin, des progéniteurs multipotents adultes, appelés MAPCs (*Multipotent Adult Progenitor Cell*), ont été trouvés – en très faible proportion – dans les cultures de cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse adulte humaine (Reyes *et al.*, 2002) ou murine (Jiang *et al.*, 2002). Ces cellules présentent un fort potentiel de prolifération : 50 à 150 doublements de la population en présence de fibronectine et EGF (Reyes *et al.*, 2001), et un surprenant potentiel de différenciation en cellules des trois feuilletts embryonnaires, proche de celui des CSE (Jiang *et al.*, 2002).

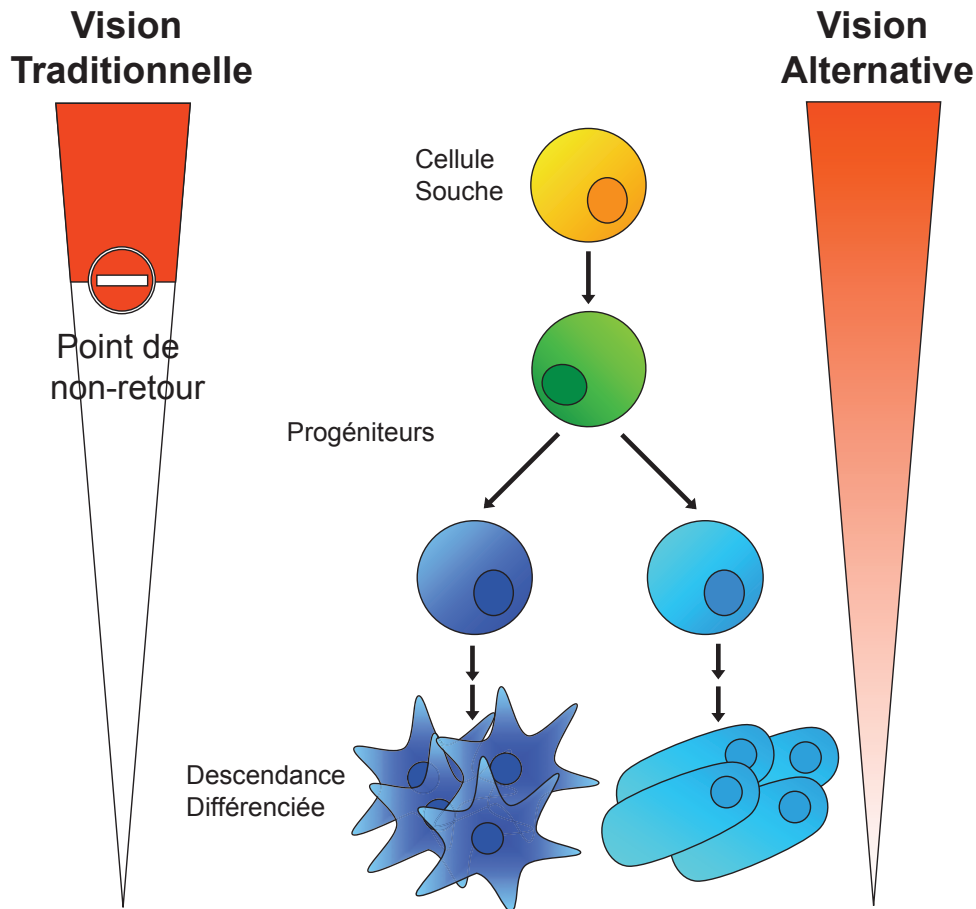
Cette apparente plasticité des cellules souches pourrait par ailleurs expliquer (ou être expliquée) par certaines propriétés de leur transcriptome. Les travaux de Terskikh et ses collaborateurs, présentés précédemment (§1.3.1, p.39), reportant un chevauchement des profils d'expression des gènes exprimés dans les CSN et les CSH. Ce chevauchement suggère que des programmes génétiques ou bien des réseaux de régulation seraient partagés par ces deux types de cellules souches. De plus, il a été montré par la suite que le transcriptome d'une cellule souche d'un type donné a beaucoup plus de transcrits en commun avec d'autres types cellulaires qu'avec sa propre descendance différenciée (Anisimov *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2002). Enfin, l'analyse des transcriptomes des MAPCs obtenues à partir de tissus différents (moelle osseuse, muscle, cerveau), réalisée par Jiang et ses collaborateurs en 2002, montre que leurs profils d'expression sont très similaires. Ainsi, l'expression de récepteurs et facteurs communs pourrait permettre aux cellules souches de répondre à des *stimuli* provenant d'environnements différents, ce qui expliquerait les bases moléculaires du phénomène de plasticité. De plus, ceci suggère que le

processus de différenciation des cellules souches nécessiterait l'action coordonnée de répresseurs et d'activateurs transcriptionnels, aboutissant à l'expression et à l'extinction des facteurs et marqueurs, déterminant les profils d'expression propres à la cellule différenciée.

Ces études ont ainsi montré que les cellules souches peuvent être très plastiques : elles sont en mesure de répondre aux signaux environnementaux, de modifier leurs caractéristiques et de mimer les propriétés et réponses des cellules souches d'autres tissus. De nombreuses études ont suggéré qu'il s'agit d'un événement commun. Mais ces études sont controversées. En effet, bien qu'elles puissent expliquer la plasticité des cellules souches des tissus adultes, d'autres explications sont concevables. Il est tout d'abord possible que des cellules souches spécifiques de différents tissus coexistent dans les organes (Jiang *et al.*, 2002). Il est aussi envisageable que la reprogrammation génétique d'une cellule souche n'ait lieu que dans des conditions appropriées, comme dans le cas du clonage (Wilmut *et al.*, 1997). Finalement, les plus sceptiques pensent qu'il s'agit de simples artefacts (co-purification d'autres cellules souches, dérive des cultures *in vitro*, etc.), ou le reflet de la perte des signaux donnés par le microenvironnement (ou niche) contrôlant leur devenir *in vivo*.

A l'heure actuelle, la notion de plasticité reste largement débattue et, comme il a été évoqué dans le chapitre 1.1 (§1.1.2, p. 11), la réversibilité de l'évolution du potentiel de différenciation oppose deux visions (Figure 1-5). D'une part, certains chercheurs soutiennent qu'il existe une population de cellules souches pluripotentes persistante chez l'adulte. Ces cellules seraient capables de se mobiliser et de coloniser différents tissus, où les facteurs qui y sont présents induiront leur différenciation en un type donné. L'existence des MAPCs semble ainsi témoigner en faveur de cette hypothèse, qui concorde avec la vision traditionnelle de la cellule souche (Figure 1-5, à gauche). Dans cette vision, la cellule souche perd son potentiel de différenciation de façon irréversible quand elle s'engage dans un lignage donné (point de non-retour). Ainsi, les partisans de cette théorie suggèrent que les phénomènes de changement de devenir observés ne sont qu'un artefact de la purification des cellules souches tissu-spécifiques, qui se voient co-purifiées avec ces cellules souches pluripotentes. D'autre part, certains auteurs affirment que le devenir d'une cellule souche n'est pas figé (Figure 1-5, à droite). Ainsi, une fois différenciée, une cellule peut revenir en arrière, se différencier, puis se redifférencier dans un autre type cellulaire. Il est aussi suggéré qu'une cellule peut passer directement d'un état différencié à un autre, phénomène qualifié de transdifférenciation\* (Weissman, 2000a). Ceci pourrait expliquer que les CSN puissent être à l'origine de cellules sanguines matures (Bjornson *et al.*, 1999).





**Figure 1-5 : Le devenir d'une cellule souche**

Deux visions du devenir d'une cellule souche s'opposent. Dans la vision traditionnelle (à gauche), lorsque les cellules souches s'engagent dans un lignage donné, elles perdent leur multipotence (en rouge) et sont incapables de revenir en arrière. En revanche une vision alternative (à droite), suggère quant à elle que lors de la différenciation cette multipotence diminue mais est conservée. Une cellule déjà engagée dans un processus de différenciation a donc la possibilité de retourner vers un état indifférencié pour changer de devenir. Figure adaptée (Weissman, 2000a).

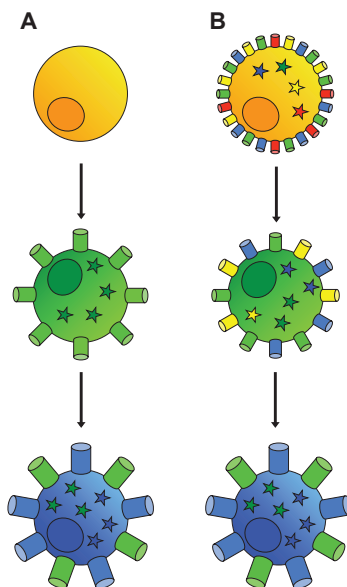
Ce débat rejoint un débat plus général sur la vision de la souchitude. En effet, à la lumière des études à grande échelle, une vision alternative propose que – plutôt qu'une *entité* – la souchitude est un *état*.

### 1.3.2.2 Une autre vision de la souchitude ?

Dans l'ensemble, le fait que les cellules souches existent dans différents tissus, en y exprimant des caractéristiques individuelles, et le fait que ces cellules soient interchangeables ou plastiques, permettent de penser que certaines propriétés de ces cellules sont universelles, ce qui conduit à la notion de souchitude. Mais plus qu'une entité ou un type cellulaire,

pouvant être définis à travers les gènes que ces cellules expriment, la souchitude pourrait être un état cellulaire, pouvant en particulier être atteint par des cellules différenciées (Blau, Brazelton & Weimann, 2001).

En termes moléculaires, deux mécanismes alternatifs ont été proposés (**Figure 1-6**). La théorie de *l'entité* suggère que les cellules souches expriment progressivement un (ou plusieurs) facteur(s) en amont d'une régulation hiérarchique, déterminant au fur et à mesure la voie à poursuivre (**Figure 1-6A**). Parmi ces facteurs, on peut par exemple citer le facteur SCL/Tal-1, dont la perte de fonction empêche le développement de tous les dérivés hématopoïétiques (Porcher *et al.*, 1996). Cette théorie est également soutenue par une analyse de la littérature sur différents types de cellules souches, indiquant que certains gènes sont exprimés dans ces dernières et pourraient constituer la liste de gènes de la souchitude (Cai *et al.*, 2004). Alternativement, la théorie de *l'état* propose que les cellules souches expriment l'ensemble des facteurs clés de leur descendance et que la différenciation s'accompagne d'une diminution progressive de l'expression de certains de ces gènes (**Figure 1-6B**). Les partisans de cette théorie ne remettent pas en cause l'existence d'une signature des cellules souches, mais ils mettent en doute la possibilité de mettre en évidence cette signature à travers des analyses de leur transcriptome (Zipori, 2004). Par ailleurs, bien que ces deux théories de la souchitude – entité ou état – semblent très divergentes, une analyse réalisée par Yan Leychkis, Stephen R. Munzer et Jessica L. Richardson, philosophes des sciences, suggèrent que des versions améliorées de ces théories sont susceptibles de converger (Leychkis, Munzer & Richardson, 2009).



**Figure 1-6 : Deux visions alternatives de la détermination du potentiel d'une cellule souche**

Deux hypothèses sur l'obtention du phénotype d'un type cellulaire donné à partir d'une cellule souche. **(A)** Soit la cellule souche n'exprime initialement aucun facteur (étoiles) ni marqueur (cylindres) de différenciation et leur expression progressive, en fonction des conditions, déterminera la voie de différenciation à suivre. **(B)** Soit la cellule souche exprime à faible niveau tout un ensemble de facteurs et marqueurs correspondant aux lignages en aval, dont certains prendront le dessus et d'autres seront inhibés en fonction des conditions. Figure adaptée (Zipori, 2004).

L'arbre de l'hématopoïèse est l'archétype de la vision où la cellule souche est une entité à la base d'un arbre. Dans ce modèle, la différenciation est linéaire, réalisée par des passages d'un état moins différencié à l'état suivant, plus différencié (Weissman, 2000a). Dans ce modèle, les choix de la cellule sont dichotomiques (lignage lymphocytaire *vs.* myéloïde/érythrocytaire, myéloïde *vs.* érythrocytaire, *etc.*) et l'environnement « éduque » la cellule en induisant l'expression successive des facteurs de tel ou tel lignage. Cependant, il est de plus en plus clair que, par exemple, les progéniteurs lymphoïdes – auparavant considérées comme exclusivement restreints au lignage lymphocytaire – conservent un certain potentiel myéloïde. Ces observations ont, par conséquent, mis en évidence le besoin de générer des nouveaux modèles, rendant compte de cette complexité (Ceredig, Rolink & Brown, 2009). Dans ces nouveaux modèles, tout au long de la différenciation, le potentiel de différenciation des cellules varie entre un potentiel *dominant* (qui sera le plus probablement conservé), un potentiel *disponible* (mais moins disponible que le dominant) et un potentiel *perdu* (mais qui reste latent, sa perte n'étant pas irrémédiable). Ainsi, la différenciation est vue comme un continuum selon la résultante entre les potentiels possibles, plutôt que des transitions entre un devenir cellulaire et le suivant (Ceredig *et al.*, 2009).

Au niveau épigénétique, cette vision alternative du concept de cellule souche pourrait se traduire par une régulation de l'accessibilité aux différents gènes par la machinerie de transcription, contrôlée par l'état de la chromatine. En effet, les modifications de la chromatine permettent le recrutement des complexes des protéines qui participent au maintien de l'état actif ou inactif des gènes (Ringrose & Paro, 2004). Or, les facteurs de remodelage, entre autres protéines interagissant avec la chromatine, sont les principaux responsables de l'architecture – et donc de l'état – de celle-ci. En accord avec une permmissivité plus importante à l'accès aux gènes dans les cellules souches, il a été montré, d'une part, que ces facteurs sont hyperdynamiques et interagissent faiblement avec la chromatine dans les CSE et, d'autre part, que cette caractéristique est perdue au cours de la différenciation (Meshorer *et al.*, 2006). De plus, ces facteurs sont fortement exprimés dans les cellules souches, comme le facteur HMGA2 dont l'activité semble nécessaire au maintien de l'autorenouvellement des CSN (Nishino *et al.*, 2008). Il a également été montré que les membres de la famille Polycomb, comme Bmi-1, sont impliqués dans le maintien de l'autorenouvellement de plusieurs types de cellules souches (Park *et al.*, 2003) et dans la mémoire de ces cellules dont les CSH (Iwama *et al.*, 2004). En effet, les modifications de la chromatine sont conservées lors de la réplication de l'ADN et de la mitose, d'où la transmission de certaines propriétés aux cellules filles. Le contrôle épigénétique de l'accessibilité aux gènes semble donc avoir un rôle clé dans l'état de cellule souche.

Le lien entre le potentiel de différenciation et l'accessibilité de la chromatine est également compatible avec l'hypothèse que, au niveau transcriptionnel, la multipotence se traduirait par un accès à l'ensemble des programmes de différenciation correspondant aux lignages en aval d'une cellule souche ou d'un progéniteur donnés. Cette hypothèse est corroborée par le fait que l'expression de certains gènes des CSH soit commune avec celle des progéniteurs en aval (Akashi *et al.*, 2003), ou encore par le fait que les CSE expriment plusieurs gènes spécifiques aux neurones dans des conditions normales de culture (Tropepe *et al.*, 2001). Cette vision est également en accord avec le modèle « d'amorçage multi-lignage » suggérant que les cellules souches expriment des niveaux faibles d'un grand nombre de gènes qui sont fortement exprimés dans leur descendance différenciée (Cross & Enver, 1997). La voie de différenciation à poursuivre serait alors déterminée par une restriction progressive des gènes exprimés.

D'un point de vue moléculaire, il est donc essentiel de considérer les mécanismes permettant d'avoir un faible niveau d'expression d'un très grand nombre de gènes. Par exemple, la CSH exprime environ 40% des gènes associés au système hématopoïétique (Akashi *et al.*, 2003). Au lieu de contrôler distinctement chacun de ces gènes, ce pourrait être l'expression aléatoire des gènes qui serait à l'origine de tels profils transcriptomiques (Chang *et al.*, 2008).

### 1.3.2.3 Rôle de la stochasticité de l'expression génique dans la différenciation cellulaire

En 1964, Jim Till et ses collaborateurs ont publié un article fondateur dans lequel ils ont mis en avant deux concepts : les cellules souches et la différenciation cellulaire stochastique (Till *et al.*, 1964). Le premier de ces deux concepts a donné lieu à l'un des champs de recherche les plus importants dans le domaine biomédical. Le dernier, en revanche, a été enterré sous la domination écrasante de la théorie du programme génétique déterministe. Cependant, au fil des années, les preuves d'une différenciation cellulaire stochastique (ou aléatoire) ont été accumulées dans de nombreux modèles expérimentaux (Hoang, 2004; Levenson & Housman, 1981). Ainsi, la variabilité du vivant n'est plus un élément à éliminer mais à intégrer dans les analyses des problématiques liées aux systèmes biologiques.

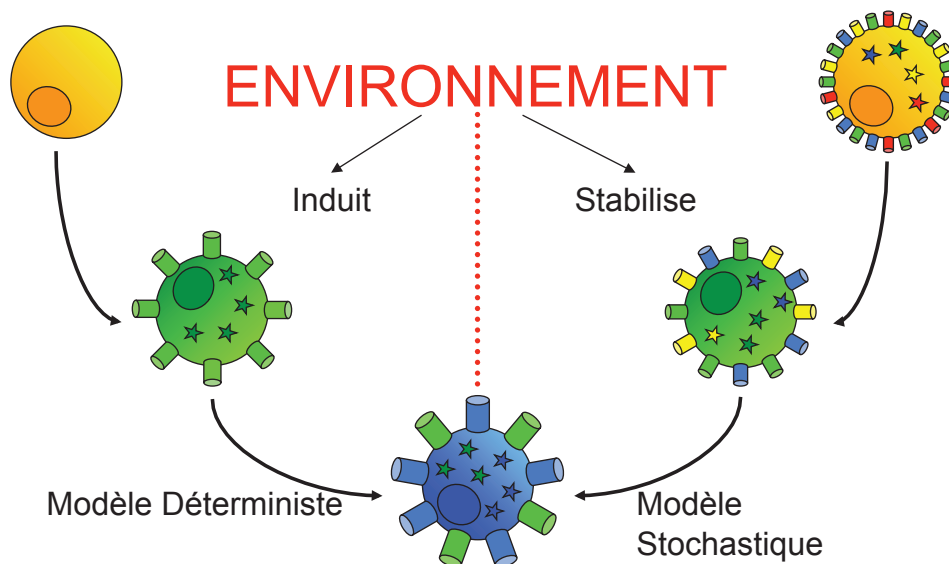
En particulier, concernant l'expression des gènes, les études cherchant à trouver la signature moléculaire des cellules souches, présentées dans les paragraphes précédents, utilisent des populations de cellules pour leurs analyses. Elles mesurent donc seulement la moyenne de la quantité d'ARNm sur l'ensemble de ces cellules. Pour aller plus loin, il a fallu développer des techniques permettant d'étudier l'expression des gènes à l'échelle d'une cellule-unique – ou *single-cell* en anglais – (Brady, 2000). Ces

nouvelles technologies restent cependant relativement laborieuses à mettre en œuvre pour l'instant, notamment par la difficulté à passer au « haut-débit » ; mais elles participent considérablement à notre compréhension des mécanismes sous-jacents. En particulier, ces technologies ont facilité l'identification des principales sources et étapes du devenir des cellules souches, cellule par cellule, par exemple pour les CSH (Yoshimoto & Yoder, 2009). Plus généralement, elles ont permis de remettre en question le mythe de la cellule moyenne (Levsky *et al.*, 2002; Levsky & Singer, 2003). En effet, il est aujourd'hui clair que la variabilité de l'expression des gènes d'une cellule à l'autre au sein d'une même population, n'est ni un phénomène marginal, ni un artéfact de mesure, mais il s'agit d'un processus biologique.

Même si elle a été déclarée « illégitime » dans un premier temps, la variabilité de l'expression des gènes a été suggérée dès les années 80. Par exemple, il a été montré que des gènes « spécifiques » de certains types cellulaires (comme la globine- $\beta$ ) sont exprimés – à un très faible niveau – par une grande variété de cellules différentes (Chelly *et al.*, 1989). Quelques études pionnières ont également montré une hétérogénéité de la réponse transcriptionnelle aux glucocorticoïdes parmi les cellules dérivées d'une même clone, et donc génétiquement identiques (Ko, Nakauchi & Takahashi, 1990). Mais ce n'est que dans les années 2000 que les bases (du moins expérimentales) de la nature stochastique de l'expression génique ont été posées (Elowitz *et al.*, 2002). En effet, l'article de Elowitz et ses collaborateurs a fourni de nombreux outils théoriques et expérimentaux permettant de décrire ce phénomène.

Aujourd'hui, l'existence de variations de l'expression génique au sein de cellules génétiquement identiques et soumises aux mêmes conditions a été démontrée expérimentalement (Kaern *et al.*, 2005). Il reste donc à comprendre sa signification biologique (Raser & O'Shea, 2004; Rosenfeld *et al.*, 2005). L'accumulation de preuves recueillies au cours de ces dernières années, montre que la stochasticité de l'expression de gènes joue un rôle dans une liste, toujours croissante, de processus biologiques. Par exemple, dans la l'embryogenèse et la genèse du cancer (Laforge *et al.*, 2005), ou dans le cycle cellulaire (Di Talia *et al.*, 2007). Il a aussi été montré que les populations bactériennes hétérogènes (avec des variations importantes au niveau de l'expression de leur gènes) se développent de façon plus dynamique dans un environnement changeant que les populations homogènes (Thattai & van Oudenaarden, 2004), suggérant que la variabilité de l'expression des gènes confère un atout adaptatif direct (Stern *et al.*, 2007; Veening, Smits & Kuipers, 2008). Enfin, il a été démontré, d'une part, que les fluctuations de l'expression de *Nanog* sont essentielles au fonctionnement du réseau OCT4/SOX2/NANOG, évoqué plus haut (§1.3.1.1, p. 40) et, d'autre part, que ce réseau maintient la nature stochastique de la transcription, afin d'interférer avec les signaux de

différenciation, dans les CSE (Kalmar *et al.*, 2009). Ainsi, très en avance sur son temps, Jean Jacques Kupiec a proposé en 1983 une théorie probabiliste de la différenciation cellulaire et l'embryogenèse, postulant déjà qu'une expression différentielle des gènes est provoquée par des événements aléatoires (Kupiec, 1983). En 1997, il va plus loin en proposant sa « théorie Darwinienne de la différenciation cellulaire », selon laquelle la stochasticité de l'expression génique serait non seulement un processus cellulaire en soit, mais un processus nécessaire à la différenciation cellulaire (Kupiec, 1997). Il faudra cependant attendre encore une décade avant d'avoir des preuves expérimentales chez les eucaryotes supérieurs (Losick & Desplan, 2008; Neildez-Nguyen *et al.*, 2008; Stockholm *et al.*, 2007). Par conséquent, plutôt que d'induire la différenciation à partir d'une cellule souche, l'environnement sélectionnerait ou stabiliserait certains phénotypes, selon le besoin, dans une population initialement hétérogène (Figure 1-7).



**Figure 1-7 : Deux modèles de différenciation cellulaire**

Dans une vision déterministe (à gauche), l'environnement induit l'expression des gènes impliqués dans le processus de différenciation. La population de cellules va ainsi exprimer ou réprimer certains gènes de manière synchrone et sous le contrôle des signaux de l'environnement. Le modèle stochastique (à droite) propose quant à lui que l'ensemble des cellules d'une population présentent à la base des différences dans les profils d'expression, résultant d'une expression aléatoire des gènes. Un changement d'environnement va ainsi sélectionner ou stabiliser les cellules présentant déjà un profil d'expression (ou la prédisposition) leur permettant un maintien dans ces nouvelles conditions.

Ainsi, l'un des principaux enjeux à l'heure actuelle consiste à élucider les bases moléculaires de la stochasticité de l'expression des gènes et, en particulier, le lien entre celle-ci et les propriétés des cellules souches. Par exemple, il est aujourd'hui essentiel de mieux comprendre les mécanismes ayant lieu en amont de la transcription. Parmi ces mécanismes, l'étude de l'influence de l'environnement chromatinien sur la variabilité de l'expression des gènes, peut nous apporter des éléments clés de réponse. Les nouvelles données cartographiques de l'*épigénome* du Road Map Project du NIH (Mendenhall & Bernstein, 2008) fourniront ainsi des informations précieuses sur l'état de la chromatine lors des différents événements ayant lieu au sein des cellules souches (maintien, reprogrammation, *etc.*). Dans ce sens, Ramalho-Santos *et al.* (2002) ont localisé sur le génome murin 60 des 216 gènes de souchitude qu'ils avaient préalablement mis en évidence et ont montré que 20 % de ces gènes étaient localisés sur le même chromosome 17. La probabilité d'un tel regroupement par hasard est particulièrement faible. Ce regroupement est ainsi compatible avec l'idée d'une régulation par environnement épigénétique partiellement similaire, et pourrait témoigner d'une co-régulation de ces gènes.

Il serait ainsi particulièrement intéressant de comprendre les réseaux de gènes qui régulent le comportement des cellules souches. En effet, le contrôle du devenir cellulaire et, en particulier, le maintien de l'autorenewement, dépendent à la fois de mécanismes déterministes et stochastiques, et ces mécanismes de régulation sous-jacents sont le résultat de réseaux moléculaires complexes. Les approches de la biologie des systèmes seront probablement nécessaires pour interpréter l'expression des gènes et déterminer les gènes et les voies fonctionnelles impliquées dans le choix du devenir cellulaire (Foster *et al.*, 2009). Par conséquent, à l'heure actuelle, plutôt que de regarder individuellement les gènes identifiés par les études transcriptomiques, il faut d'avantage s'intéresser aux fonctions biologiques auxquelles ces gènes participent, et le rôle de leurs produits dans l'autorenewement et la différenciation.

L'analyse de l'expression des gènes à haut-débit caractérise, par conséquent, la transition de la génomique structurale à la génomique fonctionnelle. Il s'agit ainsi de la première étape vers la compréhension du fonctionnement de certains réseaux (de protéines, de gènes). L'étape suivante est la caractérisation des fonctions biologiques des gènes et le rôle accompli par leurs produits dans le devenir des cellules souches.

### 1.3.3 Vers la Compréhension des Réseaux et des Fonctions Cellulaires

L'analyse du transcriptome représente une étape clé dans la compréhension des gènes gouvernant les propriétés propres aux cellules souches, et en

particulier, le contrôle de la balance entre l'autorenouvellement et la différenciation. En effet, malgré quelques limites, ces données ont permis d'avoir une vision globale du transcriptome des cellules souches, vision qu'il était impossible d'avoir par les études gène à gène, réalisées au début de la caractérisation de ces cellule. L'information extraite de ces analyses est conséquente et les analyses transcriptomiques aboutissent souvent à des centaines de gènes candidats. Ce nombre élevé implique des réseaux de régulation coordonnés, et soulève le besoin d'une « vue d'ensemble » des fonctions moléculaire ou cellulaires sous-jacentes.

### 1.3.3.1 Réseaux de régulation et voies de signalisation

L'hypothèse sous-jacente à l'analyse des réseaux est que l'expression des gènes impliqués dans une même fonction varient de façon coordonnée. Ces réseaux impliquent, en effet, une activité coordonnée des facteurs de transcription responsables de l'activation de ces gènes et, par conséquent, une activité coordonnée des voies de signalisation en amont de ces facteurs. Les études transcriptomiques donnent accès à ces mécanismes de régulation, soit en permettant de proposer des réseaux de transcription à partir de l'analyse des gènes sur- ou sous-exprimés, soit en mettant en évidence une régulation conjointe des éléments d'une même voie de signalisation.

Les facteurs clés de transcription ont été décrits dans d'autres systèmes que le système hématopoïétique. Cependant, probablement grâce aux techniques de purification et à la disponibilité de modèles particulièrement avancés, c'est dans ce système que ces réseaux sont le mieux établis (Cantor & Orkin, 2001). Ces facteurs peuvent moduler les niveaux d'expression de leurs gènes cibles en se liant à des séquences de reconnaissance (ou éléments de réponse) – plus ou moins spécifiques – dans les régions régulatrices de ces derniers. Notamment, le devenir de la cellule souche et de sa descendance s'accompagne de l'expression d'un certain nombre de gènes spécifiques (facteurs, marqueurs, *etc.*). Ainsi, l'analyse des sites de reconnaissance des facteurs clés dans les régions promotrices des gènes dont l'expression sera modulée de façon spécifique, a permis de mettre en évidence des codes de régulation transcriptionnelle. En effet, cette spécificité d'expression semble coordonné grâce aux diverses combinatoires des éléments de réponse dans les régions promotrices de ces gènes, par un ensemble de facteurs de transcription (Ottersbach *et al.*, 2010). Par exemple, l'étude de la région régulatrice et promotrice du gène *Scl/Tal1*, codant le facteur clé de l'hématopoïèse SCL/TAL1 (Lecuyer & Hoang, 2004), a mis en évidence une association spécifique de trois éléments de réponse. Cette combinaison ETS-ETS-GATA permet, en effet, la fixation de facteurs essentiels FLI1, Elf1 et ERG (de la famille des ETS) et GATA2, et s'est avérée nécessaire pour la bonne régulation de ce gène (Gottgens *et al.*, 2002). Une analyse *in silico*, recherchant cette même



signature ETS-ETS-GATA dans les régions promotrices tout au long du génome entier, ont par la suite permis d'identifier de nouvelles régions de régulation dans d'autres gènes. Le lien entre l'activité de trois de ces gènes et le développement sanguin et endothélial a d'ores et déjà été validé (Donaldson *et al.*, 2005).

Pour aller plus loin et afin d'avoir une vue d'ensemble, certaines études se sont intéressées aux réseaux transcriptionnels. Ces réseaux décrivent les interactions entre les différents facteurs de transcription impliqués au cours du processus allant de la cellule souche étudiée jusqu'à sa descendance complètement différenciée. Les études fonctionnelles, alliant des études à grande échelle et des analyses *in silico* à des approches de biologie cellulaire et de génétique, ont permis de cartographier les interactions (physiques, inhibition, activation, *etc.*) entre les facteurs de transcription et avec leurs gènes cibles au cours du devenir des cellules souches. En pratique, l'analyse des régions promotrices des gènes différentiellement modulés (identifiés par l'analyse du transcriptome) lors de l'engagement de la cellule souche ou de sa descendance, ainsi que les études permettant d'identifier les gènes cibles de certains facteurs de transcription (comme les études basées sur la co-immuno-précipitation de la chromatine liée à une protéine d'intérêt, la ChIP), ont permis d'établir ces réseaux. Il a ainsi été proposé que, de manière analogue au réseau OCT4/SOX2/NANOG dans les CSE (§1.3.1.1, p. 40), le réseaux SCL/GATA2/FLI1 est susceptible de jouer un rôle clé dans le maintien de l'état indifférencié par une multitude de boucles de rétrocontrôle positives (Miranda-Saavedra & Gottgens, 2008).

Par ailleurs, bien que les différentes études réalisées pour le moment n'aient pas permis de mettre en évidence un ensemble de gènes responsables de souchitude, l'analyse du transcriptome a néanmoins mis en évidence un certain nombre de voies de signalisation impliquées dans le maintien de l'autorenewement. Par exemple, une étude réalisée sur des cellules souches hépatiques murines induites à se différencier, montre la variation coordonnée de plusieurs éléments de la voie de signalisation Wnt (Plescia, Rogler & Rogler, 2001). En effet, non seulement différents composants de la voie sont sous-exprimés, mais des régulateurs négatifs sont aussi sur-exprimés, entraînant une extinction de cette voie au cours de la différenciation. Les auteurs ont également observé une extinction de l'expression de c-myc et de la cycline D, deux gènes cibles de la voie Wnt. Ces observations sont corroborées, d'une part, par les études transcriptomiques, qui montrent que certains éléments de cette voie sont sur-exprimés par différents types de cellules souches (Ivanova *et al.*, 2002) et, d'autre part, par des études fonctionnelles suggérant le rôle de cette voie dans le maintien des cellules souches dans d'autres modèles, comme les cellules souches épidermiques ou nerveuses, entre autres (Reya & Clevers, 2005).

Par ailleurs, l'expression des membres de la voie de signalisation Notch peut également être mise en évidence dans différents types de cellules souches. En particulier, cette voie semble importante pour le maintien de l'autorenouvellement des cellules souches germinales, hématopoïétiques et neurales chez différentes espèces, vraisemblablement grâce à sa capacité à inhiber la différenciation de ces cellules dans certaines conditions physiologiques (Molofsky, Pardal & Morrison, 2004). Par exemple, jagged-1 – le ligand soluble de Notch – induit la survie des CSH (Karanu *et al.*, 2000). Or ceci est corroboré par la présence du transcrite de Notch1 dans le transcriptome des CSH (Park *et al.*, 2002). En outre, l'interférence entre les voies de signalisation Notch et Wnt pourrait être à l'origine de signaux cellulaires nécessaires à la prolifération (signaux Wnt) en l'absence de différenciation (signaux Notch), menant à des divisions symétriques des cellules souches, nécessaires pour l'expansion des cellules en état d'autorenouvellement (Espinosa *et al.*, 2003).

Enfin, la voie de signalisation Hedgehog semble être également impliquée dans le contrôle du devenir des cellules souches et dans le maintien et régénération des tissus adultes (Blank, Karlsson & Karlsson, 2008). En effet, elle est nécessaire au maintien des neurosphères, structures contenant des CSN (Lai *et al.*, 2003; Machold *et al.*, 2003), mais aussi à la prolifération des cellules souches somatiques des ovaires de drosophiles (Zhang & Kalderon, 2001). Aussi, cette voie semblerait être impliquée dans le contrôle du devenir des CSH (Bhardwaj *et al.*, 2001; Merchant *et al.*, 2010). D'autre part, certains composants de cette voie sont mutés ou sur-exprimés dans plusieurs types de cancers (Beachy, Karhadkar & Berman, 2004; Kubo *et al.*, 2004).

De manière intéressante, ces mêmes voies qui semblent importantes pour l'autorenouvellement des cellules souches sont liées à l'apparition de cancers lorsqu'elles sont dérégulées, tels que des carcinomes du colon ou de l'épiderme (voie Wnt), des médulloblastomes (voie Hedgehog) ou des leucémies (voie Notch), renforçant le lien entre cellules souches et cancer suggéré précédemment (Reya *et al.*, 2001). De plus, il semblerait que ces trois voies de signalisation fonctionnent conjointement, via de fortes interactions (Cohen, 2003).

Ces exemples montrent donc que les mêmes voies de signalisation sont importantes pour différents types de cellules souches, même si les profils d'expression des gènes codant pour les protéines impliquées dans ces voies peuvent varier d'un type de cellule souche à un autre. Ces cellules partageraient donc des mécanismes moléculaires similaires, mais non identiques. En regardant les gènes dont l'expression varie de façon simultanée, il serait donc possible d'identifier des voies qui n'étaient pas auparavant associées aux cellules souches, voire de nouvelles voies de

signalisation. Ceci montre l'importance de ne pas analyser les données transcriptomiques uniquement gène à gène, mais également à une échelle plus globale, en regroupant les gènes impliqués dans des fonctions moléculaires communes.

### 1.3.3.2 Classes de gènes et grandes fonctions

Les cellules souches, quel que soit le tissu dont elles proviennent ou leur potentiel de différenciation, doivent faire face aux mêmes défis. En effet, au cours du chapitre 1.1, un certain nombre de propriétés communes, impliquant plusieurs fonctions moléculaires ont été décrites. Par exemple, les cellules souches peuvent être soumises à des périodes de division accélérée, ou entrer dans des périodes de quiescence (dans le cas des cellules souches qui durent toute la vie d'un individu). Elles ont donc besoin de contrôler leur cycle cellulaire afin d'éviter la sénescence. De plus, les cellules souches doivent maintenir l'intégrité de leur génome afin d'éviter l'accumulation de mutations génétiques et/ou une transformation néoplasique. Enfin, le choix entre autorenouvellement et différenciation implique une interaction avec leur environnement ou niche. Ainsi, certaines fonctions devraient être privilégiées ou plus rigoureusement contrôlées, éventuellement par des mécanismes similaires, dans différents types de cellules souches et de progéniteurs.

Les analyses transcriptomiques aboutissent souvent à des centaines de gènes candidats. Afin de faciliter l'analyse, les résultats sont généralement classés dans des catégories fonctionnelles selon l'ontologie de *Gene Ontology* (Ashburner *et al.*, 2000). Souvent, au moins une dizaine de classes fonctionnelles sont représentées. En citant par exemple l'étude pionnière de Phillips et ces collaborateurs en 2000 sur les CSH – décrite précédemment (§1.3.1.2, p. 41) – les gènes surexprimés par ces cellules sont impliqués dans la signalisation cellulaire, la transcription et la traduction, le métabolisme, le contrôle du cycle cellulaire, la structure cellulaire et le stress. Ces observations suggèrent ainsi que le maintien du phénotype d'une cellule souche nécessite un large spectre de gènes fonctionnellement divers.

Par ailleurs, il est essentiel de signaler que dans les études transcriptomiques des cellules souches, une très grande partie des gènes exprimés par ces cellules ne correspond qu'à des gènes dont la fonction associée est inconnue. En procédant par des analyses de réseaux et en comparant plusieurs études du transcriptome de différents types de cellules souches dans différentes conditions, des associations robustes entre gènes connus et gènes inconnus pourront suggérer une possible fonction de ces derniers. En aval des études à grande échelle, les méthodes permettant l'identification et la caractérisation de nouveaux gènes sont donc

essentiels. Ainsi, avec l'avancement de l'annotation du génome, certains gènes passeront de la catégorie « gènes nouveaux » à une classe fonctionnelle donnée. Les techniques de génétique fonctionnelle et les approches de biologie cellulaire permettront également de caractériser fonctionnellement les gènes et les fonctions cellulaires ou moléculaires d'intérêt. Par exemple, en aval d'une étude transcriptomique, mettant en évidence une sur-expression de 277 gènes par les CSH par rapport à des progéniteurs hématopoïétiques engagés, le rôle fonctionnel de 61 gènes dont la fonction n'avait jamais été reliée aux CSH a été étudié. Leur implication a été évaluée dans un modèle d'étude de l'hématopoïèse chez le poisson zèbre, en réalisant des inhibitions à moyenne échelle par interférence à l'ARN grâce à la technique Morpholino antisense oligonucleotide. Parmi ces gènes, l'inhibition de 14 d'entre eux (23 %) a abouti à un phénotype affectant le système hématopoïétique et ont ainsi été validés (Eckfeldt *et al.*, 2005). Par conséquent, les données et les portes ouvertes par les études à grande échelle peuvent être réévaluées à tout moment, et évoluent en parallèle des techniques permettant d'affiner leur validation.

## 1.4 Conclusion

Durant la dernière décennie, le domaine de l'étude des cellules souches a connu un essor important, avec notamment l'identification des CSE humaines et la mise en évidence d'une possible plasticité des cellules souches somatiques. La compréhension des mécanismes gouvernant les propriétés propres aux cellules souches (la souchitude), en particulier le contrôle de l'équilibre entre autorenouvellement et différenciation, est ainsi devenu un enjeu capital. Dans les études explorant cet équilibre, les progéniteurs offrent une alternative permettant de s'affranchir de la complexité (du point de vue des possibilités du devenir cellulaire) et des contraintes expérimentales (rareté, difficulté de purification, *etc.*) de la cellule souche. Afin de mieux comprendre les bases moléculaires du contrôle de l'équilibre entre l'autorenouvellement et la différenciation, nous avons décidé de profiter pleinement des avantages des T2ECs. Concrètement, les T2ECs sont des progéniteurs en état d'autorenouvellement dont la différenciation terminale en érythrocytes matures peut être induite à volonté, permettant un total contrôle sur cet équilibre. De plus, grâce à leur monopotence, les choix de lignage ne pourront pas interférer avec le choix autorenouvellement *vs.* différenciation.

Suite aux débats engendrés par l'étude du transcriptome des cellules souches, les chercheurs ont dû remettre en question la pertinence de ces analyses. Cependant, bien que l'hypothèse du *Master Switch* ait été remise en cause ou que la nature stochastique de l'expression des gènes complexifie le panorama, ceci est loin de démontrer l'inutilité de la transcriptomique. Malgré quelques limites, les analyses transcriptomiques ont permis la découverte de mécanismes d'une complexité qui semble inhérente à la biologie des cellules souches et qui n'aurait jamais été soupçonnée par des approches classiques de type « gène à gène ». Ce débat ne remet donc pas en question le système d'étude mais plutôt les questions qu'on lui pose. L'importante masse de données générée par les études menées dans l'ère de la génomique – bien qu'intimidante au premier abord – montre que, contrairement à un ensemble de gènes bien défini, le concept de cellule souche met en jeu un vaste spectre de voies de signalisation et de fonctions cellulaires. Ainsi, les études transcriptomiques ont pu constituer un point de départ pour identifier des voies de signalisation ou des fonctions qui semblent particulièrement importantes pour le maintien de l'état d'autorenouvellement, ou pour l'engagement des cellules souches et de leur descendance vers la différenciation.

La question au cœur de notre recherche est celle de la compréhension des bases moléculaires de l'autorenouvellement. Pour adresser cette question,

nous avons choisi d'explorer deux processus qui nous semblent essentiels dans le contrôle des choix du devenir cellulaire. D'une part, une analyse précédente du transcriptome des T2ECs lors de l'engagement vers la différenciation a mis en évidence la sur-expression du gène *OSC/LSS* – codant une enzyme impliquée dans la voie de biosynthèse du cholestérol – par les cellules en état d'autorenouvellement. Dans le cadre de ces travaux de thèse, nous avons ainsi étudié le rôle de la régulation de la synthèse du cholestérol *via* l'expression du gène *OSC/LSS* dans le maintien de l'autorenouvellement, en combinant des approches chimiques et des approches de génétique fonctionnelle dans les T2ECs (chapitre 2.2). D'autre part, une question qui reste ouverte à l'heure actuelle est celle du rôle de l'expression stochastique des gènes lors du processus de différenciation. Afin d'explorer cette question, nous avons dans un premier temps amorcé l'incontournable étape de mise au point d'un certain nombre d'outils permettant de suivre l'expression des gènes sur cellule unique à l'aide de gènes rapporteurs (chapitre 2.3). Afin de pouvoir moduler l'expression (sur-expression et sous-expression) de l'*OSC/LSS*, d'une part, et de pouvoir exprimer des gènes rapporteurs, d'autre part, il été essentiel de mettre en place, dans un premiers temps, des systèmes de génétique fonctionnelle fiables et adaptés au T2ECs (chapitre 2.1).



## 2 RESULTATS

### 2.1 Systemes de Génétique Fonctionnelle

#### 2.1.1 *Optimisation des Conditions de Transfection*

Nos stratégies d'inhibition d'un gène candidat, tout comme celles de sur-expression, sont basées sur la transfection transitoire ou stable des T2ECs. Nous avons donc commencé par mettre au point et optimiser les protocoles de transfection dans ces cellules. Les T2ECs, étant des cellules primaires et en suspension, sont très difficiles à transfecter. Les techniques les plus communes en termes de transfection cellulaire (liposomes, *etc.*) étant inefficaces, nous utilisons la nucléofection (technologie Amaxa). Cette technique s'est avérée très efficace avec nos cellules mais elle affecte trop lourdement la viabilité de celles-ci. Afin d'augmenter la rentabilité de cette méthode, nous avons optimisé les conditions du protocole.

Afin de visualiser les cellules exprimant le transgène et pouvoir déterminer par cytométrie de flux (FACS) le pourcentage de cellules transfectées, nous avons utilisé le vecteur pmaxGFP (Amaxa), qui permet l'expression constitutive de la GFP sous le contrôle d'un promoteur CMV. Les matériels et méthodes utilisés pour la culture des T2ECs, la nucléofection et l'analyse du pourcentage de cellules fluorescentes par FACS sont décrits dans (Mejia-Pous *et al.*, 2009).

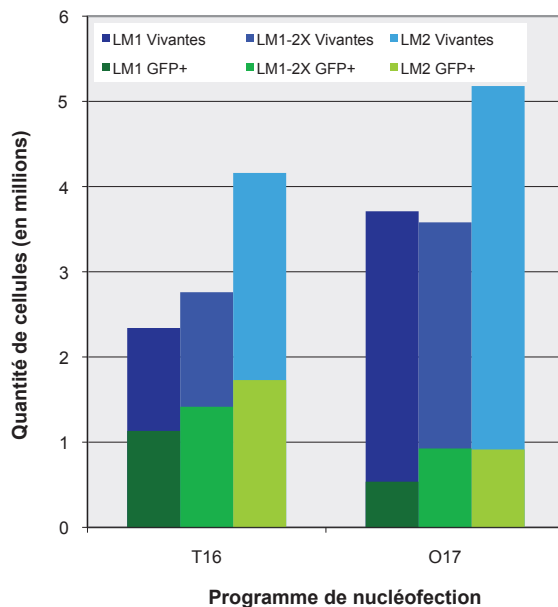
##### 2.1.1.1 **Programme de nucléofection et milieu de reprise**

La nucléofection est une technologie basée sur l'électroporation à la fois de la membrane plasmique et de l'enveloppe nucléaire, permettant ainsi la localisation de l'ADN exogène directement dans le noyau. Le dispositif utilisé propose différents programmes d'électroporation, faisant varier les paramètres du choc électrique (durée, intensité, *etc.*). Ainsi, il est indispensable de déterminer le programme le plus approprié pour les T2ECs, à savoir celui qui offre le meilleur compromis entre efficacité (pourcentage des cellules transfectées) et viabilité (nombre de cellules vivantes après transfection). Les premiers tests ont été réalisés dans l'équipe par Sandrine Giraud, permettant d'exclure un certain nombre de programmes. Nous avons ensuite étudié en détail deux des programmes retenus : le programme T16 et le programme O17. Un autre paramètre qui permet d'améliorer la viabilité des cellules est le milieu de reprise. Les T2ECs sont normalement cultivées dans un milieu dénommé LM1 (Gandrillon *et al.*, 1999). Nous avons donc testé deux milieux alternatifs



pour reprendre les cellules après transfection : le milieu LM1-2X (LM1 avec une concentration deux fois plus importante des facteurs de croissance nécessaires pour le maintien des T2ECs) et le milieu LM2 (idem LM1, mais en utilisant un milieu de base pauvre en calcium).

Afin de mesurer les performances des différentes conditions testées, nous avons mesuré le lendemain de la transfection le nombre de cellules vivantes et le pourcentage relatif (par rapport à la population totale) de cellules fluorescentes, afin de calculer leur nombre absolu. Nous avons ainsi déterminé que, quel que soit le programme utilisé, le milieu de reprise peut nettement influencer la survie des T2ECs après transfection. Plus précisément, des trois milieux testés, le milieu LM2 est celui qui permet d'obtenir le plus grand nombre de cellules vivantes, pour un programme donné (Figure 2-1). Concernant l'efficacité de la transfection, le programme T16 est meilleur que le programme O17, mais il est moins viable. En effet, pour un même milieu de reprise, la population transfectée avec programme T16 contient moins de cellules vivantes, mais la proportion et le nombre de cellules exprimant le transgène est plus important (Figure 2-1). Ainsi, nous avons choisi de continuer les expériences en utilisant le programme T16 et le milieu LM2.

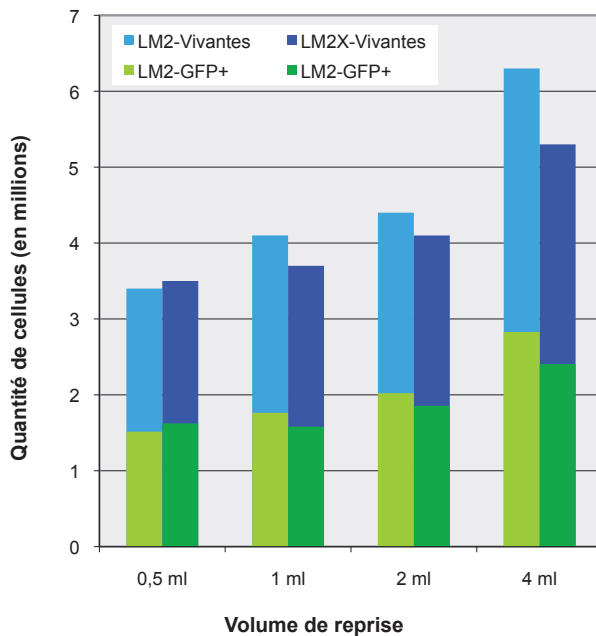


**Figure 2-1 : Test du programme de nucléofection et du milieu de reprise**

5.10<sup>6</sup> cellules ont été transfectées avec le vecteur *pmaxGFP* en utilisant soit le programme O17, soit le programme T16 et ont ensuite été reprises dans 4ml de l'un des milieux testés : du LM1, du LM1-2X ou du LM2. Le lendemain, le nombre de cellules vivantes a été déterminé par marquage au bleu de trypan (coloration des cellules mortes), puis comptage sur lame de Mallassez. Le pourcentage de cellules fluorescentes a été mesuré par cytométrie de flux, et le nombre de cellules fluorescentes a ensuite été calculé par rapport au nombre des cellules vivantes.

### 2.1.1.2 Volume de reprise

En utilisant le programme T16 et le milieu LM2 comme référence, nous avons ensuite analysé l'effet du volume de reprise et conclu que plus le volume est grand, meilleure est l'efficacité de transfection (Figure 2-2). Enfin, étant donné que le milieu LM1-2X semble améliorer la viabilité par rapport au milieu LM1 (Figure 2-1), nous avons cherché à déterminer si, de manière analogue, le milieu LM2X (LM2 avec une concentration deux fois plus importante des facteurs de croissance) augmente la viabilité par rapport au milieu LM2. Cependant, nous avons observé que le milieu LM2 permet d'obtenir plus de cellules vivantes (et donc plus de cellules positives) que le milieu LM2X (Figure 2-2).



**Figure 2-2 : Test du volume et du milieu de reprise**

*5.10<sup>6</sup> cellules ont été transfectées avec le vecteur pmaxGFP en utilisant le programme T16 et ont ensuite été reprises dans 0,5, 1, 2 ou 4ml de soit LM2, soit LM2X. Le lendemain, le nombre de cellules vivantes a été déterminé par marquage au bleu de trypan (coloration des cellules mortes), puis comptage sur lame de Mallassez. Le pourcentage de cellules fluorescentes a été mesuré par cytométrie de flux, et le nombre de cellules fluorescentes a ensuite été calculé par rapport au nombre des cellules vivantes.*

Suite aux différents tests décrits ci-dessus, nous avons donc déterminé que transfecter les T2ECs en utilisant le programme T16 et ensuite reprendre les cellules dans 4 ml de milieu LM2, constituent les conditions optimales de transfection dans ces cellules.

## 2.1.2 Système de Sous-expression d'un Gène Candidat par RNAi

### 2.1.2.1 Principe

Afin d'étudier l'effet de l'inhibition de l'expression d'un gène, nous avons choisi la méthode des shRNA (*short hairpin RNA*). Cette technique est basée sur le principe d'interférence à l'ARN, une réponse cellulaire qui cible

et inactive l'ARN simple brin qui est à l'origine d'un ARN double brin, reconnu comme un ARN viral par la cellule (Figure 2-3, à gauche). La réponse induite par les shRNA est un détournement de cette réponse cellulaire antivirale par l'utilisation d'un vecteur permettant une expression transitoire d'un petit ARN. Ce dernier, qui présente une structure secondaire de type tige-boucle, cible l'ARNm correspondant au gène candidat et entraîne l'inhibition de son fonctionnement par dégradation ou par obstruction de la traduction (Figure 2-3, à droite).

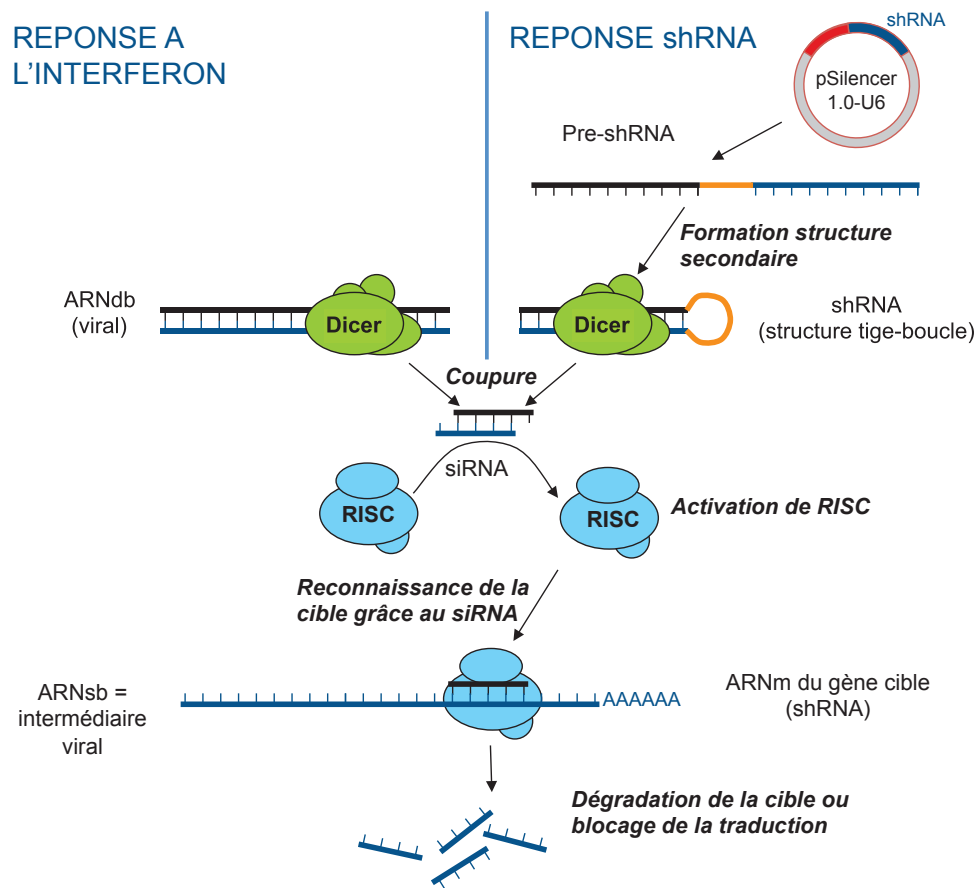


Figure 2-3 : Principe de l'interférence à l'ARN

La réponse à l'interféron (à gauche) est une réponse endogène activée par la présence d'ARN double brin (ARNdb) viral. Elle est déclenchée par Dicer, un complexe multi-protéique qui reconnaît l'ARNdb et le digère en petits ARN double brin (siRNA), qui activeront à leur tour le complexe RISC et permettront de cibler l'ARN simple brin, intermédiaire viral de l'ARN double brin détecté. La réponse induite par le shRNA (à droite), est basée sur l'utilisation du vecteur pSilencer1.0-U6, qui permet l'expression de petits ARN sous le contrôle du promoteur U6 murin (recrutement de l'ARN polIII). L'ARN transcrit par ce vecteur va permettre la formation du shRNA (short hairpin RNA) : une structure en tige-boucle qui sera reconnue comme de l'ARNdb par Dicer, déclenchant ainsi une réponse d'interférence à l'ARN. Le shRNA contient une séquence complémentaire à l'ARNm cellulaire d'intérêt, permettant de le cibler avec le complexe RISC et entraînant ainsi la dégradation ou le blocage de la traduction (selon spécificité) du gène ciblé.

### 2.1.2.2 Un exemple d'utilisation : l'inhibition de l'*OSC/LSS*

Afin de cibler spécifiquement l'ARNm de l'*OSC* (voir Chapitre 2.2, p.86), des oligonucléotides ont été conçus en utilisant le programme Whitehead (<http://jura.wi.mit.edu/bioc/siRNAext/home.php>). Après avoir aligné les 63 séquences proposées avec le génome du poulet (sur le site Ensembl [http://www.ensembl.org/Multi/blastview?species=Gallus\\_gallus](http://www.ensembl.org/Multi/blastview?species=Gallus_gallus)), 7 ont été retenues. Parmi ces 7, les 5 séquences présentant le meilleur score BBRC (Amarzguioui & Prydz, 2004) ont été choisies. Enfin, la séquence de la boucle, la séquence anti-sens de la cible, le signal de terminaison de transcription et les sites de restriction nécessaires au clonage ont été ajoutés. De plus, afin d'augmenter la spécificité et éviter les erreurs de répllication dans les bactéries, une mutation sur 2 nucléotides a été introduite au centre de la séquence sens (la partie qui a la même séquence que l'ARNm). Nous avons ensuite cloné ces 5 oligonucléotides dans le vecteur p*Silencer*<sup>TM</sup> 1.0-U6 sous forme d'ADN double brin (le détail du clonage est décrit dans le §2.2.3, p.101).

Les cinq séquences des shRNA dirigés contre l'ARNm de l'*OSC/LSS* et clonés dans le vecteur p*Silencer*1.0-U6 sont décrites ci-dessous (gras: sites de restriction – ApaI en 5' et EcoRI en 3' – pour le clonage, souligné : nucléotides mutés, surligné : séquence de la boucle, italique : séquence de terminaison de transcription).

shOSC1 :

5' GCGGGCCCGAGCCATCAGCGAGCTGTATTCAAGAGATACAGCTCCGTGATGGCTCTTTTTGAATTCG3'

shOSC2 :

5' GCGGGCCCGCCTCAGGACTACGTTGCTTTCAAGAGAGCAACGTTCTCCTGAGGCTTTTTGAATTCG3'

shOSC3 :

5' GCGGGCCCGTCTGATTTCTCCTATGCTTTCAAGAGAGCATAGGTTCAATCAGACTTTTTGAATTCG3'

shRNA4 :

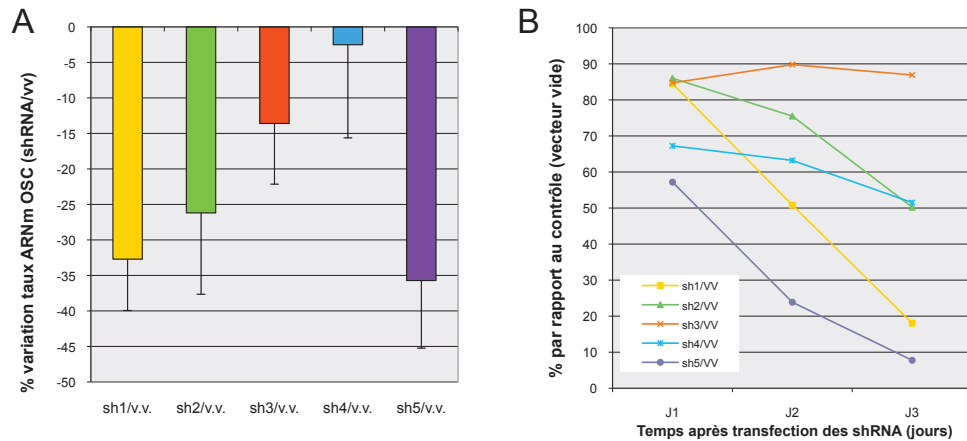
5' GCGGGCCCGTGCAAGACATTGCCAGCATTTCAAGAGATGCTGGCATAGTCTTGCACTTTTGAATTCG3'

shRNA5 :

5' GCGGGCCCGTATCAGCATACGTCCGATTTCAAGAGATCGGACCAATGCTGATACTTTTGAATTCG3'

Nous avons testé l'efficacité de leur inhibition en mesurant le taux d'ARNm du gène cible (Figure 2-4A) et le nombre de cellules vivantes (Figure 2-4B) dans les populations de T2ECs transfectées avec les constructions précédemment décrites. Nous avons ainsi observé que les différentes constructions n'ont pas la même capacité à diminuer le taux d'ARNm cible. De manière intéressante, nous avons observé que la diminution de l'ARNm de l'*OSC/LSS* entraîne une diminution du nombre de cellules, qui est à peu près proportionnelle à la diminution du taux d'ARNm. Les shOSC1 et shOSC5, qui présentent le plus fort taux d'inhibition ont été choisis pour la suite de l'étude du rôle de l'*OSC/LSS*, décrite dans le chapitre 2.2. En effet, le fait d'obtenir des effets similaires avec deux shRNA dirigés contre deux régions distinctes du même ARNm constitue un très bon contrôle de

spécificité (Editorial, 2003). Les matériels et méthodes de ces expériences sont décrits dans le §2.2.3 (p.101).



**Figure 2-4 : Inhibition de l'OSC/LSS induite par l'expression des shRNA.**

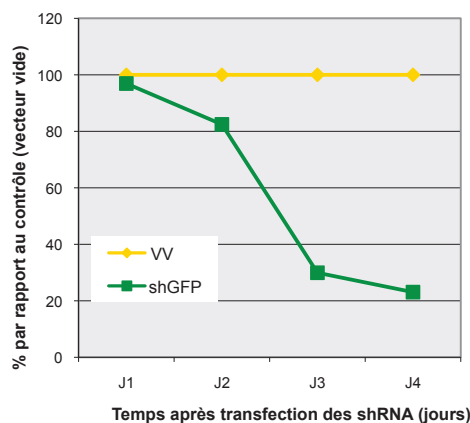
Des populations de T2ECs ont été nucléofectées soit avec l'un des 5 shRNA ciblant l'ARNm du gène OSC/LSS (sh1 à sh5), soit avec le vecteur pSilencer vide (V.V). (A) : Le taux d'ARNm du gène OSC/LSS a été quantifié par PCR quantitative dans les cellules exprimant les shOSC par rapport aux T2ECs transfectées avec le vecteur vide, 24h après transfection. Les données ont été normalisées en fonction du taux d'ARNm de différents gènes standard ( $n = 3$ ). (B) : L'évolution au cours du temps par rapport au jour de transfection du nombre de cellules, évalué chaque jour grâce à un test WST-1, est donné en tant que pourcentage du vecteur vide.

### 2.1.2.3 Mise en place d'un contrôle pertinent et pratique pour les approches shRNA

Le contrôle le plus utilisé dans les expériences basées sur l'interférence à l'ARN consiste à créer une nouvelle séquence à partir de la séquence du shRNA utilisé pour cibler le gène candidat. Cette séquence, communément désignée *scrambled* (« brouillé » en anglais), est ainsi obtenue en mélangeant l'ordre des nucléotides composant la séquence d'origine. Ainsi, ce contrôle présentera le même taux de A, T, G et C dans sa séquence que le shRNA utilisé pour inhiber le gène cible et est sensé contrôler l'effet de l'introduction et l'expression d'un shRNA dans la cellule. Le problème principal de ce contrôle est que, bien qu'il soit pratiquement certain qu'il ne pourra pas cibler l'ARNm du gène candidat, il est possible que la nouvelle séquence composée corresponde à celle d'autres gènes cellulaires (Editorial, 2003). Ces nouvelles séquences devront donc être attentivement contrôlées, notamment par alignement de séquences avec les gènes de l'organisme étudié. Un autre inconvénient pratique de ce contrôle, est évident lors de l'étude de plusieurs shRNA en parallèle. En effet, étant donné que chaque shRNA a une séquence donnée, il faudrait donc faire autant de shRNA *scrambled* que de shRNA étudiés.

Afin de nous affranchir du poids méthodologique qu'impliquerait une multiplication des contrôles, nous avons décidé de mettre en place un contrôle unique, utilisable dans l'étude de plusieurs shRNA en parallèle, mais également utilisable dans d'autres études futures au sein de l'équipe. Pour ce faire nous avons décidé d'utiliser un shRNA ciblant un gène exogène, comme la GFP ou la luciférase. Les matériels et méthodes de ces expériences sont décrits dans le §2.2.3, p.101

Dans un premier temps nous avons testé le shRNA dirigé contre la GFP (shGFP), qui nous a été gracieusement offert par François Morlé. Cependant, il s'est avéré que l'expression du shGFP entraîne une forte diminution de la survie des T2ECs, par rapport aux cellules transfectées avec le vecteur vide (Figure 2-5). Etant donné que le shGFP a été conçu pour être utilisé dans des souris murines, il est donc probable que le shGFP cible un ARNm aviaire et interfère avec le fonctionnement des T2ECs. Nous avons donc décidé de concevoir un nouvel shRNA dirigé contre la luciférase.



**Figure 2-5 : Effet du shRNA dirigé contre la GFP exogène.**

Des populations de T2ECs ont été nucléofectées soit avec le shRNA ciblant l'ARNm du gène exogène de la GFP (shGFP), soit avec le vecteur pSilencer vide (VV). L'évolution au cours du temps par rapport au jour de transfection du nombre de cellules, évalué chaque jour grâce à un test WST-1, est donné en pourcentage par rapport au vecteur vide.

De manière analogue à la conception des shRNA dirigés contre l'ARNm de l'OSC/LSS (§2.1.2.2, p. 67), les oligonucléotides ciblant l'ARNm de la Luciférase ont été conçus en utilisant le programme Whitehead. Après avoir aligné les 23 séquences proposées avec le génome du poulet, 11 ont été retenues. Parmi ces 11, les 2 séquences présentant le meilleur alignement et le meilleur score BBRC (Amarzguioui & Prydz, 2004) ont été choisies. Enfin, les séquences nécessaires pour le clonage et pour le bon fonctionnement du shRNA ont été ajoutées. Nous avons ensuite cloné ces 2 oligonucléotides dans le vecteur pSilencer™ 1.0-U6 sous forme d'ADN double brin (le détail du clonage est décrit dans le §2.2.3, p.101).

Les deux séquences des shRNA dirigés contre l'ARNm de la luciférase et clonés dans le vecteur pSilencer1.0-U6 sont décrites ci-dessous (gras: sites

de restriction – ApaI en 5' et EcoRI en 3' – pour le clonage, souligné : nucléotides mutés, surligné : séquence de la boucle, italique : séquence de terminaison de transcription).

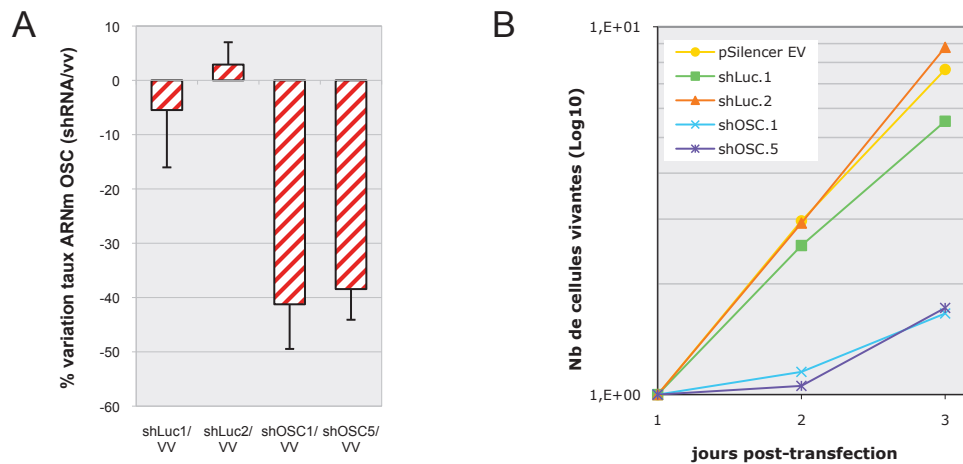
shLuc1 :

5' GCGGGCCCGAAAGATCGGGGTGTAATTTTCAAGAGAAATTACACGGCGATCTTCTTTTTGAATTCG3'

shLuc2 :

5' GCGGGCCCGCGTTAATCTTAGAGGCGATTCAAGAGATCGCCTCTTTGATTAACGCTTTTTGAATTCG3'

Nous avons comparé leur effet à celui des shRNA dirigés contre *OSC/LSS*, notre gène d'intérêt (shOSC1 et shOSC5). Nous avons ainsi déterminé que l'effet de shLuc1 et shLuc2 est minime comparé à l'effet de shOSC1 et shOSC5, à la fois sur le taux d'ARNm (Figure 2-6A) et sur le nombre de cellules (Figure 2-6B). Etant donné que l'effet du shLuc2 est encore plus proche de celui du contrôle vecteur vide, nous avons donc décidé d'utiliser le shLuc2 comme contrôle pour les études basées sur l'utilisation des shRNA. Cependant, il est évident que n'ayant observé que deux critères (taux d'ARNm du gène *OSC/LSS* et nombre de cellules), il sera nécessaire de vérifier l'ensemble des critères analysés dans les études futures (changement de gène cible, autres critères analysés, *etc.*). Les matériels et méthodes de ces expériences sont décrits dans le §2.2.3, p.101



**Figure 2-6 : test des shRNA dirigés contre la luciférase.**

Des populations de T2ECs ont été nucléofectées soit avec l'un des deux shRNA ciblant l'ARNm de la luciférase (shLuc1 ou shLuc2), soit avec l'un des deux shRNA ciblant l'ARNm du gène *OSC/LSS* (shOSC1 ou shOSC5), soit avec le vecteur pSilencer vide (VV ou EV). (A) : Le taux d'ARNm du gène *OSC/LSS* a été quantifié par PCR quantitative dans les cellules exprimant les shRNA par rapport aux T2ECs nucléofectées avec le vecteur vide, 24h après transfection. Les données ont été normalisées en fonction du taux d'ARNm de différents gènes standard ( $n = 3$ ). (B) : Le nombre de cellules a été déterminé par comptage quotidien et son évolution au cours du temps est donnée par rapport au jour de transfection.

### 2.1.3 Mise en Place d'un Système d'Expression Stable

#### 2.1.3.1 Présentation du système mis en place

L'étude de l'effet de la sur-expression d'un gène candidat dans les T2ECs avec un système d'expression transitoire, permet son expression pendant 4 jours maximum et avec une diminution du taux de cellules l'exprimant au fil des divisions cellulaires (une division toutes les 18 à 22h pour les T2ECs). Cette méthode ne permet donc pas d'observer des effets à moyen ou long terme. Afin de s'affranchir de cette contrainte temporelle, nous avons conçu et mis au point un système d'expression stable efficace dans les T2EC, associant une expression stable grâce au système Tol2-Transposase, d'une part, et au tri magnétique des cellules positives, d'autre part. En effet, l'équipe du Dr. Yoshiko Takahashi (NIST, RIKEN, Japon), a récemment développé un système de transfection stable basé sur l'utilisation de la transposase et des séquences cibles Tol2 dans plusieurs organismes, dont le poulet. Ce système permet l'intégration stable d'une cassette dans le génome cellulaire par un mécanisme de recombinaison piloté par des séquences Tol2, encadrant la cassette, qui seront reconnues par la transposase (Sato *et al.*, 2007). Nous avons ainsi établi une collaboration avec cette équipe afin de tester cette nouvelle méthode sur les T2ECs. D'autre part, afin de sélectionner les cellules exprimant le transgène, nous avons choisi d'effectuer un tri cellulaire magnétique basé sur l'expression d'un marqueur de surface (en l'occurrence le hCD4 dont la partie cytoplasmique a été supprimée). Le tri se fait par MACS (MAGnetic Cell Sorting), en utilisant des anticorps contre ce marqueur couplés à des microbilles magnétiques et une colonne aimantée (Gaines & Wojchowski, 1999). Cette méthode permet ainsi le tri des cellules portant un transgène de manière rapide et efficace, contrairement aux techniques basées sur la sélection (antibiotique par exemple). En effet, ces dernières sont plus longues et peuvent souvent entraîner des biais liés à la forte contrainte sélective.

Nous avons ainsi conçu le vecteur pT2MIK, permettant l'expression d'un ARNm bicistronique sous le contrôle d'un promoteur constitutif, et portant un site de clonage multiple pour insérer le gène d'intérêt suivi par la séquence du  $\Delta$ hCD4 (avec un IRES pour permettre sa traduction). Dans un premier temps, nous y avons cloné la séquence codante de la eGFP à la place du gène d'intérêt, afin de pouvoir tester ce système dans les T2ECs. Nous avons ainsi établi les conditions optimales de transfection : quantité de cellules, quantité d'ADN, rapport molaire entre le vecteur pT2MIK – permettant l'intégration dans le génome – et le vecteur permettant l'expression de la transposase. Aussi, nous avons déterminé les conditions optimales de tri : temps entre les différentes étapes et nombre de tris successifs nécessaires. La conception et la mise en place de cette stratégie



permettant l'expression stable d'un transgène, ainsi que le tri rapide et efficace dans des cellules primaires a fait l'objet d'une publication (Mejia-Pous et al., 2009), présentée ci-dessous.

La publication de ces travaux a permis de valoriser la conception du système d'expression stable et de tri Tol2/MACS, d'ores et déjà sollicité pour d'autres études (au sein de l'équipe mais aussi dans d'autres équipes). En particulier, le système Tol2 s'est avéré être un outil incontournable pour l'étude de l'expression stochastique des gènes. En effet, il a été utilisé pour la mise en place d'une stratégie permettant de suivre l'expression des gènes en temps réel et en cellule unique, grâce à l'utilisation de rapporteurs stablement exprimés par les T2ECs (chapitre 2.3, p.129).

#### **2.1.3.2 Publication : Association Tol2 et MACS : Mise en place et validation**

Methodology article

**Open Access**

## **A combination of transposable elements and magnetic cell sorting provides a very efficient transgenesis system for chicken primary erythroid progenitors**

Camila Mejia-Pous<sup>1</sup>, José Viñuelas<sup>1</sup>, Claudine Faure<sup>1</sup>, Joanna Koszela<sup>1</sup>, Koichi Kawakami<sup>2</sup>, Yoshiko Takahashi<sup>3</sup> and Olivier Gandrillon\*<sup>1</sup>

Address: <sup>1</sup>Equipe "Bases Moléculaires de l'Autorenouvement et de ses Altérations", Université de Lyon, F-69622, Université Lyon 1, Villeurbanne, CNRS, UMR5534, Centre de Génétique Moléculaire et Cellulaire, Lyon, France, <sup>2</sup>Division of Molecular and Developmental Biology, National Institute of Genetics, and Department of Genetics, The Graduate University of Advanced Studies (SOKENDAI), Mishima, Shizuoka 411-8540, Japan and <sup>3</sup>Nara Institute of Science and Technology (NAIST) 8916-5, Takayama, Ikoma, NARA, 630-0192, Japan

Email: Camila Mejia-Pous - Camila.Mejia@cgm.univ-lyon1.fr; José Viñuelas - jose.vinuelas@cgm.univ-lyon1.fr; Claudine Faure - faure@cgm.univ-lyon1.fr; Joanna Koszela - Joanna.Koszela@ens-lyon.fr; Koichi Kawakami - zfish@navy.plala.or.jp; Yoshiko Takahashi - yotayota@bs.naist.jp; Olivier Gandrillon\* - gandrillon@cgm.univ-lyon1.fr

\* Corresponding author

Published: 18 September 2009

BMC Biotechnology 2009, 9:81 doi:10.1186/1472-6750-9-81

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/9/81>

© 2009 Mejia-Pous et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Received: 8 December 2008

Accepted: 18 September 2009

### **Abstract**

**Background:** Stable transgenesis is an undeniable key to understanding any genetic system. Retrovirus-based insertional strategies, which feature several technical challenges when they are used, are often limited to one particular species, and even sometimes to a particular cell type as the infection depends on certain cellular receptors. A universal-like system, which would allow both stable transgene expression independent of the cell type and an efficient sorting of transfected cells, is required when handling cellular models that are incompatible with retroviral strategies.

**Results:** We report here on the combination of a stable insertional transgenesis technique, based on the Tol2 transposon system together with the magnetic cell sorting (MACS) technique, which allows specific selection of cells carrying the transgene in an efficient, reliable and rapid way.

**Conclusion:** This new Tol2/MACS system leads to stable expression in a culture of primary chicken erythroid cells highly enriched in cells expressing the transgene of interest. This system could be used in a wide variety of vertebrate species.

### **Background**

Transient and stable transgenesis is a powerful and fundamental technique for understanding any genetic system. In particular, integration in the genome, which allows for the stable expression of a transgene, is often a prerequisite for studying the biological function of a gene.

Retrovirus-based insertional strategies, the technique most frequently used to obtain stable transgenesis,

present some technical drawbacks. First, following insertion, the presence of viral sequences can lead to the transactivation of nearby cellular genes through the action of strong enhancer/promoter elements contained, for example, within the viral long terminal repeat (LTR) [1-4]. Also, the handling and modification of retroviral vectors is laborious and time-consuming. Finally, since these strategies are based on an infection process, they depend on cellular receptors [5] so their use is limited to a particular

species, and sometimes even to a particular cell type. This latter restriction is perhaps the main one when handling a particular cell type or samples from a particular (less commonly used) species, incompatible with retroviral strategies.

To circumvent these problems, a novel method of transgenesis, using a transposon-mediated gene transfer technique, has been recently described (see references below). Transposons are genetic elements that can move from one locus in the genome to another and they have been used as powerful tools in model animals and plants. The Tol2 transposable element, which was originally found in the medaka fish [6], has been reported to be capable of undergoing efficient transposition in a wide variety of vertebrate species including zebrafish, frog, mice, chicken and human [7-12]. Recently, cis-sequences necessary for the Tol2 element transposition were revealed [13] which led to the development of transposon vectors containing minimal DNA sequences that are easily manipulated. A plasmid, harboring a Tol2 construct with the gene expression cassette flanked by Tol2 cis-sequences, and a helper plasmid, containing the transposase-coding sequence driven by a constitutive promoter, are simultaneously introduced into vertebrate cells. As a result of the transposase activity, the transposon construct is excised from the plasmid, and subsequently integrated into the host genome ([14], see also Figure 1A).

As the use of the chicken model expands [15], efficient and stable transgenesis methods in this species are increasingly required for many experimental strategies, including genetic screens and dissection of transcriptional regulatory networks. In addition to being a remarkably important and historic model system in developmental biology, genomic resources for *Gallus gallus*, including the genomic sequence [16], have been expanding rapidly. Moreover, *G. gallus* is an interesting source of primary cells for large-scale *ex-vivo* studies, such as the normal erythroid progenitors T2EC (called for TGF- $\alpha$ /TGF- $\beta$ -induced Erythrocytic Cells) [17]. A transcriptomic approach in T2EC has allowed for the identification of a group of candidate genes important for normal or pathological self-renewal [18-20]. Downstream of these genomic approaches, it is now essential to be able to perform functional studies targeting those candidate genes in order to understand their biological role, for example in the self-renewal process, by acquiring a stable expression of their corresponding cDNAs in a significant proportion of cells among the total population.

We describe here the use of a Tol2-mediated stable gene transfer in primary chicken erythroid progenitors. In order to obtain a significant proportion of cells expressing the gene of interest within the total population, we have asso-

ciated this Tol2-based transgenesis with the MACS (MAGnetic Cell Sorting) system ([21], see also Figure 1B). We demonstrate that the resulting Tol2/MACS system allows the enrichment of the cell population in cells that stably express the transgene, reported here by the eGFP.

## Methods

### Plasmid constructs

**pT2MIK** (6.7 kb, Figure 1C): pT2AL200R150G [13] was digested with *XhoI*/*BglII* to remove the cassette containing the EF1 $\alpha$  promoter-eGFP-polyA sequence. These sites were blunt-ended, and the blunt-ended fragment CMV-MCS-IRES- $\Delta$ hCD4-polyA, prepared by *NruI*/*XhoI* digestion from pMACS-4-IRES.II [21], was inserted. The pT2MIK plasmid obtained permits the expression of a bicistronic mRNA controlled by a constitutive promoter (CMV). It harbors a MCS to clone the gene of interest, followed by the  $\Delta$ hCD4-coding sequence, which is downstream of an IRES to allow its translation.

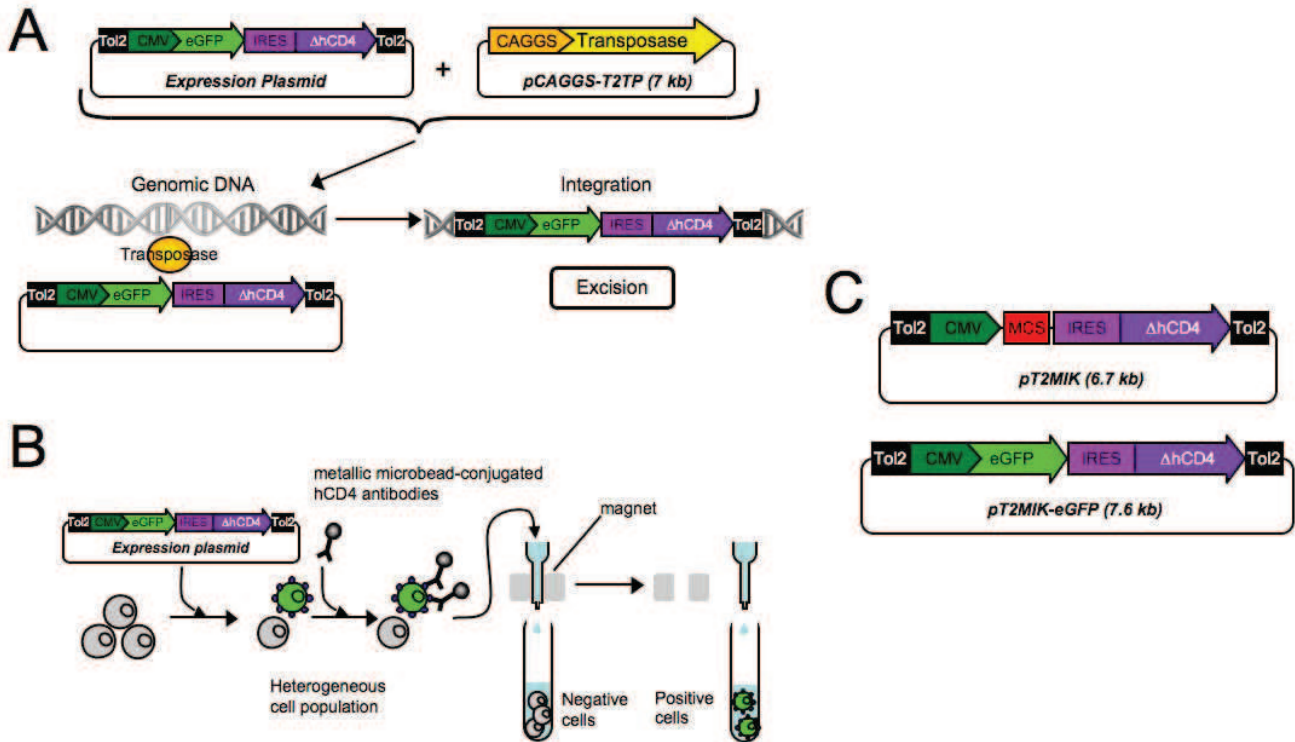
**pT2MIK-eGFP** (7.6 kb, Figure 1C): the pT2MIK plasmid was digested with *EcoRV*, a site present in the MCS. A blunt-ended *Clal* fragment from pRCAS.C-EGFP (kindly donated by Pr. Germain Gillet), containing the eGFP coding sequence, was then inserted.

**pCAGGS-T2TP** (7 kb, Figure 1A) [10]: transposase supplier plasmid that contains the transposase cDNA driven by the strong CAGGS promoter (a modified CMV). A transient supply of the CAGGS-controlled transposase appears to be sufficient for the transposition of a transfected gene, as shown below. Moreover, it is assumed that the transient activity of transposase avoids an unnecessary repetition of transposition once the cassette has been integrated into the genome.

**pT2.CMV-hKO** (5.1 kb, see Additional File 1): pT2AL200R150G [13] was digested with *XhoI*/*BamHI* to remove the cassette containing the EF1 $\alpha$  promoter. These sites were blunt-ended, and the blunt-ended fragment containing the CMV promoter, prepared by *HindIII*/*XbaI* digestion from the pCRNCM plasmid [22], was then inserted. The eGFP fragment was subsequently removed by *Clal* digestion, and a *Clal* fragment containing hKO, previously extracted from phKO1-S1 (MBL International Corporation) by a *BamHI*/*HindIII* digestion, was inserted.

### Primary cell culture

T2EC cells were generated from SPAFAS white leghorn chickens (PA12 line from INRA, Tours, France) as previously described [17]. These cells were expanded in LMI medium ( $\alpha$ -MEM medium, 10% FBS (Fetal Bovine Serum), 1 mM HEPES, 100 nM  $\beta$ -mercaptoethanol, 1 mM dexamethasone, 5 ng/ml TGF- $\alpha$ , 1 ng/ml TGF- $\beta$ 1, 100 U/ml penicillin and 100  $\mu$ g/ml streptomycin).

**Figure 1**

**Stable Transgenesis and Sorting Systems. A:** Tol2 transposition system: Cells are cotransfected with the plasmid carrying the Tol2 construct (Expression plasmid) and the helper plasmid, allowing a transient transposase expression (pCAGGS-T2TP). On the one hand, the Tol2 construct contains the expression cassette that should be integrated in the cellular genome, flanked by two Tol2 cis-sequences. On the other hand, the helper plasmid contains the transposase cDNA driven by a CAGGS promoter (a CMV-based constitutive promoter). The Tol2 construct is transposed by a cut-and-paste mechanism that requires the sequence-specific binding of the transposase to the Tol2 sequences on each extremity of the cassette. This transposition process involves the precise excision from the plasmid and integration of the cassette into the genomic DNA. **B:** Magnetic Cell Sorting (MACS): Cells are transfected with a plasmid construct harboring both the transgene and the  $\Delta$ hCD4-coding sequence. The  $\Delta$ hCD4 is a surface marker, derived from the human CD4 in which the cytoplasmic region was deleted. Positive cells, expressing both transgene and the  $\Delta$ hCD4 marker, are magnetically labeled with an antibody, coupled to metallic microbeads, which recognizes the hCD4 extracellular region. After passing the heterogeneous cell population through a column placed on a magnetic field, labeled cells are retained by the column, whereas negative cells pass through. Positive cells are then easily eluted by just moving the column away from the magnet. **C:** The engineered pT2MIK empty plasmid with a multicloning site (MCS) and the pT2MIK-eGFP plasmid used throughout this study.

#### Cell transfection by nucleofection

Transient transfections were performed by the nucleofection method (Amaxa Technology). For each nucleofection assay,  $10^7$  cells were washed once with PBS and resuspended in 100  $\mu$ l of nucleofector buffer (Cell line Nucleofector kit V, Amaxa/Lonza). After adding 10  $\mu$ g of DNA (pT2MIK or pT2MIK-eGFP +/- pCAGGS-T2TP in variable molecular ratios), cells were transferred to the cuvette supplied and nucleofected with the T-16 program of the Nucleofector device (Amaxa/Lonza). Following nucleofection, cells were immediately transferred to LM2 medium (LM1 medium with RPMI 1640 instead of  $\alpha$ -MEM) and grown overnight (18 hours maximum).

#### Magnetic Cell Sorting (MACS)

To increase the MACS efficiency, dead cells and fragments were removed before each MACS assay. For this, living cells were purified by centrifugation through a density gradient on LSM (Lymphocytes Separation Medium, Eurobio) to get rid of any dead cells and cellular fragments. Up to  $10^7$  cells were resuspended in 1 ml of LM1 and carefully laid onto 1 ml of LSM. After a 15 minute centrifugation at 2500 rpm without brake, the cells on top of the LSM were recovered, washed with 3 ml of PBSA (PBS, BSA 0.5%) and resuspended in PBSA.

Transfected cells, co-expressing the  $\Delta$ hCD4 marker on the cell surface (Figure 1B), were then magnetically isolated and separated from untransfected cells using the MACSelect - Transfected Cell Selection System. Up to  $10^7$  cells were magnetically labeled with the MACSelect MicroBeads and separated on a MACS Column and an OctoMACS Separator by magnetic force. The sorting was performed according to the manufacturer's instructions, with the following modification: PBSA (PBS, BSA 0.5%) was used instead of PBE (PBS, EDTA 5 mM).

#### **Immunofluorescent hCD4 staining**

$10^6$  cells were labeled with a human CD4 antibody conjugated to allophycocyanin (APC) fluorochrome (CD4-APC Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's instructions, with the following modification: no EDTA was added to the staining buffer.

#### **Flow cytometry analysis**

Fluorescence data was acquired with a FACSCanto II flow cytometer and the data was analyzed using the 5.0.1 Diva software (both from Becton-Dickinson). The positive fluorescence threshold was fixed in order to have 99% of the negative cells below this threshold.

#### **Statistical Analysis**

Firstly, in order to determine whether performing a parametric test was possible or not, the homoscedasticity of the distribution (homogeneity of variance) was tested using a Fischer-based test (O'Brien test). In our case, as values were homoskedastic for all the comparisons, only parametrical tests were then used. When comparing only one pair, a Student test (t-test) was applied. When comparing simultaneously three conditions or more, significant differences among the compared conditions were first tested by an ANOVA (Analysis of Variance). For a significant ANOVA test, all pairs' comparison was tested using the Tukey-Kramer HSD test.

#### **Genomic insertion sites identification by the splinkerette PCR technique**

##### *Transfection and stably transfected monoclonal T2EC cells*

To identify the T2EC Tol2 genomic insertion site, we used a simplified pT2MIK-derived plasmid (pT2.CMV-hKO) expressing the CoralHue humanized Kusabira-Orange fluorescent protein reporter (MBL International Corporation) driven by the CMV promoter. As described above,  $5 \times 10^6$  cells were nucleofected with 5  $\mu$ g of plasmid DNA (pT2.CMV-hKO/Transposase = 5/1). Eight days after transfection, cells expressing the reporter gene were sorted and individually cloned in conical bottom 96-well microplates using a FACS Vantage SE cytometer (Becton-Dickinson). Two clones were grown for 13 days, by which time the clonal population size was  $2.8 \times 10^5$  and  $4 \times 10^5$  cells, prior to DNA extraction.

#### **Genomic DNA extraction, restriction endonuclease digestion and splinkerette adaptor ligation**

Each of the two clones was lysed in STE buffer (100 mM NaCl, 1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA pH 7.8, 10 mM Tris-HCl pH 8) for 1 hour, at 50 °C, in the presence of SDS and Proteinase K (Roche). Genomic DNA (gDNA) was then treated for 20 min at 60 °C with RNase A (Sigma-Aldrich) before being purified with 1 volume phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1, v/v/v) (Sigma-Aldrich) and precipitated with 2 volumes of absolute ethanol and 1/9<sup>th</sup> volume of 3 M NaOAc pH 5.2. Subsequently, 1  $\mu$ g of gDNA was digested with 1  $\mu$ l of FastDigest *Tail* (Fermentas), the recognition site of which is a 4 bp motif, for 16 hours at 65 °C. This digestion was performed using the Fermentas 10 $\times$  FastDigest buffer, in a final volume of 20  $\mu$ l.

Considering that a 4 bp recognition site will occur roughly every 256 bp, and therefore that 200 ng of *Tail*-digested gDNA correspond to 1.28 pmol DNA, 200 ng of digested DNA were ligated to a 3 $\times$  molar excess of the annealed splinkerette adaptor (Splinklong-ACGT+Splinkshort-hairpin) with the T4 DNA ligase (4 U), for 1 hour at 22 °C, using the Fermentas Rapid DNA Ligation kit. In order to improve the ligation yield, digested DNA was heated for 5 min at 60 °C before being ligated.

Finally, the ligation product was purified with phenol/chloroform/isoamyl alcohol following the same protocol as for the gDNA extraction and using glycogen (Fermentas), at a final concentration of 1  $\mu$ g/ $\mu$ l, in a total volume of 20  $\mu$ l.

This procedure was also performed for the pT2.CMV-hKO plasmid and for non-transfected T2EC gDNA to obtain, respectively, positive and negative controls of splinkerette PCR.

#### **Adaptor and primers**

The splinkerette adaptor and the oligonucleotide primers used for this study were synthesized by Invitrogen and are identified as follows:

Splinklong-ACGT: CGAAGAGTAACCGTTGCTAGGAGAGACCGTGGCTGAATGAGACTGGT GTCGACACTAGTGGACGT.

Splinkshort-hairpin: CCACTAGTGTGCGACACCAGTC TCT AATTTTTTTTTTCAAAAAA.

hKOSp1: AGACCGAGGGCAACATCACCGAGC.

Splink1: CGAAGAGTAACCGTTGCTAGGAGAGACC.

nested-hKOSp2: GTGGAGGACGCCGTGGCCCACTGC.

nested-Splink2: GTGGCTGAATGAGACTGGTGTGCGAC.

#### Splinkerette PCR

Two rounds of PCR (PCR1 and nested-PCR2), using primers specific for the reporter transgene hKO (hKOSp1 and nested-hKOSp2) and for the annealed splinkerette adaptor (Splink1 and nested-Splink2), were performed with the AccuPrime Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen), in a final volume of 50  $\mu$ l (AccuPrime PCR Buffer II 1 $\times$ , 200 nM Forward Primer, 200 nM Reverse Primer, 1 U AccuPrime Taq DNA Polymerase). The PCR DNA template was 1/300<sup>th</sup> of the ligation product for the PCR1 and 1/10<sup>th</sup> of the PCR1 product for the nested-PCR2.

The two PCR rounds were run in a Biometra TRIO-Thermoblock (Biometra) using the following program: 2 min of initial denaturation at 94°C, followed by 30 cycles of 30 s denaturation at 94°C, and 4 min of annealing-elongation at 68°C.

PCR products were then loaded onto 25 cm  $\times$  25 cm 1.5% agar gel and purified using the NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel), according to the manufacturer's instructions.

#### DNA sequencing and analysis

DNA sequencing was performed with an ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer, according to the instructions of the BigDye Terminator v1.1 Sequencing kit (Applied Biosystems). The Tol2 insertion sites in T2EC gDNA were identified by alignment with the ENSEMBL database <http://www.ensembl.org> using the BLASTN algorithm.

## Results

### **The Tol2 construct allows for stable transgene expression in primary cells**

We first tested the possibility of generating stable transfectants in T2EC cells using the Tol2 system. For this, T2EC were transfected by nucleofection using the pT2MIK-eGFP plasmid (Figure 1C), either in the absence (eGFP) or in the presence (eGFP+T) of the transposase expression plasmid (Figure 2A), and fluorescence was recorded as a function of time. It was immediately apparent that in the absence of transposase, as expected, no fluorescence was detected one week after transfection. This is in marked contrast to the cells cotransfected with the transposase-supplier plasmid (in equimolar amounts of both plasmids) where 10.0%  $\pm$  1.7 of cells within the total population retained eGFP signals for up to 14 days (Figure 2A).

In order to determine optimal cotransfection conditions, we tested different molar ratios of the plasmid carrying the gene of interest and of the helper plasmid. We, thus, observed that the efficiency of stable expression is higher when there is more pT2MIK-eGFP expression plasmid

than transposase-supplier helper plasmid (Figure 2B). Indeed, when adding 5 times less eGFP expression plasmid than transposase expression plasmid (1/5 ratio), only 4.0%  $\pm$  1.0 of cells expressed eGFP after one week. Equally, we observed that equimolar conditions (1/1 ratio) increased this percentage (i.e. 10.0%  $\pm$  1.7), although this difference is not statistically significant. Inversing the ratio, and adding more eGFP expression plasmid than the transposase one, ultimately leads to a significantly higher proportion of eGFP-positive cells: 11.0%  $\pm$  2.1 and 12.5%  $\pm$  4.3 for 5/1 and 10/1 ratios, respectively. After two weeks, although the differences seem not to be important because of a significant standard deviation (often observed in primary cultures as cells become senescent), the tendency remains the same.

Our data, therefore, demonstrates that the molecular ratio between the Tol2 plasmid and the transposase helper plasmid has an impact on the stable expression efficiency in T2EC. Efficacy is certainly improved when adding higher amounts of the Tol2 construct plasmid than the transposase provider plasmid. The 5/1 ratio leads to an optimal level of expression of the gene of interest, with about 10% of the transfected cells stably expressing the reporter transgene.

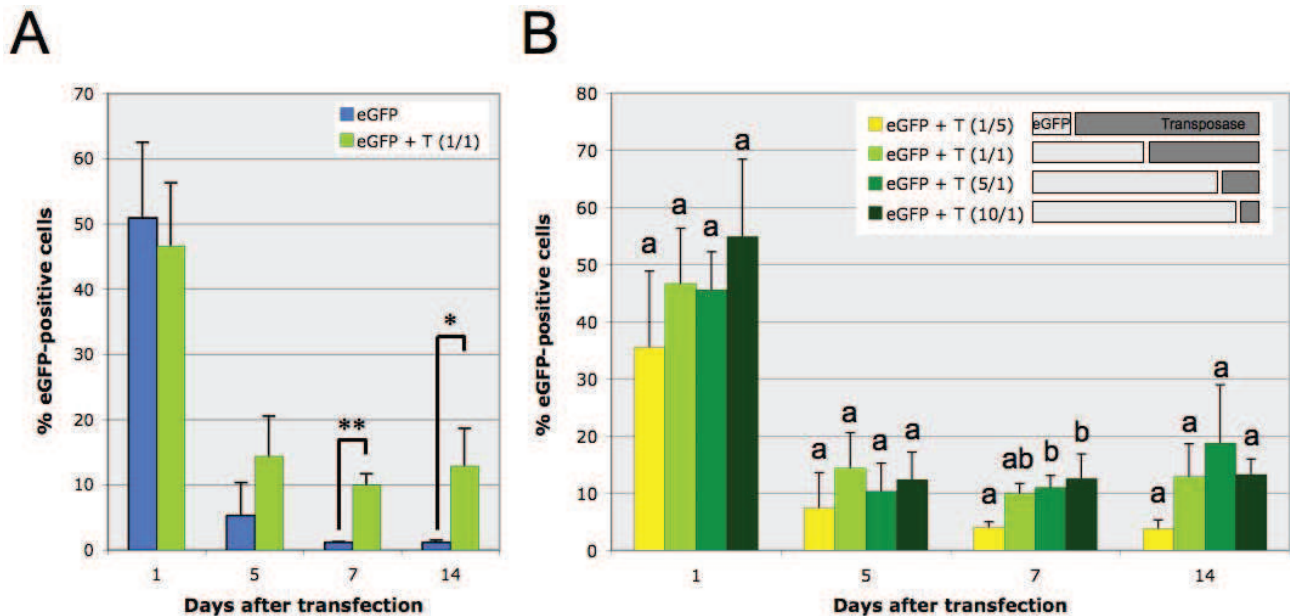
### **The transgene carried by the Tol2 construct is stably transposed into the cellular genome**

Our results strongly suggest that transposition into the genomic DNA (gDNA) was successfully achieved. To confirm this hypothesis, we identified the transgene insertion sites in two T2EC clones transfected with a Tol2 construct, using a modified version of the splinkerette PCR technique [23]. After sequencing the corresponding PCR fragment (Figure 3A) and identifying the Tol2 construct, we aligned all of the "non-Tol2" region sequence with the *G. gallus* gDNA sequence (Figure 3B). We observed that, in a clonal population, there seems to be only one single insertion point, which is located in chromosome 4 (Figure 3C). The second T2EC clone analyzed also shows one single insertion point, localized in a different chromosome (chromosome 1; see Additional File 2).

The cotransfection of the expression plasmid, together with the transposase-supplier helper plasmid, has therefore allowed for the stable expression of the reporter transgene in avian primary erythroid progenitors by transposition of the Tol2 construct into the cellular genome.

### **Characterization of the $\Delta$ hCD4 surface marker expression**

Although 10% of stably positive cells is a sign of efficient transgenesis when working on primary cells, it is still relatively low for studying and observing closely the biological effect of a given transgene. Such a low percentage of

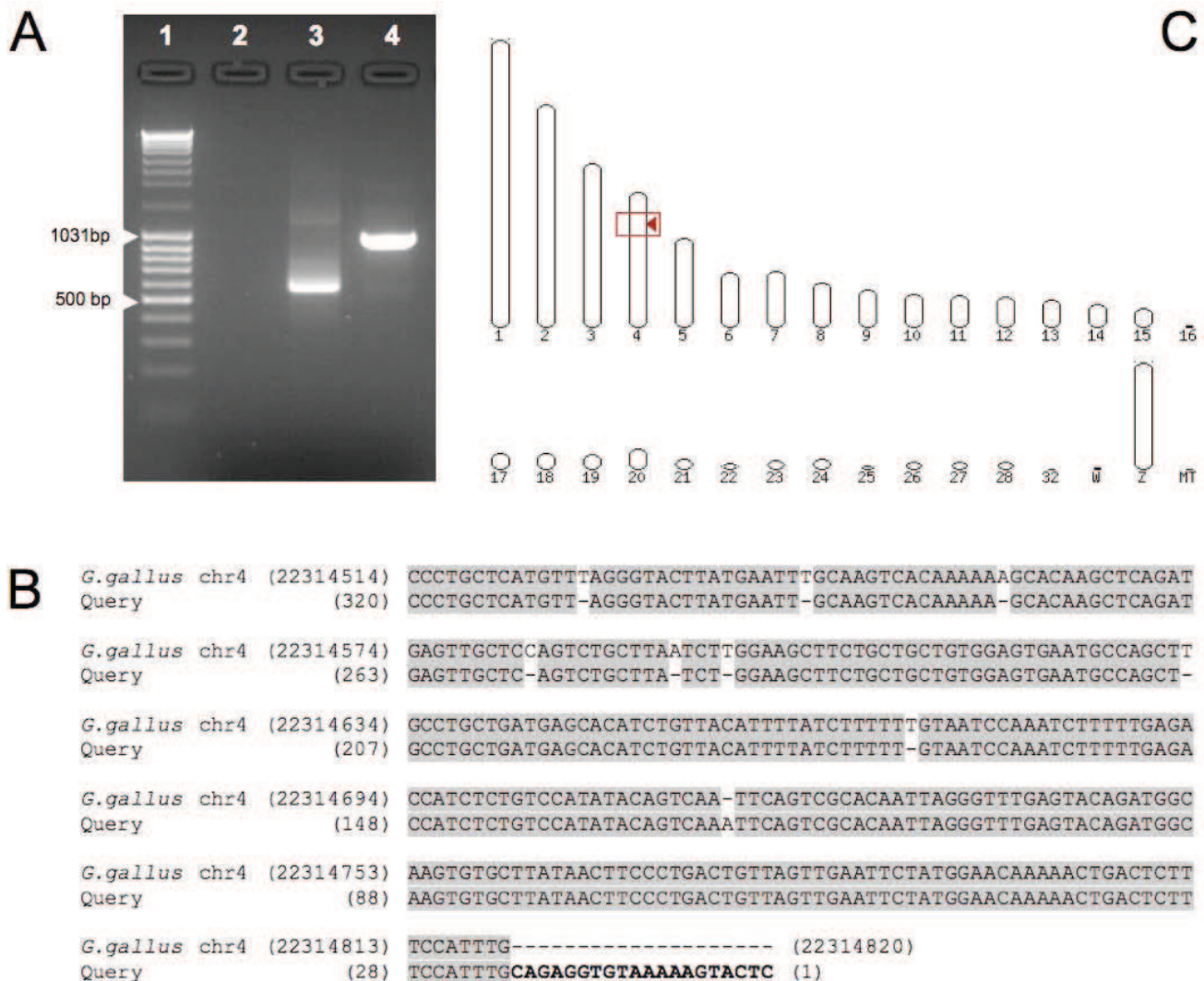
**Figure 2**

**Stable expression of eGFP in the presence of transposase. A:** Relative proportion evolution, with respect to time after transfection, of eGFP-positive cells within a population of T2EC, either transfected with the pT2MIK-eGFP expression plasmid only (eGFP), or cotransfected with the pT2MIK-eGFP plasmid and the transposase expression pCAGGS-T2TP plasmid (eGFP + T) with an equimolar ratio (1/1). Significant differences were determined with a t-Test ( $n \geq 3$ ):  $p = 2.44 \times 10^{-2}$  (\*) and  $p = 9 \times 10^{-4}$  (\*\*). **B:** Relative proportion evolution, with respect to time after transfection, of eGFP-positive cells within a population of T2EC cotransfected with the pT2MIK-eGFP plasmid (eGFP) and the pCAGGS-T2TP plasmid (T). As indicated in the legend, different molecular ratios were tested, pT2MIK-eGFP (7.6 kb)/pCAGGS-T2TP (7 kb): 1/5; 1/1; 5/1 and 10/1, but the amount of total DNA (pT2MIK-eGFP + pCAGGS-T2TP) was constant. For one given time point, conditions not connected by the same letter are significantly different,  $p < 0.05$  (Tukey-Kramer HSD test,  $n \geq 3$ ). Cell fluorescence was analyzed by flow cytometry (FACS). The positive fluorescence threshold is fixed in order to have 99% of the negative cells (i.e. cells transfected with the empty plasmid) below this threshold. A 1% value is, hence, considered as null.

cells stably expressing a transgene can be bypassed by clonal selection when working with immortal cell lines. This is clearly not the case when working with normal cells since their lifespan is limited by the so-called "Hayflick limit" [24]. For T2EC cells, which can only be grown for about one month [17], this therefore precludes the use of multiple successive cloning to generate a pure population of cells expressing a transgene of interest. We therefore decided to use the MACS-based method, in which cells carrying the transgene are retained on a magnetic column (Figure 1B).

Since the  $\Delta$ hCD4 sequence is carried by the same bicistronic mRNA as the reporter transgene (Figure 1C), the presence of the  $\Delta$ hCD4 marker should indicate the presence of the transgene. In order to confirm this feature in our experimental model,  $\Delta$ hCD4 expression, following different transfection conditions, was quantified using a fluorochrome-conjugated hCD4 antibody (Figure 4). Initially, even though  $\Delta$ hCD4 is not naturally expressed by T2EC, we observed that a very small percentage of

untransfected cells are positive to  $\Delta$ hCD4 labeling (2%, Figure 4A), suggesting that a small fraction of T2EC expresses a surface protein that cross-reacts with the hCD4 antibody. However, this percentage of false-positive cells is insignificant compared to the  $\Delta$ hCD4-positive fraction of cells within a population transfected with the pT2MIK empty plasmid (30.4%, Figure 4B) or with the pT2MIK-eGFP expression plasmid (23.2%, Figure 4C). Furthermore, our data shows that among the eGFP-positive cells (44.6% of the total population, Figure 4C), approximately half of them are also  $\Delta$ hCD4-positive. Indeed, with respect to the total population, 21% of cells are eGFP-positive/ $\Delta$ hCD4-positive and 23.6% are eGFP-positive/ $\Delta$ hCD4-negative. If considering the surface marker only, the latter fraction is composed of false-negative cells. Also, as expected, it appears that the  $\Delta$ hCD4 expression level is correlated to the eGFP expression level and the false-negative cells correspond to the low-level eGFP-expressing cells. Whether these cells express the surface marker at an undetectable level in these conditions or do not express it at all is, as yet, unresolved. Nevertheless, these observa-

**Figure 3**

**Identification of the Tol2 construct genomic insertion sites on the T2EC clone #1.** **A:** Splinkerette PCR products on 1.5% agar gel. 1: Fermentas DNA Ladder Mix; 2: genomic DNA from non-transfected T2EC; 3: pT2.CMV-hKO plasmid; 4: genomic DNA from T2EC clone #1, cotransfected with the pT2.CMV-hKO plasmid and the transposase plasmid, pCAGGS-T2TP (molecular ratio: 5/1). **B:** Alignment of the splinkerette PCR product with the *Gallus gallus* genome. The sequence corresponding to the Tol2 construct is shown in **bold**. **C:** Localization of the Tol2 construct insertion site into chromosome 4 of the *Gallus gallus* genome.

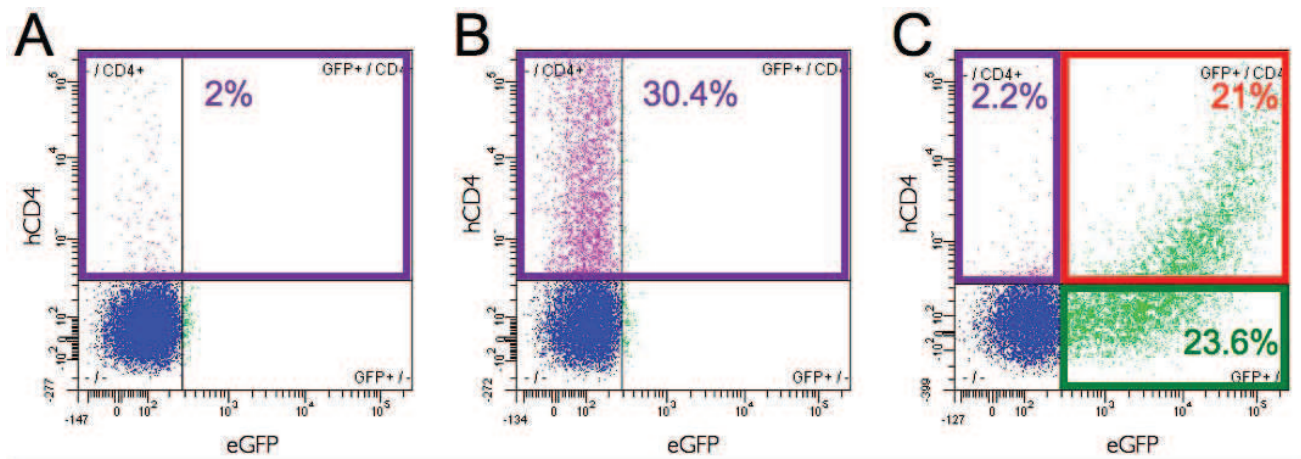
tions confirm that the pT2MIK-eGFP expression plasmid allows the expression of the  $\Delta$ hCD4 surface marker, on which the magnetic sorting (MACS) depends.

#### **MACS allows for the efficient sorting of eGFP-positive cells**

In order to increase the proportion of cells expressing the transgene of interest with respect to the total transfected population, we tested the efficacy of the MACS-based method. As previously observed, in the absence of any selection (Figure 5, first column: No MACS) the relative

ratio of cells expressing the eGFP reporter gene dropped rapidly to about 8% and was then stably maintained ( $7.6\% \pm 1.1$  and  $8.3\% \pm 0.8$  for 7 and 11 days, respectively, post-transfection). Following a single round of sorting (Figure 5, second column: MACS x1), the culture already contains a significantly higher rate of cells carrying the transgene in a stable manner. The percentage of eGFP-positive cells, with respect to the total population, is four to five times higher than in unsorted cells ( $38.0\% \pm 11.2$  and  $34.4\% \pm 3.8$  at day 7 and 11, respectively). When the



**Figure 4**

**Quantification of the hCD4 marker and the eGFP expression before MACS.** A population of T2EC not transfected (A) or transfected with either the pT2MIK empty plasmid (B) or the pT2MIK-eGFP expression plasmid (C) were labeled with an APC-conjugated antibody that recognizes the hCD4. Labeled cell fluorescence was analyzed by flow cytometry (FACS) one day after transfection. The positive fluorescence threshold is fixed in order to have 99% of the negative cells (i.e. untransfected and unlabeled cells) below this threshold. A 1% value is, hence, considered as null.

sorting is extended to three successive times, the same culture (Figure 5, fourth column: MACSx3) reaches a relative ratio of about eight to nine times higher than the non-sorted culture ( $72.9\% \pm 4.9$  and  $63.5\% \pm 14.6$  at day 7 and 11, respectively). Although at the end of the experiment the eGFP-positive cell percentage, with respect to the total population, in the MACSx2 condition (Figure 5, third column:  $48.1\% \pm 7.2$  after 11 days post-transfection) is not significantly different from both the MACSx1 and the MACSx3 conditions, it is a necessary transitory step towards the three times-sorted culture, in which the positive cell percentage differs significantly from both the non-sorted and the once sorted cultures.

Thus, the MACS-based technique has enabled us to significantly enrich a population of transfected primary progenitor cells with eGFP-positive cells.

#### **MACS exclusively sorts cells that stably express the transgene**

In order to assess whether the eGFP-positive cells sorted after three successive rounds were stably positive cells, we tested the same protocol of successive rounds of MACS on a T2EC population transfected with the eGFP expression plasmid only which, consequently, shows a transient eGFP expression (Figure 5, italic values). On day 4, with respect to the length of time following transfection, we observed that the first two rounds of MACS successfully sorted eGFP-positive cells in the absence of transposase and, hence, those transiently expressing the transgene. This sorting gives a population within which there is a high percentage of eGFP-positive cells ( $94.4\%$  and  $90.6\%$

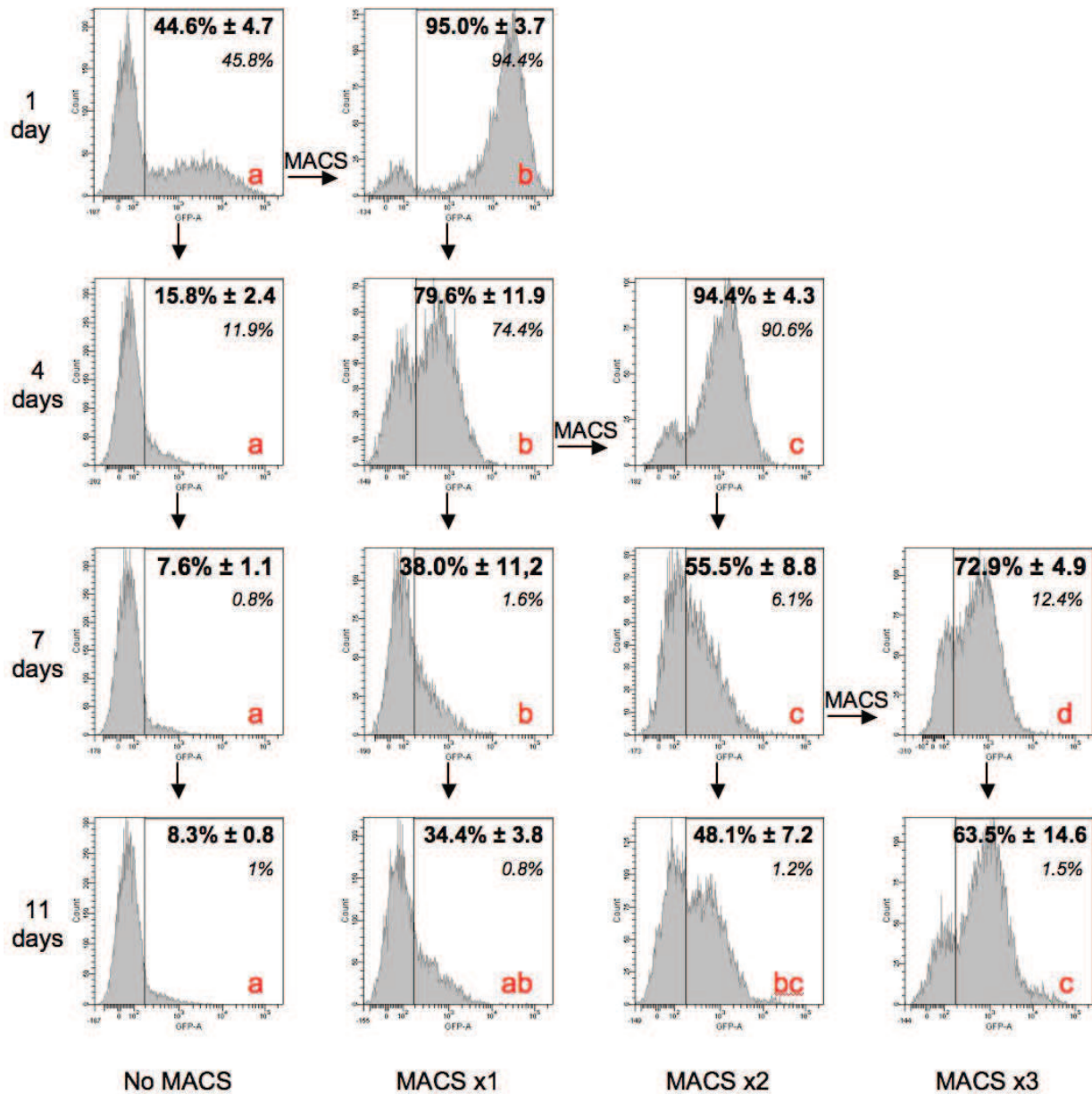
after one and two MACS, respectively). However, between the fourth and the seventh day which, according to our previous observations, is the period when the transient expression is lost and the stably expressing transfectants emerge (Figure 2A), the percentage of eGFP-positive cells dropped dramatically to 6.1%. Although the third MACS separation moderately increases this percentage (to 12.4%), these transient-expressing cells are rapidly lost at the next point of measurement (1.5%, which virtually overlaps with the 1% null threshold).

Taken together, our data show that the Tol2 transposition system can be associated with a MACS-based technique which significantly improves the stable expression efficiency of the resulting Tol2/MACS system. In fact, this association significantly increases the proportion of cells expressing the transgene among the total transfected population.

#### **Discussion**

We have described an efficient technique which allows the selection of the stable integration of an exogenous transgene into the host genome. The importance of this study is twofold:

1. we have demonstrated that the versatility of the Tol2 system can be extended to normal chicken erythroid progenitor cells and
2. we have demonstrated the feasibility of combining this chromosomal integration technique with a MACS (MAGnetic Cell Sorting)-based enrichment method,

**Figure 5**

**Enrichment, using MACS, of the transfected population on cells carrying the transgene.** Relative ratio evolution of eGFP-positive cells within a population of T2EC cotransfected with the eGFP expression plasmid and the transposase-supplier helper plasmid (molecular ratio: 5/1). Rows: different time points after transfection (on days), ↓ symbolizes the evolution of the culture as a function of time. Columns: Successive MACS: cell cultures were sorted once (MACSx1), twice (MACSx2), three times (MACSx3) or not sorted at all (no MACS), → symbolizes the evolution of one culture before and after a sorting. Histograms illustrate the cell number repartition according to the fluorescence intensity, from one single representative experiment. Values in **bold** correspond to the mean ± SD after experiment repetition (n = 4). For the same given time point, conditions not connected by the same letter (a, b, c, or d) are significantly different, p < 0.05 (Tukey-Kramer HSD test, n ≥ 3). Values in *italics* correspond to the relative ratio of eGFP-positive cells within a population of T2EC transfected with the eGFP expression plasmid only (no transposase) and sorted once, twice, three times or not sorted at all. Cell fluorescence was analyzed by flow cytometry (FACS). The positive fluorescence threshold is fixed in order to have 99% of the negative cells (i.e. cells transfected with the empty plasmid) below this threshold. A 1% value is, hence, considered as null.

allowing the instantaneous sorting of cells carrying the transgene.

The value of the Tol2 transposon-derived transgenesis strategy has been confirmed by reports of its ability to undergo efficient transposition in a wide variety of vertebrate species [7-12]. Among the DNA transposable elements, the Sleeping Beauty transposon, a member of the *mariner* family [25], has been previously reported to be capable of undergoing efficient transposition in chicken [26]. However, a Sleeping Beauty-based transgenesis system was found to be inefficient in primary avian cells, despite its efficacy when tested on immortalized avian cells [27]. The present report demonstrates that Tol2, contrary to Sleeping Beauty, provides an efficient transgenesis system in primary avian erythroid progenitors.

Regarding the optimal molecular ratio between the expression and the helper plasmid, our data suggest that transposition is more efficient when cells are cotransfected with more of the Tol2 expression plasmid than the transposase one. This observation seems to indicate that there is an "overproduction inhibition", which leads to a decrease in transpositional activity in the presence of an increased amount of transposase [28]. Nevertheless, it has recently been reported that the Tol2 transposon-based system does not exhibit overexpression inhibition within the tested transposase concentration range [12]. Even if, at first sight, there seems to be a discrepancy between this report and our results, there is a subtle experimental distinction which may explain this difference. In reference [12], the total amount of DNA was variable. This is in contrast with our own study in which we decided to fix the total DNA amount. The increase in the level of the transposase plasmid was then accompanied by a decrease in the amount of expression plasmid. Moreover, in our cellular model the efficiency of the Tol2/MACS system is proportional to the quantity of Tol2 expression plasmid present, as well as the number of cells to be transfected (see Additional File 3). Therefore, the reason for the decreased transpositional efficacy observed with the 1/5 ratio is likely to be the decrease in the amount of Tol2 expression plasmid rather than an "overexpression inhibition".

In our experimental model, we were limited both by a maximal total of DNA used for the transfection and by the number of cells to be transfected, since the cell viability after nucleofection is inversely proportional to these parameters (see Additional File 3). These features are inherent to our model (i.e. primary erythroid progenitors and the nucleofection technique) so, when transferring the Tol2/MACS method to other cellular models and/or other transfection techniques, this should be set and optimized in order to take full advantage of this method.

We developed an approach based on the splinkerette technique [23] that allowed us not only to prove that there is an integration into the cellular genome, but also to actually characterize the insertion sites. Our results show that there is one single insertion point per T2EC clone analyzed, suggesting that the transposition event is a quite discrete event which probably leads to only one (or at most very few) insertion site. The single insertion point is localized on different chromosomes in the two analyzed clones. Whether this insertion site localization is random or whether there are some preferential genomic regions cannot currently be determined.

In order to obtain a population where a significant proportion (if not all) of the cells express the transgene, it is necessary to select or sort the transfected cells. When working on established cell lines, a common method consists of establishing transgenic clones or lines, which can be time-consuming. Although working *ex-vivo* with primary cells allows for more relevant studies (because they are normal and non-genetically altered cells), the lifespan of such cells is, by definition, limited. Hence we have chosen the MACS technique as it allows instantaneous enrichment of the population of cells carrying the transgene, unlike selection-based techniques which are longer and often introduce a bias due to their high selectivity. For example, it has been reported that selecting antibiotic-based agents can alter cellular metabolism genes [29]. Our data shows that the present MACS-based method leads, after three successive selections, to a population in which about 70% of the cells stably express the transgene. Previous work in the laboratory [30] showed that transitory transfection of SCA2, a gene involved in the self-renewal of T2EC, has significant biological effects for up to three days after transfection. As these progenitors have a rapid cycle (they divide every 18 hours [17]), the transgene expression decreases in the whole population. In fact, cells carrying the transgene are diluted in a population that has doubled its size four times in three days. Despite this, three days after SCA2 transfection a significant effect can still be observed, which demonstrates that this effect can be detected even if there is only a small fraction of cells expressing it. Therefore, having 70% of cells expressing the transgene in a stable manner within the population is sufficient for carrying out studies on the genetic functions in these cells.

The efficacy of the MACS system relies upon the expression of the cell surface marker  $\Delta$ hCD4, the translation (and, hence, expression) of which depends on the efficacy of the IRES. It has been shown that IRES efficiency is lower than that of the "classic" ribosome entry site (at the mRNA 5' extremity, which drives the cap-dependent translation) [31]. Characterization of the expression of this marker, compared with the transgene expression reported by the

eGFP, confirmed this assumption. Therefore, when using the present method, one should take into account that about half of the positive cells will actually appear as false-negatives (i.e., expressing the transgene but not the marker). Moreover, the expression level of  $\Delta$ hCD4 is an important parameter, since the efficacy of positive cell retention on the magnetic column depends on the amount of microbead-conjugated antibodies at the cell surface, which is proportional to the expression level of this surface marker. In our experiments, the first MACS selection (leading to almost 100% positive cells) was carried out between 14 and 18 hours after transfection, since we observed that a MACS cell sorting performed more than 24 hours later was remarkably less efficient (data not shown). Timing is, therefore, an important parameter since we observed that the earlier the selection is done, the higher the expression level is and, consequently, the higher the efficiency. According to these observations, it is tempting to argue that the time point we use is so rapid that we are likely not to select stable integration events. However, our data shows that even if the first two MACS rounds of separation are equally efficient on cells expressing the transgene stably or transiently (with or without transposase), the third one is only efficient when cells are cotransfected with transposase and, hence, stably express the transgene. This suggests that these first two MACS selections are needed to increase both the proportion of cells expressing the transgene and the expression level of the  $\Delta$ hCD4 surface marker in order to increase the efficacy of the third, and last, MACS separation, which is in fact the most decisive.

Furthermore, the fact that cells transfected with the empty plasmid also express the  $\Delta$ hCD4 marker shows that the absence of a gene cloned upstream of the IRES does not impair its expression. This is an important feature since, in functional studies based on transgene expression, the negative control is often the condition transfected with the same empty plasmid. Therefore, the present strategy allows the sorting of cells transfected with the empty plasmid in the same way as cells transfected with the transgene-containing plasmid and, hence, provides a pertinent minus control. We also observed that, even though it is marginal, there is a small fraction of cells that would appear as false-positives and could, therefore, be selected. This may explain, at least partially, the fact that after each MACS step there is always a fraction of negative cells remaining (not expressing the transgene). However, this could also be explained by the extinction of the transgene expression. As both the IRES efficacy and the specificity of labeling with the microbeads-conjugated antibodies depend on the cell type, this should be tested in a preliminary experiment when transferring the current method to another experimental model.

According to the  $\Delta$ hCD4 expression data, it is tempting to suppose that FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting ([32]) is much more efficient than MACS, but even if there is a difference in performance it is not particularly striking. Supposing the same method was adapted to FACS (i.e. with a fluorescent reporter gene downstream of the IRES instead of the  $\Delta$ hCD4), there would also be a fraction of false-negative cells since the level of reporter gene expression depends on the efficiency of the IRES. Therefore, the proportion of true-positive cells (i.e., expressing the transgene and the reporter fluorescent gene) would not be very different from the one observed with the  $\Delta$ hCD4, which is about 20% in T2EC. In practice, for MACS, we determined in our experimental model that up to 10% of the cells are actually sorted (see Additional File 4) This observation suggests that among the 20% of cells expressing the  $\Delta$ hCD4, the magnetic column will actually retain only half. FACS is based on optical properties detected by an instrument, whereas MACS depends on several physical interactions ( $\Delta$ hCD4 marker/antibody/magnetic column), so it is possible that FACS would have a higher sensitivity and this could increase the percentage of sorted cells up to 20%.

Nevertheless, if this constitutes an obvious advantage of FACS over MACS, there are also many advantages of MACS over FACS. First of all, FACS requires the expression of a fluorescent reporter gene, which is generally present in the cytoplasm. The expression of the MACS-required  $\Delta$ hCD4, which is only at the cell surface without any cytoplasmic region present (as it has been deleted), is therefore more confined and more silent as regards cell function. Also, the antibody-conjugated microbeads are ultrasmall (approx. 50 nm  $\varnothing$ ), biodegradable, and non-toxic to cells. Thus, transfected cells are magnetically selected without affecting cell function or viability. Furthermore, from a purely practical point of view, the MACS technique and equipment are more accessible than those used for FACS. In fact, FACS requires the appropriate sorter, an instrument that may not be available in the laboratory. On the other hand, the MACS equipment is very simple: the magnetic sorter can be placed on the lab bench as it is as easy to handle as a normal test tube rack. Moreover, whereas FACS selection can be time-consuming, since it sorts cell by cell, with a MACS experiment it is possible to instantly sort up to  $10^7$  positive cells, within  $2 \times 10^8$  cells per column, in about one hour (including the labeling and wash steps), with the column version used in our experiment. For cells which have a reduced viability outside of the incubator, this could make a huge difference. In addition, it is possible to work with several columns at the same time, or to work with high capacity columns (up to  $10^8$  positive-cells within  $2 \times 10^9$  cells per column).

However, it is important to note that our system is compatible with a Tol2/FACS variant. Instead of using the microbead-conjugated antibody and a magnetic column, it is possible to use a fluorochrome-conjugated hCD4 antibody (equivalent to the one used to characterize the expression of the  $\Delta$ hCD4 in this study) to label the cells carrying the transgene and then sort these cells according to their fluorescence.

The MACS technique provides an efficient, rapid, gentle and easy way to sort cells, but methodological improvements could still be made. We believe that since the efficiency of the IRES-based expression might be questionable (see above), the priority is to develop an alternative Tol2/MACS system without the drawbacks of the IRES. We are, therefore, currently designing a Tol2 construct with two genes (the one of interest and the  $\Delta$ hCD4-coding sequence) driven by two different promoters, leading to higher expression on the  $\Delta$ hCD4 and, hence, a higher MACS efficiency. However, it is known that constitutive and highly active promoters can mutually interfere with each others functioning [4]. This is why it seems relevant to add, between the transgene and the sorting gene, an insulator [33] to block any interference between the two promoters. The functional analysis of such a construct is, however, beyond the objectives of the current study.

It is, therefore, expected that further improvements can be made to extend the versatility of this stable expression strategy, combined with the simple and efficient MACS method. This strategy will then allow a genetic manipulation of target cells/tissues in a wide range of cell types and species. Moreover, this strategy is perfectly suited for primary cells, which are non-immortalized and often delicate, and, more generally, in all cases when time becomes a critical parameter.

### Conclusion

We have described a new Tol2/MACS selection system that leads to stable expression in a culture of primary chicken erythroid cells highly enriched in cells expressing the transgene of interest. This system could be used in a wide variety of vertebrate species and is perfectly suited for primary cells, which are often delicate, and, more generally, in all cases when time becomes a critical parameter.

### Authors' contributions

CMP performed all the cellular experiments, except the genome insertion point identification, participated in the design and the production of the molecular constructs and drafted the manuscript. JV performed the clonal seeding set-up, the genome insertion point identification experiments and the statistical analyses. CF participated in

the design and the production of the molecular constructs. JK performed the transfection experiment demonstrating the proof of the concept of Tol2 usage in T2EC. KK and YT provided the pT2AL200R150G and pCAGGS-T2TP plasmids and provided guidance on their use. KK confirmed the genome insertion point identification using a different technique. OG conceived the study and participated in its design and coordination. All authors read and approved the final manuscript.

### Additional material

#### Additional file 1

*pT2.CMV-hKO plasmid map.* Tail restriction sites are shown.

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1472-6750-9-81-S1.PNG>]

#### Additional file 2

*Identification of the Tol2 construct genomic insertion sites on T2EC clone #2. (A) Alignment of the splinkerette PCR product with the Gallus gallus genome. The sequence part of the Tol2 construct is shown in bold. (B) Localization of the Tol2 construct insertion site into chromosome 1 of the Gallus gallus genome.*

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1472-6750-9-81-S2.PNG>]

#### Additional file 3

*Influence of the amount of DNA and the cell number on MACS efficiency. (A) Relative proportion evolution, with respect to time after transfection, of eGFP-positive cells within a population of T2EC cotransfected with the eGFP expression pT2MIK-eGFP plasmid and the transposase expression pCAGGS-T2TP plasmid with a 5/1 molecular ratio. Different total DNA (pT2MIK-eGFP+ pCAGGS-T2TP) amounts (5  $\mu$ g or 10  $\mu$ g) and cell numbers ( $5 \times 10^6$  or  $10 \times 10^6$ ) were tested. Cell fluorescence was analyzed by flow cytometry (FACS). The positive fluorescence threshold is fixed in order to have 99% of the negative cells (i.e. cells transfected with the empty plasmid) below this threshold. A 1% value is, hence, considered as null. (B) Percentage of living cells, for the same conditions as (A), according to the morphology characteristics (size and granularity) measured by flow cytometry (FACS) one day after transfection.*

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1472-6750-9-81-S3.PNG>]

#### Additional file 4

*Cell number before and after each MACS step.* A population of T2EC cotransfected with the eGFP expression plasmid and the transposase-supplier helper plasmid (molecular ratio: 1/1) was successively sorted three times on day 1, day 4 and day 7, with respect to time after transfection (Respectively MACSx1 and MACSx2, MACSx3). The cell number was determined before (input) and after (output) each MACS step and the ratio output/input was calculated.

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1472-6750-9-81-S4.PNG>]

## Acknowledgements

We are grateful to Michèle Weiss, Gaël Leprun and Simon Poly for their technical help and V. James (JV Business Services Ltd.) for language editing of the manuscript. This work was supported by grants from the LNCC, the CNRS, the UCBL, the Region Rhône Alpes, the IXXI and the ARC. CMP is a PhD fellow from the LNCC and JV is supported by a CNRS post-doctoral grant.

## References

- Bartholomew C, Ihle JN: **Retroviral insertions 90 kilobases proximal to the Evi-1 myeloid transforming gene activate transcription from the normal promoter.** *Mol Cell Biol* 1991, **11(4)**:1820-1828.
- Lazo PA, Lee JS, Tschichl PN: **Long-distance activation of the Myc protooncogene by provirus insertion in Mlvi-1 or Mlvi-4 in rat T-cell lymphomas.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, **87(1)**:170-173.
- Morishita K, Parker DS, Mucenski ML, Jenkins NA, Copeland NG, Ihle JN: **Retroviral activation of a novel gene encoding a zinc finger protein in IL-3-dependent myeloid leukemia cell lines.** *Cell* 1988, **54(6)**:831-840.
- Weber EL, Cannon PM: **Promoter choice for retroviral vectors: transcriptional strength versus trans-activation potential.** *Human gene therapy* 2007, **18(9)**:849-860.
- Coffin JM: **Retroviridae: the viruses and their replication.** In *Fundamental virology* 3rd edition. Edited by: Fields BN, Howley PM, Knipe DM. Lippincott-Raven, Philadelphia; 1996:763-844.
- Koga A, Suzuki M, Inagaki H, Bessho Y, Hori H: **Transposable element in fish.** *Nature* 1996, **383(6595)**:30.
- Kawakami K, Koga A, Hori H, Shima A: **Excision of the tol2 transposable element of the medaka fish, *Oryzias latipes*, in zebrafish, *Danio rerio*.** *Gene* 1998, **225(1-2)**:17-22.
- Kawakami K, Shima A, Kawakami N: **Identification of a functional transposase of the Tol2 element, an Ac-like element from the Japanese medaka fish, and its transposition in the zebrafish germ lineage.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, **97(21)**:11403-11408.
- Kawakami K, Imanaka K, Itoh M, Taira M: **Excision of the Tol2 transposable element of the medaka fish *Oryzias latipes* in *Xenopus laevis* and *Xenopus tropicalis*.** *Gene* 2004, **338(1)**:93-98.
- Kawakami K, Noda T: **Transposition of the Tol2 element, an Ac-like element from the Japanese medaka fish *Oryzias latipes*, in mouse embryonic stem cells.** *Genetics* 2004, **166(2)**:895-899.
- Sato Y, Kasai T, Nakagawa S, Tanabe K, Watanabe T, Kawakami K, Takahashi Y: **Stable integration and conditional expression of electroporated transgenes in chicken embryos.** *Dev Biol* 2007, **305(2)**:616-624.
- Balciunas D, Wangensteen KJ, Wilber A, Bell J, Geurts A, Sivasubbu S, Wang X, Hackett PB, Largaespada DA, McIvor RS, et al: **Harnessing a high cargo-capacity transposon for genetic applications in vertebrates.** *PLoS genetics* 2006, **2(11)**:e169.
- Urasaki A, Morvan G, Kawakami K: **Functional dissection of the Tol2 transposable element identified the minimal cis-sequence and a highly repetitive sequence in the subterminal region essential for transposition.** *Genetics* 2006, **174(2)**:639-649.
- Kawakami K: **Tol2: a versatile gene transfer vector in vertebrates.** *Genome Biol* 2007, **8(Suppl 1)**:S7.
- Stern CD: **The chick; a great model system becomes even greater.** *Dev Cell* 2005, **8(1)**:9-17.
- Consortium ICGS: **Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution.** *Nature* 2004, **432(7018)**:695-716.
- Gandrillon O, Schmidt U, Beug H, Samarut J: **TGF-beta cooperates with TGF-alpha to induce the self-renewal of normal erythrocytic progenitors: evidence for an autocrine mechanism.** *Embo J* 1999, **18(10)**:2764-2781.
- Dazy S, Damiola F, Parisey N, Beug H, Gandrillon O: **The MEK-1/ERKs signalling pathway is differentially involved in the self-renewal of early and late avian erythroid progenitor cells.** *Oncogene* 2003, **22(58)**:9205-9216.
- Damiola F, Keime C, Gonin-Giraud S, Dazy S, Gandrillon O: **Global transcription analysis of immature avian erythrocytic progenitors: from self-renewal to differentiation.** *Oncogene* 2004, **23(46)**:7628-7643.
- Bresson C, Keime C, Faure C, Letrillard Y, Barbado M, Sanfilippo S, Benhra N, Gandrillon O, Gonin-Giraud S: **Large-scale analysis by SAGE reveals new mechanisms of v-erbA oncogene action.** *BMC Genomics* 2007, **8**:390.
- Gaines P, Wojchowski DM: **piRES-CD4t, a dicistronic expression vector for MACS- or FACS-based selection of transfected cells.** *Biotechniques* 1999, **26(4)**:683-688.
- de la Pompa JL, Zeller R: **Ectopic expression of genes during chicken limb pattern formation using replication defective retroviral vectors.** *Mech Dev* 1993, **43(2-3)**:187-198.
- Devon RS, Porteous DJ, Brookes AJ: **Splinkerettes--improved vectorettes for greater efficiency in PCR walking.** *Nucleic Acids Res* 1995, **23(9)**:1644-1645.
- Hayflick L: **The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains.** *Exp Cell Res* 1965, **37**:614-636.
- Medhora M, Maruyama K, Hartl DL: **Molecular and functional analysis of the mariner mutator element Mos1 in *Drosophila*.** *Genetics* 1991, **128(2)**:311-318.
- Sherman A, Dawson A, Mather C, Gilhooly H, Li Y, Mitchell R, Finnegan D, Sang H: **Transposition of the *Drosophila* element mariner into the chicken germ line.** *Nat Biotechnol* 1998, **16(11)**:1050-1053.
- Kong BW, Carlson DF, Fahrenkrug SC, Foster DN: **Application of the Sleeping Beauty transposon system to avian cells.** *Animal genetics* 2008, **39(2)**:180-186.
- Lohe AR, Hartl DL: **Autoregulation of mariner transposase activity by overproduction and dominant-negative complementation.** *Molecular biology and evolution* 1996, **13(4)**:549-555.
- Rodolosse A, Barbat A, Chantret I, Lacasa M, Brot-Laroche E, Zweibaum A, Rousset M: **Selecting agent hygromycin B alters expression of glucose-regulated genes in transfected Caco-2 cells.** *The American journal of physiology* 1998, **274(5 Pt 1)**:G931-938.
- Bresson-Mazet C, Gandrillon O, Gonin-Giraud S: **Stem cell antigen 2: a new gene involved in the self-renewal of erythroid progenitors.** *Cell proliferation* 2008, **41(5)**:726-738.
- Mizuguchi H, Xu Z, Ishii-Watabe A, Uchida E, Hayakawa T: **IRES-dependent second gene expression is significantly lower than cap-dependent first gene expression in a bicistronic vector.** *Mol Ther* 2000, **1(4)**:376-382.
- Hulett HR, Bonner WA, Barrett J, Herzenberg LA: **Cell sorting: automated separation of mammalian cells as a function of intracellular fluorescence.** *Science* 1969, **166(906)**:747-749.
- Walters MC, Fiering S, Bouhassira EE, Scalzo D, Goetze S, Magis W, Garrick D, Whitelaw E, Martin DI: **The chicken beta-globin 5'HS4 boundary element blocks enhancer-mediated suppression of silencing.** *Mol Cell Biol* 1999, **19(5)**:3714-3726.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:  
http://www.biomedcentral.com/info/publishing\_adv.asp



## 2.2 OSC & Equilibre entre Autorenouvellement & Différenciation

### *2.2.1 La Synthèse du Cholestérol : Une Fonction Dans l'Autorenouvellement ?*

Comme il a été souligné dans le chapitre 1.2 (§1.2.3.2 p.35), les T2ECs sont des progéniteurs érythrocytaires primaires, qui peuvent être maintenus en état d'autorenouvellement grâce aux facteurs TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  et la Dexaméthasone, présents dans le milieu de culture. De plus, leur différenciation en érythrocytes matures peut être induite à volonté, en remplaçant ces facteurs par les facteurs nécessaires à leur différenciation (insuline et sérum de poulet anémié).

Afin de caractériser les bases moléculaires du choix entre autorenouvellement et différenciation, le transcriptome des T2ECs lors du passage de l'autorenouvellement vers la différenciation a été analysé au sein du laboratoire grâce à la technique SAGE (Velculescu *et al.*, 1995). Pour ce faire, deux librairies ont été construites à partir de deux populations de T2ECs dans les deux états de référence : autorenouvellement et 24h après induction de la différenciation (Damiola *et al.*, 2004). L'analyse de ces deux librairies a montré que 123 gènes présentent une expression différentielle significative entre l'état d'autorenouvellement et les phases précoces de la différenciation. 11 gènes ont été analysés plus en détail et pour 9 d'entre eux le différentiel a été confirmé par PCR quantitative. Parmi ces gènes, le gène *OSC/LSS*, codant l'oxydosqualene cyclase/lanosterol synthase est l'un des plus significativement sur-exprimés par les T2ECs en état d'autorenouvellement et sa validation par PCR quantitative est particulièrement robuste (Damiola *et al.*, 2004).

L'OSC (Identifiant Enzyme Classification : EC 5.4.99.7) est l'enzyme qui catabolise la cyclisation du 2,3-monoepoxysqualène (MOS) – une étape clé et limitante de la voie de biosynthèse du cholestérol – synthétisant ainsi le lanostérol, premier intermédiaire stéroïde à quatre cycles (Figure 2-7).

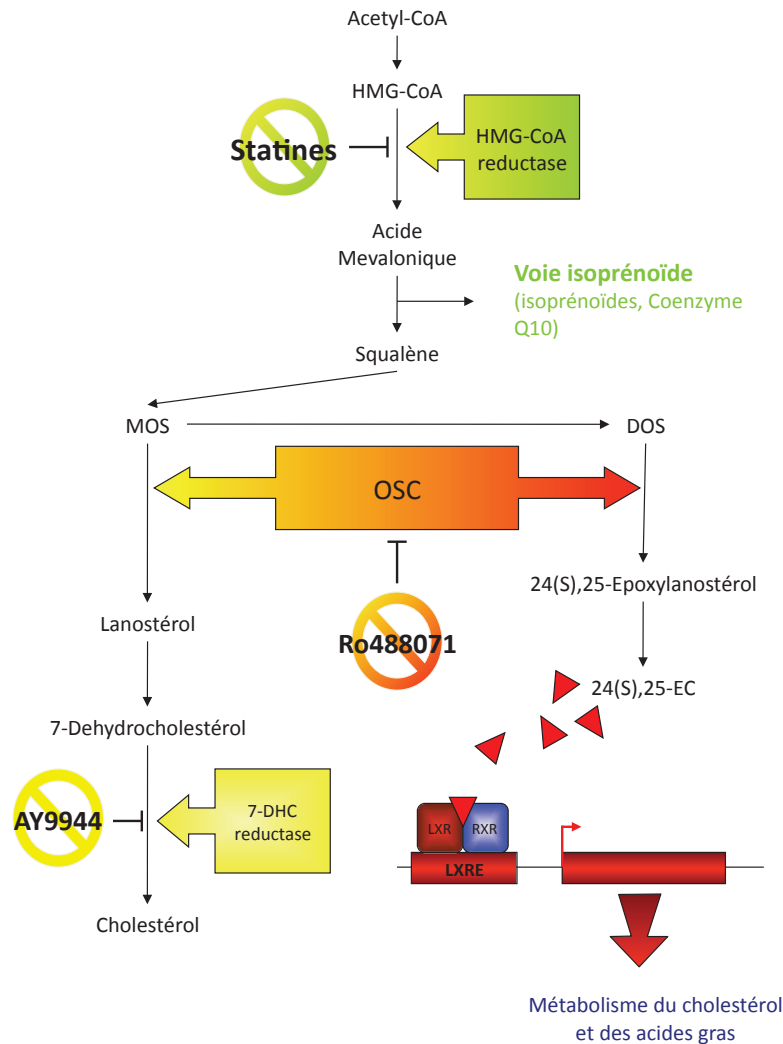


Figure 2-7 : Voie de la biosynthèse du cholestérol et voie alternative de la synthèse du oxystérol

La synthèse du cholestérol est composée de plus de 25 étapes et uniquement celles qui sont pertinentes pour cette étude sont présentées sur ce schéma. L'hydroxyméthylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) réductase est une enzyme limitante dont la régulation est strictement contrôlée, son activité est inhibée par les statines, des inhibiteurs compétitifs. En aval de l'acide mevalonique, bifurque la voie isoprénoïde produisant quelques molécules métaboliquement importantes comme la Coenzyme Q10, entre autres. L'oxydosqualène cyclase (OSC) est une autre enzyme limitante de la voie de la synthèse du cholestérol; elle catalyse la conversion du 2,3-monoépoxy-squalène (MOS) en lanostérol, premier intermédiaire cyclique de la voie. Le Ro48-8071 est un inhibiteur chimique de l'OSC. L'AY9944 est un inhibiteur de la  $\Delta^7$ -dehydrocholestérol (7-DHC), qui catalyse la dernière étape de la synthèse du cholestérol. Alternativement, le MOS est transformé en 2,3;22,23-diepoxy-squalène (DOS) par la squalène époxydase, il s'agit de la première étape de la voie alternative de la synthèse du oxystérol. L'OSC catalyse également la synthèse de 24(S),25-époxycholestérol à partir du DOS, aboutissant à la formation de 24(S),25-époxycholestérol (triangles rouges). Ce dernier est un puissant activateur du récepteur nucléaire LXR (liver X receptor) qui hétérodimérise avec RXR (retinoïd X receptor) pour réguler des gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol et des acides gras. Adapté de (Huff & Telford, 2005).



Le cholestérol, quant à lui, est un composant clé du fonctionnement cellulaire. En particulier, cet élément possède un rôle structural au sein de la cellule : c'est un organisateur de la membrane plasmique dont la fluidité et la stabilité mécanique dépendent de la teneur en cholestérol. Mais le cholestérol peut également avoir un rôle dans la signalisation intracellulaire *via* les radeaux lipidiques, des réelles plateformes de signalisation, ou en tant que précurseur nécessaire à la maturation de la protéine Hedgehog.

### 2.2.1.1 Contrôle de l'homéostasie du cholestérol cellulaire

Le cholestérol peut être internalisé *via* des récepteurs membranaires à partir de la circulation sanguine, dans laquelle il est associé à des lipoprotéines, telles que la LDL (*Low Density Lipoprotein*). Cependant, les cellules de la plupart des organes et tissus peuvent également satisfaire leurs besoins par la synthèse intracellulaire de cholestérol endogène à partir de l'acétyl-CoA (Figure 2-7 et (Simons & Ikonen, 2000)). Cette dernière a lieu dans le réticulum endoplasmique, où résident certains des facteurs de transcription qui régulent l'expression des enzymes impliquées dans cette synthèse *de novo* de cholestérol. Parmi ces facteurs, les facteurs de transcription SREBP-1 et -2 constituent l'un des principaux mécanismes de régulation du taux de cholestérol, assurant son homéostasie dans la cellule. En effet, les SREBPs (*Sterol Response Element Binding Proteins*) contrôlent la transcription de nombreux gènes liés au cholestérol, tels que les gènes codant les enzymes impliquées dans la biosynthèse du cholestérol (dont l'OSC et l'HMG-CoA réductase, entre autres), ou encore les gènes impliqués dans son absorption à partir de la circulation sanguine ou son exportation hors de la cellule. L'activation de SREBP est principalement contrôlée par des stérols (dont le cholestérol lui-même) dans le réticulum endoplasmique, *via* un mécanisme protéolytique qui aboutit à la libération d'un fragment transcriptionnellement actif (Brown & Goldstein, 1997; Brown & Goldstein, 1999; Goldstein, DeBose-Boyd & Brown, 2006).

Etant donné que l'HMG-CoA-réductase est la première enzyme limitante de la voie, on pourrait s'attendre à ce que la biosynthèse du cholestérol soit exclusivement régulée à ce niveau. Toutefois, des études récentes ont mis en évidence l'existence d'un rétrocontrôle négatif, ciblant directement l'expression des gènes codant d'autres enzymes de la voie, et en particulier celle du gène *OSC/LSS* (Dang *et al.*, 2009; Villagra *et al.*, 2007). Ce mécanisme entrainerait ainsi la diminution du niveau de cholestérol cellulaire dans certaines conditions pathologiques d'hypercholestérolémie, et semble indépendant des SREBPs.

Par ailleurs, l'OSC catabolise également la transformation du 2,3;22,23-diepoxysqualène (DOS) en 24(S),25-époxycholestérol, aboutissant à la formation de 24(S),25-époxycholestérol (24,25EC; PubChem Substance ID : 7983975), un oxystérol endogène. Il est important de remarquer que les oxystérols sont des molécules produites de manière endogène et impliquées dans l'homéostasie du cholestérol (Brown & Jessup, 2009). Cependant, contrairement à la grande majorité des oxystérols qui sont des dérivés oxygénés du cholestérol, la synthèse du 24,25EC a lieu en parallèle de celle du cholestérol et non pas *a posteriori* (Figure 2-7). De plus, le 24,25EC peut être produit par toutes les cellules synthétisant du cholestérol et agit en tant que régulateur endogène de l'homéostasie du cholestérol (Brown, 2009). En particulier, il s'agit d'un activateur puissant de LXR, lequel – une fois activé – régule l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la régulation du métabolisme cellulaire des lipides, y compris l'exclusion du cholestérol en dehors de la cellule, *via* des transporteurs de type *ATP-Binding Cassettes*, ABC (Ory, 2004). De plus, il a été montré que cet oxystérol peut aussi contrôler l'activation protéolytique des SREBPs – mentionnée plus haut – et contrôler directement son activation, ou encore induire l'accélération de la dégradation de l'HMG-CoA-réductase (Brown, 2009).

Ainsi, l'homéostasie du cholestérol cellulaire est assurée par un double mécanisme, régulant à la fois directement la voie de biosynthèse – *via* la modulation des enzymes impliquées – et, parallèlement, son exportation *via* l'expression des gènes cibles de LXR (Rowe *et al.*, 2003; Wong *et al.*, 2008).

### 2.2.1.2 Le cholestérol : un organisateur des membranes

Sauf pour quelques exceptions, la membrane plasmique est relativement rigide : elle ne peut être étirée élastiquement que jusqu'à une augmentation de 2 à 3% de sa surface avant rupture (Morris & Homann, 2001). Or, la fluidité membranaire régule la mobilité des protéines et donc les interactions entre celles-ci au sein de la membrane. Notamment, grâce à cette fluidité, des groupes de protéines membranaires peuvent s'assembler à des endroits particuliers de la membrane pour donner des structures spécialisées. De plus, la fluidité joue un rôle dans l'assemblage de la membrane. Concrètement, les membranes dérivent uniquement de membranes préexistantes et leur croissance s'effectue par l'insertion de lipides et de protéines dans la matrice fluide du feuillet membranaire. Enfin, beaucoup de mécanismes cellulaires fondamentaux – comme les mouvements des cellules, leur croissance, leur division, des changements morphologiques transitoires (sécrétion, endocytose) ou plus stables (différenciation) – découlent du déplacement de composants membranaires (Karp, 2007).

En ce qui concerne le cholestérol, son groupe hydroxyle polaire prend contact avec la phase aqueuse, près des têtes polaires des phospholipides, alors que son groupe polycyclique stéroïde interfère avec leurs chaînes acyle et tend à les immobiliser. L'effet global du cholestérol sur la fluidité d'une membrane varie selon la composition de celle-ci en lipides. En effet, le cholestérol limite le mouvement aléatoire de la portion des chaînes d'acides gras voisines de la zone externe des feuillettes, en réduisant ainsi la fluidité (Le Guerneve & Auger, 1995), mais, en même temps, il écarte et disloque les queues des acides gras, rendant de ce fait légèrement plus fluides les régions internes de la bicouche (Lodish *et al.*, 1997).

Contrairement à une distribution aléatoire des éléments membranaires – proposée par le modèle de la mosaïque fluide (Houslay & Stanley, 1982) – il est maintenant accepté que la distribution latérale de la bicouche membranaire est hétérogène. En effet, à certains endroits, des protéines membranaires sont regroupées dans des microrégions enrichies en sphingolipides et en cholestérol, appelées radeaux lipidiques (Edidin, 1997; Edidin, 2001). Les sphingolipides sont majoritairement séquestrés dans ces régions où, en association avec le cholestérol, ils contribuent à la faible fluidité caractéristique de ces radeaux (Brown & London, 2000; Simons & Ehehalt, 2002). Par ailleurs, leur présence est souvent associée à des fonctions cellulaires importantes comme la transduction des signaux, la polarisation des cellules ou le bourgeonnement viral (Rajendran & Simons, 2005; Simons & Toomre, 2000).

Etant donné l'importance de la membrane vis-à-vis du rôle physiologique des érythrocytes, sa structure et ses propriétés mécaniques ont été largement étudiées. Cependant, relativement peu d'études rapportent l'existence et les propriétés des radeaux dans ces cellules. D'après ces études, les radeaux lipidiques érythrocytaires sont des structures capables d'incorporer des protéines à ancre GPI (Civenni *et al.*, 1998). Cependant, il a été montré que l'assemblage de ces radeaux n'a pas besoin d'ancre GPI, alors que le cholestérol serait crucial pour le recrutement des protéines dans les radeaux des érythrocytes (Samuel *et al.*, 2001). Pour aller plus loin, il a été récemment montré qu'une diminution du cholestérol affecte la distribution des protéines dans les radeaux des érythrocytes, car il induit la formation de domaines plus ordonnés (les sphingolipides qui les composent sont plus serrés) et donc moins fluides (Domingues *et al.*, 2010). Par ailleurs, ces structures seraient impliquées – ou du moins altérées – dans l'infection du *Plasmodium falciparum*, agent responsable de la malaria (Murphy *et al.*, 2004; Nagao, Seydel & Dvorak, 2002; Samuel *et al.*, 2001). Enfin, les radeaux lipidiques seraient nécessaires à la formation et au relargage des vésicules en réponse au calcium, un moyen de protection des érythrocytes contre leur destruction par certaines protéines du sérum plasmique (Civenni *et al.*, 1998; Salzer *et al.*, 2002; Salzer & Prohaska, 2001). Pour l'ensemble de ces études, dans la pratique, ces structures sont

définies comme des membranes résistantes à la solubilisation par des détergents non ioniques à 4°C, on parle alors de DRM (*detergent-resistant membranes*), fraction soupçonnée de contenir les radeaux lipidiques. Or, une étude relativement récente suggère que cette propriété est en effet nécessaire mais pas suffisante pour isoler ces structures (Ciana, Balduini & Minetti, 2005). En effet, en utilisant différentes étapes supplémentaires, les auteurs obtiennent des structures dont les compositions varient, démontrant ainsi à quel point ces structures restent mal comprises.

### 2.2.1.3 Cholestérol & contrôle de l'autorenewement

Le cholestérol est essentiel au bon fonctionnement de certaines composantes de la signalisation cellulaire, soit par son rôle d'organisateur dans les radeaux lipidiques, soit en tant que molécule nécessaire pour la maturation des protéines de la famille Hedgehog.

#### 2.2.1.3.1 Cholestérol, radeaux lipidiques & signalisation

Les radeaux lipidiques sont considérés comme de véritables plates-formes de signalisation (Lingwood & Simons, 2010; Simons & Toomre, 2000), et le cholestérol est essentiel à leur assemblage et fonction, (Slotte & Bierman, 1988). Ainsi, il a été suggéré que la disponibilité en cholestérol cellulaire contrôle le nombre et/ou la composition des radeaux lipidiques, contrôlant ainsi la sensibilité (ou réceptivité) des cellules à leur environnement (Incardona & Eaton, 2000). De plus, un lien de cause à effet entre le contrôle du taux de cholestérol cellulaire et la modulation de la signalisation dépendante des radeaux lipides, *via* l'activation de LXR a été très récemment rapporté (Pommier *et al.*, 2010).

Par ailleurs, plusieurs rapports documentent le lien entre l'homéostasie du cholestérol et les voies de signalisation contrôlant l'autorenewement dans les T2ECs : la voie de Ras/Raf/MEK/ERK et celle du TGF- $\beta$  (§1.2.3.2.2, p.36). D'une part, il a été rapporté que l'appauvrissement de la cellule en cholestérol bloque l'activation de Raf-1 par Ras. Plus particulièrement, il a été proposé que le recrutement de Ras dans les radeaux lipidiques est nécessaire pour la transduction du signal (Carey *et al.*, 2003; Roy *et al.*, 1999) et que la spécificité de la réponse au signal dépend de la localisation spatiale de Ras et de Raf, grâce à des microdomaines membranaires riches en cholestérol (Matallanas *et al.*, 2006; Rizzo *et al.*, 2001). D'autre part, une corrélation positive a été observée entre le taux du facteur TGF $\beta$ -1 circulant et l'hypercholestérolémie plasmique *in vivo* (Zhou *et al.*, 2009), et il a été montré qu'un appauvrissement en cholestérol entrave la transduction du signal véhiculé par le TGF- $\beta$  (Ma *et al.*, 2007). Cependant, à l'heure actuelle, la question de savoir si le taux de cholestérol et les radeaux lipidiques agissent

positivement ou négativement sur la signalisation du TGF- $\beta$  reste sujette à controverse (Chen, 2009).

Enfin, malgré le fait que le mécanisme de régulation des SREBPs impliquant une voie protéolytique (§2.2.1.1, p.88) soit le plus souvent étudié, un faisceau croissant de preuves suggère que ces facteurs de transcription sont également régulés par des *stimuli* extracellulaires et, en particulier, par les voies mentionnées ci-dessus. Tout d'abord, il a été démontré que ARC105, un modulateur clé de la signalisation du TGF- $\beta$  (Kato *et al.*, 2002), est impliqué dans l'homéostasie du cholestérol *via* les SREBPs (Yang *et al.*, 2006). Il a également été démontré *in vitro* et *in vivo* que l'activité transcriptionnelle de SREBP-2 est régulée par phosphorylation, et que celle-ci est dépendante de ERK1/2 (Kotzka *et al.*, 2004; Kotzka *et al.*, 2000; Roth *et al.*, 2000).

Ces données suggèrent donc que l'homéostasie du cholestérol peut être régulée par les voies de signalisation associées à l'autorenouvellement *via* SREBP, et que, réciproquement, le taux de cholestérol peut moduler ces voies de signalisation *via* la composition des radeaux.

#### 2.2.1.3.2 Cholestérol & signalisation Hedgehog

En plus d'agir sur la fluidité de la membrane, le cholestérol est un précurseur des ligands de la voie de signalisation Hedgehog, les protéines Hedgehog. Ces dernières sont des protéines sécrétées, contrôlant la morphogenèse et la prolifération pendant le développement (Cohen, 2003). Aussi, la voie de signalisation Hedgehog quant à elle semble être impliquée dans la régulation et le maintien des cellules souches adultes. Plus particulièrement, concernant les progéniteurs érythrocytaires, cette voie de signalisation est nécessaire pour l'expansion des colonies à partir des progéniteurs érythrocytaires de stress et de l'érythropoïèse adulte normale (Cridland *et al.*, 2009; Detmer *et al.*, 2000; Perry *et al.*, 2009). En outre, il a été démontré que l'absence de signalisation Hedgehog induit les progéniteurs érythrocytaires à se différencier prématurément (Mandal *et al.*, 2007).

Par ailleurs, l'activation des protéines Hedgehog se fait grâce à une modification lipidique de chaque extrémité du précurseur protéique (Porter, Young & Beachy, 1996b). Précisément, le domaine C-terminal possède une activité catalytique qui permet l'autoprotéolyse de l'extrémité carboxylique du précurseur. Une molécule de cholestérol sera ensuite liée de manière covalente par une liaison ester (Porter *et al.*, 1996a), et cette modification post-traductionnelle est nécessaire pour la bonne transduction du signal de la voie Hedgehog (Incardona & Eaton, 2000). De plus, une privation en cholestérol entraîne une inhibition de l'activation de cette protéine, et empêche ainsi l'activation de la voie de signalisation Hedgehog

(Guy, 2000), suggérant que la voie de signalisation Hedgehog pourrait être modulée *via* la disponibilité en cholestérol cellulaire.

#### 2.2.1.3.3 Cholestérol & apoptose

Les mitochondries sont des organites pauvres en cholestérol, avec des estimations allant de 0,5 à 3% de la teneur en cholestérol trouvée dans d'autres membranes cellulaires (Daum & Vance, 1997; van Meer, Voelker & Feigenson, 2008). Toutefois, il a été récemment rapporté que les mitochondries isolées à partir de différentes cellules cancéreuses présentent des niveaux de cholestérol anormalement élevés, corrélés avec une résistance cellulaire à la mort par apoptose de ces cellules (Montero *et al.*, 2008). Dans les cellules saines, la protéine pro-apoptotique Bax existe en tant que monomère inactif dans le cytosol. La translocation de Bax vers la membrane externe mitochondriale, suivie de son oligomérisation, forme des pores intramembranaires et est considérée comme une des premières étapes de l'apoptose (Green & Kroemer, 2004). De manière intéressante, il a été montré que l'accumulation du cholestérol dans la membrane mitochondriale diminue l'activation de Bax et diminue son insertion membranaire et oligomérisation, en protégeant ainsi les cellules de l'apoptose (Christenson *et al.*, 2008; Lucken-Ardjomande, Montessuit & Martinou, 2008).

Par ailleurs, plusieurs preuves expérimentales et cliniques suggèrent que les statines – une famille d'inhibiteurs de la biosynthèse du cholestérol (Figure 2-7, p. 87) – ont des propriétés anti-cancéreuses, en entraînant l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire des cellules cancéreuses (Chan, Oza & Siu, 2003; Demierre *et al.*, 2005; Gauthaman, Fong & Bongso, 2009). Récemment, il a été démontré que la stabilisation de p53 – un régulateur clé du cycle cellulaire (voir §1.1.2.1, p.11) – est impliquée dans l'apoptose induite par les statines et dépendante de la translocation de Bax, (Lee *et al.*, 2010b). Enfin, il a été montré que la déplétion en cholestérol entraîne également une induction de l'apoptose par une activation de Bad, une autre protéine pro-apoptotique (Motoyama *et al.*, 2009).

Ainsi, alternativement à son implication dans la signalisation cellulaire, le cholestérol peut donc influencer le devenir des cellules souches en protégeant ces dernières de l'apoptose. Dans ce sens, il a été montré que les oxystérols – évoqués précédemment et qui constituent des régulateurs du métabolisme du cholestérol – peuvent également avoir des effets apoptotiques, reliant le contrôle de ces deux processus (Lordan, Mackrill & O'Brien, 2009).

## 2.2.2 Présentation des Résultats Obtenus

### 2.2.2.1 Rôle de l'OSC dans le choix autorenouvellement *vs.* différenciation

Sur la base des différentes données de la littérature, décrites ci-dessus, et dans la continuité de l'étude transcriptomique réalisée sur les T2EC, nous nous sommes donc intéressés au rôle de l'OSC dans le contrôle ou le maintien de l'autorenouvellement dans notre modèle.

Vu le lien entre le cholestérol et certaines maladies cardiovasculaires, la régulation du niveau d'expression de l'OSC et de son activité *in vivo*, présente une importance médicale ; cette régulation est donc une cible potentielle dans la conception de drogues hypocholestérolémiantes (Huff & Telford, 2005). Cependant, à ce jour, aucune étude n'a montré son implication dans le processus d'autorenouvellement ou de différenciation, notamment dans le système hématopoïétique. Une partie de l'approche choisie pour cette étude est justement basée sur l'inhibition de l'activité enzymatique de l'OSC par le Ro48-8071, un inhibiteur chimique de l'activité enzymatique de cette enzyme par analogie de substrat (Figure 2-7, p. 87), qui nous a été généreusement fourni par le Dr. Johannes D. Aebi (Roche). L'inhibiteur Ro48-8071 – conçu avec un objectif thérapeutique – a été testé *in vitro* (Dehmlow *et al.*, 2003) et *in vivo* (Morand *et al.*, 1997). La deuxième partie de l'étude de l'OSC est basée sur la modulation de l'expression du gène *OSC/LSS* par interférence à l'ARN (décrit dans le §2.1.2, p.65) ou par sur-expression transitoire.

Nous avons ainsi montré que l'OSC joue un rôle crucial dans le contrôle de l'équilibre entre l'autorenouvellement, la différenciation et l'apoptose dans les T2ECs. En effet, tant son activité que son expression sont nécessaires pour maintenir les T2ECs dans un état d'autorenouvellement, en les empêchant de quitter ce stade soit par apoptose, soit par différenciation. De plus, nous avons observé que deux autres inhibiteurs de la voie de biosynthèse du cholestérol (Simvastatin et AY-9944, Figure 2-7, p.87) reproduisent les effets de l'inhibition de l'OSC, avec inversion de l'effet de ces trois drogues par addition de cholestérol. En outre, nous avons démontré que la présence de cholestérol exogène dans une culture de T2ECs en autorenouvellement a un effet positif sur le nombre de cellules. Pris ensemble, ces résultats démontrent que la participation de l'OSC dans le maintien de l'autorenouvellement est fondée sur sa fonction dans la synthèse *de novo* du cholestérol.

Nous avons ainsi proposé un modèle dans lequel le cholestérol est nécessaire au maintien des cellules en état d'autorenouvellement. Ce rôle pourrait être relié au lien étroit entre le cholestérol et les voies de signalisation gouvernant l'autorenouvellement, ou encore l'apoptose,

comme indiqué précédemment (§2.2.1.3, p. 91). Une diminution du taux de cholestérol entrainerait ainsi leur engagement, ce qui se traduit par la sortie de l'état d'autorenouvellement. En accord avec des modèles proposés précédemment, le devenir des cellules au-delà de cet engagement dépendra de la présence des facteurs de différenciation, permettant leur survie (et donc leur différenciation) ou leur absence (résultant ainsi en leur mort cellulaire par apoptose). Au centre de ce modèle – en raison de sa position clé à la fois dans la synthèse du cholestérol et dans la synthèse du 24, 25EC – l'OSC représente un mécanisme de régulation fin, permettant le contrôle du taux de cholestérol cellulaire de manière autonome.

L'ensemble de ces travaux a fait l'objet d'un papier soumis à *BMC Cell Biology*, actuellement en considération et le manuscrit original est présenté ci-dessous (§2.2.3, p. 101).

### 2.2.2.2 Utilisation du système Tol2/MACS pour la sur-expression de l'OSC

L'un des arguments soutenant l'importance de l'OSC dans l'équilibre entre autorenouvellement et différenciation est basé sur l'observation de l'effet de sa sur-expression lors du passage de l'autorenouvellement vers la différenciation. En effet, nous avons observé que la sur-expression de l'OSC s'oppose à l'engagement vers la différenciation, suggérant que la diminution de l'expression du gène *OSC/LSS* est une étape nécessaire à la sortie de l'état d'autorenouvellement. L'effet de cette sur-expression reste cependant relativement modeste. Le système de transfection (transitoire) peut sans doute expliquer cela. En effet, étant donné que l'effet de la sur-expression se traduit par un retard de la différenciation, celui-ci ne peut être observé qu'une fois la différenciation engagée (de sorte que les cellules *qui ne se sont pas* différenciées deviennent apparentes). Par conséquent, plus la différenciation progresse, plus ce retard est mis en évidence. Concrètement, dans nos conditions, un écart entre les cellules sur-exprimant l'*OSC/LSS* et le contrôle n'est significatif que à partir du troisième jour de différenciation. Or, à l'inverse, le niveau de l'OSC exogène diminue avec le temps: la protéine transgénique est observée les 3-4 premiers jours, mais elle est presque complètement perdue par la suite. Afin de contourner cette contrainte de temps, nous avons décidé de sur-exprimer l'OSC de manière stable, nous permettant ainsi de réaliser des études à moyen ou long terme.

Tout d'abord, nous avons testé le protocole de transfection stable traditionnellement utilisé dans l'équipe, basé sur une stratégie d'infection rétrovirale. Pour ce faire, l'ADNc correspondant à l'*OSC/LSS* de poulet a été cloné dans le vecteur rétroviral défectif pCRNCM.FLAG. Ce vecteur contient la séquence d'un FLAG, permettant d'obtenir une protéine fusion, afin de détecter la protéine exogène. Ensuite, nous avons testé dans un



premier temps cette construction en transfection transitoire. Nous avons ainsi observé que cette construction permettait aisément l'expression et la détection de l'OSC.FLAG, sur-exprimée pendant trois à quatre jours. Notre construction étant fonctionnelle, nous pouvions entreprendre notre stratégie d'infection rétrovirale en vue d'une transfection stable. Malheureusement, malgré plusieurs tentatives, nous n'avons pas réussi à observer ni la protéine fusion par Western Blot ni une sur-expression au niveau de l'ARNm par PCR quantitative et ceci ni dans les T2ECs, ni dans les CEFs, les fibroblastes embryonnaires de poulet utilisés pour la fabrication de virus préalablement à l'infection des T2ECs. Nous avons donc décidé de cloner l'ADNc correspondant à l'OSC/LSS fusionné avec le FLAG dans le vecteur pT2MIK, décrit précédemment (§2.1.3, p. 71). Le test de la nouvelle construction pT2MIK-OSC.FLAG.5' a été mené, sous ma tutelle, par Gaël Leprun lors de son stage de M1 ; les expériences présentées ci-dessous sont adaptées à partir de son rapport de stage.

#### 2.2.2.2.1 Matériel et Méthodes

##### ✓ *Culture Cellulaire :*

Les T2ECs sont préparées à partir de la moelle osseuse de tibia d'embryons de poulet (souche PA12, INRA) de 19/20 jours et maintenues en autorenewement comme décrit précédemment (Gandrillon *et al.*, 1999).

##### ✓ *Vecteurs utilisés :*

pT2MIK (Mejia-Pous *et al.*, 2009) : vecteur de base permettant l'expression d'un ARNm bicistronique, sous le contrôle d'un promoteur constitutif (CMV), portant un site de clonage pour insérer le gène d'intérêt, et suivi par la séquence du  $\Delta$ hCD4 précédée d'un IRES pour permettre sa traduction. pT2MIK-eGFP (Mejia-Pous *et al.*, 2009) : vecteur pT2MIK contenant la séquence codant l'eGFP dans le site EcoRV. pT2MIK-OSC.FLAG.5' : vecteur pT2MIK contenant l'ADNc de la protéine fusion OSC.FLAG dans le site EcoRV. pCAGGS-T2TP (Kawakami *et al.*, 2004) : plasmide permettant l'expression de la transposase sous le contrôle du promoteur fort CAGGS (CMV modifié). Un apport transitoire de cette transposase est suffisant pour permettre la transposition d'une cassette. De plus, ce caractère transitoire permet d'éviter une répétition de la transposition du transgène, une fois intégré dans le génome. pCRNCM : vecteur rétroviral défectif modifié. pCRNCM-OSC.FLAG.5' : vecteur pCRNCM contenant l'ADNc de la protéine fusion OSC.FLAG (FLAG en 5', soit extrémité N-terminale de la protéine) entre les sites XbaI et EcoRI. pMACS-4.1 (Mitenyi Biotec) : vecteur codant le marqueur  $\Delta$ hCD4 sous le contrôle d'un promoteur constitutif CMV.

##### ✓ *Transfection par Nucléofection :*

Les transfections sont réalisées par la méthode de nucléofection (Amaxa Technology). Pour chaque nucléofection,  $10^7$  cellules sont lavées une fois dans un tampon PBS et resuspendues dans 100  $\mu$ l de tampon de nucléofection (Cell line Nucleofector kit V ; Amaxa Biosciences). Après ajout de 10  $\mu$ g d'ADN plasmidique, les cellules sont transférées dans une cuvette puis nucléofectées à l'aide du programme T-16 du Nucleofector (Amaxa). Après la nucléofection, les cellules sont immédiatement reprises dans du milieu LM2 (milieu LM1 avec du RPMI 1640 au lieu de  $\alpha$ -MEM) durant une nuit entière (16 heures maximum).

##### ✓ *Élimination des cellules mortes et des fragments cellulaires :*

La présence de cellules mortes et de débris cellulaires diminue fortement l'efficacité du tri magnétique, ils sont donc éliminés avant. Pour cela, les cellules vivantes sont purifiées par centrifugation à travers un gradient de LSM (Lymphocytes Separation Medium, Eurobio).

1 à  $10.10^6$  cellules sont resuspendues dans 1 ml de LM1 et délicatement déposées sur 1 ml de LSM. Après 15 minutes de centrifugation à 1027 g sans frein, les cellules à l'interphase LM1/LSM sont récupérées, lavées dans 2 ml de LM1, puis resuspendues dans du LM1.

✓ *MAGnetic Cell Sorting (MACS) :*

Les cellules transfectées co-exprimant le transgène et le marqueur de surface  $\Delta$ hCD4 sont isolées magnétiquement et séparées des cellules non transfectées grâce au MACSelect (Miltenyi Biotec). 1 à  $5.10^6$  cellules sont retenues par les MACSelect MicroBeads (billes sur lesquelles sont fixés des anticorps anti-hCD4) puis séparées par champ magnétique en passant les cellules sur une colonne aimantée (MACS Column). Les cellules sont triées selon le protocole du fournisseur, mais en utilisant du PBSA (PBS ; BSA 0,5 %) au lieu du PBE (PBS ; EDTA 5 mM).

✓ *Cytométrie de flux :*

La fluorescence émise soit par les différents marquages, soit par les cellules positives pour la eGFP, est détectée à l'aide d'un cytomètre de flux FACScantoII et les données sont analysées grâce au logiciel DIVA (tous les deux de Becton-Dickinson). Le seuil de fluorescence significatif est déterminé à partir de l'autofluorescence basale.

✓ *Lyse cellulaire :*

Les cellules sont lavées avec 1 ml de tampon PBS froid, puis reprises dans du PBS contenant des anti-protéases (complete Mini EDTA-free protease inhibitor cocktail tablets, Roche) et des anti-phosphatases (Phosphatase inhibitor cocktail 2, Sigma). La lyse est réalisée pendant 30 minutes dans la glace en vortexant de temps en temps. Un aliquot du lysat cellulaire est ensuite prélevé pour un dosage des protéines, le reste étant dénaturé 5 minutes à 100 °C dans un tampon Laemmli (100 mM Tris pH6,8, SDS 2 %, Glycérol 10 %, 50 mM DTT et Bleu Bromophénol 0,005 %) et conservé à -20 °C.

✓ *Dosage protéique :*

Le kit DC Protein Assay (BioRad) est utilisé selon les indications du fournisseur. La concentration en protéines des échantillons est déterminée à partir de la densité optique à 750 nm, en étalonnant avec une gamme de BSA composée de plusieurs points entre 0 et 2 mg/ml.

✓ *Western blot :*

20  $\mu$ g de protéines totales sont déposés sur un gel d'acrylamide 10 %. Après migration électrophorétique dans du tampon de migration (0,1 % SDS, 25 mM Tris Base et 192 mM Glycine), les protéines sont transférées en milieu liquide sur une membrane de Polyfluorure de Vinylidène (PVDF) pendant 1h15 dans un tampon de transfert (25 mM Tris base, 192 mM Glycine et 20 % Ethanol). Après transfert, les protéines sont fixées au rougeponceau pendant 5 minutes, puis la membrane est saturée dans une solution de lait 5 % TBS-Tween20 0,1 % pendant 2 heures à température ambiante sous agitation. Elle est ensuite incubée dans une solution de BSA 2 % TBS-Tween20 0,1 % avec l'anticorps primaire anti-FLAG M2 (Sigma) dilué au 1/10000<sup>ème</sup>, pendant une nuit à 4°C sous agitation. Après trois lavages de 10 minutes dans du TBS-Tween 0,1 %, la membrane est incubée pendant 2 heures, sous agitation, en présence de l'anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé à l'HRP (Horse Radish Peroxidase, Rockland) dilué au 1/10000<sup>ème</sup> dans de la BSA 2 % TBS-Tween20 0,1 %. Après deux lavages de 10 minutes dans du TBS-Tween 0,1 % et un lavage de 10 minutes dans du TBS, les protéines d'intérêt sont révélées par chimioluminescence (ECL kit Amersham Pharmacia Biotech) et autoradiographie.

✓ *Extraction ARN :*

L'ARN total est extrait avec le Kit RNeasy Mini (Qiagen), selon les instructions du fabricant. La pureté et la quantification des échantillons sont évaluées par spectrophotométrie (Nanodrop).

✓ *RT qPCR :*

La réaction de transcription inverse (RT) est effectuée sur 1  $\mu$ g d'ARN total, préalablement chauffé à 65 °C, dans 20  $\mu$ l de milieu réactionnel en utilisant la M-MULV Reverse Transcriptase (200 U/ $\mu$ g), des amorces aléatoires (Random Primers ; 10 ng/ $\mu$ l), des dNTPs (1 mM) et le tampon fourni par le fabricant (Promega). La réaction de RT se

déroule de la manière suivante : incubation 10 minutes à 21 °C, 45 minutes à 37 °C et enfin 5 minutes à 96 °C. Les ADNc sont ensuite purifiés par précipitation à l'éthanol 70 % en présence de NaCl 0,5 M durant une nuit à -20 °C, avant d'être centrifugés 20 minutes à 16100 g à 4 °C. Le culot est rincé à l'éthanol 70 % et resuspendu dans 100 µl d'eau ultra-pure (équivalent à 5 fois le volume final de la RT). 1/40<sup>ème</sup> de la réaction de RT (2,5 µl d'ADNc) est ensuite prélevé pour mesurer le taux d'ARNm de l'OSC en PCR quantitative (en plaque 96 puits) grâce au système MX3000 (Stratagène) en utilisant le kit LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche). Le programme de PCR utilisé est celui décrit dans le protocole fourni par le fabricant du kit, avec une température d'hybridation de 58 °C. Les amorces spécifiques du gène OSC sont :

OSC-S : 5' AGCTGATGGATCATGGGAAG3' ;

OSC-AS : 5' ATCTGCTTGGAGAGCAGGAA3'.

Les deux gènes *eIF5* et *RPS13*, considérés comme invariants dans ces conditions, sont utilisés comme gènes de normalisation ; les amorces respectives sont :

eIF5-S : 5' CTGCAAGACATGTTGGATGG3' ;

eIF5-AS : 5' TCCCTGTACCAGTGTACCA3' ;

RPS13-S : 5' AGGCTTGACTCCCTCACAAA3' ;

RPS13-AS : 5' ATCAAACGGAACCTGGCATC3'.

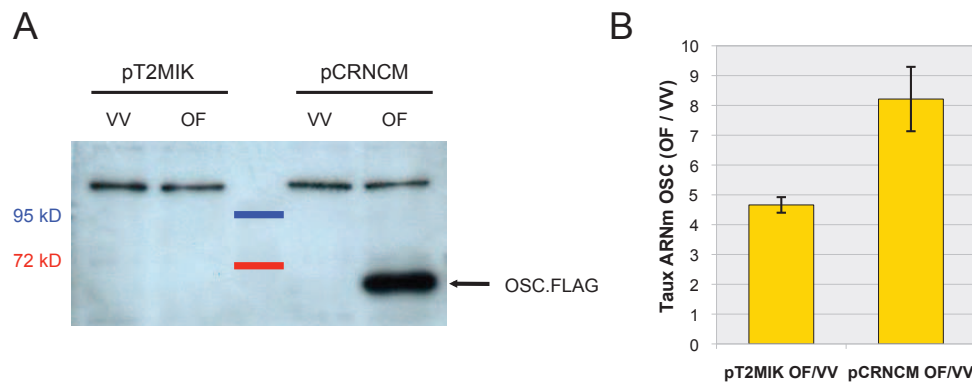
L'efficacité (E) de la réaction de PCR, ainsi que le rapport (R) du taux relatif d'ARNm de l'OSC entre la condition vecteur vide et vecteur d'expression de l'OSC.FLAG, sont calculés comme décrit précédemment (Pfäffl, 2001).

#### 2.2.2.2 Résultats

Aucun anticorps dirigé contre la protéine OSC de poulet n'étant commercialisé, le vecteur a été conçu de manière à permettre l'expression d'une protéine fusion : l'OSC produite est ainsi marquée en 5' avec l'épitope FLAG (OSC.FLAG). L'anticorps primaire utilisé pour le Western blot est donc un anticorps anti-FLAG. La fonctionnalité du vecteur pT2MIK-OSC.FLAG.5' a d'abord été testée de manière transitoire, afin de confirmer que ce vecteur permet l'expression de l'OSC exogène (Figure 2-8). Pour cela, l'expression de l'OSC.FLAG dans des T2ECs a été vérifiée par Western blot en utilisant deux bases vectorielles différentes : pT2MIK-OSC.FLAG.5' et pCRNCM-OSC.FLAG.5'. Ce dernier, utilisé précédemment dans le laboratoire pour les expériences de sur-expression transitoire de l'OSC.FLAG, est utilisé ici comme témoin positif de l'expérience. Afin de pouvoir trier par MACS les cellules portant la construction pCRNCM-OSC.FLAG.5', des cellules ont été co-transfectées avec le vecteur pMACS-4.1 contenant le  $\Delta$ hCD4 sous le contrôle d'un promoteur constitutif et permettant un tri efficace. Afin de rapprocher au maximum les deux conditions expérimentales, nous avons aussi co-transfecté le vecteur pMACS-4.1 avec le vecteur d'intérêt pT2MIK-OSC.FLAG.5'.

L'expression de l'OSC.FLAG a été vérifiée par Western blot à partir des extraits protéiques des cellules triées par MACS, 24 heures après transfection par nucléofection. On peut observer la présence de l'OSC.FLAG dans les extraits protéiques des T2ECs transfectées avec le pCRNCM-OSC.FLAG.5' (absente dans la condition pCRNCM-vide). En

revanche, l'OSC.FLAG n'est pas visible dans la condition pT2MIK-OSC.FLAG.5' (Figure 2-8A). Afin de déterminer s'il s'agit d'un problème au niveau de la transcription ou de la traduction, une nouvelle expérience a été réalisée dans les mêmes conditions que celles de l'analyse protéique, à l'exception que les cellules n'ont pas été triées par MACS. En effet, la méthode de qPCR étant plus sensible que le Western blot, ceci n'était pas nécessaire. Le taux d'ARNm du gène *OSC/LSS* a été quantifié par PCR quantitative, avec des amorces dirigées contre la partie codante de ce gène (ne discriminant donc pas les transcrits endogènes et exogènes). Nous avons ainsi observé une augmentation du taux d'ARNm de l'*OSC/LSS* par rapport au vecteur vide, d'environ 5 fois et 8 fois avec les vecteurs pT2MIK-OSC.FLAG.5' et pCRNCM-OSC.FLAG.5', respectivement (Figure 2-8B).



**Figure 2-8 : Détection de l'expression de l'OSC.FLAG par Western blot et par qPCR**

Des T2ECs ont été nucléofectées soit avec pT2MIK-vide (pT2MIK VV), soit avec pT2MIK-OSC.FLAG.5' (pT2MIK OF). De même, des T2ECs ont été nucléofectées soit avec pCRNCM-vide (pCRNCM VV), soit avec pCRNCM-OSC.FLAG.5' (pCRNCM OF).

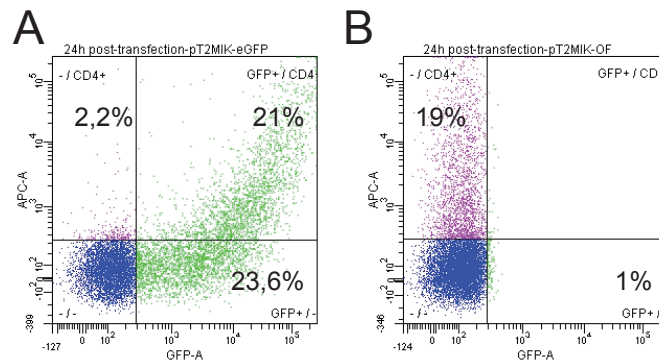
(A) Western blot réalisé à partir de 20 µg de protéines totales extraites à partir des populations de T2ECs correspondant aux quatre conditions. La bande présente dans les 4 conditions correspond à une bande aspécifique de l'anticorps anti-FLAG. La bande correspondante à l'OSC.FLAG, autour de 72 kDa, est signalée par une flèche.

(B) Les ARNm totaux ont été extraits 24 heures après nucléofection. Le taux d'ARNm du gène *OSC/LSS* a ensuite été quantifié par PCR quantitative. Les données graphiques correspondent aux rapports OF/VV après normalisation du taux d'ARNm du gène *OSC* par les gènes standard *eIF5* et *RPS13*.

Le vecteur pT2MIK-OSC.FLAG.5' permet donc la transcription de l'ARNm portant la séquence codante de l'OSC, mais ne permet pas l'expression de la protéine OSC.FLAG. Nous avons donc vérifié si l'absence de celle-ci s'accompagnait également d'une absence du marqueur  $\Delta$ hCD4, porté par le même ARNm bicistronique. Pour vérifier cela, des T2ECs ont été transfectées avec pT2MIK-OSC.FLAG.5'. Les cellules transfectées avec le vecteur pT2MIK-eGFP ont servi de contrôle positif.

Le pourcentage de cellules hCD4<sup>+</sup>, et/ou eGFP<sup>+</sup> a ensuite été mesuré par cytométrie de flux (Figure 2-9).

Nous avons ainsi montré que 23,2 % des cellules nucléofectées avec pT2MIK-eGFP (qui permet l'expression du transgène, rapporté par la eGFP) expriment le marqueur ΔhCD4 (Figure 2-9A). Le vecteur pT2MIK-OSC.FLAG.5' permet lui aussi l'expression de ce marqueur à un taux équivalent (19 %, Figure 2-9B). Ces observations suggèrent donc qu'il existe un problème spécifique à la protéine OSC.FLAG car la deuxième protéine du bicistron – le marqueur ΔhCD4 – est exprimée normalement.



**Figure 2-9 :** Analyse par FACS de l'expression du marqueur ΔhCD4 et/ou de la eGFP.

Des T2ECs ayant été nucléofectées avec le vecteur pT2MIK-eGFP (A), ou pT2MIK-OSC.FLAG.5' (B), ont été marquées par l'anticorps anti-hCD4 couplé au fluorochrome APC. Le pourcentage de cellules hCD4<sup>+</sup> ainsi que la fluorescence eGFP ont été mesurés par FACS 24 heures après la nucléofection. Le seuil significatif de fluorescence eGFP est fixé de manière à avoir 99 % de la population non transfectée en dessous de ce seuil (d'où le 1 % de cellules eGFP<sup>+</sup> dans la condition B).

### 2.2.2.2.3 Conclusion

Afin de sur-exprimer de façon stable l'OSC/LSS dans les T2ECs, nous avons souhaité utiliser un système d'expression stable basé sur le système Tol2-Transposase d'une part, et le tri magnétique des cellules positives d'autre part. Pour ce faire, nous avons cloné dans le vecteur pT2MIK la séquence correspondant à l'ADNc de l'OSC/LSS aviaire fusionné avec un FLAG. Cependant les tests d'expression avec le vecteur pT2MIK-OSC.FLAG.5' ont montré une absence d'expression de cette protéine, malgré la sur-expression au niveau de l'ARNm. De plus, l'expression du marqueur de surface ΔhCD4 montre qu'il y a bien traduction de cette protéine portée par le même ARNm bicistronique.

Une explication possible de ce résultat serait que c'est la protéine fusion OSC.FLAG elle-même qui est défectueuse. Pourtant cette construction a été clonée directement à partir du vecteur pCRNCM-OSC.FLAG.5', qui

permet l'expression de cette protéine. La séquence codante de l'OSC.FLAG, ainsi que les zones de la jonction avec le vecteur ont été séquencées après clonage, permettant de confirmer qu'il n'y a pas eu de mutations ou un problème au niveau de la construction. De plus, le vecteur pT2MIK permet l'expression de la protéine eGFP, ainsi que de la protéine RPS3A, clonée dans le cadre d'un autre projet de l'équipe par Sandrine Giraud et Anh-Thu Lefebvre (expression validée par Western blot). Cela signifie donc que le problème n'est pas dû au vecteur pT2MIK lui-même.

Au vu des problèmes techniques mentionnés ci-dessus, nous avons malheureusement été obligés d'abandonner la stratégie d'une expression stable de l'OSC/LSS dans les T2ECs pour étudier l'effet de sa sur-expression.

### *2.2.3 Publication : OSC, Synthèse du Cholestérol et Contrôle de l'Autorenouvellement*

## **Cholesterol synthesis, modulated by oxidosqualene cyclase gene expression, maintains self-renewal in primary erythroid progenitors**

**Camila Mejia-Pous<sup>1</sup>, Francesca Damiola<sup>1</sup>, Olivier Gandrillon<sup>§,1</sup>**

<sup>1</sup>"Bases Moléculaires de l'Autorenouvellement et de ses Altérations" Group, Université de Lyon, F-69622, Université Lyon 1, Villeurbanne, CNRS, UMR5534, Centre de Génétique Moléculaire et Cellulaire, Lyon, France

<sup>§</sup>Corresponding author (Address: CGMC B.Mendel 16 rue Dubois 69622 Villeurbanne cedex – Phone: +33 (0)4.72.44.81.90 – Fax : +33 (0)4.72.43.26.85 – [olivier.gandrillon@univ-lyon1.fr](mailto:olivier.gandrillon@univ-lyon1.fr))

Email addresses:

CMP: [camila.pous@univ-lyon1.fr](mailto:camila.pous@univ-lyon1.fr)

FD: [damiolaf@fellows.iarc.fr](mailto:damiolaf@fellows.iarc.fr)

OG: [olivier.gandrillon@univ-lyon1.fr](mailto:olivier.gandrillon@univ-lyon1.fr)

## Abstract

### Background

The stem cell concept is sustained by the self-renewal property, which implies the ability of a cell to proliferate without losing its developmental potential and without entering into differentiation processes. However, molecular mechanisms that control cell fate choices involving self-renewal are still poorly understood. A previous transcriptomic study, carried out in primary avian erythroid progenitors (named T2ECs), revealed that the gene encoding oxidosqualene cyclase (OSC/LSS), an enzyme involved in cholesterol synthesis, is significantly up-regulated by self-renewing cells.

### Results

In order to investigate OSC function, we studied the effect of its enzymatic activity inhibition, its gene knockdown and its over-expression. Our data show that OSC acts both by protecting self-renewing cells from apoptosis and by blocking their differentiation program, demonstrating that OSC is required to maintain self-renewal in T2ECs. The similar effects observed with two other inhibitors of the cholesterol synthesis pathway indicate that OSC involvement in the maintenance of self-renewal relies on its cholesterol synthesis-related function. This is reinforced by addition of exogenous cholesterol experiments, which show that cholesterol has a positive effect on self-renewal and impairs a proper commitment to differentiation.

### Conclusion

Taken together, our results suggest that *de novo* cholesterol synthesis, modulated by *OSC/LSS* expression, is involved in the self-renewal *vs.* differentiation/apoptosis decision making, by keeping cells in a self-renewal state.



## Background

The stem cell concept is sustained by the self-renewal property, which implies the ability of a cell to proliferate without losing its developmental potential and without entering into differentiation processes [1]. Despite the discovery of some molecular signatures of stem cells [2, 3], the molecular mechanisms responsible for the choice between self-renewal and differentiation are still poorly understood.

In the hematopoietic system, the self-renewal property was initially thought to be restricted to the hematopoietic stem cells (HSC), which can generate all the blood lineages [1]. However, the high number of erythrocytes produced, in either physiological [4] or pathological [5] conditions, cannot be sustained by HSC self-renewal only. It was, therefore, proposed that less immature progenitors can also self-renew [6-9], which led to the use of these progenitors in studying the molecular basis of self-renewal. Since the balance between cell gain (self-renewal) and cell loss (apoptosis and differentiation) governs the size of the progenitors compartment, this balance is critical for maintenance of the hematopoietic system homeostasis and, consequently, it is tightly regulated. The mechanisms regulating this decision-making can be investigated more in detail by studying self-renewal in primary progenitors, which are less complex and more accessible than HSC. In our study we used immature avian erythroid progenitor cells, called T2ECs, obtained directly from chicken bone marrow. T2ECs are normal and non-immortalized *ex-vivo* cells that can be grown in an undifferentiated state and their differentiation into mature erythrocytes can be induced, at any time, through a combination of external factors [7]. Additionally, their differentiation potential is restricted to the erythrocyte lineage, so fate choice mechanisms (i.e. self-renewal vs. differentiation) are not blurred by the mechanisms involved in lineage choices.

In order to characterize the molecular mechanisms underlying the choice between self-renewal and differentiation, the transcriptome of T2ECs in a self-renewal state and at the beginning of the differentiation process was analyzed [10]. We identified nine candidate genes potentially involved in the control of the T2ECs fate decision-making. Among them, the *OSC/LSS* gene, encoding oxidosqualene cyclase/lanosterol synthase, is the most significantly up-regulated gene in the self-renewing cells, as compared to the differentiating cells. However, why and how this up-regulation is involved in the maintenance of the self-renewal state is still not understood and is the subject of this present work.

OSC/LSS (EC: 5.4.99.7) catalyzes the cyclization of monoepoxysqualene to lanosterol, which is the first sterol in cholesterol biosynthesis [11]. In addition, OSC also catalyses the cyclization of diepoxysqualene to epoxycholesterol, an intermediate of the synthesis pathway of 24(S),25-epoxycholesterol, which is a natural ligand of the liver X receptor (LXR), a nuclear receptor [12]. Cholesterol is a key cellular element with both structural and functional roles. In particular, the fluidity and mechanical stability of the cell membrane depends on the cholesterol content. Furthermore, cholesterol is also involved in intracellular signalling. Indeed, it is essential for maintaining the low fluidity that characterizes lipid rafts [13], which are considered as signalling platforms [14, 15]. In addition, a cholesterol-mediated post-translational modification of Hedgehog proteins [16], allows a proper transduction of Hedgehog signalling [17], which is thought to be involved in the regulation of adult stem cells maintenance [18].

In this study, we demonstrate that OSC plays a key role in the cell fate choice of immature erythroid progenitors. Our data show that OSC expression and cholesterol synthesis are

indeed necessary to maintain the self-renewal state by 1) protecting those cells from apoptosis and by 2) blocking the differentiation program.

## Results

### OSC expression and activity are mandatory for the erythroid progenitors growth in self-renewal state

In order to determine the *OSC/LSS* function in self-renewal, we first studied the effect of OSC enzymatic activity inhibition using the chemical inhibitor Ro48-8071. The addition of Ro48-8071 to self-renewing T2ECs induced a decrease in cell number, detectable at the beginning of the treatment and becoming significant on the fourth day after inhibitor addition, when the treated population showed a reduction in cell number of about 40% compared to the untreated control (**Figure 1A**:  $1.0 \times 10^6 \pm 0.2$  and  $1.7 \times 10^6 \pm 0.4$ , respectively). This effect was amplified with time and, after seven days of treatment, the cell number in the Ro48-8071-treated population was four times lower than in the control group (**Figure 1A**). Since OSC, and in particular its active site, is extremely well conserved between several species, we hypothesized that Ro48-8071 inhibits avian OSC as well as human or rodent OSC [19, 20]. However, to confirm that the observed effects were strictly the consequence of OSC inhibition, we used two different shRNAs, targeting two distinct regions of *OSC/LSS* mRNA (shOSC.1 and shOSC.5), which specifically down-regulate the gene at the mRNA level (**Figure 1B-a**). The observed effects were even more striking than those observed after OSC activity inhibition. Indeed, from the first day after transfection, T2ECs expressing either the shOSC.1 or the shOSC.5 already presented growth impairment, and three days after transfection, there were only about 15 % of cells left in the shRNA-expressing cell populations compared to the control group (**Figure 1B-b**). As expected, a control shRNA that targets the exogenous Luciferase mRNA (shLuc.2) no effect on either *OSC/LSS* expression or cell growth, compared to the effect observed with shOSC.1 and shOSC.5 (**Figure 1B-a** and **Figure 1B-c**). Since shRNA-mediated *OSC/LSS* knockdown and OSC enzymatic activity inhibition mediated by Ro48-8071 had a similar effect on the growth of self-renewing progenitors, we can infer that the effects are specifically induced by OSC inhibition.

We then tested the effect of OSC inhibition on T2ECs after these cells have been induced to differentiate (**Figure 3**). It is important to note that, during differentiation, T2ECs still actively proliferate and even present a slight acceleration in the cell cycle [7]. Remarkably, in differentiating conditions, the survival of T2ECs no longer depends on OSC activity since the treatment with Ro48-8071, even at extremely high doses, had absolutely no effect on their proliferation (**Figure 3A, right**). By contrast, the same doses induced a dramatic effect in a self-renewing population (**Figure 3A, left**). This specific effect on self-renewing cells was confirmed by a cell count after a three-day treatment period (**Figure 3B**). Additionally, we confirmed that during differentiation, even in the presence of Ro48-8071, the percentage of T2ECs expressing JS4 and MEP17, respectively maturity and immaturity differentiation markers, at their surface evolved according to normal differentiation kinetics (**Figure 3C**). This was further confirmed by a benzidine staining experiment: the differentiation rate, evaluated by haemoglobin (an intracellular maturity marker) staining, was not affected by the inhibitor treatment (data not shown). Thus, once cells have undergone differentiation, the inhibition of OSC activity has no effect, neither on cell survival nor on the differentiation process itself.

These observations therefore demonstrate that OSC activity is crucial for self-renewal and suggest that this reliance is actually restricted to the self-renewal process alone and does not result from a general impairment of cell growth.

### OSC controls the balance between self-renewal and differentiation/apoptosis

Since OSC inhibition was seen to decrease cell growth, we studied both the cell cycle and apoptosis to determine the causes of this effect. Firstly, to monitor the population throughout the cell divisions, T2ECs were stained with CFSE. No difference was observed between Ro48-8071-treated and untreated cells on the transition time through the cell cycle and the treatment did not result in the emergence of a quiescent population (**Figure 4A**). This was confirmed by a more detailed cell cycle analysis by DNA staining, which showed no impact of the Ro48-8071 treatment on the mitotic phases (G2/M or S, **Figure 4B**). In contrast, OSC inhibition led to a significant decrease in the percentage of cells in G0/G1 phases, due to an inversely proportional increase in cell percentage in the SubG1 fraction (**Figure 4B**). SubG1 fraction is often associated to apoptotic cells. To confirm that the augmentation of cell proportion in this fraction results from an increase of apoptotic cells, the apoptosis rate was measured by a TUNEL assay, which clearly showed an increment of apoptotic cell percentage of about 50 % (**Figure 4C**).

*OSC/LSS* expression is down-regulated during differentiation from the very first hours after differentiation induction (**Figure 5A**). Since this down-regulation takes place particularly early, at a crucial moment of differentiation, we sought to determine whether it is upstream (as a necessary step) or downstream (as a consequence of the fact that cells no longer need OSC activity) of the commitment to differentiate. In self-renewing conditions, the proportion of cells expressing the maturity marker JS4, in a culture treated with Ro48-8071, was almost four times higher compared to the controls, whereas the proportion of cells expressing the immaturity marker was halved (**Figure 5B**). The inhibition of OSC activity thus led to a clear increase in spontaneous differentiation from self-renewing cells. Interestingly, this observation was confirmed by *OSC/LSS* knockdown, which resulted in the up-regulation of the globin $\beta^A$  gene (**Additional File 1**). Inversely, the transient OSC over-expression led to a decrease in the proportion of differentiating cells, as demonstrated by the decrease (-15%) in the percentage of cells expressing maturity markers and by the increase (+13%) in those expressing immaturity markers (**Figure 5C**). It is notable that, whereas the effect of inhibition on spontaneous differentiation is striking, the OSC over-expression effect remains relatively modest. This might be related to our transient transfection conditions.

Our data demonstrate that, in self-renewing conditions, the decrease in cell number induced by OSC inhibition is accompanied by an increase in the apoptosis rate and an induction of spontaneous differentiation. On the other hand, inducing differentiation while over-expressing *OSC/LSS* impairs the commitment into differentiation. Therefore, we propose that, in physiological conditions, OSC activity is involved in the self-renewal vs. differentiation/apoptosis switch by preventing both apoptosis and differentiation of self-renewing cells.

### OSC involvement in self-renewal maintenance relies on its function in the cholesterol synthesis pathway

Since OSC is an enzyme of the cholesterol synthesis pathway, we wanted to determine whether it is the cholesterol itself that is involved in the maintenance of T2ECs self-renewal or if this role is sustained by an alternative OSC function. We first studied the effect of two additional inhibitors, which act on the cholesterol synthesis pathway either upstream

(Simvastatin) or downstream (AY-9944) of OSC. We observed a remarkable similarity of the dose-dependent effects between the two cholesterol synthesis pathway inhibitors and the specific OSC inhibitor Ro48-8071 (compare **Figure 6A** and **Figure 6B** to **Figure 3A, left**). Moreover, for all three inhibitors, addition of exogenous cholesterol to the culture medium reverses their negative effect on cell growth (**Figure 6C**) and cell number (data not shown). Since these observations suggest that OSC-dependent self-renewal maintenance is essentially due to its role in cholesterol synthesis, we decided to examine the effect of the cholesterol itself on T2ECs self-renewing abilities. After three days of treatment with exogenous cholesterol, we observed a positive effect on cell growth: the cell number in cholesterol-treated cultures was about 20 % higher than in untreated control cultures (**Figure 8A**). Furthermore, a T2ECs population induced to differentiate in the presence of cholesterol contained about one third less cells expressing the maturity marker JS4, compared to a population induced to differentiate without the addition of exogenous cholesterol, suggesting a negative effect of cholesterol addition on the ability of T2ECs to differentiate (**Figure 8B**).

Taken together, our results are consistent with the hypothesis that *OSC/LSS* expression, *via* cholesterol biosynthesis, plays a physiological role in the balance between self-renewal and differentiation/apoptosis (**Figure 9**, discussed below).

## Discussion

### OSC controls the cell fate decision-making

T2ECs are primary erythroid progenitors, capable of self-renewal without any obvious differentiation and without losing their differentiation potential. Therefore, it is a model perfectly suited for studying the molecular mechanisms controlling the choice between self-renewal and differentiation *ex vivo* [7, 10, 21-24]. Global transcription analysis resulted in a list of candidate genes potentially involved in the mechanisms that control this choice. Among them, *OSC/LSS* encoding oxidosqualene cyclase/lanosterol synthase was the most significantly up-regulated gene in self-renewing cells [10].

Firstly, to confirm that self-renewal-associated *OSC* up-regulation is necessary for the maintenance of this state, we studied the effect of its down-regulation in self-renewing T2ECs. Our results show that *OSC* activity and expression are crucial to maintain primary immature erythroid progenitors in a self-renewal state, and that its down-regulation triggers the exit from this state towards either differentiation or apoptosis. Therefore, also considering that *OSC/LSS* differentiation-driven down-regulation takes place particularly early, we propose that *OSC* is involved in the self-renewal/differentiation switch (**Figure 9**). Rather than a three-possibilities choice (i.e., self-renewal *vs.* differentiation *vs.* apoptosis), a much more parsimonious view state that cell fate choice would rely on a “to exit or not to exit” decision, which leads cells either to stay in a self-renewal state or to leave the self-renewal compartment and enter into a commitment phase [25]. Once committed, cell fate depends on the presence or absence of external survival factors. Indeed, it has been reported that external factors, such as erythropoietin, are required for terminal erythroid differentiation mainly because they protect differentiating cells from apoptosis [26, 27], but are not required for commitment into the erythroid lineage [28, 29].

The importance of *OSC/LSS* in this model is highlighted by the induction of spontaneous differentiation from self-renewing T2ECs, observed in *OSC* enzymatic inhibition and shRNA-mediated knockdown experiments. Indeed, what we observed could actually be the result of an initial differentiation that, in the absence of specific survival factors, results in a commitment-dependent cell death by apoptosis. On the other hand, the symmetric experiment shows that *OSC/LSS* down-regulation is required for proper commitment. Thus *OSC* activity, by preventing inappropriate commitment in self-renewing conditions, blocks the resulting commitment-dependent apoptosis when the conditions required for final differentiation are not present [30]. Interestingly, it has been reported that the thyroid hormone (TH), which is involved in the self-renewal/differentiation switch of erythroid progenitors [25, 31], down-regulates cholesterol synthesis through transcriptional repression of *OSC/LSS* expression *via* the YY1/HDAC3 complex [32-34]. Therefore, external signals can induce *OSC/LSS* down-regulation, which subsequently triggers commitment. This hypothesis is sustained by our own results, which demonstrate that *OSC* down-regulation is necessary, and sufficient in itself, to trigger commitment.

### Cholesterol homeostasis, regulated by *OSC*, is involved in cell fate choice

We report here that two other inhibitors of the cholesterol biosynthesis pathway reproduced the effects of *OSC* inhibition, with reversal by cholesterol addition. Furthermore, we demonstrated that the presence of exogenous cholesterol in a self-renewing T2ECs culture

improved cell growth. Taken together, these results demonstrate that OSC involvement in the maintenance of self-renewal relies on its function in *de novo* cholesterol synthesis (**Figure 9**). In agreement with our results, an increased cholesterol requirement by proliferating erythroid cells was recently proposed [35]. On the other hand, our data demonstrate that, during transition from self-renewal to differentiation, decreasing cellular cholesterol rate is a mandatory step, explaining the decrease of membrane cholesterol levels observed during erythroid differentiation [36].

It has been previously reported that hypercholesterolemia resulted on a blockage of erythroid differentiation, most likely explained by a markedly increase in the membrane cholesterol content of erythroid cell membranes [37]. Cholesterol can be taken up from lipoproteins in the circulation, but cells of most organs and tissues can also satisfy their requirements for cholesterol *via* endogenous *de novo* cholesterol biosynthesis [38]. All those studies agree well with our present study in pointing out the importance of cholesterol in cell fate choice. Nevertheless, in contrast with those previous studies, our results demonstrate that cholesterol homeostasis, and hence cellular fate, can also be regulated in a cell-autonomous way *via* the cholesterol synthesis pathway and precisely *OSC/LSS* expression,

Recently, it has been reported that a new cholesterol-binding protein, TSPO2, is involved in the redistribution of cholesterol, which seems important for nucleus expulsion during erythrocyte maturation [39]. Our results show that cholesterol down-regulation is also involved earlier, in the self-renewal/differentiation switch. Besides, consistent with our own results, the authors show that the cholesterol biosynthetic pathway is down-regulated during erythroid differentiation, before even TSPO2 expression is detectable, and notably, that OSC is the first down-regulated enzyme of the pathway [39].

Since HMG-CoA-Reductase is the rate-limiting enzyme of the cholesterol synthesis cascade, it could be expected that cholesterol synthesis would be exclusively regulated at the HMG-CoA-Reductase level. However, in agreement with our *OSC/LSS* knockdown experiments, recent studies [32, 40] reported a cause-and-effect relationship between *OSC/LSS* expression and cholesterol synthesis regulation, and it has been proposed that its down-regulation may constitute a novel mechanism involved in the control of cholesterol metabolism. Dang *et al.* [40] provided evidence of the existence of a negative feedback, which directly targets *OSC/LSS*, aimed at decreasing the cholesterol level in hypercholesterolemic pathological conditions. In addition to cholesterol synthesis, OSC is also involved in the synthesis pathway of 24(S),25-epoxycholesterol, a natural LXR ligand. Once activated, LXR regulates the expression of several genes involved in the regulation of cellular lipid metabolism, including the cellular efflux of cholesterol [12]. Because of the unique position occupied by OSC in both synthesis pathways, this feedback probably involves a dual mechanism of action: decreased cholesterol synthesis and increased 24(S),25-epoxycholesterol synthesis [41, 42].

## Cholesterol-dependent self-renewal pathways

### Cholesterol and Hedgehog signalling

Hedgehog signalling is required for the expansion of erythroid progenitor colonies in stress and normal adult erythropoiesis [43-45]. Additionally, it has been shown that in the absence of Hedgehog signalling erythroid progenitors differentiate prematurely [46]. Since Hedgehog signalling sustains self-renewal in erythroid progenitors, its attenuation could therefore be a mandatory step, prior to commitment. In agreement with this, T2ECs transcriptome analysis confirmed that Sonic Hedgehog mRNA is present exclusively in self-renewing conditions, but absent in differentiating conditions (SQUAT database query [47]). On the other hand, it has

been previously demonstrated that cholesterol deprivation results in an impairment of Hedgehog maturation, thereby preventing the activation of Hedgehog signalling pathway [48]. Interestingly, AY-9944, a cholesterol inhibitor also used in our study, blocks Hedgehog signalling response, and exogenous cholesterol restores this response [49]. Therefore, the Hedgehog signalling pathway could be controlled by the modulation of cellular cholesterol, which is required for Hedgehog post-translational maturation. Coherently with this hypothesis, cyclopamine, a Hedgehog pathway inhibitor [50], has a negative dose-dependent effect on T2ECs self-renewal, with reversal by cholesterol addition (our own unpublished data). However, because of the structural similarity between cyclopamine and cholesterol, it is difficult to determine whether or not this molecule interferes with cholesterol metabolism [51]. Therefore, a detailed dissection of the hedgehog pathway, with a functional genetics approach, would be required before arguing that this signalling pathway is mandatory for T2ECs self-renewal and its cholesterol dependence.

#### **OSC, cholesterol and lipid-rafts**

Cell cholesterol availability regulates number and/or composition of lipid rafts, thereby controlling the cell responsiveness to its environment [17]. Moreover, several reports document the link between cholesterol homeostasis and two signalling pathways that have been identified as crucial in T2ECs self-renewal and subsequently confirmed in other cellular models and organisms: the Ras/Raf/MEK/ERK [7, 23, 52-56] and the TGF $\beta$  [7, 24, 57-59] signalling pathways.

Additionally, like many genes encoding enzymes implicated in cholesterol synthesis, *OSC/LSS* expression is regulated by the transcription factor SREBP-2, which, according to our SAGE data [47], is also up-regulated in T2ECs in self-renewal state, compared to differentiation. There is increasing evidence suggesting that SREBPs can be regulated by extracellular stimuli and, in particular, by the above mentioned pathways. ARC105, a key modulator of TGF $\beta$  signalling [60] has been demonstrated to be involved in cellular cholesterol homeostasis [61]. It has also been demonstrated *in vitro* and *in vivo* that SREBP-2 transcriptional activity is regulated by ERK1/2-dependent phosphorylation [62-64]. These data therefore suggest that *OSC/LSS* expression can be controlled *via* SREBP-2 by the self-renewal-associated signalling, and, reciprocally, can modulate self-renewal signalling pathways *via* raft composition.

#### **OSC: the first step in cholesterol decrease**

In the light of our own data establishing a central role for OSC in the decision-making process, and of all the previously discussed literature establishing the web of interactions encompassing OSC, we can speculate about the following sequential mechanism, involving a negative feedback aiming to down-regulate cell cholesterol rate and first targeting *OSC/LSS* expression. External signals (e.g., TH) would directly trigger *OSC/LSS* down-regulation, leading to a first *OSC/LSS*-dependent decrease in cholesterol levels, a reduction which then would modify Hedgehog signalling and/or the lipids rafts content and affect the self-renewal signalling pathways. The decrease in the transduction of self-renewal signals would lead to a concomitant down-regulation of SREBPs activity and, hence, to a global down-regulation of the cholesterol synthesis pathway, amplifying the negative feedback loop triggered by the initial *OSC/LSS* down-regulation. This would then induce cells to exit the self-renewal state and to enter into the commitment process. The generality of this mechanism for self-renewal exit decision-making will require similar studies to be performed on other model systems.



## Conclusion

We have demonstrated that OSC expression and activity are essential for maintaining self-renewal in primary erythroid progenitors and that its inhibition is sufficient and necessary to induce differentiation. We therefore conclude that OSC activity prevents cells from entering into the commitment process, and that its down-regulation is required for a proper progression through the early stages of differentiation. Moreover, our results are consistent with the hypothesis that the *de novo* cholesterol synthesis, modulated by *OSC/LSS* expression, plays a physiological role in the self-renewal vs. differentiation/apoptosis decision making by keeping cells in the self-renewal state. Further clarification of the mechanism underlying the precise action of cholesterol, and its relationship with intracellular cell signalling, may provide valuable information that would help in understanding cell self-renewal.

## Methods

### Primary cell culture & Treatments

#### T2ECs isolation

T2ECs were generated from SPAFAS white leghorn chickens (PA12 line from INRA, Tours, France) and expanded as previously described [7].

#### Self-renewal and differentiation conditions

T2ECs were maintained in the self-renewal state in LMI medium, as described [7]. Differentiating cells were obtained by changing the T2ECs culture medium from the LMI to the DM17 medium as previously described [7].

#### Cell culture reagents & treatments

Ro48-8071 was a gift from Dr Johannes D. Aebi (Pharmaceuticals Division, F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland). In order to determine the appropriate Ro48-8071 dose, an initial dose-response test was carried out (data not shown). Based on the IC<sub>50</sub> (5.7 nM, information provided by Dr. Johannes D. Aebi), three doses were tested: IC<sub>50</sub>, 3xIC<sub>50</sub> and 10xIC<sub>50</sub>. Although an effect was observed with the IC<sub>50</sub> dose, the intermediary 3xIC<sub>50</sub> (i.e., 17.1 nM) was used for most of the experiments. Simvastatin, AY-9944 and cholesterol were all purchased from Sigma-Aldrich (Buchs, Switzerland) as powders, which were resuspended according to the manufacturer's instructions.

Drugs or cholesterol were added directly to the cell culture medium at the concentrations and for the time periods indicated. The untreated control population was treated with an equal volume of the molecule solvent or vehicle (i.e., DMSO for Ro48-8071, Simvastatin and AY-9944 and ethanol for the cholesterol).

#### Cell population size and growth measurement

Cell population size was determined either by counting living cells (negatives to the Trypan blue coloration) with the Mallassez cell method or by estimating the number of cells by a WST-1 assay (Cell Proliferation Reagent WST-1, Roche Applied Science, Mannheim, Germany), as previously described [23].

#### Cell cycle analysis

##### Cell division monitoring by CFSE staining

$5 \cdot 10^6$  cells were incubated for 15 minutes at 37°C with the CFSE (CellTrace CFSE Cell Proliferation Kit for flow cytometry, Molecular Probes, Eugene, OR USA), according to the manufacturer's instructions, with the following modifications: cells were incubated with 5 μM of CFSE in the culture medium instead of PBS, 0.1% BSA. Cells were then seeded at  $5 \cdot 10^5$  cells/ml, as described above. Fluorescence was measured from a culture aliquot every day by flow cytometry and cultures were diluted every 2-3 days according to the cell density.

##### Cell cycle analysis by Propidium Iodide (PI) staining

For each condition,  $2 \cdot 10^6$  cells were washed in PBS and fixed in cold PBS, ethanol 2:3 with an incubation period of 30 minutes on ice. Cells were then harvested, resuspended in PBS-RNase (1 mg/ml) and incubated for 30 minutes at 37°C prior to being stained with the Propidium Iodide (Sigma-Aldrich) solution (15 minutes, 50 μg/ml in PBS). Fluorescence was then measured by flow cytometry.

**Apoptosis rate measurement by TUNEL Assay**

The rate of apoptosis was determined by the TUNEL assay (*In Situ* Cell Death Detection Kit, TMR red, Roche Applied Science).  $10^6$  cells were labelled, according to the manufacture's instructions, and fluorescence was measured by flow cytometry.

**Cell surface antigens detection by Immunofluorescent labelling**

$10^5$  to  $5.10^5$  cells were labelled with the primary antibodies (MEP17 1:100; JS4 1:50), as previously described [23], and fluorescence was measured by flow cytometry.

**Flow cytometry analysis**

Fluorescence data acquisition was carried out using either a FACScalibur or a FACSCantoII flow cytometer. Data analysis was performed using the CELLQuest software (data from the FACScalibur) or Diva software (data from the FACSCantoII). Cytometers and software were all purchased from Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, NJ, USA). Overlay figures were made using the FlowJo software v8.8.6 (<http://www.flowjo.com>). The positive fluorescence threshold is fixed in order to have 99% of the negative control cells below this threshold.

**Plasmid constructs****pSilencer-shRNA constructs**

The sequences used to construct short hairpin RNA (shRNA) interference vectors, leading to the pSilencer-shOSC.1, pSilencer-shOSC.5 and pSilencer-shLuc.2 vectors, were designed from chicken OSC (NM 001006514) and firefly luciferase (AY633557) cDNA sequences using the Whitehead software (<http://jura.wi.mit.edu/bioc/siRNAext/home.php>). Double strain fragments containing these targeting sequences were synthesized and are identified as follows (underlined: targeting sequence):

shOSC.1:

5'GCGGGCCCGAGCCATCAGCGAGCTGTATTCAAGAGATACAGCTCCGTGATGGCTCTTTTTTGAATTCG3'

shOSC.5:

5'GCGGGCCCGTATCAGCATACTCCGATTTCAGAGAATCGGACCAATGCTGATACTTTTTTGAATTCG3'

shLuc.2:

5'GCGGGCCCGGTTAATCTTAGAGGCGATTCAAGAGATCGCCTCTTTGATTAAACGCTTTTTTGAATTCG3'

Fragments containing the shRNA coding sequences were cloned in *Apal/EcoRI* into the pSilencer\_1.0-U6 vector (Ambion, Austin, TX USA).

**pCRNCM-OSC.FLAG.5'**

The double strain fragment corresponding to the FLAG sequence was synthesized and is identified as follows:

Flag.S:

5'CCGGAATTCTTTGTCGACATGGACTACAAGGACGACGACAAGTATCGATGATAATCTAGACTAG3'

The fragment containing the FLAG sequence was cloned in *EcoRI/XbaI* into the pCRNCM [65]. The *OSC/LSS* coding sequence was amplified, by PCR, from the plasmid DNA containing chicken *OSC/LSS* cDNA (a kind gift of Jean Marie Buerstedde [66]). For information about the PCR conditions and primers used, please contact the authors. The fragment obtained by PCR was then cloned in *Clal/XbaI* into the pCRNCM.FLAG (with the FLAG in the OSC coding sequence 5' extremity).

**pMACS.4.1**

Vector purchased from Mitenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany) and previously described [67].

**Cell Transfection and sorting**

Transient transfections were performed by the nucleofection method (Amaxa Technology, Lonza Cologne, Cologne, Germany), as previously described [68], with the following modification: cells were transfected with 10 µg of DNA (7 µg of pCRNCM or pSilencer constructs + 3 µg of pMACS.4.1). To increase the Magnetic Cell Sorting (MACS) efficiency, dead cells and fragments were removed before each MACS assay, as previously described [68]. Transfected cells were then magnetically sorted using the MACSelect - Transfected Cell Selection System (Mitenyi Biotec).

**Real-Time PCR**

Total RNA extraction was performed using the RNA (Plus) Mini Kit (QIAGEN, Germantown, MD USA), according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription assays were performed as previously described [10]. cDNAs were incubated overnight at -20°C (70 % ethanol, 500mM NaCl), precipitated by centrifugation at 16000 g at 4°C, washed with 70 % ethanol and resuspended in 5 times the RT reaction volume. Real-time PCR (RT-PCR) was performed with a LightCycler system, using the LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (both from Roche Applied Science), for *OSC/LSS* expression during differentiation and the MX3000P system (Stratagene, Cedar Creek, TX USA), using the kit LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche Applied Science), for the quantification of *OSC/LSS* and the *GB-β<sup>4</sup>* expression in shRNA experiments. RT-PCR reactions were performed according to the manufacturer's instructions, using 1/20<sup>th</sup> or 1/40<sup>th</sup> of the RT reaction product as template. For information about the specific PCR conditions, standard genes and primer sequences used, please contact the authors. The relative quantification, with respect to the control conditions, for each gene was performed using a previously published mathematical method [69].

**Western blot analysis**

Cells were lysed in PBS supplemented with phosphatase inhibitor cocktail 2 (Sigma-Aldrich) and a complete mini EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche Applied Science). Protein concentration was determined by using the DC Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA USA). Western Blot was performed, as described by [21], with the following modification : a PVDF membrane was used for transfer instead of nitrocellulose. Membranes were probed with the anti-FLAG M2 primary antibody (SIGMA), diluted to 1/10000 in TBST, 2% BSA, at 4°C overnight and for 2 hours at room temperature with HRP-conjugated secondary anti-mouse IgG antibody (Rockland, Philadelphia, PA USA) diluted to 1/10000 in TBST, 2% BSA. Detection was performed with the ECL plus Western blotting system (Amersham Pharmacia Biotech, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, United Kingdom) according to the manufacturer's instructions.

**Statistical Analysis**

In order to determine whether performing a parametric test was possible or not, the homoscedasticity of the distribution (homogeneity of variance) was tested with a Fischer test.

In our case, as values were homoscedastic for all the comparisons, a Student test (t-test) was performed.

## List of Abbreviations

HSC, hematopoietic stem cell; LSS, lanosterol synthase; LXR, liver X receptor; OSC, oxidosqualene; T2ECs, TGF $\alpha$ /TGF $\beta$ -induced erythrocytic cells.

## Authors' contributions

CMP: conception and design, collection and assembly of data, data analysis and interpretation, manuscript writing; FD: Collection of preliminary data, final approval of manuscript; OG: conception and design, financial support, administrative support, final approval of manuscript.

## Acknowledgments

We are grateful to Dr Johannes D. Aebi for kindly providing the Ro48-8071 inhibitor, Corinne Bresson, Sandrine Gonin-Giraud, Claudine Faure and Gaël Leprun for their technical help and Valerie James (JW Business Services Ltd.) for language editing of the manuscript. This work was supported by grants from the LNCC, the CNRS, the UCBL, the Region Rhône Alpes and the ARC. CMP is a PhD fellow from the LNCC and UCBL.

## References

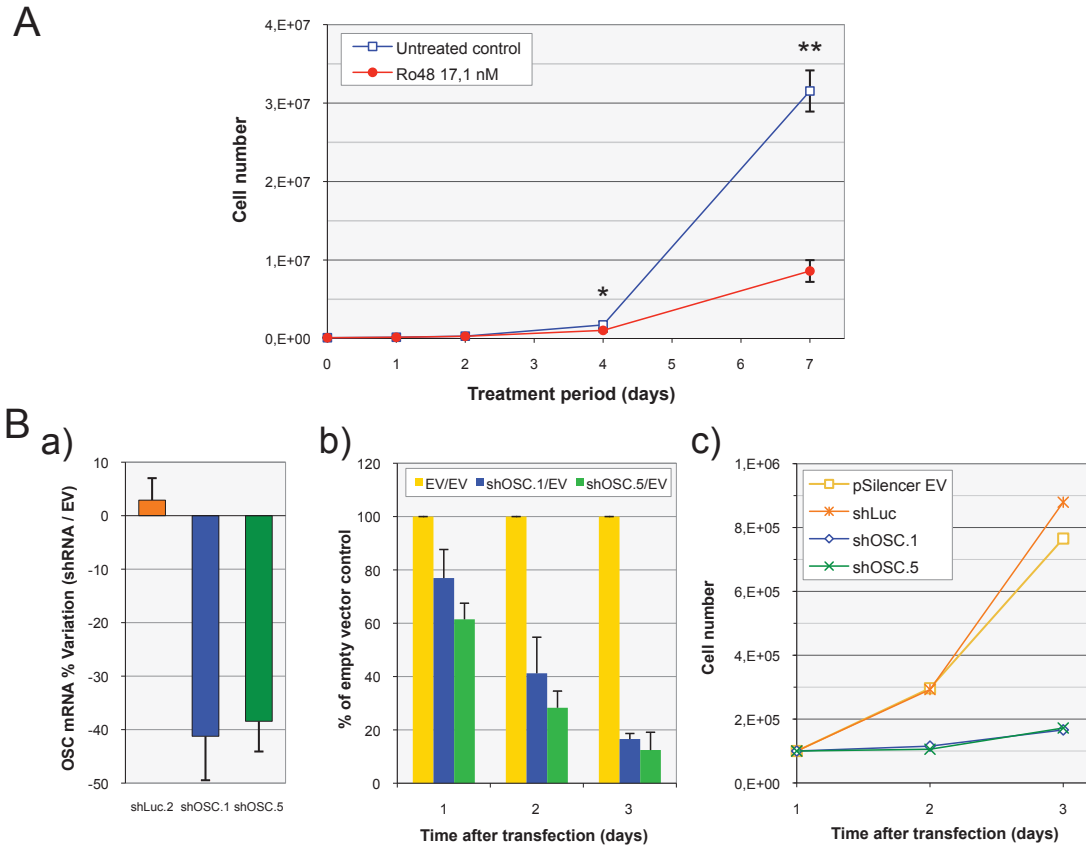
1. Weissman IL: **Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution.** *Cell* 2000, **100**(1):157-168.
2. Ivanova NB, Dimos JT, Schaniel C, Hackney JA, Moore KA, Lemischka IR: **A stem cell molecular signature.** *Science* 2002, **298**(5593):601-604.
3. Ramalho-Santos M, Yoon S, Matsuzaki Y, Mulligan RC, Melton DA: **"Stemness": transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells.** *Science* 2002, **298**(5593):597-600.
4. Hentze MW, Muckenthaler MU, Andrews NC: **Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism.** *Cell* 2004, **117**(3):285-297.
5. Bauer A, Tronche F, Wessely O, Kellendonk C, Reichardt HM, Steinlein P, Schutz G, Beug H: **The glucocorticoid receptor is required for stress erythropoiesis.** *Genes Dev* 1999, **13**(22):2996-3002.
6. Pain B, Woods CM, Saez J, Flickinger T, Raines M, Peyrol S, Moscovici C, Moscovici MG, Kung HJ, Jurdic P *et al*: **EGF-R as a hemopoietic growth factor receptor: the c-erbB product is present in chicken erythrocytic progenitors and controls their self-renewal.** *Cell* 1991, **65**(1):37-46.
7. Gandrillon O, Schmidt U, Beug H, Samarut J: **TGF-beta cooperates with TGF-alpha to induce the self-renewal of normal erythrocytic progenitors: evidence for an autocrine mechanism.** *Embo J* 1999, **18**(10):2764-2781.
8. Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ: **Applying the principles of stem-cell biology to cancer.** *Nature reviews* 2003, **3**(12):895-902.
9. Dolznig H, Grebien F, Deiner EM, Stangl K, Kolbus A, Habermann B, Kerenyi MA, Kieslinger M, Moriggl R, Beug H *et al*: **Erythroid progenitor renewal versus differentiation: genetic evidence for cell autonomous, essential functions of EpoR, Stat5 and the GR.** *Oncogene* 2006, **25**(20):2890-2900.
10. Damiola F, Keime C, Gonin-Giraud S, Dazy S, Gandrillon O: **Global transcription analysis of immature avian erythrocytic progenitors: from self-renewal to differentiation.** *Oncogene* 2004, **23**(46):7628-7643.
11. Huff MW, Telford DE: **Lord of the rings--the mechanism for oxidosqualene:lanosterol cyclase becomes crystal clear.** *Trends Pharmacol Sci* 2005, **26**(7):335-340.
12. Ory DS: **Nuclear receptor signaling in the control of cholesterol homeostasis: have the orphans found a home?** *Circ Res* 2004, **95**(7):660-670.
13. Slotte JP, Bierman EL: **Depletion of plasma-membrane sphingomyelin rapidly alters the distribution of cholesterol between plasma membranes and intracellular cholesterol pools in cultured fibroblasts.** *Biochem J* 1988, **250**(3):653-658.
14. Simons K, Toomre D: **Lipid rafts and signal transduction.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000, **1**(1):31-39.
15. Lingwood D, Simons K: **Lipid rafts as a membrane-organizing principle.** *Science* 2010, **327**(5961):46-50.
16. Porter JA, Ekker SC, Park WJ, von Kessler DP, Young KE, Chen CH, Ma Y, Woods AS, Cotter RJ, Koonin EV *et al*: **Hedgehog patterning activity: role of a lipophilic modification mediated by the carboxy-terminal autoprocessing domain.** *Cell* 1996, **86**(1):21-34.
17. Incardona JP, Eaton S: **Cholesterol in signal transduction.** *Curr Opin Cell Biol* 2000, **12**(2):193-203.
18. Blank U, Karlsson G, Karlsson S: **Signaling pathways governing stem-cell fate.** *Blood* 2008, **111**(2):492-503.
19. Dehmlow H, Aebi JD, Jolidon S, Ji YH, von der Mark EM, Himber J, Morand OH: **Synthesis and structure-activity studies of novel orally active non-terpenoid 2,3-oxidosqualene cyclase inhibitors.** *J Med Chem* 2003, **46**(15):3354-3370.
20. Morand OH, Aebi JD, Dehmlow H, Ji YH, Gains N, Lengsfeld H, Himber J: **Ro 48-8.071, a new 2,3-oxidosqualene:lanosterol cyclase inhibitor lowering plasma cholesterol in hamsters, squirrel monkeys, and minipigs: comparison to simvastatin.** *J Lipid Res* 1997, **38**(2):373-390.
21. Bresson C, Keime C, Faure C, Letrillard Y, Barbado M, Sanfilippo S, Benhra N, Gandrillon O, Gonin-Giraud S: **Large-scale analysis by SAGE reveals new mechanisms of v-erbA oncogene action.** *BMC Genomics* 2007, **8**:390.
22. Bresson-Mazet C, Gandrillon O, Gonin-Giraud S: **Stem cell antigen 2: a new gene involved in the self-renewal of erythroid progenitors.** *Cell proliferation* 2008, **41**(5):726-738.
23. Dazy S, Damiola F, Parisey N, Beug H, Gandrillon O: **The MEK-1/ERKs signalling pathway is differentially involved in the self-renewal of early and late avian erythroid progenitor cells.** *Oncogene* 2003, **22**(58):9205-9216.

24. Gonin-Giraud S, Bresson-Mazet C, Gandrillon O: **Involvement of the TGF-beta and mTOR/p70S6Kinase pathways in the transformation process induced by v-ErbA.** *Leukemia research* 2008, **32**(12):1878-1888.
25. Gandrillon O, Ferrand N, Michaille JJ, Roze L, Zile MH, Samarut J: **c-erbA alpha/T3R and RARs control commitment of hematopoietic self-renewing progenitor cells to apoptosis or differentiation and are antagonized by the v-erbA oncogene.** *Oncogene* 1994, **9**(3):749-758.
26. Koury MJ, Bondurant MC: **Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed death in erythroid progenitor cells.** *Science* 1990, **248**(4953):378-381.
27. Lesault I, Quang CT, Frampton J, Ghysdael J: **Direct regulation of BCL-2 by FLI-1 is involved in the survival of FLI-1-transformed erythroblasts.** *Embo J* 2002, **21**(4):694-703.
28. Dolznig H, Habermann B, Stangl K, Deiner EM, Moriggl R, Beug H, Mullner EW: **Apoptosis protection by the Epo target Bcl-X(L) allows factor-independent differentiation of primary erythroblasts.** *Curr Biol* 2002, **12**(13):1076-1085.
29. Wu H, Liu X, Jaenisch R, Lodish HF: **Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor.** *Cell* 1995, **83**(1):59-67.
30. Christenson E, Merlin S, Saito M, Schlesinger P: **Cholesterol effects on BAX pore activation.** *Journal of molecular biology* 2008, **381**(5):1168-1183.
31. Bauer A, Mikulits W, Lagger G, Stengl G, Brosch G, Beug H: **The thyroid hormone receptor functions as a ligand-operated developmental switch between proliferation and differentiation of erythroid progenitors.** *Embo J* 1998, **17**(15):4291-4303.
32. Villagra A, Ulloa N, Zhang X, Yuan Z, Sotomayor E, Seto E: **Histone deacetylase 3 down-regulates cholesterol synthesis through repression of lanosterol synthase gene expression.** *J Biol Chem* 2007, **282**(49):35457-35470.
33. Ericsson J, Usheva A, Edwards PA: **YY1 is a negative regulator of transcription of three sterol regulatory element-binding protein-responsive genes.** *J Biol Chem* 1999, **274**(20):14508-14513.
34. Ishizuka T, Lazar MA: **The N-CoR/histone deacetylase 3 complex is required for repression by thyroid hormone receptor.** *Mol Cell Biol* 2003, **23**(15):5122-5131.
35. Shalev H, Kapelushnik J, Moser A, Knobler H, Tamary H: **Hypocholesterolemia in chronic anemias with increased erythropoietic activity.** *Am J Hematol* 2007, **82**(3):199-202.
36. Montfoort A, Boere WA: **Cholesterol and phospholipid composition of erythroblasts isolated from mouse spleen after Rauscher leukemia virus infection.** *Lipids* 1978, **13**(9):580-587.
37. Holm TM, Braun A, Trigatti BL, Brugnara C, Sakamoto M, Krieger M, Andrews NC: **Failure of red blood cell maturation in mice with defects in the high-density lipoprotein receptor SR-BI.** *Blood* 2002, **99**(5):1817-1824.
38. Simons K, Ikonen E: **How cells handle cholesterol.** *Science* 2000, **290**(5497):1721-1726.
39. Fan J, Rone MB, Papadopoulos V: **Translocator protein 2 is involved in cholesterol redistribution during erythropoiesis.** *J Biol Chem* 2009, **284**(44):30484-30497.
40. Dang H, Liu Y, Pang W, Li C, Wang N, Shyy JY, Zhu Y: **Suppression of 2,3-oxidosqualene cyclase by high fat diet contributes to liver X receptor-alpha-mediated improvement of hepatic lipid profile.** *J Biol Chem* 2009, **284**(10):6218-6226.
41. Rowe AH, Argmann CA, Edwards JY, Sawyez CG, Morand OH, Hegele RA, Huff MW: **Enhanced synthesis of the oxysterol 24(S),25-epoxycholesterol in macrophages by inhibitors of 2,3-oxidosqualene:lanosterol cyclase: a novel mechanism for the attenuation of foam cell formation.** *Circ Res* 2003, **93**(8):717-725.
42. Wong J, Quinn CM, Gelissen IC, Brown AJ: **Endogenous 24(S),25-epoxycholesterol fine-tunes acute control of cellular cholesterol homeostasis.** *J Biol Chem* 2008, **283**(2):700-707.
43. Cridland SO, Keys JR, Papathanasiou P, Perkins AC: **Indian hedgehog supports definitive erythropoiesis.** *Blood Cells Mol Dis* 2009, **43**(2):149-155.
44. Detmer K, Walker AN, Jenkins TM, Steele TA, Dannawi H: **Erythroid differentiation in vitro is blocked by cyclopamine, an inhibitor of hedgehog signaling.** *Blood Cells Mol Dis* 2000, **26**(4):360-372.
45. Perry JM, Harandi OF, Porayette P, Hegde S, Kannan AK, Paulson RF: **Maintenance of the BMP4-dependent stress erythropoiesis pathway in the murine spleen requires hedgehog signaling.** *Blood* 2009, **113**(4):911-918.
46. Mandal L, Martinez-Agosto JA, Evans CJ, Hartenstein V, Banerjee U: **A Hedgehog- and Antennapedia-dependent niche maintains Drosophila haematopoietic precursors.** *Nature* 2007, **446**(7133):320-324.
47. Leyritz J, Schicklin S, Blachon S, Keime C, Robardet C, Boulicaut JF, Besson J, Pensa RG, Gandrillon O: **SQUAT: A web tool to mine human, murine and avian SAGE data.** *BMC Bioinformatics* 2008, **9**:378.



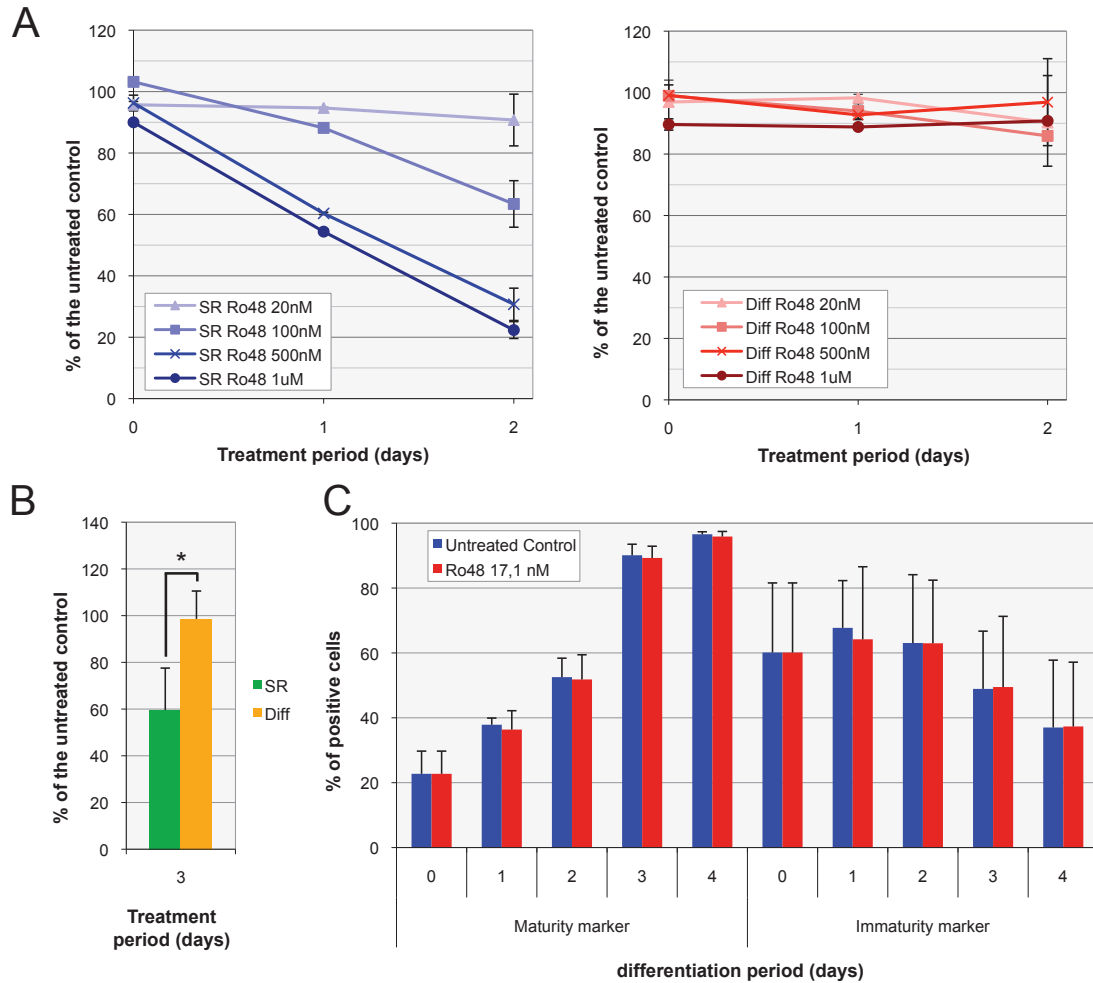
48. Guy RK: **Inhibition of sonic hedgehog autoprocessing in cultured mammalian cells by sterol deprivation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**(13):7307-7312.
49. Incardona JP, Gaffield W, Kapur RP, Roelink H: **The teratogenic Veratrum alkaloid cyclopamine inhibits sonic hedgehog signal transduction.** *Development* 1998, **125**(18):3553-3562.
50. Chen JK, Taipale J, Cooper MK, Beachy PA: **Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothened.** *Genes Dev* 2002, **16**(21):2743-2748.
51. Incardona JP, Gaffield W, Lange Y, Cooney A, Pentchev PG, Liu S, Watson JA, Kapur RP, Roelink H: **Cyclopamine inhibition of Sonic hedgehog signal transduction is not mediated through effects on cholesterol transport.** *Dev Biol* 2000, **224**(2):440-452.
52. Rubiolo C, Piazzolla D, Meissl K, Beug H, Huber JC, Kolbus A, Baccarini M: **A balance between Raf-1 and Fas expression sets the pace of erythroid differentiation.** *Blood* 2006, **108**(1):152-159.
53. Roy S, Luetterforst R, Harding A, Apolloni A, Etheridge M, Stang E, Rolls B, Hancock JF, Parton RG: **Dominant-negative caveolin inhibits H-Ras function by disrupting cholesterol-rich plasma membrane domains.** *Nature cell biology* 1999, **1**(2):98-105.
54. Rizzo MA, Kraft CA, Watkins SC, Levitan ES, Romero G: **Agonist-dependent traffic of raft-associated Ras and Raf-1 is required for activation of the mitogen-activated protein kinase cascade.** *J Biol Chem* 2001, **276**(37):34928-34933.
55. Carey KD, Watson RT, Pessin JE, Stork PJ: **The requirement of specific membrane domains for Raf-1 phosphorylation and activation.** *J Biol Chem* 2003, **278**(5):3185-3196.
56. Matallanas D, Sanz-Moreno V, Arozarena I, Calvo F, Agudo-Ibanez L, Santos E, Berciano MT, Crespo P: **Distinct utilization of effectors and biological outcomes resulting from site-specific Ras activation: Ras functions in lipid rafts and Golgi complex are dispensable for proliferation and transformation.** *Mol Cell Biol* 2006, **26**(1):100-116.
57. Fortunel NO, Hatzfeld A, Hatzfeld JA: **Transforming growth factor-beta: pleiotropic role in the regulation of hematopoiesis.** *Blood* 2000, **96**(6):2022-2036.
58. Zhou X, Johnston TP, Johansson D, Parini P, Funa K, Svensson J, Hansson GK: **Hypercholesterolemia leads to elevated TGF-beta1 activity and T helper 3-dependent autoimmune responses in atherosclerotic mice.** *Atherosclerosis* 2009, **204**(2):381-387.
59. Ma X, Wang Q, Jiang Y, Xiao Z, Fang X, Chen YG: **Lateral diffusion of TGF-beta type I receptor studied by single-molecule imaging.** *Biochem Biophys Res Commun* 2007, **356**(1):67-71.
60. Kato Y, Habas R, Katsuyama Y, Naar AM, He X: **A component of the ARC/Mediator complex required for TGF beta/Nodal signalling.** *Nature* 2002, **418**(6898):641-646.
61. Yang F, Vought BW, Satterlee JS, Walker AK, Jim Sun ZY, Watts JL, DeBeaumont R, Saito RM, Hyberts SG, Yang S *et al*: **An ARC/Mediator subunit required for SREBP control of cholesterol and lipid homeostasis.** *Nature* 2006, **442**(7103):700-704.
62. Kotzka J, Muller-Wieland D, Roth G, Kremer L, Munck M, Schurmann S, Knebel B, Krone W: **Sterol regulatory element binding proteins (SREBP)-1a and SREBP-2 are linked to the MAP-kinase cascade.** *J Lipid Res* 2000, **41**(1):99-108.
63. Roth G, Kotzka J, Kremer L, Lehr S, Lohaus C, Meyer HE, Krone W, Muller-Wieland D: **MAP kinases Erk1/2 phosphorylate sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1a at serine 117 in vitro.** *J Biol Chem* 2000, **275**(43):33302-33307.
64. Kotzka J, Lehr S, Roth G, Avci H, Knebel B, Muller-Wieland D: **Insulin-activated Erk-mitogen-activated protein kinases phosphorylate sterol regulatory element-binding Protein-2 at serine residues 432 and 455 in vivo.** *J Biol Chem* 2004, **279**(21):22404-22411.
65. de la Pompa JL, Zeller R: **Ectopic expression of genes during chicken limb pattern formation using replication defective retroviral vectors.** *Mech Dev* 1993, **43**(2-3):187-198.
66. Abdrakhmanov I, Lodygin D, Geroth P, Arakawa H, Law A, Plachy J, Korn B, Buerstedde JM: **A large database of chicken bursal ESTs as a resource for the analysis of vertebrate gene function.** *Genome Res* 2000, **10**(12):2062-2069.
67. Gaines P, Wojchowski DM: **pIRES-CD4t, a dicistronic expression vector for MACS- or FACS-based selection of transfected cells.** *Biotechniques* 1999, **26**(4):683-688.
68. Mejia-Pous C, Vinuelas J, Faure C, Koszela J, Kawakami K, Takahashi Y, Gandrillon O: **A combination of transposable elements and magnetic cell sorting provides a very efficient transgenesis system for chicken primary erythroid progenitors.** *BMC biotechnology* 2009, **9**:81.
69. Pfaffl MW: **A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.** *Nucleic Acids Res* 2001, **29**(9):e45.

## Figures



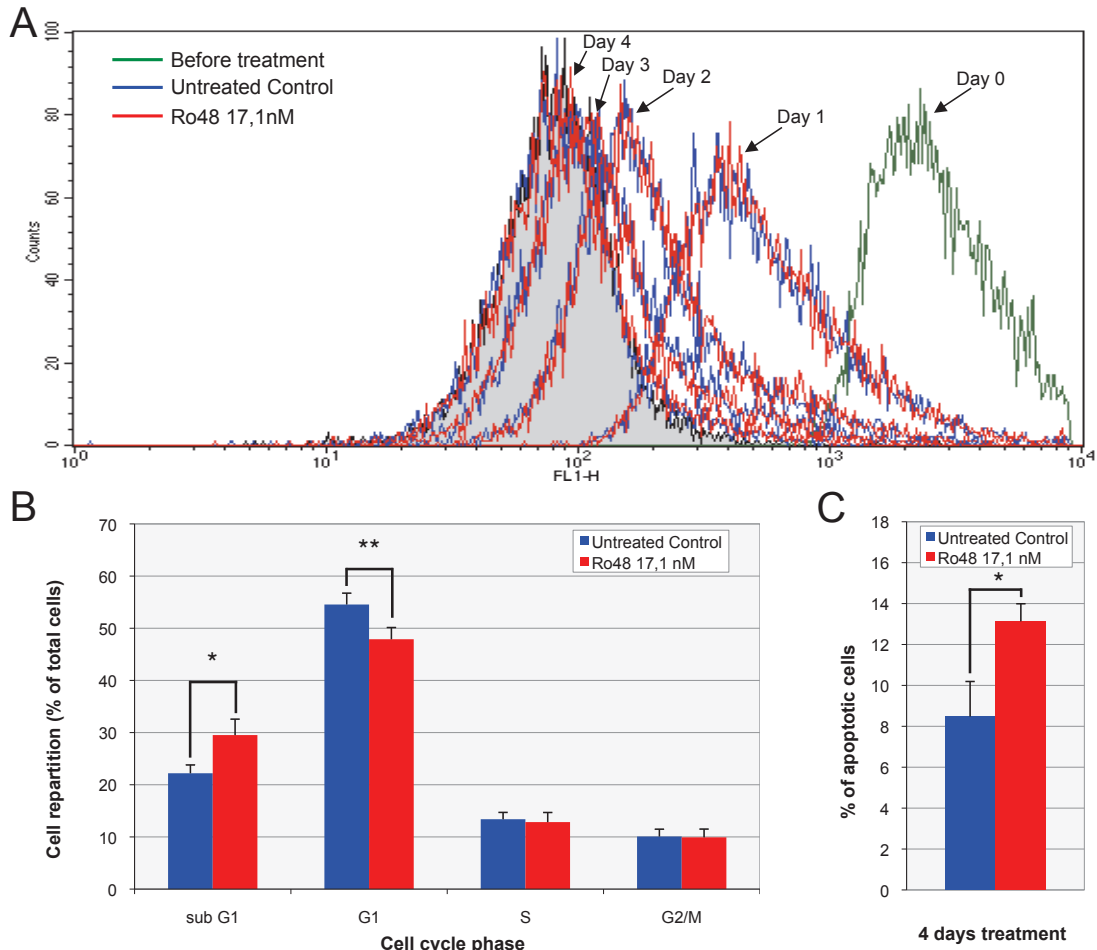
**Figure 1: OSC inhibition and self-renewal ability**

(A): T2ECs were grown in self-renewing conditions in the presence or absence of Ro48-8071 and the cell number was determined by cell counting. The cell number evolution during the treatment is represented as a cumulative growth curve (Mean  $\pm$  SD,  $n=3$ ),  $p = 5.74 \times 10^{-2}$  (\*) and  $p = 1.80 \times 10^{-4}$  (\*\*). (B): *OSC/LSS* shRNA-mediated knockdown in T2ECs expressing either shOSC.1 or shOSC.5, each targeting a different region of *OSC/LSS* mRNA, compared to T2ECs expressing shLuc.2 (targeting Luciferase mRNA). (a) *OSC/LSS* mRNA was quantified by RT-PCR with respect to the empty vector control (pSilencer EV). Data was normalized according to different standard genes ( $n=3$ ). (b) The number of living cells was assessed at each time point through a WST-1 assay and the evolution, with respect to transfection time, of cell number as a percentage of the empty vector (EV) is shown (Mean  $\pm$  SD,  $n=2$ ). (c): The number of cells expressing shOSC.1 and shOSC.5, determined by cell counting and represented as a cumulative growth curve was compared with the negative controls: pSilencer EV and shLuc.2.



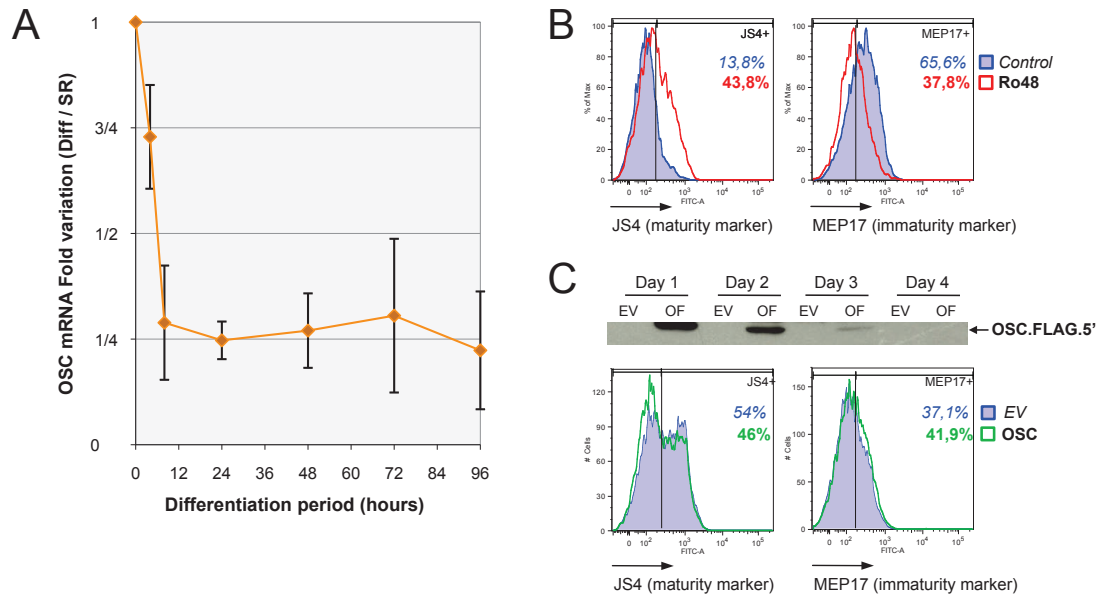
**Figure 3: OSC inhibition, survey and differentiation of differentiating cells**

(A): T2ECs were grown in the presence or absence of Ro48-8071, either in self-renewing (SR, left) or differentiating (Diff, right) conditions. During the treatment with increasing doses of Ro48-8071, the number of living cells was assessed at each time point by a WST-1 assay and is presented here as a percentage of the untreated control (Mean  $\pm$  SD, n=2). (B): After three days of treatment with Ro48-8071 (100 nM), either in self-renewing (SR) or differentiating (Diff) conditions, the number of cells was determined by cell counting and values are shown as a percentage (Mean  $\pm$  SD, n=3) of the untreated control for the same condition (i.e. SR or Diff),  $p = 9 \times 10^{-3}$  (\*). (C): T2ECs were grown in differentiating conditions in the presence or absence of Ro48-8071 and differentiation markers (maturity: JS4 and immaturity: MEP17) were quantified at each time point during the treatment. The percentage of positive cells for either the maturity or the immaturity marker (Mean  $\pm$  SD, n=3) is given.



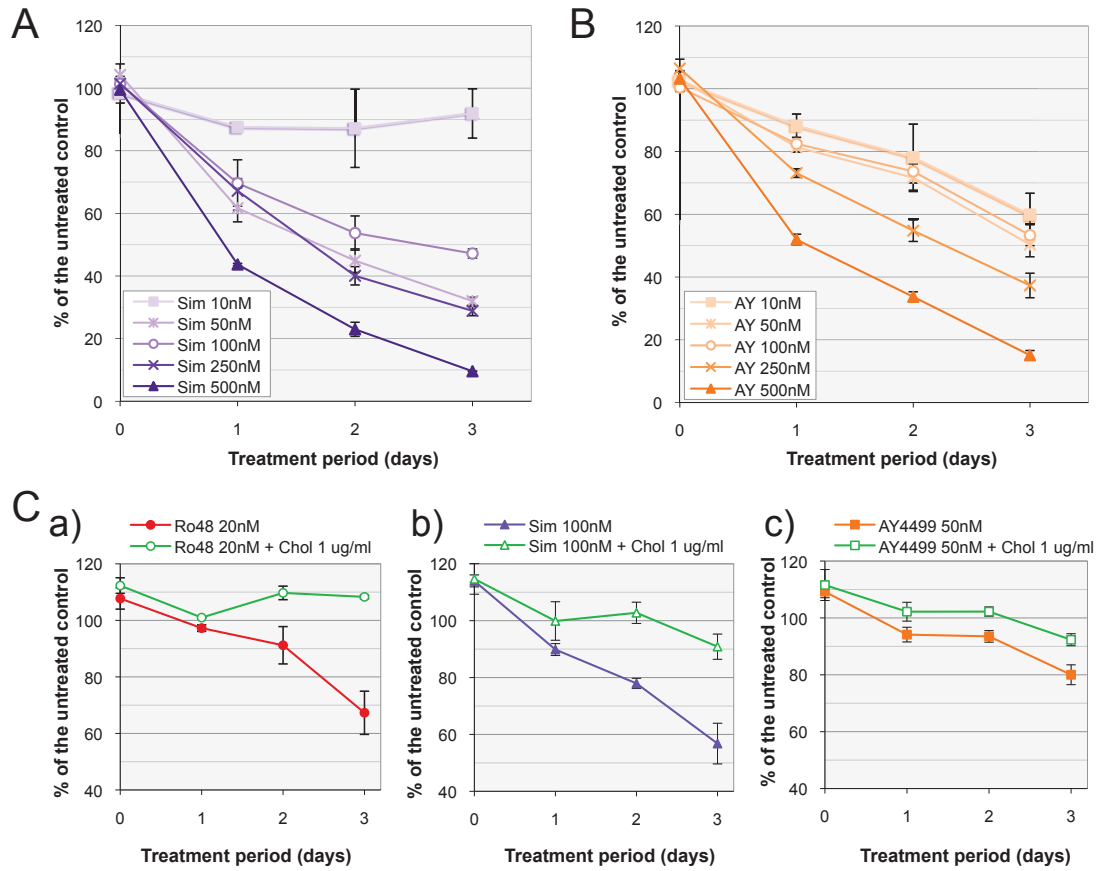
**Figure 4: OSC inhibition, cell cycle and survival of self-renewing cells**

T2ECs were grown in self-renewing conditions, in the presence or absence of Ro48-8071, for four days. (A): T2ECs, stained with CFSE, were monitored during the treatment period by measuring the CFSE fluorescence. Each peak represents the cell count as a function of the fluorescence at a given time point. (B): Cell repartition (Mean  $\pm$  SD, n=3), determined by PI DNA staining, either in the different cell cycle phases (G0/G1, S and G2/M) or in the subG1 fraction (lower PI staining than G0/G1),  $p = 2.12 \times 10^{-2}$  (\*) and  $p = 2.11 \times 10^{-2}$  (\*\*). (C): Rate of apoptotic cells (Mean  $\pm$  SD, n=2) determined by a TUNEL assay,  $p = 7.51 \times 10^{-2}$  (\*).



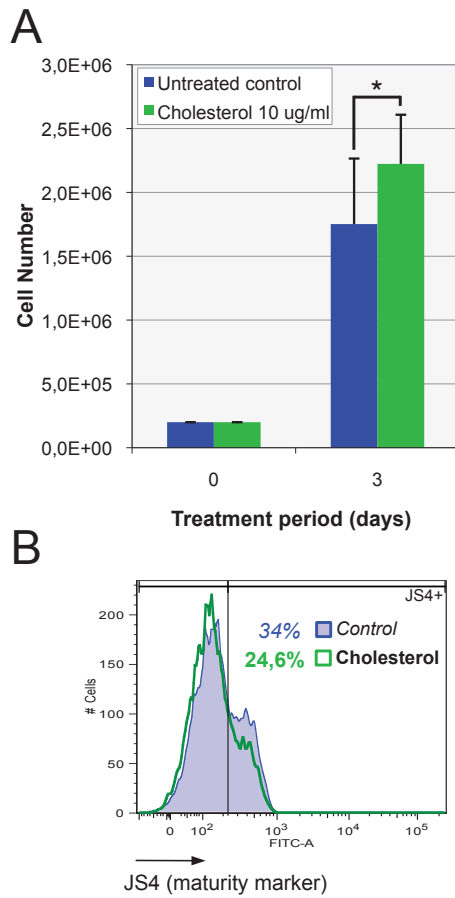
**Figure 5: OSC and self-renewal/differentiation balance**

(A): *OSC/LSS* mRNA expression in differentiating T2ECs was quantified by RT-PCR, with respect to self-renewing T2ECs (Diff/SR), at different time points. The evolution with respect to the differentiation induction time is shown (Mean  $\pm$  SD, n=3). (B) T2ECs were grown in self-renewing conditions in the absence or presence of Ro48-8071 (100 nM) and differentiation markers were quantified after three days of treatment. (C): T2ECs transiently over-expressing OSC.FLAG5' protein (OSC) or transfection controls (EV) were induced to differentiate on day-1 post-transfection and differentiation markers (maturity: JS4 and immaturity: MEP17) were quantified after three days of differentiation, on day-4 post-transfection. (B) and (C): Each figure represents the cell count as a function of the intensity of the marker labelling and the percentage of positive cells is presented either in *italics* for both the untreated and EV controls or in **bold** for both treated and over-expression conditions.



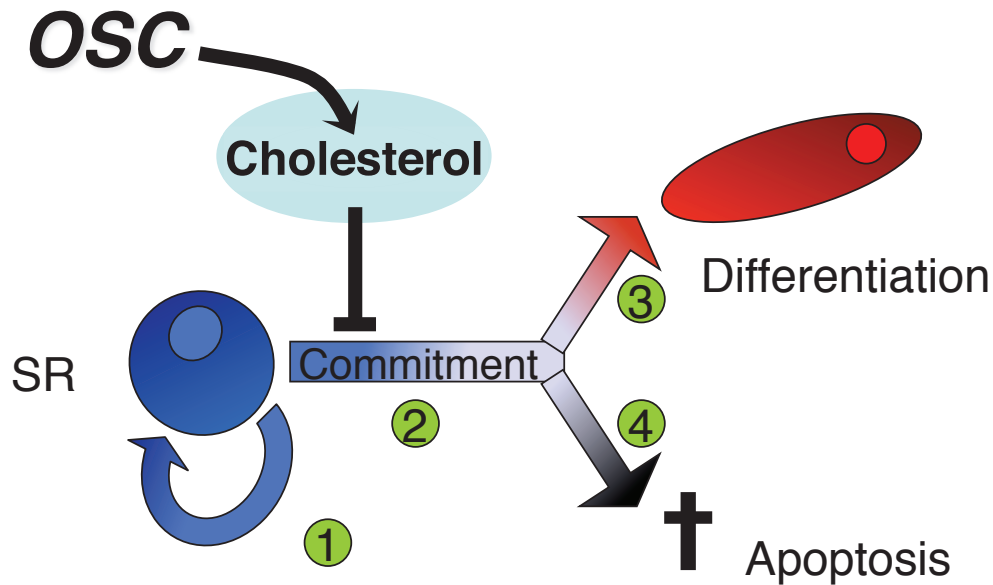
**Figure 6: Cholesterol synthesis inhibition and self-renewal ability**

T2ECs were grown in the absence or presence of increasing doses of either (A) Simvastatin or (B) AY-9944 in self-renewal conditions. The number of living cells was assessed at each time point through a WST-1 and is presented as a percentage of the untreated control (Mean  $\pm$  SD, n=2). (C): T2ECs were treated with (a) Ro48-8071, (b) Simvastatin or (c) AY-9944, either in the presence or absence of cholesterol. The number of living cells was assessed at each time point through a WST-1 assay and is given as a percentage of the untreated control (Mean  $\pm$  SD, n=2).



**Figure 8: Cholesterol and self-renewal maintenance**

(A): T2ECs were grown in the presence or absence of exogenous cholesterol, for three days, in self-renewal conditions and the cell number was determined by cell counting (Mean  $\pm$  SD,  $n=3$ ),  $p = 1.4 \times 10^{-1}$  (\*). (B): T2ECs were grown in the presence or absence of cholesterol, for three days, in differentiating conditions and the maturity marker JS4 was quantified. The figure represents the cell count as a function of the intensity of the marker labelling and the percentage of positive cells is presented either in *italics* for the untreated control or in **bold** for the treated condition.

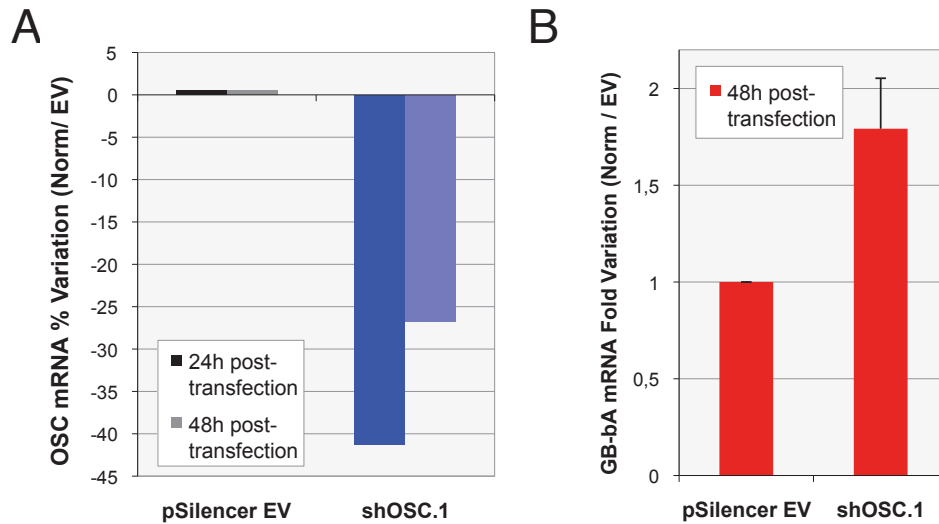


**Figure 9: Proposed role of OSC in cell fate determination**

The self-renewing cells either stay in the self-renewal state (①) or exit through a commitment process from this state (②). Once committed, these cells either terminally differentiate (③) or die by apoptosis (④), depending upon the absence or presence of certain factors and other outside signals: in the absence of essential differentiating factors, committed cells will undergo apoptosis. OSC, *via de novo* cholesterol synthesis, prevents the commitment of self-renewing progenitors when the conditions required for final differentiation are not present.



## Additional files

**Additional File 1: OSC/LSS knockdown and self-renewal/differentiation balance**

ShRNA-mediated knockdown in T2ECs expressing shOSC.1, compared to T2ECs transfected with the empty vector (pSilencer EV). Either **(A)** *OSC/LSS* or **(B)** globine $\beta^A$  (GB-bA) mRNA was quantified by RT-PCR with respect to the empty vector (EV) control, 48h after transfection time (Mean  $\pm$  SD, n=2).

## 2.3 Différenciation & Stochasticité

Comme le suggère un nombre croissant de données expérimentales, la variabilité aléatoire (ou stochasticité) de l'expression génique est loin d'être un « bruit » ou un artefact expérimental, mais constitue un processus cellulaire ayant un rôle dans un certain nombre de fonctions, dont le devenir cellulaire (§1.3.2.3, p. 51). Cependant, les causes moléculaires de cette variabilité restent encore mal comprises, notamment dans les cellules eucaryotes supérieures. En particulier, la signification biologique de ce phénomène reste une question ouverte. Afin d'étudier la relation entre l'expression stochastique des gènes et la différenciation cellulaire, ainsi que l'importance de cette première dans le contrôle de l'équilibre entre autorenouvellement et différenciation, nous avons décidé de profiter pleinement de l'avantage des T2ECs en termes de contrôle de l'induction de la différenciation et donc du devenir cellulaire.

### *2.3.1 Différenciation & Stochasticité : deux observations intrigantes.*

#### **2.3.1.1 Effet de la température sur la différenciation de T2ECs**

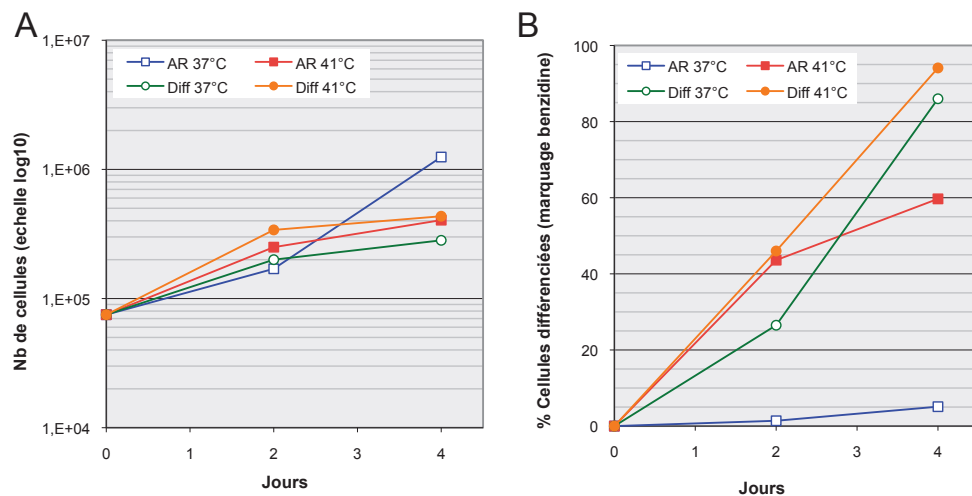
Parmi un grand nombre de mécanismes moléculaires, l'une des explications physiques possibles de la stochasticité de l'expression des gènes, avancée au cours des dernières années, est l'interaction aléatoire entre les protéines contrôlant la transcription (facteurs de transcription, facteurs de remodelage de la chromatine, *etc.*) et les régions promotrices des gènes (Halford, 2009; Halford & Marko, 2004; Pederson, 2001). Or, la température est un paramètre, parmi d'autres, pouvant influencer l'interaction entre les protéines. En effet, le mouvement des atomes et des molécules va augmenter avec la température. Nous avons ainsi étudié l'effet d'une augmentation de la température de culture sur des T2ECs en état d'autorenouvellement.

La température normale du poulet adulte (après éclosion) est thermorégulée autour de 41°C, alors que dans l'œuf couvé, contenant l'embryon de poulet, elle varie autour de 37 – 39°C. Les T2ECs sont extraites à partir de la moelle osseuse d'embryons de poulet et sont donc cultivées à 37°C. Cependant, comme nous l'avons évoqué précédemment (§1.2.3.2.2, p.36), les T2ECs peuvent également être extraites à partir de poulets adultes. La température embryonnaire (37°C) comme la température adulte (41°C) sont donc compatibles avec la culture de ces cellules.

Nous avons observé que le fait de cultiver les T2ECs à 41°C est un réel inducteur de différenciation. En effet, lorsque les T2ECs sont cultivées dans le milieu d'autorenouvellement, on observe une prolifération

importante et un taux de différenciation spontanée négligeable (Figure 2-10, *AR 37°C*). La différenciation des T2ECs à 37°C, induite par les facteurs présents dans le milieu de culture de différenciation, se traduit par un ralentissement de la prolifération et une augmentation du pourcentage des cellules différenciées (Figure 2-10, *Diff 37°C*). De manière intéressante, nous avons vu que l'augmentation de la température est un paramètre suffisant pour induire une différenciation spontanée en conditions d'autorenouvellement (Figure 2-10, *AR 41°C*), ou accélérer le processus de différenciation (Figure 2-10, *Diff 41°C*). La composition des milieux et les conditions de culture sont détaillées dans le §2.2.3, p. 101.

Cette observation peut être reliée à l'idée selon laquelle la température modifie la stochasticité de l'expression des gènes, en influençant les interactions entre protéines. En effet, de nombreux indices découverts au cours de la dernière décade suggèrent un lien entre la stochasticité et la différenciation cellulaire (§1.3.2.3 p. 51). Comme notre expérience – certes préliminaire – va dans ce sens, nous avons donc décidé d'explorer ce lien plus en détail.



**Figure 2-10 : Effet de la température sur la différenciation des T2ECs**

Des T2ECs ont été cultivées soit dans du milieu d'autorenouvellement (*AR*), soit dans du milieu de différenciation (*Diff*) pendant quatre jours. (A) Le nombre de cellules vivantes a été déterminé par marquage au bleu de trypan (coloration des cellules mortes) suivi d'un comptage sur lame de Mallassez. (B) Le pourcentage de cellules différenciées a été déterminé par marquage à la benzidine acétique (coloration de l'hémoglobine), suivi d'un comptage sur lame des cellules positives au marquage.

### 2.3.1.2 Mesure d'un indicateur de stochasticité lors de la différenciation

Afin d'évaluer à partir d'un autre point de vue la corrélation entre la stochasticité de l'expression des gènes et la différenciation cellulaire, suggérée dans le paragraphe précédant, nous avons mesuré la variabilité de l'expression des marqueurs cellulaires au cours de ce processus. Classiquement, on quantifie la stochasticité par la variance normalisée ( $\sigma^2/\mu^2$ , avec  $\sigma^2$  étant la variance et  $\mu$  la moyenne de la population étudiée). Nous avons ainsi suivi l'évolution de la variance normalisée de protéines membranaires indicatrices de l'avancée du processus de différenciation. Pour l'érythropoïèse aviaire, on peut notamment citer MEP17 (un marqueur d'immaturité) et JS4 (un marqueur de maturité), dont l'expression va, respectivement, augmenter et diminuer au cours de la différenciation (Gandrillon *et al.*, 1999). L'évolution de ces marqueurs membranaires a été suivie par cytométrie de flux, dans des populations de T2ECs en état d'autorenouvellement ou au cours du processus de différenciation. La détection par cytométrie de flux est basée d'une part sur le fait que ces marqueurs sont exprimés à la surface cellulaire, et d'autre part sur une reconnaissance anticorps/antigène. D'un point de vue moléculaire, des anticorps primaires vont spécifiquement reconnaître ces marqueurs exprimés à la surface. Des anticorps secondaires spécifiques de ces anticorps primaires et couplés à un fluorochrome permettent alors de rendre compte de l'expression de ces marqueurs d'intérêt par cytométrie de flux. Ainsi, plus une cellule exprime de marqueurs, plus d'anticorps primaires (et donc secondaires) seront détectés et, par conséquent, plus l'intensité de la fluorescence (proportionnelle au nombre de molécules émettrices) sera importante. La valeur de cette intensité, directement mesurée par cytométrie de flux, nous renseigne donc sur le niveau d'expression du marqueur en question. Le détail sur les conditions de culture et les marquages membranaires est décrit dans le §2.2.3 (p. 101) et les données obtenues ont ensuite été extraites et analysées par Gaël Kaneko, en thèse au sein de l'équipe.

Trois paramètres peuvent nous renseigner sur l'évolution de l'expression des marqueurs de différenciation au sein d'une population. Premièrement, on peut quantifier le pourcentage (par rapport à la population totale) des cellules exprimant les marqueurs en question (Figure 2-11A). On peut également suivre l'évolution de la moyenne du niveau d'expression au sein de la population (Figure 2-11B). Enfin, on peut mesurer la variabilité de leurs niveaux d'expression d'une cellule à l'autre, au sein de la population (Figure 2-11C). Cette variabilité, calculée grâce à la variance normalisée ( $\sigma^2/\mu^2$ ), est relative à la stochasticité de l'expression des marqueurs en question. Nous avons ainsi observé que le pourcentage des cellules positives et le niveau moyen d'expression des marqueurs étudiés (MEP17 et JS4), évolue en accord avec les cinétiques de différenciation attendues :

ces deux paramètres diminuent pour MEP17 et augmentent pour JS4 lors de la différenciation, par rapport à l'état d'autorenewement (Figure 2-11A et Figure 2-11B). Concernant la variabilité de l'expression de ces marqueurs, nous avons observé que, dans une population en état d'autorenewement, celle-ci est relativement stable au cours du temps. En revanche, lorsque la population est induite à se différencier, la variabilité de l'expression de ces marqueurs évolue au cours de la différenciation (Figure 2-11C). De plus, ce niveau de stochasticité est inversement corrélé au niveau d'expression, avec une augmentation de celui-ci pour MEP17 et une diminution pour JS4.

Ces observations suggèrent ainsi que la variabilité de l'expression des gènes n'est pas juste un « bruit » qui serait constant quelque soit l'état. En effet, s'il s'agissait d'une variabilité expérimentale ou biologique, inhérente à notre système (marqueur, cellule, quantification par cytométrie de flux, *etc.*), elle serait la même, indépendamment de l'état (autorenewement ou différenciation). L'utilisation d'un marquage antigénique et de la cytométrie de flux, permet de quantifier l'expression d'un gène cellulaire et offre ainsi un aperçu de la variabilité de celui-ci. La pertinence de cette observation repose, notamment, sur le fait qu'il s'agit d'un gène cellulaire endogène et, de plus, corrélé avec le processus de différenciation. Cependant, en raison des propriétés de ce système, en particulier le fait que la détection requière la mise en place d'un « échafaudage moléculaire » (marqueur + anticorps primaire + anticorps secondaire), cette mesure implique des paramètres supplémentaires qui peuvent influencer variabilité (l'augmenter ou au contraire la masquer). Il est donc nécessaire de compléter cette approche de détection indirecte (*i.e.*, *via* des anticorps) pour étudier la stochasticité de l'expression génique. Dans ce sens, les gènes rapporteurs, permettant l'expression de protéines fluorescentes sous le contrôle d'un promoteur déterminé, permettent une détection plus directe de leur produit d'expression. D'autre part, la cytométrie de flux permet de quantifier le niveau d'expression d'un gène (détecté par immunomarquage ou grâce une protéine fluorescente) au sein d'une population et de mesurer la variabilité d'une cellule à une autre dans cette population à un instant donné. Cependant, cette méthode de mesure ne permet pas de suivre l'expression génique dans une même cellule au cours du temps (cellule unique), ce que le suivi de la fluorescence en temps réel permet.

RESULTATS : DIFFERENCIATION & STOCHASTICITE

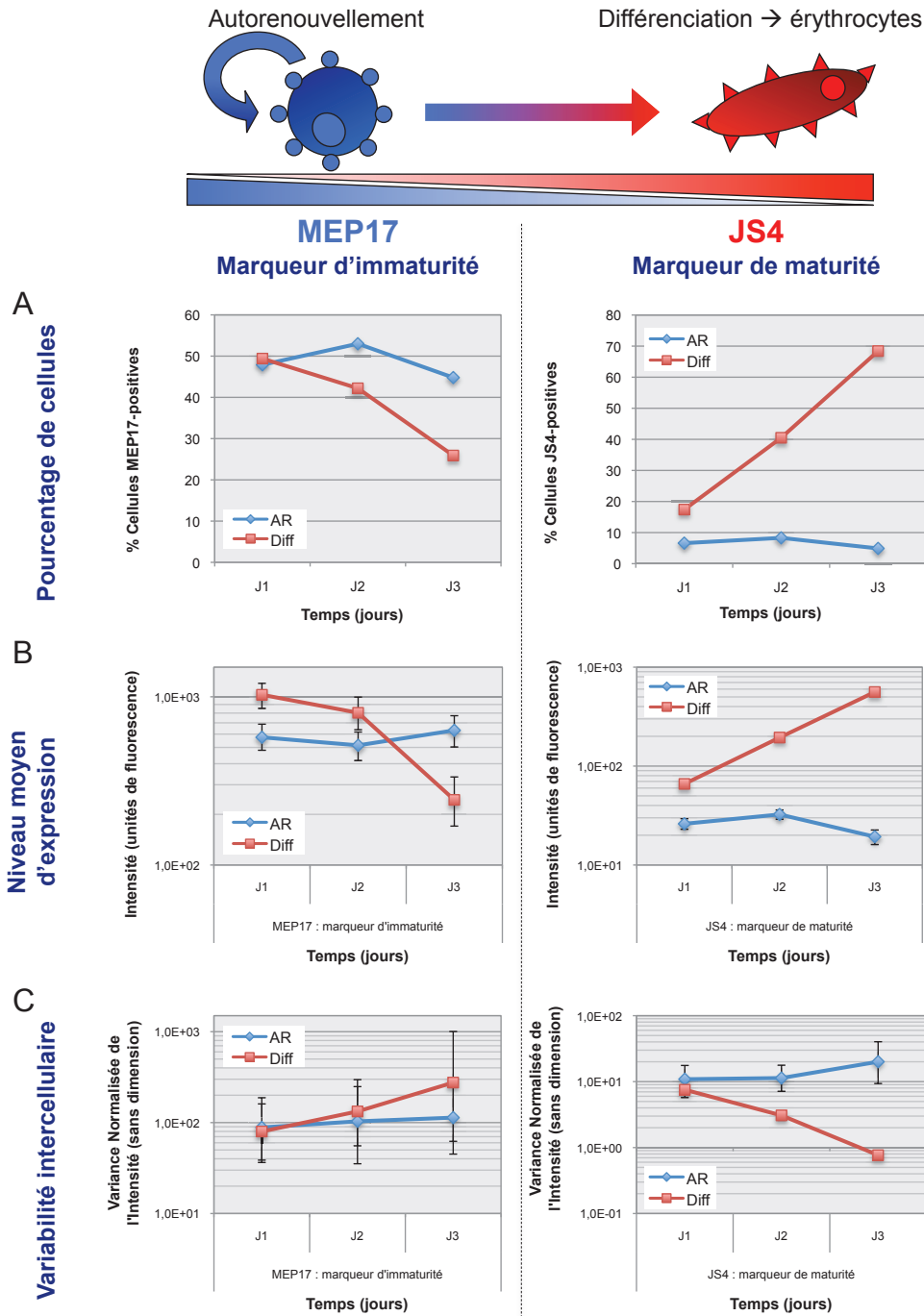


Figure 2-11 : Evolution de l'expression des marqueurs cellulaires au cours de la différenciation.

Des T2ECs ont été cultivées soit dans du milieu d'autorenouvellement (AR), soit dans du milieu de différenciation (Diff) pendant quatre jours et les marqueurs de surface (ou membranaires) de différenciation ont été quantifiés par cytométrie de flux. Deux marqueurs ont été étudiés : le marqueur d'immaturité MEP17, dont l'expression diminue au cours de la différenciation et le marqueur de maturité JS4, dont l'expression augmente au cours de la différenciation. L'évolution des paramètres analysés est donnée en fonction du temps par rapport au début de la culture. (A) Pourcentage de cellules exprimant soit MEP17 (à gauche), soit JS4 (à droite), par rapport à la population totale. (B) Niveau moyen d'expression de soit MEP17 (à gauche), soit JS4 (à droite), évalué par l'intensité de la fluorescence du marquage correspondant. La moyenne est calculée à partir des intensités individuelles de l'ensemble des cellules mesurées dans la population totale et son intervalle de confiance, déterminé par bootstrap, est représenté. (C) Variabilité intercellulaire (d'une cellule à l'autre au sein de la population) du niveau d'expression de soit MEP17 (à gauche), soit JS4 (à droite), évaluée par la variance normalisée. Cette dernière correspond au rapport  $\sigma^2/\mu^2$  avec  $\sigma^2$  et  $\mu$  étant respectivement la variance et la moyenne de l'intensité de la fluorescence de la population totale. L'intervalle de confiance, déterminé par bootstrap, est représenté.

L'étude de l'effet de la température sur la différenciation, d'une part, et l'évolution de la variabilité de l'expression des marqueurs cellulaires au cours de la différenciation, d'autre part, semblent confirmer le lien entre la stochasticité de l'expression des gènes et la différenciation cellulaire. Bien que ces observations soient très excitantes et nous encouragent à aller plus loin, elles ne constituent tout de même pas une preuve à elles seules : elles doivent être complétées par d'autres études pour pouvoir tirer des conclusions solides. De plus, elles ne nous renseignent pas sur les mécanismes moléculaires sur lesquels repose cette variabilité (régulation, causes, conséquences, *etc.*). Afin de vérifier l'hypothèse de l'importance physiologique de ce phénomène dans la différenciation, une étape primordiale consiste à suivre la variation de l'expression de différents gènes au cours du temps dans l'état d'autorenouvellement et après induction de la différenciation, et ceci au niveau de la cellule unique.

### *2.3.2 Suivi de l'Expression Génique en Temps Réel*

Nos observations soutiennent l'hypothèse d'une corrélation entre la stochasticité de l'expression génique et la différenciation cellulaire. Une question qui se pose est alors de comprendre s'il y a une relation de cause à effet entre ces deux processus et, le cas échéant, quels sont les mécanismes moléculaires sous-jacents. L'indicateur évoqué plus haut – la variance normalisée – permet de quantifier deux types de variabilité de l'expression génique. D'une part, il permet de quantifier la variabilité intercellulaire, utilisée ci-dessus pour le suivi des marqueurs de différenciation (à un instant donné au sein d'une population de cellules par rapport à la moyenne de la population) : à chaque instant de mesure, on calcule la moyenne et la variance sur l'ensemble des cellules mesurées. On peut alors analyser l'évolution temporelle de la variabilité au sein de la population. D'autre part, la variance normalisée permet de quantifier la variabilité intracellulaire (pour une même cellule par rapport à sa propre moyenne au cours du temps) : pour chaque cellule on calcule la moyenne et la variance temporelle des niveaux d'expression individuels. On obtient alors une valeur de variabilité pour chaque cellule mesurée. Ce type de mesure est bien entendu plus pertinent si l'on veut étudier la variabilité de l'expression des gènes au cours du temps et, notamment, lors du processus de différenciation. D'un point de vue pratique, il s'agit donc de mesurer en cellule unique et en temps réel l'expression – grâce à des rapporteurs fluorescents – de plusieurs gènes de manière simultanée, avant et au cours de la différenciation érythrocytaire. Ce type de mesure requiert donc la possibilité d'exprimer et détecter de manière distincte plusieurs gènes rapporteurs, et nécessite un dispositif expérimental spécifique permettant d'isoler des cellules en suspension, comme le sont les T2ECs.

### 2.3.2.1 Visualisation des rapporteurs fluorescents

La validation et la mise au point de la détection simultanée des rapporteurs fluorescents choisis ont été menés, sous ma tutelle, par Joanna Koszela lors de son stage de L3. Les expériences présentés ci-dessous sont adaptées à partir de son rapport de stage.

#### 2.3.2.1.1 Matériel et Méthodes

##### ✓ *Culture Cellulaire :*

Les T2ECs sont préparées à partir de la moelle osseuse de tibia d'embryons de poulet (souche PA12, INRA) de 19/20 jours et maintenues en autorenouvellement comme décrit précédemment (Gandrillon *et al.*, 1999).

##### ✓ *Vecteurs utilisés :*

Les vecteurs pCRNCM-mCherry et pCRNCM-hKO, permettant l'expression de la protéine Cherry et KO sous le contrôle d'un promoteur CMV, ont été dérivés à partir du vecteur rétroviral défectif pCRNCM. Le vecteur mCerulean-C1, permettant l'expression de la protéine Cerulean sous le contrôle d'un promoteur CMV, nous a été gracieusement offert par Dave Piston (Vanderbilt University Medical Center).

##### ✓ *Transfection par Nucléofection :*

Les transfections sont réalisées par la méthode de nucléofection (Amaya Technology), comme décrit précédemment (§2.2.2.2.1, p. 96) avec la modification suivante :  $5.10^6$  cellules (au lieu de  $10^7$ ) ont été transfectées avec  $5\mu\text{g}$  de vecteur (au lieu de  $10\mu\text{g}$ ).

##### ✓ *Cytométrie de flux :*

La fluorescence émise soit par les différents marquages, soit par les cellules positives pour la eGFP, est détectée à l'aide d'un cytomètre de flux FACScantoII et les données sont analysées grâce au logiciel DIVA (tous les deux de Becton-Dickinson). La fluorescence est analysée à partir de 24 h après la transfection : une aliquote de culture est prélevée et les cellules sont reprises dans 300-1000  $\mu\text{L}$  de PBS selon la concentration cellulaire. Les cellules non transfectées servent comme contrôle négatif de fluorescence afin de fixer les seuils négatifs des signaux fluorescents.

#### 2.3.2.1.2 Résultats

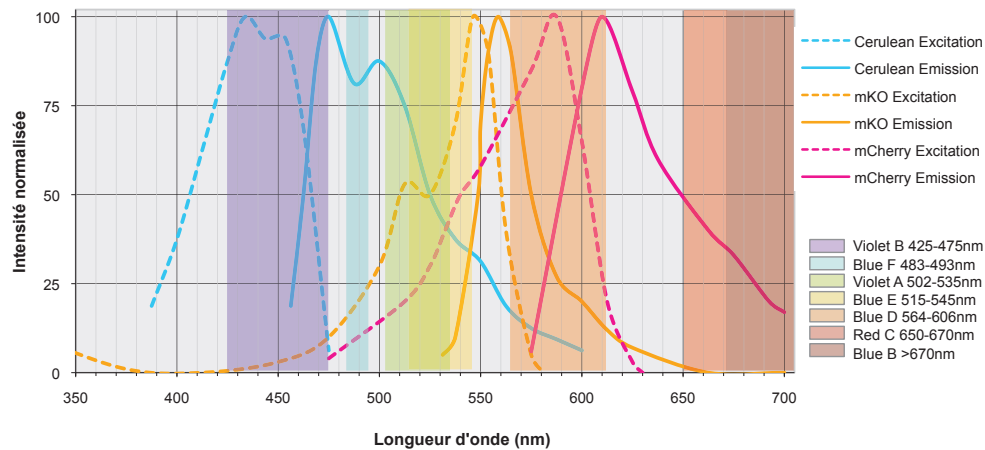
##### ✓ *Transfections simples*

Trois protéines fluorescentes Cherry (rouge), KO (orange) et Cerulean (cyan) ont été choisies en raison de leurs caractéristiques en adéquation avec les exigences du projet : la photostabilité indispensable lors des expériences de longue durée, leur grande intensité de fluorescence, ainsi que leurs spectres d'émission de fluorescence (i.e., longueur d'onde du signal émis) suffisamment éloignés (Shaner, Steinbach & Tsien, 2005). Les séquences d'ADN codant pour ces protéines sont sous le contrôle du promoteur CMV.

Les T2ECs ont été transfectées avec les plasmides pCRNCM-mCherry, pCRNCM-hKO ou mCerulean-C1 et leur fluorescence a été analysée par cytométrie de flux. Étant donné que ces protéines ne sont pas couramment utilisées, le problème du choix des filtres d'émission et des lasers d'excitation pour l'analyse par FACS s'est posé. En effet, les filtres mis à



notre disposition (Figure 2-12) n'étaient pas optimaux pour mesurer la fluorescence émise par chacune de ces protéines : les pics, ainsi que de larges parties des spectres, se situent en dehors des zones de détection.



**Figure 2-12 : Spectres caractérisant les protéines fluorescentes utilisées**

*Spectres théoriques d'excitation (pointillés) et d'émission (trait continu) des protéines fluorescentes Cerulean (bleu), KO (orange), Cherry (rouge) avec la superposition des bandes passantes des 8 filtres du FACS CantoII. Chaque filtre détecte le signal fluorescent dans une plage (ou bande passante) de longueurs d'onde déterminée.*

L'analyse expérimentale du signal fluorescent de chaque protéine, détecté par chacun des filtres à disposition, a donc été nécessaire afin de déterminer le meilleur filtre pour une protéine donnée, c'est-à-dire celui permettant la détection du signal le plus intense pour le plus grand taux de cellules. Conformément à ce que laissaient prévoir les spectres théoriques, les filtres donnant le meilleur signal pour Cerulean et KO, sont les filtres Violet B et Blue D respectivement. En revanche, bien que le filtre Blue D soit plus proche du pic d'émission de Cherry, le filtre Red C offrait un signal plus intense, c'est donc ce dernier (Red C) qui a été choisi pour Cherry. Une fois les filtres de détection déterminés, l'efficacité de transfection a pu être mesurée pour chacun des vecteurs portant les différentes protéines fluorescentes (Tableau 2-I) : 69,5% pour Cerulean<sup>+</sup>, 53,9% KO<sup>+</sup> et 42,9% pour Cherry<sup>+</sup>. Ces taux d'efficacité sont très satisfaisants pour les T2ECs si on tient en compte qu'il s'agit de cellules primaires et en suspension (généralement plus difficiles à transférer).

<i>Fluorescence positive</i>	<i>Vecteur d'expression</i>	<i>Efficacité de transfection</i>
Cerulean+	mCerulean-C1	69,5%
KO+	pCRNCM-hKO	53,9%
Cherry+	pCRNCM-mCherry	42,9%

**Tableau 2-I : Efficacité des transfections simples**

Des T2ECs ont été nucléofectées avec le vecteur mCerulean-C1 ou pCRNCM-hKO ou pCRNCM-mCherry, permettant l'expression des protéines fluorescentes Cerulean, KO et Cherry, respectivement. L'efficacité de la transfection est évaluée 24h après nucléofection par le pourcentage de cellules exprimant la protéine fluorescente correspondante. Ce pourcentage a été déterminé d'après le nombre de cellules fluorescentes, par rapport à la population totale, mesuré par FACS.

### ✓ Transfections multiples

Par la suite, des expériences de transfection avec deux ou trois vecteurs ont été menées afin de mettre en place une stratégie permettant la détection des trois rapporteurs simultanément dans la même cellule. Les populations doublement (deux vecteurs différents) ou triplement (trois vecteurs) transfectées ont été préparées et leur fluorescence a été mesurée par FACS. Il est ainsi apparu que les filtres initialement choisis pour les cellules transfectées par un seul vecteur ne permettaient pas de distinguer ces populations (plus complexes) les unes des autres. En effet, le chevauchement des spectres d'émission des différentes protéines, au niveau des plages de détection (Figure 2-12), empêche la mesure correcte de la fluorescence car on peut observer la fluorescence de plusieurs protéines avec un même filtre (Tableau 2-II).

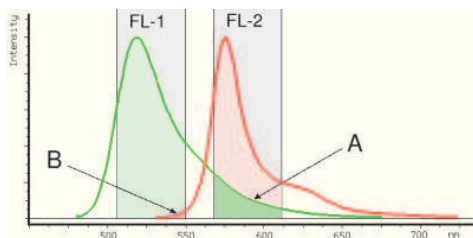
Il a été donc nécessaire de définir chacune des populations de cellules à l'aide d'une combinatoire de filtres qui lui était spécifique. Par exemple, les cellules doublement transfectées Cerulean+/KO+ sont les seules à donner à la fois un signal positif dans les filtres Violet B, Blue E, Blue D, et Blue B ET un signal négatif dans le filtre Red C.

Par ailleurs, il semblait à première vue que les populations co-transfectées avec les vecteurs codant pour Cerulean et Cherry ne pouvaient pas être séparées des triples transfectants. En effet, la fluorescence des deux populations était détectée sur tous les filtres considérés (Tableau 2-II). Cependant, un traitement des signaux a permis de constater que le signal provenant de Cerulean et observé dans le filtre Blue E était du signal « contaminant ». Il était donc possible de corriger les signaux par des méthodes de compensation (Figure 2-13, à gauche). Ainsi, en utilisant plusieurs équations de compensation (Figure 2-13, à droite), nous avons réussi à distinguer la population Cerulean+/Cherry+ de celle des cellules transfectées par les trois vecteurs, par son absence de fluorescence dans le filtre Blue E.

Transfection	-	Simple			Double			Triple
		Cerulean	KO	Cherry	Cerulean + Cherry	Cerulean + KO	Cherry + KO	Cerulean + Cherry + KO
Violet B	-	+	-	-	+	+	-	+
Blue E	-	+/-	+	-	+/-	+	+	+
Blue D	-	-	+	+	+	+	+	+
Blue B	-	-	+	+	+	+	+	+
Red C	-	-	-	+	+	-	+	+

**Tableau 2-II : Détection de la fluorescence de Cerulean, KO et Cherry par les filtres du FACS**

Des T2ECs ont été nucléofectées avec le vecteur mCerulean-C1 ou pCRNCM-hKO ou pCRNCM-mCherry, permettant l'expression des protéines fluorescentes Cerulean, KO et mCherry, respectivement. Leur fluorescence est mesurée par cytométrie de flux 24h après nucléofection. Pour chaque population de cellules exprimant aucune (NT), une, deux ou trois des protéines fluorescentes, la présence (+) et l'absence (-) de signal dans chacun des filtres du FACS considérés ont été répertoriées.



FL-1	- %FL-2	Pourcentage de compensation
KO (Blue E)	Cerulean (Violet B)	4,7%
KO (Blue E)	Cherry (Red C)	0,2%
KO (Blue E)	Cherry (Blue D)	0,15%
Cherry (Blue D)	Cerulean (Violet B)	1,1%
Cherry (Red C)	KO (Blue E)	0,2%
Cherry (Red C)	KO (Blue D)	0,1%

**Figure 2-13 : Stratégie de Compensation utilisée pour distinguer les signaux fluorescents détectés**

À gauche : Principe de la compensation de fluorescence : Le chevauchement des spectres d'émission des divers fluorochromes (FL) utilisés en cytométrie rendent nécessaire l'emploi de compensations de fluorescence afin de soustraire la superposition des deux signaux de fluorescence. A : pourcentage du signal du FL1 à soustraire de FL2 ; B : pourcentage du signal du FL2 à soustraire de FL1.

(Figure adaptée <http://flowcyt.salk.edu/howto/compensation/compensation-howto.html>).

À droite : équations de compensation selon chacun des filtres utilisés lors de la mesure de la fluorescence des trois protéines fluorescentes au FACS.

Ces mises au point effectuées, nous avons pu distinguer les différentes populations de cellules doublement ou triplement transfectées et mesurer leurs pourcentages de transfection (Tableau 2-III). La triple transfection permet d'obtenir un taux de 40,1% de cellules Cherry<sup>+</sup>/KO<sup>+</sup>/Cerulean<sup>+</sup>. Cet ordre de grandeur est très satisfaisant et confirme que les T2ECs peuvent aisément subir une triple transfection.

<i>Fluorescences positives</i>	<i>Efficacité de transfection</i>
Cerulean+/KO+	39,8%
Cerulean+/Cherry+	48,3%
KO+/Cherry+	34,2%
Cherry+/KO+/Cerulean+	40,1%

**Tableau 2-III : Efficacité des transfections multiples**

*Des T2ECs ont été nucléofectées simultanément avec deux ou trois vecteurs rapporteurs (mCerulean-C1 ou pCRNCM-KO ou pCRNCM-mCherry). L'efficacité de transfection est évalué par le pourcentage de cellules exprimant les deux ou trois protéines fluorescentes correspondantes. Ce pourcentage a été déterminé d'après le nombre de cellules fluorescentes, par rapport à la population totale, mesuré par FACS.*

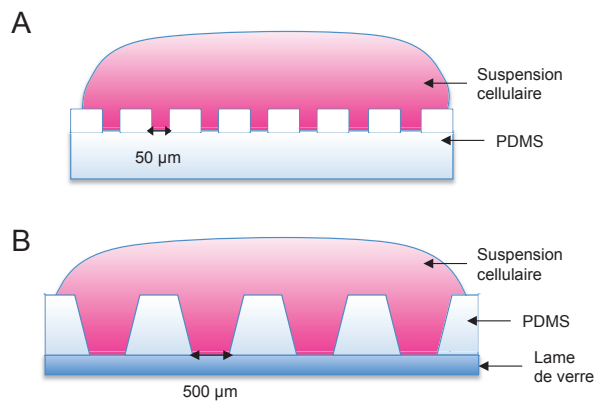
Nous avons ainsi démontré qu'il est possible d'exprimer et de détecter de manière simultanée plusieurs protéines fluorescentes, produites par l'expression de gènes rapporteurs dans les T2ECs. La détection par cytométrie de flux (FACS) de l'expression de chacune des trois protéines fluorescentes, et de leur niveau d'expression au sein de la population, permet donc l'étude de la variabilité intercellulaire de l'expression génique. Afin de pouvoir mesurer la stochasticité intracellulaire – à savoir la variabilité au sein d'une même cellule au cours du temps – il était nécessaire de mettre en place un dispositif adapté aux T2ECs, permettant d'isoler les cellules et de les suivre individuellement tout au long de l'expérience (ce que ne permet pas le FACS).

### 2.3.2.2 Individualisation des cellules uniques

La première étape de la mise en place d'un dispositif permettant le suivi en temps réel de l'expression des gènes rapporteurs – décrits précédemment – consistait à pouvoir individualiser les T2ECs en culture. Cette mise au point a été réalisée en collaboration avec des nanotechnologistes : Alexandra Fuchs, Manuel Théry et François Chatelain, du laboratoire des BioPuces au CEA de Grenoble. Les T2ECs étant des cellules en suspension, la seule possibilité d'individualisation est de les cultiver séparément dans des puits. Concernant ces puits, deux contraintes devaient être prises en compte : le besoin de pouvoir suivre simultanément plusieurs cellules dans le même champ de vision du microscope et un matériel le plus optiquement invisible (i.e., interférant un minimum avec la détection de la fluorescence). Nous avons ainsi décidé d'utiliser le polydiméthylsiloxane (PDMS), un matériel transparent, compatible avec la détection de la fluorescence en microscopie, *a priori* biologiquement inerte et permettant de faire des puits de dimensions microscopiques et à la taille et forme désirées (McDonald & Whitesides, 2002).

✓ *Test de la viabilité des T2ECs dans le PDMS*

Afin de déterminer si le PDMS est un matériel compatible avec la culture des T2ECs, nous avons évalué la viabilité de ces cellules cultivées dans les puits moulés avec ce matériel. Nous avons utilisé deux types de puits : soit dans des petits puits (30 à 50  $\mu\text{m}$ ) entièrement composés en PDMS (Figure 2-14A), soit des puits plus larges (500  $\mu\text{m}$ ) et dont les parois sont en PDMS, mais le fond est en verre, limitant ainsi le contact entre les cellules et le PDMS (Figure 2-14A). Nous avons suivi la culture et observé que, quelque soit le type de puits, les cellules se multiplient normalement, montrant que le PDMS est compatible avec la culture des T2ECs.



**Figure 2-14 : Culture en puits moulés dans du PDMS**

*Les T2ECs sont cultivées dans des puits PDMS par décantation, en déposant une goutte de culture cellulaire sur le moule.*

*(A) Motif à petits puits (30 à 50  $\mu\text{m}$  de diamètre au fond du puits), entièrement réalisés en PDMS.*

*(B) Motif à grands puits (500  $\mu\text{m}$  de diamètre au fond du puits), avec le fond du puits composé en verre.*

✓ *Conception d'un modèle pour les puits en PDMS adaptés au T2ECs*

Afin d'optimiser la forme et la taille des puits à la culture des T2ECs, nous avons conçu un modèle de puits adaptés à leur forme, taille et cycle cellulaire. En effet, les T2ECs sont des cellules rondes en suspension et qui se divisent toutes les 18-22h. Ainsi, pour des observations de plusieurs heures il est fortement possible que des divisions cellulaires adviennent. Deux types de puits ont ainsi été conçus : des simples (Figure 2-15A) et des doubles (Figure 2-15B et Figure 2-15C). Ces derniers, dont deux formes ont été conçues (ellipse, Figure 2-15B ou binocle Figure 2-15C), devaient contraindre les deux cellules filles à se mettre côte à côte afin de pouvoir les suivre après division. La taille des T2ECs a été évaluée par rapport à la taille déterminée par microscopie électronique des TECs (Figure 2-16), des cellules extrêmement proches en morphologie, cytologie et ontogenèse des T2ECs (Pain *et al.*, 1991).

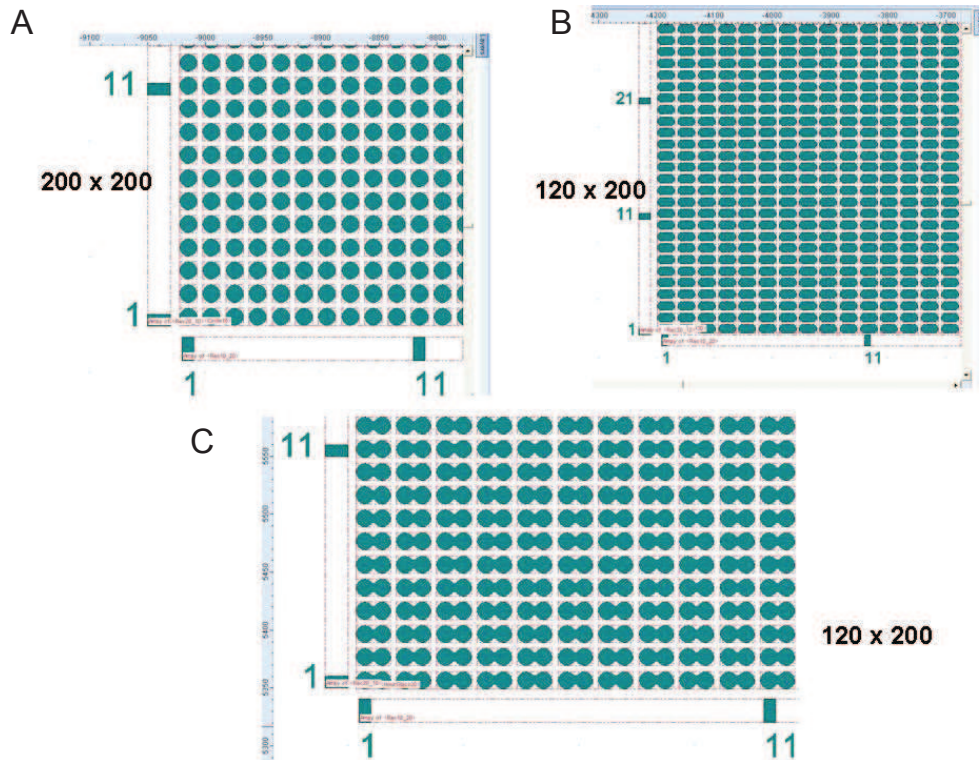


Figure 2-15 : Modèle de puits moulés en PDMS adaptés au T2ECs

Les schémas représentent des zooms de matrices de puits d'environ 200 puits par 120 ou 200 puits . L'échelle est donnée en microns sur chaque zoom. La profondeur du puits est de 30  $\mu\text{m}$ , quelque soit la forme.

- (A) Puits simple (pour une cellule), cercle de diamètre 15  $\mu\text{m}$
- (B) Puits double (pour deux cellules), ellipse de 15  $\mu\text{m}$  X 30  $\mu\text{m}$
- (C) Puits double (pour deux cellules), binocle de 15  $\mu\text{m}$  X 30  $\mu\text{m}$

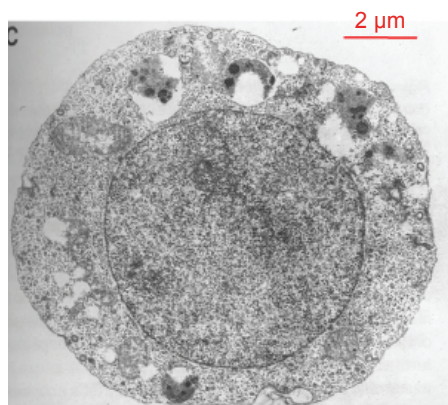


Figure 2-16 : Morphologie des TECs

Image d'une TEC obtenue par microscopie électronique (X6200). L'échelle est donnée par la barre (2  $\mu\text{m}$ ). Figure adaptée (Pain et al., 1991)

### 2.3.2.3 Validation des outils mis en place

Suite à la mise en place de la détection des trois protéines fluorescentes décrites plus haut : Cherry, KO et Cerulean, les gènes correspondants ont été clonés dans un vecteur permettant l'insertion dans le génome, grâce au système Tol2/Transposase mis au point et décrit précédemment (§2.1.3, p. 71). Leur validation a été réalisée par Mathieu Gineste au cours de son stage de M2, démontrant la possibilité d'exprimer ces trois protéines de manière stable.

Par ailleurs, afin d'identifier le point de l'insertion génomique relayée par le système Tol2/Transposase, la technique de spinklerette-PCR a été mise en place par José Viñuelas, en stage post-doctoral au sein de l'équipe. La stratégie et la validation de cette identification sont décrites dans notre papier méthodologique ((Mejía-Pous *et al.*, 2009), §2.1.3.2, p. 72). Nous avons par la suite déterminé que cette insertion est unique (~60 % des cas), double ou, au plus, triple (~30 % et ~10 %, respectivement). De plus, ces localisations sont différentes pour l'ensemble des cas analysés – une vingtaine à l'heure actuelle – et les analyses statistiques suggèrent une localisation aléatoire. Ainsi, au sein d'une population transfectée, la localisation chromosomique de cette insertion peut varier d'une cellule à l'autre. Or, l'expression d'un gène est fortement régulée par l'environnement chromatinien. Ainsi, dans cette population – initialement hétérogène d'un point de vue d'insertion génomique – il est tout à fait naturel d'observer une variation de l'expression des protéines fluorescentes, codées par des gènes situées dans des localisations différentes. Par conséquent, pour déterminer la variabilité de l'expression génique, il est nécessaire d'étudier une population de cellules génétiquement identiques en termes d'insertion chromosomique. Les T2ECs étant des cellules primaires, la mise en culture de cellules isolées par tri et leur expansion clonogénique, préalable à l'analyse, est donc limitée dans le temps. Cette procédure a été mise en place par Mathieu Gineste, dans un premier temps, et affinée ensuite par José Viñuelas.

L'association de l'expression stable grâce au système Tol2/Transposase et de l'expansion clonogénique des T2ECs exprimant des rapporteurs fluorescents a permis d'obtenir des clones issus d'une cellule, et leur détection par microscopie a été réalisée dans des puits PDMS. Nous avons ainsi observé qu'au sein d'un même clone, l'expression est variable d'une cellule à l'autre, alors que celles-ci sont issues d'une même et unique cellule au départ, et ont donc la même localisation chromosomique. De plus, à travers les différentes mises en place réalisées, nous avons pu établir les conditions nécessaires et les bases expérimentales nécessaires pour la mesure et la modélisation de la nature stochastique de l'expression des gènes. Ces résultats, ainsi que les bases expérimentales et de modélisation ont fait l'objet d'un chapitre du livre « *Le Hasard au cœur de la cellule* », sous

la direction de Jean-Jacques Kupiec, Olivier Gandrillon, Michel Morange et Marc Silberstein. Ce chapitre est présenté ci-dessous.

*2.3.3 Publication : Bases Moléculaires de la Stochasticité de l'Expression Génique*



---

**Mécanismes moléculaires et fonction biologique de la variabilité de l'expression génique à l'échelle de la cellule unique : une approche systémique**

**Antoine COULON, Guillaume BESLON, François CHATELAIN, Alexandra FUCHS, Olivier GANDRILLON, Mathieu GINESTE, Jean-Jacques KUPIEC, Camila MEJIA-PEREZ, Andras PALDI**

---

La nature stochastique de l'expression des gènes au niveau cellulaire a été démontrée par un grand nombre d'études<sup>1</sup>. La plupart de ces études ont été menées sur des organismes unicellulaires procaryotes<sup>2</sup> (notamment chez *E. coli*) ou eucaryotes<sup>3</sup> (chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*; cf. Blake *et al.* 2003, Raser & O'Shea 2004). Chez les eucaryotes supérieurs, les travaux pionniers effectués par Levsky conduisent à des conclusions similaires (Levsky *et al.* 2002). Plus récemment, des études utilisant des lignées de cellules humaines exprimant des protéines fluorescentes<sup>4</sup> (Sigal *et al.* 2006, Neildez-Nguyen *et al.* 2007), ou des analyses transcriptomiques<sup>5</sup> (Chang *et al.* 2008) ont été publiées, qui montrent l'importance de la stochasticité de l'expression, y compris chez l'homme. L'ensemble de ces travaux a clairement démontré qu'il

- 
1. Benzer (1953), (Ross *et al.* 1994), (Golding *et al.* 2005), (Elowitz *et al.* 2002); pour des revues récentes, cf. Kaern *et al.* (2005), Raser & O'Shea (2005), Maheshri & O'Shea (2007).
  2. Cellules simples sans noyau délimité par une membrane (par exemple les bactéries).
  3. Organismes dont les (ou la) cellules contiennent de nombreux organites délimités par des membranes, notamment le noyau qui contient l'ADN associé aux protéines dans la chromatine.
  4. Il s'agit d'une technique qui permet de visualiser la protéine, donc de la mettre en évidence dans une cellule et d'étudier ainsi la régulation de l'expression du gène qui la code. Pour ce faire, on utilise des gènes dits « rapporteurs » qui ont été modifiés de telle sorte que la protéine exprimée soit justement fluorescentes.
  5. Analyse de tous les ARN transcrits dans une cellule donc de tous les gènes exprimés dans cette cellule.

existe une hétérogénéité quantitative très importante et généralement sous-évaluée dans l'expression des gènes à l'échelle unicellulaire.

Il a été proposé que cette variabilité (souvent improprement appelée «bruit» et donc considérée comme négligeable) puisse jouer un rôle dans de nombreux phénomènes biologiques dont :

- un rôle adaptatif direct, par exemple en permettant à des lignées bactériennes de résister à des conditions environnementales temporairement défavorables<sup>6</sup>;
- un rôle dans le cycle cellulaire (Di Talia *et al.* 2007);
- un rôle dans le déroulement du cycle du virus HIV (Weinberger *et al.* 2005) et à l'échelle cellulaire chez certains procaryotes (Maamar *et al.* 2007);
- un rôle dans des processus de différenciation<sup>7</sup> cellulaire<sup>8</sup>;
- un rôle dans le développement des cancers (Laforge *et al.* 2005, Capp 2005).

Cependant, dans de nombreux cas, le lien causal direct entre la stochasticité et son éventuel rôle biologique (par exemple la différenciation) est difficile à établir. En outre, les causes moléculaires de la stochasticité dans l'expression génique restent encore mal comprises, notamment dans les cellules eucaryotes supérieures et en particulier chez l'homme<sup>9</sup>. Une des raisons tient certainement à ce que les techniques expérimentales requises pour valider les modèles sur ces cellules restent encore difficiles d'accès. Par ailleurs, la plupart des modèles, explicitement ou non, restent dans un cadre de pensée procaryote. Une autre raison tient au fait que peu d'équipes s'intéressent à la variabilité en tant que phénotype biologique *es qualité*, préférant se concentrer sur l'activité moyenne des gènes. C'est pourquoi nous avons décidé de changer radicalement notre point de vue sur l'expression génique et de constituer un consortium scientifique centré non plus sur le niveau d'expression des gènes mais sur les *variations* de ce niveau.

L'objectif de notre groupe est de développer un nouveau regard sur la stochasticité de l'expression génique. Nous nous plaçons pour cela dans le cadre de pensée dit de la «biologie des systèmes» dont l'objectif

6. Stern *et al.* (2007), Thattai & van Oudenaarden (2004), Balaban *et al.* (2004), Veening *et al.* (2008).

7. Les organismes multicellulaires possèdent de nombreuses cellules qui ont toutes le même génome mais qui n'expriment que des sous-ensembles de gènes, différents selon les types cellulaires, ce qui leur confère des propriétés différentes, par exemple: les cellules musculaires, osseuses, sanguines, etc.

8. Wernet *et al.* (2006), Hume (2000), Kupiec (1997), Paldi (2003), Chang *et al.* (2008).

9. Cai *et al.* (2006), Chubb *et al.* (2006), Raj *et al.* (2006), Neildez-Nguyen *et al.* (2007).

est d'identifier et de caractériser les grandes règles de fonctionnement des systèmes biologiques. Notre groupe pluridisciplinaire est composé de biologistes moléculaires et cellulaires, des spécialistes des nanobio-technologies capables de mesurer finement l'activité cellulaire, et des informaticiens modélisateurs.

Le développement de la biologie des systèmes nécessitera deux efforts simultanés : d'abord un changement de paradigme, qui consistera à accorder une plus grande attention aux interactions qu'aux objets qui les supportent, et en second lieu, un changement méthodologique en cherchant à établir un cycle vertueux entre l'observation d'un système biologique (biologie «humide») et son analyse théorique (biologie *in silico*). Cette méthodologie est parfois qualifiée d'approche «4M» car elle repose classiquement sur les quatre étapes suivantes :

- «Mesure» : il est avant tout nécessaire d'acquérir des données à haut débit, à des échelles souvent peu explorées. Dans le cas de l'analyse de la stochasticité, il est ainsi nécessaire de mesurer l'activité cellulaire sur cellule unique avec des résolutions temporelles fines.

- «Mining» : afin d'extraire l'information contenue dans les mesures, il faut déterminer (et extraire) les indicateurs les plus pertinents pour la question posée.

- «Modélisation» : les questions posées par la biologie des systèmes sont en général trop complexes pour être abordées directement. L'utilisation de modèles informatiques ou mathématiques permet de guider l'analyse<sup>10</sup>.

- «Manipulation» : une fois les hypothèses formulées dans le cadre des modèles, il convient de «revenir à la paillasse» pour tester leur validité en modifiant les conditions expérimentales.

L'objectif de cette approche est de mettre en place un «cercle vertueux», alliant expérimentation et modélisation et dans lequel chaque étape va idéalement apporter des informations susceptibles de guider l'ensemble du processus scientifique. Dans le cadre de notre consortium, nous conduisons des actions aux différentes étapes de l'approche «4M» afin d'explorer l'énigme scientifique que nous pose l'expression stochastique des gènes et de mieux comprendre ses relations avec la différenciation cellulaire.

10. Sur ce point, cf. *Matière première*, N°3/2008 : « Modèles, simulations, systèmes » (Kupiec *et al.* 2008), avec notamment les contributions de Pierre-Alain Braillard, d'Olivier Gandrillon, d'Evelyn Fox Keller, de Denis Noble.

## 1 – Mesure

Le niveau d'expression d'un gène n'est pas identique dans toutes les cellules d'une population, même clonale<sup>11</sup> (Neildez-Nguyen *et al.* 2007, Elowitz *et al.* 2002), à un instant donné, ni au cours du temps dans une cellule donnée. Ce phénomène, qualifié d'expression stochastique des gènes, a longtemps été ignoré par la biologie moléculaire, qui utilisait essentiellement des mesures moyennées sur des ensembles de cellules. Or, la mesure – et donc la compréhension – de l'activité stochastique des gènes passe nécessairement par l'acquisition de données sur cellules uniques afin de mesurer la variabilité des activités des cellules individuelles d'une population cellulaire par rapport à la moyenne de l'activité de toutes les cellules de cette population. Classiquement, on quantifie alors la stochasticité par la variance normalisée ( $\sigma^2/\mu^2$ )<sup>12</sup>.

De plus, l'analyse de la stochasticité impose de mesurer l'activité cellulaire régulièrement pendant de longues périodes de temps. Il est donc nécessaire d'acquérir des mesures temporelles en parallèle sur plusieurs cellules individuelles. On peut alors quantifier :

- *La variabilité de l'expression intercellulaire* : à chaque instant de mesure, on calcule la moyenne et la variance sur l'ensemble des cellules mesurées. On observe alors une évolution temporelle de la variabilité au sein de la population. Nous avons étudié ce type de variabilité dans des cellules humaines (cf. section 1.1).

- *La variabilité de l'expression intracellulaire* : pour chaque cellule, on calcule la moyenne et la variance temporelle des niveaux d'expression individuels. On obtient alors une valeur de variabilité pour chaque cellule mesurée. Ce type de mesure nécessite de pouvoir suivre au cours du temps des cellules uniques, ce qui nécessite un dispositif expérimental spécifique (cf. section 1.2).

### 1.1 – Mesures de l'expression intercellulaire chez l'homme

Il est possible de séparer la stochasticité d'un gène en deux composantes (Swain *et al.* 2002, Elowitz *et al.* 2002) : la part « intrinsèque » (stochasticité générée au niveau de la transcription du gène en ARN donc de son expression initiale ou « intrinsèque ») et la part « extrinsèque » (stochasticité générée aux étapes ultérieures de la synthèse des

11. C'est-à-dire une population dont tous les cellules sont issues d'une seule cellule et possèdent donc le même génome. Les différences observées entre ces cellules ne peuvent donc provenir de différences génétiques.

12.  $\sigma$  est la variance et  $\mu$  la moyenne. La variance est un paramètre statistique qui permet précisément de mesurer la variabilité des individus d'une population.

protéines : traduction des ARN en protéines et modifications épigénétiques<sup>13</sup>). Au niveau d'un gène donné, les fluctuations du promoteur entre plusieurs états (liés par exemple à l'état ouvert/fermé de la chromatine et/ou la présence/absence de facteurs de transcription), ainsi que le fait que l'expression soit un processus multi-étapes (transcription puis traduction) permettent de rendre compte de nombreuses propriétés de la stochasticité intrinsèque et extrinsèque<sup>14</sup>. Un de nos premiers objectifs a donc été de quantifier l'influence de ces deux sources de stochasticité dans un système eucaryote.

La variation intercellulaire à un instant donné peut être mesurée par un dispositif de type FACS (Fluorescent Activated Cell Sorter). Nous avons utilisé ce dispositif pour mesurer, chez l'homme, les variations d'expression dues aux fluctuations de la chromatine autour du promoteur et celles dues à des sources «extrinsèques» (Neildez-Nguyen *et al.* 2007). En effet, chez les eucaryotes, et contrairement aux bactéries, l'ADN est étroitement associé à des protéines, les histones, pour former le complexe chromatinien. L'unité structurelle de la chromatine est le nucléosome, composé d'un complexe de huit molécules d'histones autour duquel l'ADN fait deux tours, ce qui peut interdire l'accès du complexe de transcription à l'ADN. Afin de permettre l'initiation de la transcription, le nucléosome doit donc se dissocier de l'ADN ou s'éloigner du promoteur. La chromatine n'étant pas une structure figée, les nucléosomes s'associent et se dissocient continuellement (Misteli 2001) et la vitesse de ce *turn-over* dépend largement des modifications post-traductionnelles des histones. Ces modifications, qu'on appelle «épigénétiques», comme l'acétylation, la méthylation ou la poly(ADP-ribosyl)ation, agissent sur les forces d'interactions entre les histones et l'ADN. Nous savons que les régions du génome contenant des gènes activement transcrits dans la cellule portent des modifications épigénétiques différentes des régions réprimées. Or, ces modifications sont catalysées par des enzymes, et comme toute réaction enzymatique dans la cellule, elles sont soumises à des fluctuations stochastiques dont l'origine est liée à l'agitation ther-

13. La séquence nucléotidique (l'information génétique) de l'ADN est d'abord transcrite en ARN (transcription). Puis, cet ARN est lui-même traduit en une chaîne linéaire d'acides aminés (traduction). À son tour, cette chaîne se replie pour former une structure tridimensionnelle. Finalement, cette structure tridimensionnelle subit, en général sous l'action d'enzymes, des modifications dites post-traductionnelles ou épigénétiques, correspondant à des modifications chimiques des acides aminés de la protéine. Selon la théorie en vigueur les propriétés d'une protéine dépendent de sa structure tridimensionnelle qui, par sa forme et les charges électriques, permet les interactions avec d'autres molécules

14. Kepler & Elston (2001), Blake *et al.* (2003), Thattai & van Oudenaarden (2001), Paulsson (2004).

mique<sup>15</sup> qui affecte toujours les molécules d'un système biologique. Les fluctuations épigénétiques sont donc une source potentielle de variation de l'expression génique.

Nous avons mis au point un système expérimental qui permet d'isoler les variations de transcription dues aux fluctuations de la chromatine autour du promoteur<sup>16</sup> de celles dues à des sources «extrinsèques» (Neildez-Nguyen *et al.* 2007). Ce système est basé sur l'utilisation de deux gènes rapporteurs codant pour une protéine fluorescente jaune (YFP) ou bleu (CFP) et contrôlés par un promoteur ubiquitaire identique. Ces gènes sont exprimés dans des cellules humaines (neuroblastomes de la lignée 911). Les sources extrinsèques induisent les mêmes variations du niveau de fluorescence des deux protéines, tandis que les sources intrinsèques (dont les fluctuations de la chromatine) induisent des variations non corrélées. Les copies du gène rapporteur ayant été insérées dans deux positions différentes sur le génome, les variations non corrélées du niveau de fluorescence incluent la part de stochasticité due à la chromatine autour des deux sites d'intégration. On peut alors mesurer la variation non corrélée dans une population cellulaire en croissance par cytométrie en flux. Enfin, en comparant le niveau de cette variation entre des populations de cellules dans lesquelles les gènes rapporteurs ont été insérés sur des sites différents, on évalue la part de la variation due à des sources «épigénétiques». Pour les populations de cellules clonales maintenues dans des conditions similaires, nous avons constaté que le niveau de variations d'origine épigénétique était inversement corrélé au niveau moyen d'expression des transgènes<sup>17</sup>. De façon surprenante, cette variation s'est avérée tout à fait comparable à la variation «extrinsèque», suggérant que les fluctuations de la chromatine ont un poids très important dans la variation du niveau d'expression d'un gène. Ces observations ouvrent la voie à l'analyse du rôle biologique que les fluctuations d'expression génique, en général, et celles dues aux facteurs épigénétiques en particulier, jouent dans l'émergence de nouveaux profils

15. Dans la matière, quel que soit son état, les atomes et molécules ne sont jamais immobiles mais en perpétuelle agitation. Ce mouvement continu est corrélé à la température: il est de moins en moins important lorsque la température diminue (il cesse totalement au zéro absolu) et inversement. Bien que soumis aux lois déterministes de Newton, ce mouvement des atomes ou molécules ne peut être prédit que de manière probabiliste, comme c'est le cas du mouvement d'une pièce de monnaie dans le jeu de pile ou face. La diffusion des molécules se fait par ce mouvement brownien aléatoire qui en l'absence de contraintes tend à homogénéiser leurs concentrations.

16. Séquence d'ADN située en amont des gènes où l'enzyme qui permet leur transcription se fixe.

17. Gène introduit artificiellement dans le génome d'une cellule. Ici, il s'agit des gènes rapporteurs exprimant les protéines fluorescentes.

d'expression génique et, par conséquent, dans le processus de différenciation cellulaire.

### 1.2 – Mesures sur cellules uniques et isolées

Afin de mesurer la stochasticité de l'expression intracellulaire, il est nécessaire d'isoler les cellules et de les suivre individuellement tout au long de l'expérience (ce que ne permet pas le FACS). Pour cela, nous devons utiliser des cellules aisément manipulables, c'est pourquoi nous utilisons un autre modèle cellulaire. Ces cellules, appelées T2ECs (Gandrillon *et al.* 1999), sont des cellules de poulet issues de cultures primaires, non altérées génétiquement. De plus, ce sont des cellules souches érythrocytaires que l'on peut maintenir *ex vivo* dans un état d'autorenouvellement (en présence des facteurs TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  et dexaméthasone) ou faire basculer à volonté dans un programme de différenciation terminale (en changeant la combinaison des facteurs externes présents dans le milieu). Enfin, ces cellules peuvent être transformées en cellules cancéreuses (en les bloquant en état d'autorenouvellement) par différents oncogènes<sup>18</sup> (dont l'oncogène v-erbA; cf. Gandrillon 2002). Ces propriétés nous permettront ultérieurement de manipuler ces cellules pour tester l'impact de la stochasticité de l'expression génique sur les phénomènes de différenciation sains ou pathologiques (cf. section 4).

Récemment, nous avons démontré la possibilité d'exprimer dans ces cellules simultanément plusieurs rapporteurs fluorescents, les protéines mKO, Cherry et Cerulean (Shaner *et al.* 2005). Ces rapporteurs sont intégrés aux T2ECs puis les cellules sont triées par FACS sur la base de leur fluorescence et clonées individuellement. On observe alors clairement que le niveau de fluorescence à un instant donné est extrêmement variable entre différentes cellules du même clone (cf. fig. 1, page suivante).

Les cellules dérivant d'un clone sontensemencées sur un moule dans lequel chaque cellule est individualisée dans un puits. La fluorescence est ensuite enregistrée avec une technique appropriée sur les cellules individuelles à une fréquence fixe (cf. fig. 2, page suivante). Cette fréquence d'acquisition est déterminée sur la base d'une double contrainte: d'une part, la toxicité à terme de l'illumination fluorescente des rapporteurs, et d'autre part, la nécessité d'acquérir des images à une fréquence suffisante pour caractériser la stochasticité.

Nous devons noter que les mesures préliminaires réalisées nous ont montré que les cellules résistent bien aux contraintes imposées par le

18. Gènes supposés induire un cancer. (Cf. le chapitre de Jean-Pascal Capp, ce volume.)

Figure 1. Analyse de la fluorescence émise par des clones de T2ECs transfectées avec un vecteur exprimant la protéine Cherry (1<sup>re</sup> ligne), KO (2<sup>e</sup> ligne) ou les deux simultanément (3<sup>e</sup> ligne). Les clones sont visualisés soit en lumière transmise (1<sup>re</sup> colonne), soit en fluorescence avec un filtre ne laissant passer que la fluorescence Cherry-spécifique, soit avec un filtre ne laissant passer que la fluorescence KO-spécifique. Les flèches pointent deux cellules dans le même plan focal, qui montrent deux niveaux très différents de l'expression de la protéine KO.

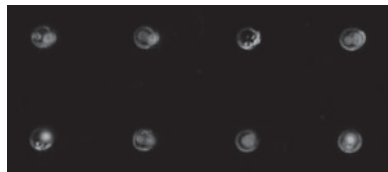
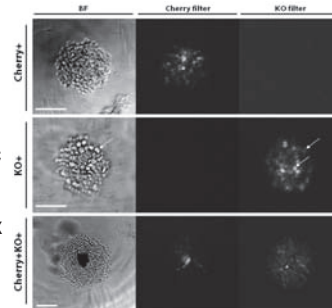


Figure 2. Cellules T2ECs isolées dans des puits sur moule PDMS (King *et al.* 2007). Sept des huit puits sont occupés par des cellules fluorescentes (images en fausses couleurs traduisant le niveau d'expression des gènes rapporteurs).

système de mesure et, en particulier, que la toxicité des marqueurs fluorescents reste faible, ce qui autorise l'acquisition d'image avec une très bonne résolution temporelle.

Les valeurs acquises sont évidemment entachées d'un bruit de mesure (les causes et les formes de ce bruit sont multiples: caméra, lampe, dégradation des protéines fluorescentes, etc.). Ce bruit est caractérisé afin de quantifier la part de variabilité d'origine biologique dans les données. Une étude des paramètres expérimentaux du système (demi-vie des protéines fluorescentes, fréquence d'acquisition, etc.) nous permet d'estimer leur influence sur l'analyse des données.

## 2 – Mining

Les informations récoltées par vidéo-microscopie représentent des volumes de données considérables qu'il convient de traiter pour en extraire les informations pertinentes. Nous avons vu que la mesure classique de la variation d'activité des gènes est la variance normalisée par la moyenne au carré. Cependant, ces «statistiques ponctuelles» n'apportent qu'une information parcellaire sur le système étudié. Dans le présent projet, nous nous proposons d'analyser les données d'expression avec les outils de la théorie du signal (spectres de puissance, autocorrélations). Ces mesures, rarement utilisées dans la littérature expérimentale de biologie cellulaire, autorisent une caractérisation beaucoup plus fine des propriétés stochastiques et permettant notamment d'obtenir des informations sur la dynamique du système (cf. Warren *et al.* 2006, et les références associées). Notons par ailleurs que l'indicateur synthétique  $\sigma^2/\mu^2$  peut être



directement déduit du spectre de puissance. En outre, nous utiliserons ce formalisme à la fois pour caractériser les modèles et analyser les données expérimentales. Il constitue en effet une passerelle idéale entre ces deux mondes et nous permettra de comparer les résultats expérimentaux avec les prédictions des modèles. Cette comparaison devrait permettre de valider les modèles, et si nécessaire de les raffiner pour les rendre plus aptes à rendre compte des données expérimentales.

Le spectre de puissance seul ne permet cependant pas de caractériser totalement un signal. En effet, il porte une information temporelle sur les variations mais reste relativement insensible aux valeurs exactes que peut prendre le signal. C'est pourquoi nous le complétons avec un histogramme du signal (fig. 3).

À partir des mesures de fluorescences, nous calculons les spectres de puissance et les histogrammes pour chaque cellule indépendante. Afin de mesurer l'intérêt du spectre de puissance pour décrire l'activité

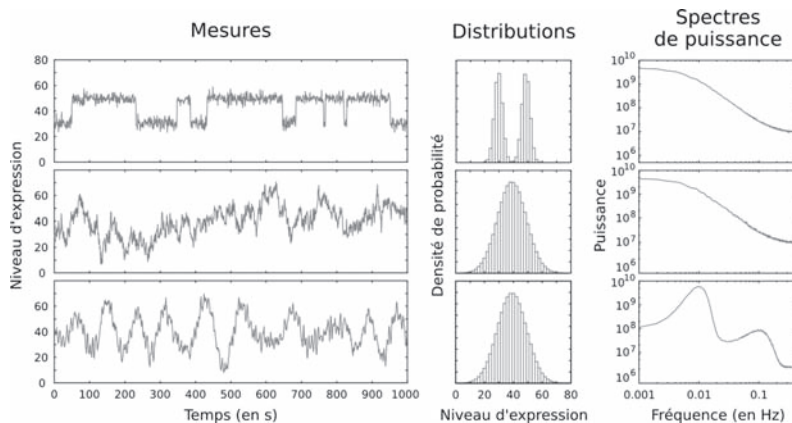


Figure 3. Caractérisation d'un signal temporel par la distribution et le spectre de puissance. Les trois signaux de gauche ont la même variance normalisée et ne sont donc pas distinguables en termes « d'intensité de la stochasticité ». Cependant, les histogrammes (au centre) et les spectres de puissance (à droite) permettent de mettre en évidence les particularités des différents signaux. Le premier signal (en haut) est bimodal, ce qui est visible sur l'histogramme mais pas sur le spectre de puissance (qui montre par ailleurs que le signal n'a aucun caractère périodique). À l'inverse, le troisième signal est monomodal (l'histogramme ne montre aucune caractéristique particulière) mais le spectre de puissance montre deux composantes périodiques (le signal est bien stochastique mais il a tendance à osciller avec des périodes approximatives de 10 et 100 secondes). Le signal du milieu est lui monomodal et faiblement corrélé. Il ne peut donc pas être distingué du premier par son spectre de puissance ni du troisième par son histogramme (rappelons que ces trois signaux ne peuvent pas être distingués les uns des autres en termes de variance normalisée). Cet exemple simple montre l'intérêt des mesures couplées (histogramme et spectre) pour la caractérisation des signaux complexes.

transcriptionnelle, nous avons réalisé des analyses préliminaires sur les données recueillies auprès de l'équipe d'Alon (Sigal *et al.* 2006). Les premiers résultats se révèlent prometteurs (fig. 4). La stochasticité de la transcription semble différente pour chacun des gènes. En outre, les allures variées des courbes de puissance indiquent des dynamiques différentes. Par exemple, le gène DDX5 montre un niveau de bruit supérieur aux faibles fréquences. De façon symétrique, le gène SFRS10 montre un niveau de bruit supérieur aux fréquences élevées. Ceci pourrait révéler l'existence de mécanismes moléculaires de contrôle de la stochasticité différents selon les gènes.

Une bonne analyse de signal doit être préparée dès l'étape d'acquisition: la fréquence de mesure doit être au moins deux fois la fréquence maximum que nous voulons observer dans le spectre de puissance. Réciproquement, la durée de mesure impacte la fréquence minimum observable dans le spectre, de même que la qualité globale du spectre (plus la mesure est longue, plus le spectre de puissance est précis). Sigal *et al.* observent le signal pendant une longue période (48heures) mais ne mesure le signal que toutes les 10 minutes. La fréquence d'acquisition est donc très basse (moins de 0,002 hertz), ce qui restreint fortement l'information disponible (tout phénomène plus rapide passera fatalement inaperçu). Il est donc probable qu'un tel signal ne puisse pas fournir d'informations pertinentes sur les origines moléculaires de la stochasticité (ces événements moléculaires – association/dissociation des facteurs de trans

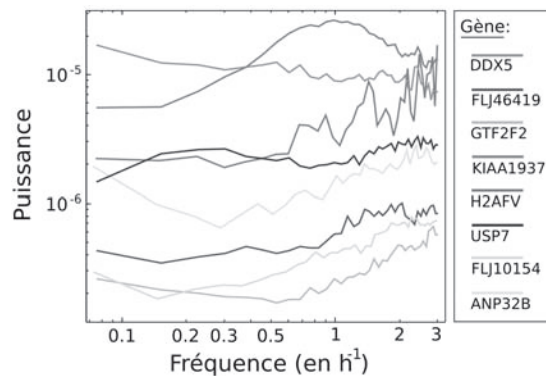


Figure 4. Spectres de puissance de la dérivée du niveau d'expression ( $dE/dt$ ) pour différents gènes, à partir des données de Sigal *et al.* (2006). La forme du spectre étant similaire d'une cellule à l'autre, chaque spectre de cette figure représente une moyenne sur plusieurs cellules. Il s'agit ici d'une limitation importante imposée par la fréquence des données de Sigal *et al.* Nous souhaitons quant à nous acquérir des informations suffisantes pour pouvoir retracer ces spectres à l'échelle de cellules uniques.

cription, ouverture/fermeture de la chromatine, association du complexe de transcription, etc. – se produisent en effet sur des échelles de temps qui vont de la seconde à quelques minutes). Les méthodes de mesure sur cellule unique présentées ci-dessus nous permettent de réaliser des expériences avec une fréquence de mesure plus élevée (de l'ordre de quelques dizaines de seconde). Ainsi, nous pourrions recueillir des données très précises, acquérir le signal en temps réel et calculer les caractéristiques de signal avec une précision jusqu'ici inégalée. Ces données permettront alors d'émettre des hypothèses précises sur les causes premières du bruit de transcription mais aussi sur sa possible fonction biologique.

### 3 – Modélisation

La complexité des phénomènes de transcription, à laquelle s'ajoute l'impossibilité d'observer directement les mécanismes moléculaires en cause, rend indispensable l'utilisation de modèles informatiques, mathématiques ou biophysiques. De fait, la question de l'expression stochastique des gènes peut être abordée d'un point de vue théorique par une grande diversité de techniques allant des modèles analytiques de physique statistique aux algorithmes de simulation<sup>19</sup>. Parmi les modèles issus de la physique statistique, on peut citer les équations maîtresses, l'équation de Fokker-Planck et le théorème de fluctuation-dissipation. Si, dans certaines situations simples, ces modèles peuvent être résolus analytiquement (ce qui permet de caractériser l'ensemble des configurations d'un système donné), dans la plupart des cas, ils doivent être résolus numériquement (dans ce cas, on ne connaît le comportement du système que pour les valeurs des jeux de paramètres testés). Lorsque le système d'intérêt est plus complexe encore, il devient nécessaire de recourir à la simulation. Dans ce dernier cas, nous n'avons plus accès qu'au comportement du système pour un jeu de paramètres donné et dans le cas d'une exécution particulière (dans le cas d'un système stochastique, chaque exécution produit un comportement spécifique, éventuellement très différent du comportement « moyen »). Parmi les algorithmes de simulation, on peut citer les algorithmes événementiels de type Gillespie SSA, les modèles utilisant l'équation de Langevin ou les modèles individu-centrés. Chaque technique impose des approximations spécifiques (par exemple une description discrète ou continue, la prise en compte de l'espace ou non) et permet de rendre compte de différents aspects du système biologique étudié.

19. Gibson & Mjolsness (2004), Turner *et al.* (2004), Maheshri & O'Shea (2007).

Fondamentalement, le caractère stochastique de l'expression génique est dû à la nature discrète des événements moléculaires et cellulaires (par exemple l'initiation de la transcription ou le nombre fini de protéines traduites par transcrit). Ce phénomène a été étudié dès la fin des années 1970. Cependant, plus récemment, une grande abondance de mécanismes de modulation de la stochasticité ont été mis en évidence (Paulsson 2005). Certains de ces mécanismes permettent d'amplifier ou de réduire le «bruit moléculaire» initial. Ainsi, les boucles d'autorégulation (positives ou négatives) ont un impact important sur le niveau de stochasticité<sup>20</sup>. Lorsqu'on considère plusieurs gènes en interaction, de nombreuses propriétés apparaissent (par exemple la multistabilité [Thattai & van Oudenaarden 2001]) et plusieurs auteurs ont étudié la transmission de la stochasticité au sein d'un réseau de gènes (Blake *et al.* 2003, Maheshri & O'Shea 2007). Tous ces modèles négligent les aspects spatiaux mais ceux-ci entrent également en jeu (Misteli 2007). La présence en faible nombre de facteurs de transcription qui diffusent dans la cellule créée – du fait du caractère stochastique du mouvement brownien de ces facteurs – des différences de concentration locales dans l'espace de la cellule qui peuvent se traduire par des «poussées» de transcription lorsque ces facteurs de transcription sont en quantité suffisante et proches du promoteur (van Zon *et al.* 2006). Ces aspects spatiaux sont difficiles à prendre en compte dans les modèles analytiques et à intégrer efficacement aux simulations événementielles (Turner *et al.* 2004). Ils demandent généralement des modèles dédiés, intégrant explicitement les dimensions d'espace et de temps (Bork & Serrano 2005, Lemerle *et al.* 2005).

Nous développons actuellement deux types de modèles, qui explorent des sources de stochasticité encore peu prises en compte, et dont les formalismes se complètent et se nourrissent.

### 3.1 – Modélisation de la dynamique du promoteur

Notre premier modèle est destiné à rendre compte de la dynamique stochastique engendrée par les associations/dissociations d'un nombre arbitraire de facteurs de transcription sur le promoteur d'un gène (quand la plupart des modèles se limitent à un ou deux facteurs – chez les eucaryotes supérieurs, il est courant qu'un promoteur soit contrôlé par plusieurs dizaines de facteurs de transcription). Ces associations/dissociations provoquent des changements d'état du promoteurs qui se manifestent par des taux de transcription différents. Nous modélisons

20. Thattai & van Oudenaarden (2001), Paulsson (2004), Tao *et al.* (2007), Becskei *et al.* (2001).

les variations de la concentration en ARNm (par un modèle de synthèse/dégradation) et, par un processus similaire, les concentrations de protéines. Ce dernier niveau nous permet de «boucler la boucle» puisque ce sont ces concentrations que nous mesurons expérimentalement.

Une des principales particularité de ce modèle est son grand pouvoir d'expression. En effet, il intègre les aspects de coopération et de compétition entre les facteurs de transcription, et peut rendre compte des modifications épigénétiques éventuellement médiées par des enzymes (celles-ci pouvant être explicitement intégrées au modèle). Or, ces modifications (ouverture/fermeture de la chromatine, déplacement des nucléosomes, modifications post-traductionnelle des différents histones, action enzymatique des facteurs de transcription sur la chromatine, etc.) semblent prendre une part importante dans la génération de la stochasticité transcriptionnelle (cf. section 2.1). Enfin, alors que dans la plupart des modèles, le promoteur est considéré comme un système binaire (ouvert/fermé), nous associons un niveau de transcription spécifique à chaque état du système, ce qui est plus générique et permet de rendre compte d'un plus grand nombre de situations biologiques (fig. 5).

Ce modèle est basé sur un formalisme mathématique (processus markovien en temps continu) unifiant l'ensemble des mécanismes biologiques décrits, ce qui permet une résolution analytique ou numérique suivant la complexité du système. Sa résolution nous permet de déterminer les caractéristiques stochastiques des événements de transcription et des

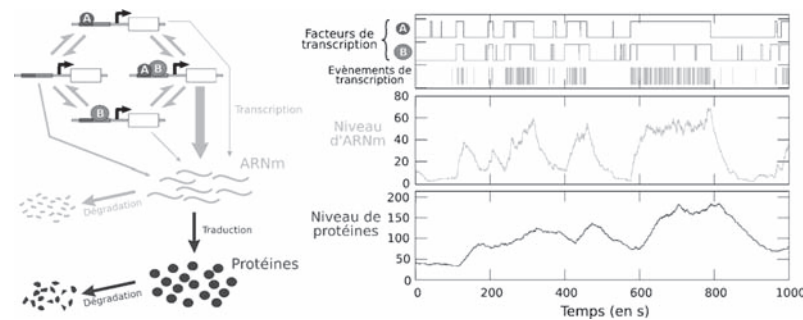


Figure 5. Dans ce modèle de l'expression stochastique d'un gène (à gauche), la dynamique du promoteur (ici illustrée par un cas simple à deux facteurs de transcription) est décrite de façon générique et peut représenter les influences mutuelles entre un nombre arbitraire de facteurs de transcription et de facteurs épigénétiques. Les événements moléculaires de synthèse et de dégradation des molécules d'ARNm et de protéines sont considérés explicitement. La simulation d'un tel système (à droite) illustre les différents signaux pouvant ensuite être caractérisés par les indicateurs évoqués précédemment (cf. section 3). Mais la simulation ne constitue qu'une réalisation donnée de la dynamique du système et la prédiction de ces mêmes indicateurs par des méthodes analytiques se révèle être bien plus efficace.

niveaux d'expression en termes de spectre de puissance et de distribution. En outre, sa simulation par un algorithme événementiel de Gillespie nous permet de calculer des réalisations effectives de la dynamique du modèle. Ce couplage entre exploration analytique et simulation nous permet de tester l'intégration d'autres paramètres dans le modèle (par exemple pour étudier plus finement l'influence de la stochasticité extrinsèque ou pour intégrer le modèle dans un réseau de gènes [Coulonet *al.*, soumis]).

### 3.2 – Modélisation 4D

Les aspects spatiaux, bien que souvent négligés, sont prépondérants dans de nombreux processus biologiques, en particulier dans le noyau des cellules eucaryotes (Misteli 2007). Les quelques modèles qui permettent, à cette échelle, de les prendre en compte font souvent des approximations fortes, négligeant par exemple les interactions électromagnétiques entre molécules (Turner *et al.* 2004, van Zon *et al.* 2006). C'est pourquoi nous développons un modèle individu-centré «4D» (trois dimensions d'espace plus le temps) pour aborder ces questions et étudier l'influence de la diffusion des facteurs de transcription et de leurs interactions entre eux ou avec la chromatine. Une première version de ce modèle (Soula *et al.* 2005) considérait les protéines comme des sphères dures avec des interactions d'association/dissociation probabilistes. Elle nous a permis d'étudier les dynamiques d'agrégation. La deuxième version (Coulon *et al.* 2008), quant à elle, considère les protéines comme des sphères souples interagissant par des champs de forces correspondant aux forces électromagnétiques intermoléculaires (force électrostatique et forces de van der Waals)<sup>21</sup>. Leur déplacement correspond à une diffusion brownienne en 3D influencée par les interactions avec les molécules voisines (cf. fig. 6). Une extension du modèle dans laquelle les protéines pourront être représentées par des systèmes de sphères souples (représentation multidomaines) est en cours de développement.

Ce modèle individu-centré met en évidence l'influence des approximations du premier modèle (en particulier les hypothèses d'homogénéité spatiale), permettant alors de mieux cerner ses limites. Inversement, la description analytique propre au modèle markovien nous permet d'aider à l'interprétation des simulations issues du modèle 4D. En outre, les résultats obtenus sur un des deux modèles sont susceptibles de motiver de nouvelles expériences sur l'autre (en plus, bien évidemment, des expériences sur cellules «réelles»). Plutôt que de s'opposer, ces deux modèles

21. Cf. aussi Olivier Gandrillon, «Modélisation moléculaire individu-centrée: contribution à une biologie des systèmes», in Kupiec *et al.* (2008).

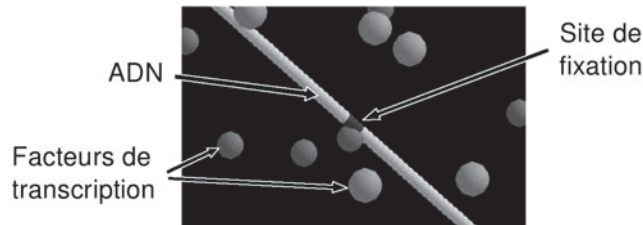


Figure 6. Modélisation 4D de l'interaction entre facteurs de transcription (ici de deux types différents) et site de fixation (expérience préliminaire). Les facteurs de transcription diffusent dans le noyau de la cellule et interagissent entre eux et avec l'ADN (ici supposé nu). Suivant les interactions entre les facteurs de transcription, les propriétés temporelles du signal vont être différentes.

se complètent donc, en permettant aux biologistes et aux modélisateurs de développer un regard plus complet sur leur système d'intérêt.

#### 4 – Manipulation

La démarche méthodologique suivie dans ce projet (la boucle «4M») suppose la mise en œuvre d'itérations entre biologie humide et biologie *in silico*. En l'état, nous sommes en train de mettre en place la première itération en préparant chacune des étapes (bien que cette boucle soit décrite séquentiellement, chaque étape est susceptible d'enrichir les autres). Il est donc difficile *a priori* de prévoir les résultats des modèles (même si des résultats préliminaires ont été obtenus) ou les résultats expérimentaux (même les dispositifs d'acquisition ont déjà été testés et qu'ils ont permis l'acquisition des premières mesures de fluorescence). *A fortiori*, nous ne pouvons pas anticiper sur les conclusions qui pourraient être tirées de la confrontation des modèles et des données, d'autant plus que la confrontation données-modèles nous conduira certainement à réviser nos modèles.

Néanmoins, il est possible de proposer plusieurs séries d'expériences au cours desquelles la manipulation du système cellulaire (et des modèles associés) permettrait de valider les hypothèses formulées et d'étudier l'influence de la stochasticité, par exemple sur la différenciation cellulaire. Ainsi, une façon classique de tester et d'améliorer les modèles consiste à faire subir des «perturbations» à l'objet biologique par rapport à son régime de fonctionnement habituel. Sur nos modèles cellulaires, ces perturbations pourraient par exemple prendre la forme d'une variation de température ou d'une modification de la composition du milieu.

Les propriétés de diffusion ainsi que les constantes d'association/dissociation des facteurs de transcription sont dépendantes de la température. Ces dépendances sont relativement bien connues à l'échelle moléculaire,

mais l'influence de ces changements sur la dynamique transcriptionnelle est difficile à prévoir intuitivement. Les deux modèles intégrant explicitement la température (mais de façon différente), leur confrontation avec le modèle cellulaire promet donc d'être très intéressante, d'autant plus que des expériences préliminaires nous ont montré que la différenciation des T2ECS semble être fortement induite par une élévation modeste de la température (Mejia-Perez & Gandrillon, données non publiées).

Un deuxième facteur de perturbation que nous pourrions étudier est l'induction de la différenciation par l'introduction de facteurs externes dans le milieu de culture. En effet, il a été proposé que la stochasticité joue un rôle déterminant dans le processus de différenciation et nos expérimentations permettraient d'apporter un éclairage nouveau sur ces questions. En effet, les différentes mesures possibles de la stochasticité au cours du processus de différenciation nous permettra d'établir les liens entre ces deux phénomènes. Ainsi, si la différenciation procède par un processus de hasard-sélection (Kupiec 1997), l'induction des facteurs de différenciation devrait faire varier de manière significative la stochasticité de l'expression des gènes avant de conduire à la différenciation. Dans ce cadre, il pourra être intéressant d'étudier spécifiquement les gènes dont l'expression moyenne varie au cours de la différenciation et de comparer leur activité stochastique à celle des autres gènes. Il est à noter que les interactions cellules-cellules jouent probablement un rôle fondamental dans ce processus (Laforge *et al.* 2005, Neildez-Nguyen *et al.* 2007)<sup>22</sup>, ce qui peut nous conduire à reformuler nos modèles ou nos expériences pour tenir compte de ces interactions.

### 5 – Conclusion et perspectives

La stochasticité de l'expression génique représente une réelle interrogation pour la biologie cellulaire et impose des changements de point de vue quant à ce qu'on peut qualifier (ou non) de fonctionnement «normal» de la cellule. Afin de mieux comprendre ces mécanismes, leurs causes et leurs implications, nous proposons un programme de recherche en quatre étapes (itérées) alliant expérimentation humide et modélisation. Bien que l'ensemble du consortium soit d'ores et déjà mobilisé autour de ce programme de recherche, nous ne pouvons pour l'instant avancer que des conclusions partielles (premières observations confirmant l'existence et l'importance quantitative de la stochasticité dans l'expression génique sur différents types cellulaires, complexité de la dynamique des facteurs

22. Cf. le chapitre de Jérôme Glisse *et al.*, ce volume.



responsables de la stochasticité à l'échelle du promoteur, etc.). Il est néanmoins clair que ce travail, quels qu'en soient les résultats, permettra de dégager de nouvelles connaissances sur le fonctionnement cellulaire. En effet, le développement de techniques de pointe en analyses sur cellules uniques à de telles résolutions temporelles est un enjeu technologique majeur en biologie des systèmes. Il permettra de disposer de données à des échelles qui nous sont aujourd'hui pratiquement inaccessibles.

En termes méthodologiques, si nous avons présenté le projet sous la forme d'un cycle, il convient de rester conscient que la confrontation données-modèles n'a de sens que si elle est itérative sur une boucle courte, c'est-à-dire si toutes les étapes (et tous les domaines de compétence) sont susceptibles de se fertiliser mutuellement. Ainsi, les premières analyses de données de fluorescence (Sigal *et al.* 2006) nous ont permis de réfléchir au formalisme permettant de passer de l'un à l'autre (ici les spectres de puissance et les distributions). On peut aussi noter que les procédures d'acquisition de la fluorescence ont été modifiées pour être compatibles avec ce formalisme. De même, la mise en place des modèles permet de spécifier de nouveaux paramètres à mesurer lors des expérimentations (ce qui peut aussi demander des expériences complémentaires) et de définir les conditions expérimentales susceptibles d'apporter le plus d'informations. La confrontation est donc plus un processus qu'un moment donné dans le projet. Dans notre cadre, cela est rendu possible par une exigence permanente de communication entre les différentes disciplines composant le consortium. En effet, l'interdisciplinarité ne se résume pas à la juxtaposition, au sein d'un groupe projet, de disciplines différentes mais bien à l'intégration de ces différentes disciplines de façon à piloter collectivement le projet scientifique et à en établir ensemble les conclusions.

Bien qu'ambitieux, ce projet n'aborde qu'une partie des questions liées à la stochasticité de l'expression génique. Ainsi, nous ne mesurons ici la stochasticité qu'à un niveau donné (les concentrations protéiques). À terme, il sera probablement nécessaire de compléter ces mesures pour valider les modèles moléculaires et/ou en affiner le paramétrage. Dans ce cadre, il nous semble particulièrement pertinent de mesurer l'activité transcriptionnelle en temps réel directement au niveau du promoteur. Les techniques d'imagerie à l'échelle moléculaire progressent à une vitesse telle qu'il est aujourd'hui possible de mesurer les temps de résidence des facteurs de transcription sur un promoteur donné. De telles mesures permettraient d'affiner considérablement nos modèles. De même, du fait des temps de traduction et de maturation des protéines fluorescentes, les comparaisons directes modèles/mesures seraient beaucoup plus efficaces

si nous pouvions mesurer directement les molécules d'ARNm et non le produit de leur traduction. Ceci implique la mise en œuvre de techniques de « balises moléculaires » (Chen *et al.* 2007) que nous envisageons d'intégrer au consortium.

Enfin, si nous avons pour l'instant abordé la question de la stochasticité dans le cadre de cellules saines, il est important de noter que ce processus pourrait aussi avoir un rôle clé dans le développement de nombreuses pathologies et, tout particulièrement, dans les mécanismes cancéreux. Même si cette question n'est pas centrale dans le contexte actuel du projet, il est clair pour tous les membres du consortium qu'elle en constitue une des perspectives les plus enthousiasmantes. Dans ce cadre, des expérimentations préliminaires peuvent déjà être envisagées puisque les cellules T2ECs utilisées pour la mesure de la stochasticité sur cellule unique peuvent être transformées en lignées cancéreuses à travers l'expression de l'oncogène v-erbA (Gandrillon 2002). Il nous sera donc relativement aisé de mesurer la stochasticité de l'expression des gènes afin d'identifier les différences entre les lignées normales et cancéreuses.

#### Références bibliographiques

- BALABAN N.Q., MERRIN J., CHAIT R., KOWALIK L. & LEIBLER S. (2004), "Bacterial persistence as a phenotypic switch", *Science*, 305 : 1622-1625.
- BECSKEI A., SERAPHIN B. & SERRANO L. (2001), "Positive feedback in eukaryotic gene networks: cell differentiation by graded to binary response conversion", *Embo J.*, 20 : 2528-2535.
- BENZER S. (1953), "Induced synthesis of enzymes in bacteria analyzed at the cellular level", *Biochim. Biophys. Acta*, 11 : 383-395.
- BLAKE W.J., CANTOR C.R. & COLLINS J.J. (2003), "Noise in eukaryotic gene expression", *Nature*, 422 : 633-637.
- BORK P. & SERRANO L. (2005), "Towards cellular systems in 4D", *Cell*, 121 : 507-509.
- CAI L., FRIEDMAN N. & XIE X.S. (2006), "Stochastic protein expression in individual cells at the single molecule level", *Nature*, 440 : 358-362.
- CAPP J.-P. (2005), "Stochastic gene expression, disruption of tissue averaging effects and cancer as a disease of development", *Bioessays*, 27 : 1277-1285.
- CHANG H.H., HEMBERG M., BARAHONA M., INGBER D.E. & HUANG S. (2008), "Transcriptome-wide noise controls lineage choice in mammalian progenitor cells", *Nature*, 453 : 544-547.
- CHEN A.K., BEHLKE M.A. & TSOURLAKAS A. (2007), "Avoiding false-positive signals with nuclease-vulnerable molecular beacons in single living cells", *Nucleic Acids Res.*, 35 : e105.
- CHUBB J.R., TRCEK T., SHENOY S.M. & SINGER R.H. (2006), "Transcriptional pulsing of a developmental gene", *Curr. Biol.*, 16 : 1018-1025.
- COULON A., BESLON G. & GANDRILLON O. (2008), "Large multi-protein structure modeling and simulation: the need for mesoscopic models", in *Methods in Molecular Biology*, Humana Press (à paraître).

- DI TALIA S., SKOTHEIM J.M., BEAN J.M., SIGGIA E.D. & CROSS F.R. (2007), "The effects of molecular noise and size control on variability in the budding yeast cell cycle", *Nature*, 448: 947-951.
- ELOWITZ M.B., LEVINE A.J., SIGGIA E.D. & SWAIN P.S. (2002), "Stochastic gene expression in a single cell", *Science*, 297: 1183-1186.
- GANDRILLON O. (2002), "The v-erbA oncogene. Assessing its differentiation-blocking ability using normal chicken erythrocytic progenitor cells", *Methods Mol. Biol.*, 202: 91-107.
- GANDRILLON O., SCHMIDT U., BEUG H. & SAMARUT J. (1999), "TGF-beta cooperates with TGF-alpha to induce the self-renewal of normal erythrocytic progenitors: evidence for an autocrine mechanism", *Embo J.*, 18: 2764-2781.
- GIBSON M.A. & MJOLSNES E. (2004), "Modeling the activity of single genes", in J.M. Bower & H. Bolouri (eds.), *Computational Modeling of Genetic and Biochemical Networks*, MIT Press: 3-48.
- GOLDING I., PAULSSON J., ZAWILSKI S.M. & COX E.C. (2005), "Real-time kinetics of gene activity in individual bacteria", *Cell*, 123: 1025-1036.
- HUME D.A. (2000), "Probability in transcriptional regulation and its implications for leukocyte differentiation and inducible gene expression", *Blood*, 96: 2323-2328.
- KAERN M., ELSTON T.C., BLAKE W.J. & COLLINS J.J. (2005), "Stochasticity in gene expression: from theories to phenotypes", *Nat. Rev. Genet.*, 6: 451-464.
- KEPLER T.B. & ELSTON T.C. (2001), "Stochasticity in transcriptional regulation: origins, consequences, and mathematical representations", *Biophys. J.*, 81: 3116-3136.
- KING K.R., WANG S., IRIMIA D., JAYARAMAN A., TONER M. & YARMUSH M.L. (2007), "A high-throughput microfluidic real-time gene expression living cell array", *Lab Chip*, 7: 77-85.
- KUPIEC J.-J. (1997), "A Darwinian theory for the origin of cellular differentiation", *Mol. Gen. Genet.*, 255: 201-208.
- KUPIEC J.-J., LECOINTRE G., SILBERSTEIN M. & VARENNE F. (dir.) (2008), *Matière première, Revue d'épistémologie et d'études matérialistes*: « Modèles, simulations, systèmes », n°3, Paris, Syllepse.
- LAFORGE B., GUEZ D., MARTINEZ M. & KUPIEC J. (2005), "Modeling embryogenesis and cancer: an approach based on an equilibrium between the autostabilization of stochastic gene expression and the interdependence of cells for proliferation", *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 89: 93-120.
- LEMERLE C., DI VENTURA B. & SERRANO L. (2005), "Space as the final frontier in stochastic simulations of biological systems", *FEBS Lett.*, 579: 1789-1794.
- LEVSKY J.M., SHENOY S.M., PEZO R.C. & SINGER R.H. (2002), "Single-cell gene expression profiling", *Science*, 297: 836-840.
- MAAMAR H., RAJ A. & DUBNAU D. (2007), "Noise in gene expression determines cell fate in *Bacillus subtilis*", *Science*, 317: 526-529.
- MAHESHRI N. & O'SHEA E.K. (2007), "Living with noisy genes: how cells function reliably with inherent variability in gene expression", *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 36: 413-434.
- MISTELI T. (2001), "Protein dynamics: implications for nuclear architecture and gene expression", *Science*, 291: 843-847.
- MISTELI T. (2007), "Beyond the sequence: cellular organization of genome function", *Cell*, 128: 787-800.
- NEILDEZ-NGUYEN T.M., PARISOT A., VIGNAL C., RAMEAU P., STOCKHOLM D., PICOT J., ALLO V., LE BEC C., LAPLACE C. & PALDI A. (2007), "Epigenetic gene expression noise and phenotypic diversification of clonal cell populations", *Differentiation*.

- PALDI A. (2003), "Stochastic gene expression during cell differentiation: order from disorder?", *Cell Mol. Life Sci.*, 60 : 1775-1778.
- PAULSSON J. (2004), "Summing up the noise in gene networks", *Nature*, 427 : 415-418.
- PAULSSON J. (2005), "Prime movers of noisy gene expression", *Nat. Genet.*, 37 : 925-926.
- RAJ A., PESKIN C.S., TRANCHINA D., VARGAS D.Y. & TYAGI S. (2006), "Stochastic mRNA synthesis in mammalian cells", *PLoS Biol.*, 4 : e309.
- RASER J.M. & O'SHEA E.K. (2004), "Control of stochasticity in eukaryotic gene expression", *Science*, 304 : 1811-1814.
- RASER J.M. & O'SHEA E.K. (2005), "Noise in gene expression: origins, consequences, and control", *Science*, 309 : 2010-2013.
- ROSS I.L., BROWNE C.M. & HUME D.A. (1994), "Transcription of individual genes in eukaryotic cells occurs randomly and infrequently", *Immunol. Cell. Biol.*, 72 : 177-185.
- SHANER N.C., STEINBACH P.A. & TSIEN R.Y. (2005), "A guide to choosing fluorescent proteins", *Nat. Methods*, 2 : 905-909.
- SIGAL A., MILO R., COHEN A., GEVA-ZATORSKY N., KLEIN Y., LIRON Y., ROSENFELD N., DANON T., PERZOV N. & ALON U. (2006), "Variability and memory of protein levels in human cells", *Nature*, 444 : 643-646.
- SOULA H., ROBARDET C., PERRIN F., GRIPON S., BESLON G. & GANDRILLON O. (2005), "Modeling the emergence of multi-protein dynamic structures by principles of self-organization through the use of 3DSpi, a Multi-Agent-based Software", *BMC Bioinformatics*, 6 : 228.
- STERN S., DROR T., STOLOVICKI E., BRENNER N. & BRAUN E. (2007), "Genome-wide transcriptional plasticity underlies cellular adaptation to novel challenge", *Mol. Syst. Biol.*, 3 : 106.
- SWAIN P.S., ELOWITZ M.B. & SIGGIA E.D. (2002), "Intrinsic and extrinsic contributions to stochasticity in gene expression", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99 : 12795-12800.
- TAO Y., ZHENG X. & SUN Y. (2007), "Effect of feedback regulation on stochastic gene expression", *J. Theor. Biol.*
- THATTAI M. & VAN OUDENAARDEN A. (2001), "Intrinsic noise in gene regulatory networks", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98 : 8614-8619.
- THATTAI M. & VAN OUDENAARDEN A. (2004), "Stochastic gene expression in fluctuating environments", *Genetics*, 167 : 523-530.
- TURNER T.E., SCHNELL S. & BURRAGE K. (2004), "Stochastic approaches for modelling in vivo reactions", *Comput. Biol. Chem.*, 28 : 165-178.
- VAN ZON J.S., MORELLI M.J., TANASE-NICOLA S. & TEN WOLDE P.R. (2006), "Diffusion of transcription factors can drastically enhance the noise in gene expression", *Biophys. J.*, 91 : 4350-4367.
- VEENING J.W., SMITS W.K. & KUIPERS O.P. (2008), "Bistability, Epigenetics, and Bet-Hedging in Bacteria", *Annu. Rev. Microbiol.*, 62 : 193-210.
- WARREN P.B., TANASE-NICOLA S. & TEN WOLDE P.R. (2006), "Exact results for noise power spectra in linear biochemical reaction networks", *J. Chem. Phys.*, 125 : 144904.
- WEINBERGER L.S., BURNETT J.C., TOETTCHER J.E., ARKIN A.P. & SCHAFER D.V. (2005), "Stochastic gene expression in a lentiviral positive-feedback loop: HIV-1 Tat fluctuations drive phenotypic diversity", *Cell*, 122 : 169-182.
- WERNET M.F., MAZZONI E.O., CELIK A., DUNCAN D.M., DUNCAN I. & DESPLAN C. (2006), "Stochastic spineless expression creates the retinal mosaic for colour vision", *Nature*, 440 : 174-180.



### 3 DISCUSSION & CONCLUSIONS

Au cours des dernières années, divers travaux portant sur les bases moléculaires de l'autorenouvellement ont suggéré que l'homéostasie du cholestérol cellulaire, d'une part, et la nature stochastique de l'expression des gènes, d'autre part, sont à la fois des acteurs et des effecteurs dans divers processus impliqués dans le devenir cellulaire.

Par ailleurs, les T2ECs sont des progéniteurs érythrocytaires primaires, qui peuvent être maintenus en état d'autorenouvellement, sans qu'ils s'engagent dans un processus de différenciation et sans qu'ils perdent leur potentiel de différenciation. Ces cellules constituent donc un modèle *ex vivo* bien adapté à l'étude des bases moléculaires de l'autorenouvellement.

Afin de mieux comprendre les mécanismes de contrôle de l'équilibre entre autorenouvellement et différenciation, et notamment les processus mis en place lors de l'engagement vers la différenciation, nous nous sommes donc intéressés au rôle du cholestérol et à la variabilité de l'expression génique dans les T2ECs.

#### 3.1 Cholestérol, OSC & Autorenewement

L'analyse transcriptomique des gènes exprimés dans les T2ECs en état d'autorenouvellement, par rapport aux étapes précoces de la différenciation, a permis de mettre en évidence une sur-expression de l'*OSC/LSS* par les cellules en état d'autorenouvellement. Ce gène code l'oxydosqualène cyclase (OSC), une enzyme impliquée dans la synthèse *de novo* du cholestérol cellulaire.

Le cholestérol est un élément clé du fonctionnement de la cellule. En particulier, une accumulation de preuves soutient le lien fonctionnel entre le taux de cholestérol cellulaire et la signalisation (§2.2.1, p. 86). D'une part, le cholestérol est essentiel à la formation des radeaux lipidiques, des plateformes moléculaires aujourd'hui considérés comme de véritables acteurs de la signalisation cellulaire. Ainsi, il a été montré que des variations du taux de cholestérol cellulaire entraînent une modification de la topographie – et donc de la fonction – de ces radeaux, et a un effet direct sur la signalisation cellulaire. En particulier, il a été montré que les deux

principales voies de signalisation impliquées dans l'autorenewement des T2ECs (TGF- $\beta$  et Ras/MEK/ERK) peuvent être modulées par le fonctionnement de ces radeaux et contrôlent à leur tour le métabolisme du cholestérol (§2.2.1.3.1, p.91). Il sera donc particulièrement intéressant de vérifier cette interdépendance dans notre modèle. D'autre part, la voie de signalisation Hedgehog – importante dans le devenir des cellules souches et en particulier dans l'autorenewement des progéniteurs érythrocytaires – est dépendante du cholestérol pour son bon fonctionnement (§2.2.1.3.2, p. 92). Enfin, un lien direct existe entre la teneur en cholestérol cellulaire et l'inhibition de l'apoptose (§2.2.1.3.3, p.93).

En raison du lien entre le cholestérol et les voies de signalisation impliquées dans l'autorenewement, son homéostasie doit être strictement régulée. Le taux de cholestérol cellulaire est le résultat du bilan entre son importation à partir de la circulation sanguine, son exportation vers l'extérieur et sa synthèse *de novo* au sein de la cellule. L'OSC est impliquée à la fois dans la synthèse du cholestérol et dans la synthèse du 24,25EC, un puissant activateur de LXR, dont les gènes cibles comprennent des transporteurs transmembranaires du cholestérol (§2.2.1.1, p.88). De plus, l'expression de LXR est anormalement élevée dans les cellules souches à l'origine des leucémies myéloïdes aiguës (Peeters *et al.*, 2006). Les principaux régulateurs de la synthèse du cholestérol sont les SREBPs, des facteurs de transcription dont les cibles incluent certaines des enzymes de la voie de synthèse du cholestérol (dont l'OSC). Cependant, en raison de sa position dans les deux voies de synthèse (cholestérol et 24,25EC), l'expression de l'OSC/LSS pourrait être la cible primaire d'un mécanisme de rétrocontrôle négatif indépendant des SREBPs, visant à diminuer le niveau de cholestérol cellulaire (Dang *et al.*, 2009; Villagra *et al.*, 2007).

Dans ce contexte, nos travaux ont démontré que l'expression et l'activité de l'OSC sont essentielles pour maintenir l'état d'autorenewement dans des progéniteurs primaires érythrocytaires, en les empêchant de quitter cet état par différenciation ou par apoptose. Cette dépendance vis-à-vis de l'OSC est spécifique à l'état d'autorenewement car les mêmes cellules, une fois induites à se différencier, sont insensibles à son inhibition. Nous avons aussi observé que l'inhibition de l'OSC (au niveau de son activité comme au niveau de son expression) est une étape à la fois nécessaire et suffisante pour induire l'engagement des T2ECs vers la différenciation. Le blocage de la différenciation des T2ECs lorsque celles-ci sur-expriment l'OSC reste cependant relativement modeste. Ceci est probablement dû aux contraintes de temps imposées par notre système de transfection transitoire. Malheureusement, nos tentatives d'exprimer l'OSC/LSS de manière stable, soit avec un système rétroviral déficient, soit avec le système Tol2/Transposase, ont échoué. Néanmoins, même si la différenciation n'est

pas complètement bloquée, le retard observé montre qu'un taux anormalement élevé d'OSC s'oppose à la différenciation. Enfin, nos résultats sont cohérents avec l'hypothèse selon laquelle la synthèse *de novo* du cholestérol est contrôlée par l'expression du gène *OSC/LSS*, et joue un rôle physiologique dans le contrôle de l'équilibre entre autorenewement, différenciation, et apoptose, en favorisant le maintien de l'autorenewement.

Ces résultats, ainsi que les données des travaux décrits dans la littérature, nous permettent donc de proposer le modèle résumé par la Figure 3-1. Dans ce modèle l'expression de l'*OSC/LSS* joue un rôle clé dans le contrôle de l'équilibre entre autorenewement et différenciation : en concordance avec les signaux favorisant l'autorenewement, le cholestérol participe au maintien de cet état.

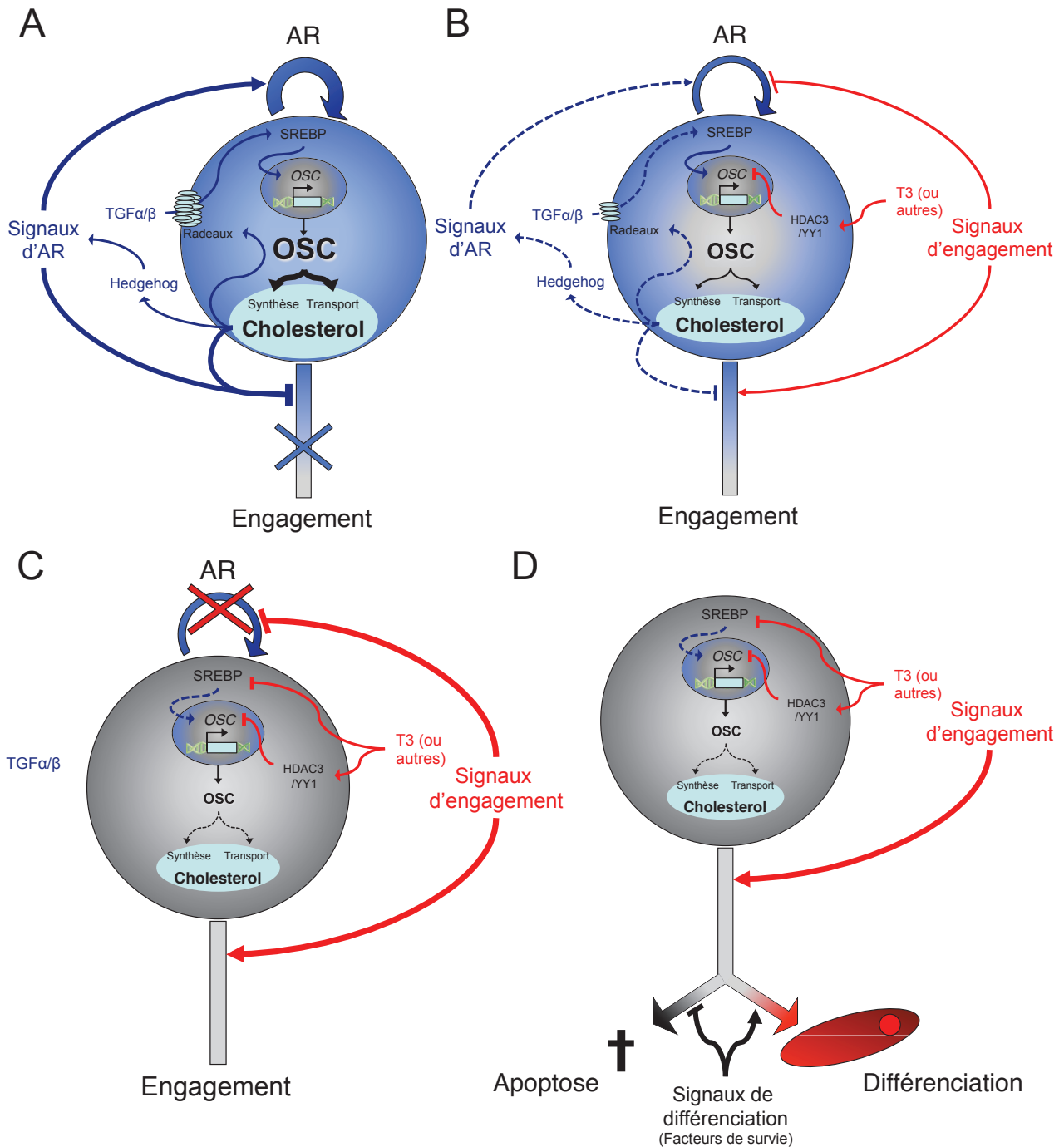
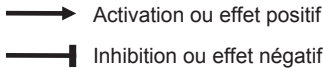
En ce qui concerne les signaux favorisant l'engagement des cellules, il a été montré que l'hormone thyroïdienne (TH ou T<sub>3</sub>), par exemple, déclenche un engagement précoce de la différenciation (Bauer *et al.*, 1998; Gandrillon *et al.*, 1994). Par ailleurs, il a été montré que le facteur YY1 est un régulateur négatif de la synthèse *de novo* du cholestérol, et il a été initialement proposé qu'il s'agirait d'un mécanisme dépendant des SREBPs (Ericsson, Usheva & Edwards, 1999). Cependant, il a été récemment démontré que YY1 réprime directement l'activité transcriptionnelle du promoteur de l'*OSC/LSS* dans un mécanisme HDAC3-dépendant (Villagra *et al.*, 2007). De manière intéressante, HDAC3 forme un complexe avec THR (Récepteur de la TH) et ce premier est libéré en présence de la TH (Ishizuka & Lazar, 2003). Ainsi, une diminution de l'expression de l'*OSC/LSS*, à l'origine d'une diminution SREBPs-indépendante de la synthèse et donc du taux de cholestérol, entraînerait une atténuation des voies de signalisation soutenant l'autorenewement (modification de la composition et/ou du nombre de radeaux lipidiques, diminution de la maturation de la protéine Hedgehog). Cette diminution de la signalisation, renforcerait, à son tour la boucle de régulation négative conduisant à la diminution de la synthèse du cholestérol, par un deuxième mécanisme plus global, cette fois *via* les SREBPs (Hashimoto *et al.*, 2006). Le rôle clé de cette première diminution de l'expression de l'*OSC/LSS* est notamment soutenu par nos résultats : son inhibition a lieu très tôt au cours de la différenciation érythrocytaire (premières heures) et cette inhibition (au niveau de l'expression ou de l'activité) est suffisante pour induire une différenciation spontanée. Autrement dit, la diminution de l'activité de l'OSC est suffisante pour induire la sortie des T<sub>2</sub>ECs de l'état d'autorenewement, vers une phase d'engagement.

Au delà de cette phase d'engagement, le devenir des cellules dépendra de la présence ou de l'absence de facteurs de survie externes. En effet, il a été



rapporté que des facteurs externes, tels que l'Epo, sont nécessaires pour la différenciation érythrocytaire terminale, par la protection des cellules en différenciation de l'apoptose *via* l'activation des voies de survie (Koury & Bondurant, 1990; Lesault *et al.*, 2002). Cependant, même si ces signaux de survie sont requis pour les étapes tardives de l'érythropoïèse, ils ne sont pas nécessaires pour l'engagement, ce qui montre que ces deux étapes sont dissociées (Dolznig *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 1995). Bien que chez le poulet, les gènes codant pour l'Epo et l'EpoR n'aient pas été identifiés, il semblerait que le mécanisme cytoplasmique en aval soit conservé. En effet, il a été montré que des progéniteurs érythrocytaires aviaires exprimant de manière ectopique le EpoR murin, sont capables de répondre à l'Epo (Steinlein *et al.*, 1994).

Enfin, des travaux très récents montrent qu'une diminution du cholestérol affecte le maintien de l'autorenouvellement des CSE (Lee *et al.*, 2010a). De plus, les auteurs de ces travaux ont montré que cette diminution affecte la transduction radeaux-dépendante du signal des voies de signalisation impliquées dans l'autorenouvellement. Cette étude permet donc de supposer que cette dépendance vis-à-vis du cholestérol pour maintenir l'état d'autorenouvellement, ne se limite pas aux progéniteurs érythrocytaires, mais pourrait s'agir d'un mécanisme général du maintien de l'autorenouvellement.



**Figure 3-1 : Contrôle du devenir des cellules en état d'autorenouvellement.**

Modèle basé sur les interactions entre les différents acteurs moléculaires impliqués dans le contrôle de l'équilibre entre l'autorenouvellement (AR), la différenciation et l'apoptose, d'après nos travaux et les données de la littérature.

(A) Le taux de cholestérol cellulaire stimule la transduction des signaux en état d'AR : TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , Hedgehog. (B) Les signaux d'engagement, comme l'hormone thyroïdienne (T3), vont induire une diminution de l'expression du gène OSC/LSS – et donc de l'activité enzymatique de l'OSC – entraînant une première diminution du taux de cholestérol. Cette diminution est à l'origine d'une atténuation de la transduction des signaux d'AR. (C) La diminution de la réponse aux signaux d'AR va ainsi accentuer la diminution du taux de cholestérol via les SREBPs, entraînant la sortie de l'AR vers une phase d'engagement. (D) Au delà de cet engagement, le devenir des cellules dépendra de la présence de facteurs permettant leur survie et donc la progression dans le processus de différenciation. En cas d'absence de tels facteurs, ces cellules ayant quitté l'état d'AR mourront par apoptose.

### 3.2 Stochasticité, Autorenouvellement & Différenciation

La stochasticité de l'expression des gènes est aujourd'hui considérée comme un processus cellulaire en soit, qui pourrait expliquer un certain nombre de propriétés des cellules souches, dont la plasticité et l'adaptabilité à un environnement changeant (§1.3.2, p. 45). En effet, il a été proposé que la variabilité aléatoire de l'expression génique est un élément clé dans le choix du devenir cellulaire. Cependant, dans de nombreux cas, le lien causal direct entre la stochasticité et son éventuel rôle biologique – dont la différenciation – est difficile à établir. En outre, les causes moléculaires de la stochasticité dans l'expression génique restent encore mal comprises, notamment dans les cellules eucaryotes supérieures. Une des raisons tient certainement à ce que les techniques expérimentales requises pour valider les modèles sur ces cellules restent encore difficiles d'accès. Par ailleurs la plupart des modèles, explicitement ou non, restent dans un cadre de pensée procaryote. Une autre raison tient au fait que peu d'équipes s'intéressent à la variabilité en tant que phénotype biologique *vs qualité*, préférant se concentrer sur l'activité moyenne des gènes. C'est pourquoi nous avons décidé de changer radicalement notre point de vue sur l'expression génique et de centrer notre intérêt non plus sur le niveau d'expression des gènes mais sur les variations de ce niveau.

Afin d'explorer l'importance et le rôle de la nature stochastique de l'expression génique dans des processus de prise de décisions cellulaires, il nous semble indispensable de développer un nouveau regard sur ce phénomène. Nous nous plaçons pour cela dans le cadre de pensée dit de la « biologie des systèmes » dont l'objectif est d'identifier et de caractériser les grandes règles de fonctionnement des systèmes biologiques. C'est pourquoi ces travaux de thèse s'inscrivent au sein d'un consortium pluridisciplinaire composé de biologistes moléculaires et cellulaires, de spécialistes des nano-bio-technologies – capables de mesurer finement l'activité cellulaire – et d'informaticiens modélisateurs. En réunissant cet ensemble de savoir-faire, nous espérons être capables de manipuler expérimentalement le niveau de stochasticité. Pour cela, nous devons d'abord en comprendre les mécanismes à l'échelle moléculaire. C'est pourquoi nous nous sommes proposés de :

1. modéliser les causes moléculaires de la stochasticité de l'expression génique ;
2. mesurer la stochasticité de l'expression génique sur des cellules uniques, soit par FACS sur une population de cellules, soit sur des cellules isolées en temps réel ;

3. confronter modèles et mesures pour itérer un cercle vertueux à la base de la biologie des systèmes.

En effet, en alliant expérimentation et modélisation, chaque étape va idéalement apporter des informations susceptibles de guider l'ensemble du processus scientifique.

Du point de vue pratique, un pré-requis pour l'étude du rôle de la variabilité de l'expression des gènes est de pouvoir, expérimentalement, suivre de manière simultanée l'expression de plusieurs gènes dans plusieurs cellules isolées (ou en « cellule unique »). Comme tout projet émergent, la mise en place d'un certain nombre d'outils était donc une étape incontournable, avant même de commencer à modéliser l'expression de ces gènes. Cette première étape a d'ores et déjà montré le besoin du cercle vertueux décrit ci-dessus. En effet, les outils d'expérimentation biologique ont été développés en parallèle des outils de modélisation. Et ce n'est qu'en interagissant avec les modélisateurs « à la paillasse » que nous avons pu affiner ou changer nos stratégies expérimentales. Notamment, ce n'est qu'une fois qu'il a été possible d'exprimer de manière stable des protéines fluorescentes dans des T2ECs obtenues par expansion clonale (et donc génétiquement identiques pour l'insertion du transgène), et isolées dans des puits individuels microscopiques sur un moule PDMS, que nous avons pu mesurer l'expression de gènes rapporteurs, en temps réel, sur plusieurs cellules isolées. Antoine Coulon (informaticien modélisateur en thèse au sein de l'équipe) a alors pu effectuer une première analyse de ces profils d'expression, ce qui nous a permis de valider certains outils (par exemple, le choix des puits moulés dans du PDMS pour l'acquisition), mais a aussi mis en évidence le besoin de contrôles permettant de déterminer les sources expérimentales des variations observées, ou encore le besoin de revenir sur certains des choix initialement faits. En termes de contrôles, nous avons ainsi pu déterminer, par exemple, le pourcentage de puits vides destinés à avoir une mesure du bruit de fond sur l'ensemble de la plaque. De même, nous avons confirmé la nécessité d'une source de fluorescence non biologique (billes fluorescentes), pour déterminer les éventuelles variations du système de mesure (typiquement, les sautes d'intensité de la lampe permettant l'excitation de la molécule fluorescente). Enfin, nous avons déterminé la fréquence minimale de l'acquisition (nombre de prises par minute), permettant d'analyser les profils d'expression avec des outils de la théorie du signal (spectres de puissance, auto-corrélation), plus sophistiqués que les outils de statistique descriptive (variance normalisée).

Par ailleurs, les protéines initialement choisies : Cherry, KO et Cerulean se sont avérées inappropriées pour l'étude de la stochasticité de l'expression des gènes. En effet, ces protéines proviennent d'organismes différents (*Discosoma sp.*, *Fungia concinna* et *Aequorea victoria* pour, respectivement, Cherry, KO et Cerulean), et elles ont donc des séquences peptidiques très différentes. Notamment, Cherry et KO fonctionnent en tant que

monomères, alors que Cerulean forme un dimère. Ces différences entraînent une grande variabilité dans leur maturation post-traductionnelle (« folding », dimérisation, *etc.*) et donc dans le temps nécessaire entre la transcription du gène et la détection de la fluorescence du produit de leur expression. Pour ces raisons, nous avons décidé de changer les protéines rapportrices, en utilisant des dérivés de la GFP (eYFP et eCFP) qui ne diffèrent que par quelques acides aminés (97,4 % de taux d'homologie). Par ailleurs, les protéines fluorescentes généralement utilisées sont très stables (elles ont souvent été modifiées afin d'optimiser leur stabilité). Concernant l'analyse de la stochasticité de l'expression génique, cette stabilité entraîne une accumulation des produits finaux de l'expression de ces gènes rapporteurs, qui peut brouiller le comportement de ces derniers au niveau transcriptionnel. En effet, si des variations rapides devaient se produire au niveau de la transcription, celles-ci seraient « écrasées » par la grande inertie que comporte leur détection. Ces déductions ont été tirées grâce à la confrontation avec les modèles mathématiques ; en effet, ce n'est que lorsque les protéines initialement choisies ont été testées dans un contexte de mesure et d'analyse dynamiques qu'elles se sont avérées peu adaptées pour nos objectifs. A l'heure actuelle, José Viñuelas met en œuvre au sein de l'équipe un procédé de déstabilisation de ces produits en utilisant des séquences PEST et ARE, qui affectent la stabilité de la protéine et du transcrit, respectivement.

Une étape clé pour ce projet a consisté à mettre en place et à caractériser un système permettant l'expression stable d'un ou de plusieurs transgènes dans les T2ECs. Suite à une collaboration avec l'équipe du Dr. Yoshiko Takahashi (NIST, RIKEN, Japon), nous avons ainsi adapté le système Tol2/Transposase aux T2ECs, permettant l'insertion d'une cassette d'expression dans le génome. Cette technique est ainsi devenue l'un des piliers de notre stratégie expérimentale. A l'heure actuelle, José Viñuelas et Gaël Kaneko – respectivement biologiste (en stage post-doctoral) et modélisateur (en thèse) – s'intéressent à l'effet de l'environnement chromatinien (selon la localisation du point d'insertion dans le génome). En effet, nous avons observé que, bien que l'insertion d'une cassette guidée par les séquences Tol2 reste un événement rare (plus de la moitié des insertions est unique), celle-ci semble aléatoire. La forte influence de l'environnement épigénétique sur l'expression des gènes est bien illustrée par le phénomène de « variegation » lié à l'effet de position d'un gène (*Position-Effect Variegation*, PEV). Dans ce cas précis, il a été montré que la transcription d'un gène localisé dans une région génomique donnée, dépendra de son environnement épigénétique (Girton & Johansen, 2008; Wakimoto, 1998). José Viñuelas et Gaël Kaneko sont ainsi en train d'étudier l'effet de l'environnement chromatinien de la localisation du point d'insertion sur la variabilité de l'expression génique. L'idée est de comprendre s'il existe des régions génomiques plus ou moins « bruyantes ». Dans un premier temps, cette étude permettra de mettre en

parallèle la variabilité de l'expression génique d'un clone donné avec les caractéristiques de la localisation génomique du point d'insertion, déterminées *in silico* (taux GC, densité en gènes, *etc.*), ou avec des analyses épigénétiques (effets des drogues influençant les modifications chromatinienne, par exemple). Cette étude nous permettra ainsi d'identifier certains des paramètres et/ou des processus moléculaires influençant la variabilité des gènes. En identifiant ces paramètres, nous aurons donc un accès à la modulation de la variabilité de l'expression génique et à son effet sur le comportement cellulaire.

L'ensemble du dispositif mis en place dans le cadre de ces travaux de thèse permettra, dans un deuxième temps, d'aborder la question du rôle biologique de la nature stochastique de l'expression génique lors des processus de choix autorenouvellement/différenciation. Bien que cette étude soit loin d'être achevée, des conclusions préliminaires peuvent d'ores et déjà être avancées (observations confirmant l'existence et l'importance qualitative et quantitative de la stochasticité dans l'expression génique, complexité de la dynamique des facteurs responsables de la stochasticité à l'échelle du promoteur, *etc.*). Il est néanmoins clair que ce travail, quels qu'en soient les résultats, permettra de dégager de nouvelles connaissances sur le fonctionnement cellulaire. En effet, le développement de techniques de pointe en analyse sur cellules uniques, à de telles résolutions temporelles, est un enjeu technologique majeur en biologie des systèmes. Il permettra de disposer de données à des échelles qui nous sont aujourd'hui pratiquement inaccessibles.

### 3.3 Conclusion

La théorie synthétique de l'évolution (i.e., la théorie moderne de l'évolution, qui réinterprète le darwinisme à la lumière de la génétique) considère que l'ADN est le résultat des contraintes sélectives externes subies par l'organisme au fil de l'évolution. Cependant, les biologistes s'accordent aujourd'hui à reconnaître que l'expression des gènes est non pas une chaîne de production robuste et prévisible, mais un phénomène aléatoire ; et que l'ADN, au delà de son rôle de programme génétique, agit aussi comme un générateur aléatoire de protéines. Cette constatation soulève plusieurs questions, dont la suivante : comment une expression aléatoire des gènes conduit-elle à une différenciation cellulaire relativement déterministe ? Autrement dit, comment générer de l'ordre à partir du désordre ?

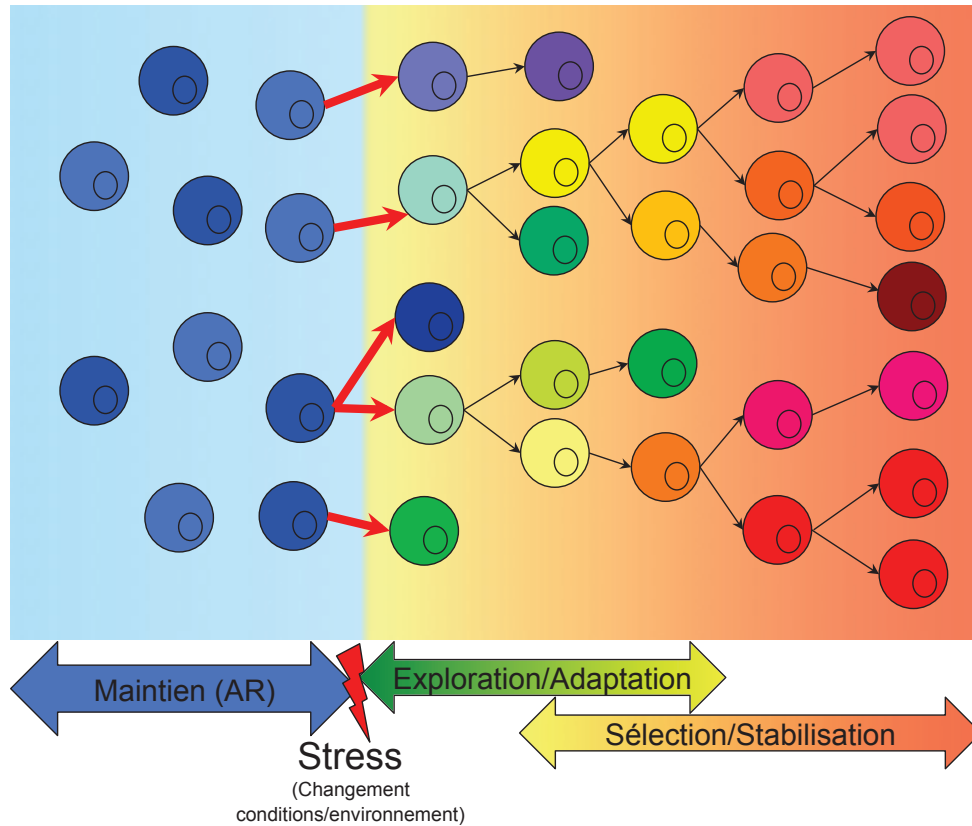
La théorie du darwinisme cellulaire est justement basée sur cette nature stochastique de l'expression des gènes. La variabilité de l'expression des gènes d'une cellule à l'autre au sein d'une population serait à l'origine d'une population hétérogène. Les contraintes du microenvironnement d'une cellule opéreraient ensuite une sélection des profils d'expression des gènes correspondant aux lignages cellulaires. Le devenir de ces cellules serait ainsi stabilisé ou sélectionné par les signaux que la cellule reçoit de son microenvironnement, qui opèrerait une sélection, tout comme l'environnement participe à la sélection naturelle des espèces. D'où le nom de « darwinisme cellulaire » (Kupiec, 1983; Kupiec, 1997; Laforge *et al.*, 2005).

Reste la question de l'amorçage de ce processus de différenciation. Nos travaux sont en accord avec un choix « *sortir ou ne pas sortir* » de l'autorenouement, plutôt qu'un choix à trois possibilités (autorenouement *vs.* différenciation *vs.* apoptose). En effet, il semblerait que l'engagement (ou la sortie de l'autorenouement) soit dissocié du processus de différenciation proprement dit (i.e., survie des cellules ayant quitté le stade d'autorenouement selon les facteurs présents dans l'environnement). Cette sortie pourrait ainsi être déclenchée par un stress, comme une diminution du cholestérol cellulaire, suite aux changements des signaux environnementaux (nouveaux facteurs, manque généré par la suppression d'un facteur essentiel, *etc.*). Une sortie de l'état d'autorenouement – déclenchée par un stress cellulaire – résulterait ainsi dans l'engagement de ces cellules, expliquant le lien souvent mis en évidence entre la différenciation et les voies d'apoptose et de survie. La nature aléatoire de l'expression des gènes permettrait alors l'exploration d'un ensemble d'états possibles en termes de potentiel de différenciation et, par conséquent, une meilleure adaptation aux changements des conditions

(Huang, 2010; Losick & Desplan, 2008). Dans ce sens, les métabolites nécessaires aux modifications de la chromatine (acétylation, méthylation) proviennent du métabolisme cellulaire, et il a été proposé que les gradients de substrat et de métabolites sont l'une des causes principales de la différenciation (Kupiec, 1997). Plus récemment, il a été démontré que les modifications de la chromatine sont directement liées au métabolisme par la disponibilité d'Acetyl-CoA, le premier métabolite de la voie de biosynthèse du cholestérol, mais aussi le substrat nécessaire pour l'acétylation de l'ADN (Ladurner, 2009; Wellen *et al.*, 2009). Ainsi, le contrôle de la synthèse du cholestérol semble constituer un basculement métabolique, entraînant une modification de l'état de la chromatine et donc de l'expression des gènes. En particulier, nos travaux soutiennent l'hypothèse d'une régulation de la synthèse du cholestérol de manière autonome par la cellule *via* l'expression de l'*OSC/LSS*.

A l'échelle des espèces, les grands changements environnementaux (glaciations, éruptions volcaniques, *etc.*) ont été à l'origine d'une radiation évolutive\*, ou « explosion », avec la génération d'un grand nombre de formes plus ou moins diversifiées. Cette radiation a ensuite été suivie d'une phase d'exploration et d'adaptation au nouvel environnement, entraînant soit le maintien, soit la disparition, selon les avantages ou les inconvénients apportés par les nouveaux caractères acquis. Au niveau de la cellule souche ou des progéniteurs, un stress – induit par exemple par l'exclusion de la niche – constituerait ainsi le basculement d'un état relativement stable (l'autorenouvellement) vers une phase d'exploration des potentiels de différenciation possibles grâce à la nature stochastique de l'expression génique. Cette phase d'engagement serait ensuite suivie d'une phase de stabilisation de certains phénotypes (et donc combinatoires d'expression), aux dépens d'autres phénotypes. Par exemple, les cellules présentant une expression (même faible) d'un récepteur répondant à un facteur de survie présent dans le nouveau milieu, seront ainsi avantagées par rapport à celles où l'expression est absente ou encore plus par rapport à celles exprimant un autre récepteur, répondant à un autre facteur induisant la mort cellulaire. Le devenir des cellules souches serait ainsi guidé par un processus stochastique générateur de différences : la possibilité d'une cellule donnée à explorer ses possibilités et à s'adapter à son environnement (Figure 3-2).





**Figure 3-2 : La différenciation comme un processus d'adaptation**

*Les cellules au sein d'une population de cellules souches en autorenouvellement (AR) présentent une variabilité de l'expression des gènes et, par conséquent, des caractères (ou phénotypes cellulaires). Lors d'un changement des conditions (dans le temps) ou de l'environnement (dans l'espace), entraînant un stress cellulaire, ces différences vont être à l'origine d'une adaptation différentielle, selon les avantages conférés par les caractères acquis (expression de récepteurs, facteurs d'expression, etc.). L'environnement va ainsi opérer une sélection et/ou stabilisation de certains de ces phénotypes avantageux, aboutissant à l'émergence d'un ou plusieurs lignages, aux dépens des phénotypes ne présentant aucun avantage ou présentant un désavantage (contre-sélection)*

Comme il a été mentionné au cours de l'introduction, le « saut » entre l'évolution (la phylogénie) et l'embryologie (l'ontogénèse) est à l'origine du terme de « *Cellule Souche* ». Il semblerait ainsi que plus qu'un saut, ce rapprochement constitue une réelle passerelle, qui nous aiderait à assimiler l'idée que l'aléatoire peut être à la base du devenir non seulement des espèces mais aussi des cellules, et en particulier des cellules souches.

## 4 REFERENCES

- AKASHI, K., HE, X., CHEN, J., IWASAKI, H., NIU, C., STEENHARD, B., ZHANG, J., HAUG, J. & LI, L. (2003). Transcriptional accessibility for genes of multiple tissues and hematopoietic lineages is hierarchically controlled during early hematopoiesis. *Blood* 101, 383-9.
- AKASHI, K., TRAVER, D., MIYAMOTO, T. & WEISSMAN, I. L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404, 193-7.
- ALADJEM, M. I., SPIKE, B. T., RODEWALD, L. W., HOPE, T. J., KLEMM, M., JAENISCH, R. & WAHL, G. M. (1998). ES cells do not activate p53-dependent stress responses and undergo p53-independent apoptosis in response to DNA damage. *Curr Biol* 8, 145-55.
- ALEXANDER, D. B. & GOLDBERG, G. S. (2003). Transfer of biologically important molecules between cells through gap junction channels. *Curr Med Chem* 10, 2045-58.
- ALLEN, D. M., VAN PRAAG, H., RAY, J., WEAVER, Z., WINROW, C. J., CARTER, T. A., BRAQUET, R., HARRINGTON, E., RIED, T., BROWN, K. D., GAGE, F. H. & BARLOW, C. (2001). Ataxia telangiectasia mutated is essential during adult neurogenesis. *Genes Dev* 15, 554-66.
- ALLSOPP, R. C., MORIN, G. B., DEPINHO, R., HARLEY, C. B. & WEISSMAN, I. L. (2003). Telomerase is required to slow telomere shortening and extend replicative lifespan of HSCs during serial transplantation. *Blood* 102, 517-20.
- AMARZGUIOUI, M. & PRYDZ, H. (2004). An algorithm for selection of functional siRNA sequences. *Biochem Biophys Res Commun* 316, 1050-8.
- ANISIMOV, S. V., TARASOV, K. V., TWEEDIE, D., STERN, M. D., WOBUS, A. M. & BOHELER, K. R. (2002). SAGE identification of gene transcripts with profiles unique to pluripotent mouse R1 embryonic stem cells. *Genomics* 79, 169-76.
- ARAI, F., HIRAO, A., OHMURA, M., SATO, H., MATSUOKA, S., TAKUBO, K., ITO, K., KOH, G. Y. & SUDA, T. (2004). Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* 118, 149-61.
- ASH, R. C., DETRICK, D. A. & ZANJANI, E. D. (1981). Studies of human pluripotential hemopoietic stem cells (CFU-GEMM) in vitro. *Blood* 58, 309-16.
- ASHBURNER, M., BALL, C. A., BLAKE, J. A., BOTSTEIN, D., BUTLER, H., CHERRY, J. M., DAVIS, A. P., DOLINSKI, K., DWIGHT, S. S., EPPIG, J. T., HARRIS, M. A., HILL, D. P., ISSELTARVER, L., KASARSKIS, A., LEWIS, S., MATESE, J. C., RICHARDSON, J. E., RINGWALD, M., RUBIN, G. M. & SHERLOCK, G. (2000). Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* 25, 25-9.
- BANNERMAN, P., NICHOLS, W., PUHALLA, S., OLIVER, T., BERMAN, M. & PLEASURE, D. (2000). Early migratory rat neural crest cells express functional gap junctions: evidence that neural crest cell survival requires gap junction function. *J Neurosci Res* 61, 605-15.
- BARKER, J. E. (1994). Sl/Sld hematopoietic progenitors are deficient in situ. *Exp Hematol* 22, 174-7.
- BARTUNEK, P., PAJER, P., KARAFIAT, V., BLENDINGER, G., DVORAK, M. & ZENKE, M. (2002). bFGF signaling and v-Myb cooperate in sustained growth of primitive erythroid progenitors. *Oncogene* 21, 400-10.

## REFERENCES

- BARZILAI, A., ROTMAN, G. & SHILOH, Y. (2002). ATM deficiency and oxidative stress: a new dimension of defective response to DNA damage. *DNA Repair (Amst)* 1, 3-25.
- BAUER, A., MIKULITS, W., LAGGER, G., STENGL, G., BROSCH, G. & BEUG, H. (1998). The thyroid hormone receptor functions as a ligand-operated developmental switch between proliferation and differentiation of erythroid progenitors. *Embo J* 17, 4291-303.
- BAUER, A., TRONCHE, F., WESSELY, O., KELLENDONK, C., REICHARDT, H. M., STEINLEIN, P., SCHUTZ, G. & BEUG, H. (1999). The glucocorticoid receptor is required for stress erythropoiesis. *Genes Dev* 13, 2996-3002.
- BEACHY, P. A., KARHADKAR, S. S. & BERMAN, D. M. (2004). Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. *Nature* 432, 324-31.
- BECKER, A. J., MCCULLOCH, E. A. & TILL, J. E. (1963). Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* 197, 452-4.
- BECKMAN, J. S., BECKMAN, T. W., CHEN, J., MARSHALL, P. A. & FREEMAN, B. A. (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 1620-4.
- BENDER, C. F., SIKES, M. L., SULLIVAN, R., HUYE, L. E., LE BEAU, M. M., ROTH, D. B., MIRZOEVA, O. K., OLTZ, E. M. & PETRINI, J. H. (2002). Cancer predisposition and hematopoietic failure in Rad50(S/S) mice. *Genes Dev* 16, 2237-51.
- BERTHET, C., RODRIGUEZ-GALAN, M. C., HODGE, D. L., GOOYA, J., PASCAL, V., YOUNG, H. A., KELLER, J., BOSSELUT, R. & KALDIS, P. (2007). Hematopoiesis and thymic apoptosis are not affected by the loss of Cdk2. *Mol Cell Biol* 27, 5079-89.
- BEUG, H., DOEDERLEIN, G., FREUDENSTEIN, C. & GRAF, T. (1982). Erythroblast cell lines transformed by a temperature-sensitive mutant of avian erythroblastosis virus: a model system to study erythroid differentiation in vitro. *J Cell Physiol Suppl* 1, 195-207.
- BHARDWAJ, G., MURDOCH, B., WU, D., BAKER, D. P., WILLIAMS, K. P., CHADWICK, K., LING, L. E., KARANU, F. N. & BHATIA, M. (2001). Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation. *Nat Immunol* 2, 172-80.
- BJORNSON, C. R., RIETZE, R. L., REYNOLDS, B. A., MAGLI, M. C. & VESCOVI, A. L. (1999). Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* 283, 534-7.
- BLANK, U., KARLSSON, G. & KARLSSON, S. (2008). Signaling pathways governing stem-cell fate. *Blood* 111, 492-503.
- BLASCO, M. A., LEE, H. W., HANDE, M. P., SAMPER, E., LANSDORP, P. M., DEPINHO, R. A. & GREIDER, C. W. (1997). Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* 91, 25-34.
- BLAU, H. M., BRAZELTON, T. R. & WEIMANN, J. M. (2001). The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell* 105, 829-41.
- BOWERMAN, B., DRAPER, B. W., MELLO, C. C. & PRIESS, J. R. (1993). The maternal gene *skn-1* encodes a protein that is distributed unequally in early *C. elegans* embryos. *Cell* 74, 443-52.
- BOZZINI, C. E., ALIPPI, R. M., BARCELO, A. C., CONTI, M. I., BOZZINI, C., LEZON, C. E. & OLIVERA, M. I. (1994). The biology of stress erythropoiesis and erythropoietin production. *Ann N Y Acad Sci* 718, 83-92; discussion 92-3.
- BOZZINI, C. E., BARCELO, A. C., CONTI, M. I., MARTINEZ, M. P. & ALIPPI, R. M. (2003). Enhanced hypoxia-stimulated erythropoietin production in mice with depression of erythropoiesis induced by hyperoxia. *High Alt Med Biol* 4, 73-9.
- BRACKEN, A. P., KLEINE-KOHLBRECHER, D., DIETRICH, N., PASINI, D., GARGIULO, G., BEEKMAN, C., THEILGAARD-MONCH, K., MINUCCI, S., PORSE, B. T., MARINE, J. C.,

## REFERENCES

- HANSEN, K. H. & HELIN, K. (2007). The Polycomb group proteins bind throughout the INK4A-ARF locus and are disassociated in senescent cells. *Genes Dev* 21, 525-30.
- BRADLEY, A., EVANS, M., KAUFMAN, M. H. & ROBERTSON, E. (1984). Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* 309, 255-6.
- BRADY, G. (2000). Expression profiling of single mammalian cells--small is beautiful. *Yeast* 17, 211-7.
- BRAWLEY, C. & MATUNIS, E. (2004). Regeneration of male germline stem cells by spermatogonial dedifferentiation in vivo. *Science* 304, 1331-4.
- BRESSON, C., KEIME, C., FAURE, C., LETRILLARD, Y., BARBADO, M., SANFILIPPO, S., BENHRA, N., GANDRILLON, O. & GONIN-GIRAUD, S. (2007). Large-scale analysis by SAGE reveals new mechanisms of v-erbA oncogene action. *BMC Genomics* 8, 390.
- BROWN, A. J. (2009). 24(S),25-epoxycholesterol: a messenger for cholesterol homeostasis. *Int J Biochem Cell Biol* 41, 744-7.
- BROWN, A. J. & JESSUP, W. (2009). Oxysterols: Sources, cellular storage and metabolism, and new insights into their roles in cholesterol homeostasis. *Mol Aspects Med* 30, 111-22.
- BROWN, D. A. & LONDON, E. (2000). Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem* 275, 17221-4.
- BROWN, M. S. & GOLDSTEIN, J. L. (1997). The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 89, 331-40.
- BROWN, M. S. & GOLDSTEIN, J. L. (1999). A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 11041-8.
- BURDON, T., SMITH, A. & SAVATIER, P. (2002). Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. *Trends Cell Biol* 12, 432-8.
- CAI, J., WEISS, M. L. & RAO, M. S. (2004). In search of "stemness". *Exp Hematol* 32, 585-98.
- CAI, J., WU, Y., MIRUA, T., PIERCE, J. L., LUCERO, M. T., ALBERTINE, K. H., SPANGRUDE, G. J. & RAO, M. S. (2002). Properties of a fetal multipotent neural stem cell (NEP cell). *Dev Biol* 251, 221-40.
- CANTOR, A. B. & ORKIN, S. H. (2001). Hematopoietic development: a balancing act. *Curr Opin Genet Dev* 11, 513-9.
- CAREY, K. D., WATSON, R. T., PESSIN, J. E. & STORK, P. J. (2003). The requirement of specific membrane domains for Raf-1 phosphorylation and activation. *J Biol Chem* 278, 3185-96.
- CEREDIG, R., ROLINK, A. G. & BROWN, G. (2009). Models of haematopoiesis: seeing the wood for the trees. *Nat Rev Immunol* 9, 293-300.
- CHAN, K. K., OZA, A. M. & SIU, L. L. (2003). The statins as anticancer agents. *Clin Cancer Res* 9, 10-9.
- CHANG, H. H., HEMBERG, M., BARAHONA, M., INGBER, D. E. & HUANG, S. (2008). Transcriptome-wide noise controls lineage choice in mammalian progenitor cells. *Nature* 453, 544-7.
- CHASIS, J. A. & MOHANDAS, N. (2008). Erythroblastic islands: niches for erythropoiesis. *Blood* 112, 470-8.
- CHELLY, J., CONCORDET, J. P., KAPLAN, J. C. & KAHN, A. (1989). Illegitimate transcription: transcription of any gene in any cell type. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 2617-21.
- CHEN, Y. G. (2009). Endocytic regulation of TGF-beta signaling. *Cell Res* 19, 58-70.
- CHENG, J., TURKEL, N., HEMATI, N., FULLER, M. T., HUNT, A. J. & YAMASHITA, Y. M. (2008). Centrosome misorientation reduces stem cell division during ageing. *Nature* 456, 599-604.

## REFERENCES

- CHENN, A. & MCCONNELL, S. K. (1995). Cleavage orientation and the asymmetric inheritance of Notch1 immunoreactivity in mammalian neurogenesis. *Cell* 82, 631-41.
- CHENN, A. & WALSH, C. A. (2002). Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors. *Science* 297, 365-9.
- CHESHER, S. H., MORRISON, S. J., LIAO, X. & WEISSMAN, I. L. (1999). In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3120-5.
- CHRISTENSON, E., MERLIN, S., SAITO, M. & SCHLESINGER, P. (2008). Cholesterol effects on BAX pore activation. *J Mol Biol* 381, 1168-83.
- CIANA, A., BALDUINI, C. & MINETTI, G. (2005). Detergent-resistant membranes in human erythrocytes and their connection to the membrane-skeleton. *J Biosci* 30, 317-28.
- CIVENNI, G., TEST, S. T., BRODBECK, U. & BUTIKOFER, P. (1998). In vitro incorporation of GPI-anchored proteins into human erythrocytes and their fate in the membrane. *Blood* 91, 1784-92.
- CLARKE, B. J. & HOUSMAN, D. (1977). Characterization of an erythroid precursor cell of high proliferative capacity in normal human peripheral blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 1105-9.
- COHEN, M. M., JR. (2003). The hedgehog signaling network. *Am J Med Genet A* 123, 5-28.
- CORBET, S. W., CLARKE, A. R., GLEDHILL, S. & WYLLIE, A. H. (1999). P53-dependent and -independent links between DNA-damage, apoptosis and mutation frequency in ES cells. *Oncogene* 18, 1537-44.
- COUNTER, C. M., AVILION, A. A., LEFEUVRE, C. E., STEWART, N. G., GREIDER, C. W., HARLEY, C. B. & BACCHETTI, S. (1992). Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J* 11, 1921-9.
- CRIDLAND, S. O., KEYS, J. R., PAPATHANASIOU, P. & PERKINS, A. C. (2009). Indian hedgehog supports definitive erythropoiesis. *Blood Cells Mol Dis* 43, 149-55.
- CRITTENDEN, S. L., TROEMEL, E. R., EVANS, T. C. & KIMBLE, J. (1994). GLP-1 is localized to the mitotic region of the *C. elegans* germ line. *Development* 120, 2901-11.
- CROSS, M. A. & ENVER, T. (1997). The lineage commitment of haemopoietic progenitor cells. *Curr Opin Genet Dev* 7, 609-13.
- D'ANDREA, A. D., LODISH, H. F. & WONG, G. G. (1989). Expression cloning of the murine erythropoietin receptor. *Cell* 57, 277-85.
- DAMIOLA, F., KEIME, C., GONIN-GIRAUD, S., DAZY, S. & GANDRILLON, O. (2004). Global transcription analysis of immature avian erythrocytic progenitors: from self-renewal to differentiation. *Oncogene* 23, 7628-43.
- DANG, H., LIU, Y., PANG, W., LI, C., WANG, N., SHYY, J. Y. & ZHU, Y. (2009). Suppression of 2,3-oxidosqualene cyclase by high fat diet contributes to liver X receptor-alpha-mediated improvement of hepatic lipid profile. *J Biol Chem* 284, 6218-26.
- DAUM, G. & VANCE, J. E. (1997). Import of lipids into mitochondria. *Prog Lipid Res* 36, 103-30.
- DAZY, S., DAMIOLA, F., PARISEY, N., BEUG, H. & GANDRILLON, O. (2003). The MEK-1/ERKs signalling pathway is differentially involved in the self-renewal of early and late avian erythroid progenitor cells. *Oncogene* 22, 9205-16.
- DEHMLow, H., AEBI, J. D., JOLIDON, S., JI, Y. H., VON DER MARK, E. M., HIMBER, J. & MORAND, O. H. (2003). Synthesis and structure-activity studies of novel orally active non-terpenoid 2,3-oxidosqualene cyclase inhibitors. *J Med Chem* 46, 3354-70.
- DEMIERRE, M. F., HIGGINS, P. D., GRUBER, S. B., HAWK, E. & LIPPMAN, S. M. (2005). Statins and cancer prevention. *Nat Rev Cancer* 5, 930-42.

## REFERENCES

- DETMER, K., WALKER, A. N., JENKINS, T. M., STEELE, T. A. & DANNAWI, H. (2000). Erythroid differentiation in vitro is blocked by cyclopamine, an inhibitor of hedgehog signaling. *Blood Cells Mol Dis* 26, 360-72.
- DEXTER, T. M., TESTA, N. G., ALLEN, T. D., RUTHERFORD, T. & SCOLNICK, E. (1981). Molecular and cell biologic aspects of erythropoiesis in long-term bone marrow cultures. *Blood* 58, 699-707.
- DI TALIA, S., SKOTHEIM, J. M., BEAN, J. M., SIGGIA, E. D. & CROSS, F. R. (2007). The effects of molecular noise and size control on variability in the budding yeast cell cycle. *Nature* 448, 947-51.
- DOETSCHMAN, T. C., EISTETTER, H., KATZ, M., SCHMIDT, W. & KEMLER, R. (1985). The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol* 87, 27-45.
- DOLZNIG, H., BOULME, F., STANGL, K., DEINER, E. M., MIKULITS, W., BEUG, H. & MULLNER, E. W. (2001). Establishment of normal, terminally differentiating mouse erythroid progenitors: molecular characterization by cDNA arrays. *FASEB J* 15, 1442-4.
- DOLZNIG, H., GREBIEN, F., DEINER, E. M., STANGL, K., KOLBUS, A., HABERMANN, B., KERENYI, M. A., KIESLINGER, M., MORIGGL, R., BEUG, H. & MULLNER, E. W. (2006). Erythroid progenitor renewal versus differentiation: genetic evidence for cell autonomous, essential functions of EpoR, Stat5 and the GR. *Oncogene* 25, 2890-900.
- DOLZNIG, H., HABERMANN, B., STANGL, K., DEINER, E. M., MORIGGL, R., BEUG, H. & MULLNER, E. W. (2002). Apoptosis protection by the Epo target Bcl-X(L) allows factor-independent differentiation of primary erythroblasts. *Curr Biol* 12, 1076-85.
- DOMINGUES, C. C., CIANA, A., BUTTAFAVA, A., CASADEI, B. R., BALDUINI, C., DE PAULA, E. & MINETTI, G. (2010). Effect of cholesterol depletion and temperature on the isolation of detergent-resistant membranes from human erythrocytes. *J Membr Biol* 234, 195-205.
- DONALDSON, I. J., CHAPMAN, M., KINSTON, S., LANDRY, J. R., KNEZEVIC, K., PILTZ, S., BUCKLEY, N., GREEN, A. R. & GOTTGENS, B. (2005). Genome-wide identification of cis-regulatory sequences controlling blood and endothelial development. *Hum Mol Genet* 14, 595-601.
- DUBART, A., FEGER, F., LACOUT, C., GONCALVES, F., VAINCHENKER, W. & DUMENIL, D. (1994). Murine pluripotent hematopoietic progenitors constitutively expressing a normal erythropoietin receptor proliferate in response to erythropoietin without preferential erythroid cell differentiation. *Mol Cell Biol* 14, 4834-42.
- DURIG, J., ROSENTHAL, C., HALFMAYER, K., WIEMANN, M., NOVOTNY, J., BINGMANN, D., DUHRSEN, U. & SCHIRRMACHER, K. (2000). Intercellular communication between bone marrow stromal cells and CD34+ haematopoietic progenitor cells is mediated by connexin 43-type gap junctions. *Br J Haematol* 111, 416-25.
- EAVES, C. J. & EAVES, A. C. (1979). Erythroid progenitor cell numbers in human marrow - implications for regulation. *Exp Hematol* 7 Suppl 5, 54-64.
- ECKFELDT, C. E., MENDENHALL, E. M., FLYNN, C. M., WANG, T. F., PICKART, M. A., GRINDLE, S. M., EKKER, S. C. & VERFAILLIE, C. M. (2005). Functional analysis of human hematopoietic stem cell gene expression using zebrafish. *PLoS Biol* 3, e254.
- EDIDIN, M. (1997). Lipid microdomains in cell surface membranes. *Curr Opin Struct Biol* 7, 528-32.
- EDIDIN, M. (2001). Shrinking patches and slippery rafts: scales of domains in the plasma membrane. *Trends Cell Biol* 11, 492-6.
- EDITORIAL. (2003). Whither RNAi? *Nat Cell Biol* 5, 489-90.
- ELOWITZ, M. B., LEVINE, A. J., SIGGIA, E. D. & SWAIN, P. S. (2002). Stochastic gene expression in a single cell. *Science* 297, 1183-6.

## REFERENCES

- EMA, H., TAKANO, H., SUDO, K. & NAKAUCHI, H. (2000). In vitro self-renewal division of hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 192, 1281-8.
- ERICSSON, J., USHEVA, A. & EDWARDS, P. A. (1999). YY1 is a negative regulator of transcription of three sterol regulatory element-binding protein-responsive genes. *J Biol Chem* 274, 14508-13.
- ESPINOSA, L., INGLES-ESTEVE, J., AGUILERA, C. & BIGAS, A. (2003). Phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 beta down-regulates Notch activity, a link for Notch and Wnt pathways. *J Biol Chem* 278, 32227-35.
- EVANS, M. J. & KAUFMAN, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-6.
- FAAST, R., WHITE, J., CARTWRIGHT, P., CROCKER, L., SARCEVIC, B. & DALTON, S. (2004). Cdk6-cyclin D3 activity in murine ES cells is resistant to inhibition by p16(INK4a). *Oncogene* 23, 491-502.
- FAUSER, A. A. & MESSNER, H. A. (1979). Identification of megakaryocytes, macrophages, and eosinophils in colonies of human bone marrow containing neutrophilic granulocytes and erythroblasts. *Blood* 53, 1023-7.
- FERRON, S., MIRA, H., FRANCO, S., CANO-JAIMEZ, M., BELLMUNT, E., RAMIREZ, C., FARINAS, I. & BLASCO, M. A. (2004). Telomere shortening and chromosomal instability abrogates proliferation of adult but not embryonic neural stem cells. *Development* 131, 4059-70.
- FICARA, F., MURPHY, M. J., LIN, M. & CLEARY, M. L. (2008). Pbx1 regulates self-renewal of long-term hematopoietic stem cells by maintaining their quiescence. *Cell Stem Cell* 2, 484-96.
- FOLKMAN, J. & MOSCONA, A. (1978). Role of cell shape in growth control. *Nature* 273, 345-9.
- FORTUNEL, N. O., HATZFELD, A. & HATZFELD, J. A. (2000). Transforming growth factor-beta: pleiotropic role in the regulation of hematopoiesis. *Blood* 96, 2022-36.
- FORTUNEL, N. O., OTU, H. H., NG, H. H., CHEN, J., MU, X., CHEVASSUT, T., LI, X., JOSEPH, M., BAILEY, C., HATZFELD, J. A., HATZFELD, A., USTA, F., VEGA, V. B., LONG, P. M., LIBERMANN, T. A. & LIM, B. (2003). Comment on " 'Stemness': transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells" and "a stem cell molecular signature". *Science* 302, 393; author reply 393.
- FOSTER, S. D., ORAM, S. H., WILSON, N. K. & GOTTGENS, B. (2009). From genes to cells to tissues--modelling the haematopoietic system. *Mol Biosyst* 5, 1413-20.
- FOUDI, A., HOCHEDLINGER, K., VAN BUREN, D., SCHINDLER, J. W., JAENISCH, R., CAREY, V. & HOCK, H. (2009). Analysis of histone 2B-GFP retention reveals slowly cycling hematopoietic stem cells. *Nat Biotechnol* 27, 84-90.
- FRASER, S. E. & BRONNER-FRASER, M. (1991). Migrating neural crest cells in the trunk of the avian embryo are multipotent. *Development* 112, 913-20.
- FRIEND, C., SCHER, W., HOLLAND, J. G. & SATO, T. (1971). Hemoglobin synthesis in murine virus-induced leukemic cells in vitro: stimulation of erythroid differentiation by dimethyl sulfoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68, 378-82.
- FULLER, M. T. & SPRADLING, A. C. (2007). Male and female *Drosophila* germline stem cells: two versions of immortality. *Science* 316, 402-4.
- GAGE, F. H. (2000). Mammalian neural stem cells. *Science* 287, 1433-8.
- GAGE, F. H., RAY, J. & FISHER, L. J. (1995). Isolation, characterization, and use of stem cells from the CNS. *Annu Rev Neurosci* 18, 159-92.
- GAINES, P. & WOJCHOWSKI, D. M. (1999). pIRES-CD4t, a dicistronic expression vector for MACS- or FACS-based selection of transfected cells. *Biotechniques* 26, 683-8.
- GANDRILLON, O., FERRAND, N., MICHAILLE, J. J., ROZE, L., ZILE, M. H. & SAMARUT, J. (1994). c-erbA alpha/T3R and RARs control commitment of hematopoietic self-

## REFERENCES

- renewing progenitor cells to apoptosis or differentiation and are antagonized by the v-erbA oncogene. *Oncogene* 9, 749-58.
- GANDRILLON, O. & SAMARUT, J. (1998). Role of the different RAR isoforms in controlling the erythrocytic differentiation sequence. Interference with the v-erbA and p135gag-myb-ets nuclear oncogenes. *Oncogene* 16, 563-74.
- GANDRILLON, O., SCHMIDT, U., BEUG, H. & SAMARUT, J. (1999). TGF-beta cooperates with TGF-alpha to induce the self-renewal of normal erythrocytic progenitors: evidence for an autocrine mechanism. *Embo J* 18, 2764-81.
- GAUTHAMAN, K., FONG, C. Y. & BONGSO, A. (2009). Statins, stem cells, and cancer. *J Cell Biochem* 106, 975-83.
- GERECHT, S., BETTINGER, C. J., ZHANG, Z., BORENSTEIN, J. T., VUNJAK-NOVAKOVIC, G. & LANGER, R. (2007). The effect of actin disrupting agents on contact guidance of human embryonic stem cells. *Biomaterials* 28, 4068-77.
- GINIS, I., LUO, Y., MIURA, T., THIES, S., BRANDENBERGER, R., GERECHT-NIR, S., AMIT, M., HOKE, A., CARPENTER, M. K., ITSKOVITZ-ELDOR, J. & RAO, M. S. (2004). Differences between human and mouse embryonic stem cells. *Dev Biol* 269, 360-80.
- GIRTON, J. R. & JOHANSEN, K. M. (2008). Chromatin structure and the regulation of gene expression: the lessons of PEV in *Drosophila*. *Adv Genet* 61, 1-43.
- GOLDSTEIN, J. L., DEBOSE-BOYD, R. A. & BROWN, M. S. (2006). Protein sensors for membrane sterols. *Cell* 124, 35-46.
- GONIN-GIRAUD, S., BRESSON-MAZET, C. & GANDRILLON, O. (2008). Involvement of the TGF-beta and mTOR/p70S6Kinase pathways in the transformation process induced by v-ErbA. *Leuk Res* 32, 1878-88.
- GORDON, M. Y. (1993). Human haemopoietic stem cell assays. *Blood Rev* 7, 190-7.
- GORDON, M. Y., MARLEY, S. B., LEWIS, J. L., DAVIDSON, R. J., NGUYEN, D. X., GRAND, F. H., AMOS, T. A. & GOLDMAN, J. M. (1998). Treatment with interferon-alpha preferentially reduces the capacity for amplification of granulocyte-macrophage progenitors (CFU-GM) from patients with chronic myeloid leukemia but spares normal CFU-GM. *J Clin Invest* 102, 710-5.
- GOTTGENS, B., NASTOS, A., KINSTON, S., PILTZ, S., DELABESSE, E. C., STANLEY, M., SANCHEZ, M. J., CIAU-UITZ, A., PATIENT, R. & GREEN, A. R. (2002). Establishing the transcriptional programme for blood: the SCL stem cell enhancer is regulated by a multiprotein complex containing Ets and GATA factors. *EMBO J* 21, 3039-50.
- GREEN, D. R. & KROEMER, G. (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305, 626-9.
- GREENBERGER, J. S., SAKAKEENY, M. A., HUMPHRIES, R. K., EAVES, C. J. & ECKNER, R. J. (1983). Demonstration of permanent factor-dependent multipotential (erythroid/neutrophil/basophil) hematopoietic progenitor cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 2931-5.
- GREGORY, C. J. & EAVES, A. C. (1978). Three stages of erythropoietic progenitor cell differentiation distinguished by a number of physical and biologic properties. *Blood* 51, 527-37.
- GREGORY, T., YU, C., MA, A., ORKIN, S. H., BLOBEL, G. A. & WEISS, M. J. (1999). GATA-1 and erythropoietin cooperate to promote erythroid cell survival by regulating bcl-xL expression. *Blood* 94, 87-96.
- GREIDER, C. W. (1998). Telomerase activity, cell proliferation, and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 90-2.
- GREIDER, C. W. & BLACKBURN, E. H. (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* 43, 405-13.
- GUY, R. K. (2000). Inhibition of sonic hedgehog autoprocessing in cultured mammalian cells by sterol deprivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 7307-12.



## REFERENCES

- HAECKEL, E. (1868a). Siebzehnter Vortrag : Stammbaum und Geschichte des Thierreichs (17th lesson: Family tree and history of the animal kingdom). In *Natürliche Schöpfungsgeschichte* (ed. G. Reimer), Berlin.
- HAECKEL, E. H. P. A. (1868b). *Natürliche Schöpfungsgeschichte. Gemeinverständliche wissenschaftliche Vorträge über die Entwicklungslehre im Allgemeinen und diejenige von Darwin, Goethe und Lamarck und Besonderen.* G. Reimer, Berlin.
- HAECKEL, E. H. P. A. (1877). Stammzelle oder Cytula. In *Anthropogenie; oder, Entwicklungsgeschichte des menschen, Keimes- und stammesgeschichte*, vol. 3rd ed., pp. 144. Wilhelm Engelmann, Leipzig.
- HALFORD, S. E. (2009). An end to 40 years of mistakes in DNA-protein association kinetics? *Biochem Soc Trans* 37, 343-8.
- HALFORD, S. E. & MARKO, J. F. (2004). How do site-specific DNA-binding proteins find their targets? *Nucleic Acids Res* 32, 3040-52.
- HARRISON, D. E. & ASTLE, C. M. (1997). Short- and long-term multilineage repopulating hematopoietic stem cells in late fetal and newborn mice: models for human umbilical cord blood. *Blood* 90, 174-81.
- HASHIMOTO, K., YAMADA, M., MATSUMOTO, S., MONDEN, T., SATOH, T. & MORI, M. (2006). Mouse sterol response element binding protein-1c gene expression is negatively regulated by thyroid hormone. *Endocrinology* 147, 4292-302.
- HAYFLICK, L. (1965). The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res* 37, 614-36.
- HEATH, D. S., AXELRAD, A. A., MCLEOD, D. L. & SHREEVE, M. M. (1976). Separation of the erythropoietin-responsive progenitors BFU-E and CFU-E in mouse bone marrow by unit gravity sedimentation. *Blood* 47, 777-92.
- HENDERSON, S. T., GAO, D., LAMBIE, E. J. & KIMBLE, J. (1994). lag-2 may encode a signaling ligand for the GLP-1 and LIN-12 receptors of *C. elegans*. *Development* 120, 2913-24.
- HENTZE, M. W., MUCKENTHALER, M. U. & ANDREWS, N. C. (2004). Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell* 117, 285-97.
- HERRERA, E., SAMPER, E. & BLASCO, M. A. (1999). Telomere shortening in mTR<sup>-/-</sup> embryos is associated with failure to close the neural tube. *EMBO J* 18, 1172-81.
- HOANG, T. (2004). The origin of hematopoietic cell type diversity. *Oncogene* 23, 7188-98.
- HOUSLAY, M. D. & STANLEY, K. K. (1982). *Dynamics of biological membranes.* John Wiley & Sons, Inc, New York
- HUANG, S. (2010). Cell Lineage Determination in State Space: A Systems View Brings Flexibility to Dogmatic Canonical Rules. *PLoS Biol* 8, e1000380.
- HUFF, M. W. & TELFORD, D. E. (2005). Lord of the rings—the mechanism for oxidosqualene:lanosterol cyclase becomes crystal clear. *Trends Pharmacol Sci* 26, 335-40.
- HUMPHRIES, R. K., EAVES, A. C. & EAVES, C. J. (1981). Self-renewal of hemopoietic stem cells during mixed colony formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 3629-33.
- HUTTNER, W. B. & KOSODO, Y. (2005). Symmetric versus asymmetric cell division during neurogenesis in the developing vertebrate central nervous system. *Curr Opin Cell Biol* 17, 648-57.
- HWANG, N. S., VARGHESE, S. & ELISSEFF, J. (2007). Cartilage tissue engineering: Directed differentiation of embryonic stem cells in three-dimensional hydrogel culture. *Methods Mol Biol* 407, 351-73.
- HWANG, Y. S., RANDLE, W. L., BIELBY, R. C., POLAK, J. M. & MANTALARIS, A. (2006). Enhanced derivation of osteogenic cells from murine embryonic stem cells after treatment with HepG2-conditioned medium and modulation of the embryoid body formation period: application to skeletal tissue engineering. *Tissue Eng* 12, 1381-92.

## REFERENCES

- INCARDONA, J. P. & EATON, S. (2000). Cholesterol in signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* 12, 193-203.
- ISCOVE, N. N., MESSNER, H., TILL, J. E. & MCCULLOCH, E. A. (1972). Human marrow cells forming colonies in culture: analysis by velocity sedimentation and suspension culture. *Ser Haematol* 5, 37-49.
- ISCOVE, N. N. & SIEBER, F. (1975). Erythroid progenitors in mouse bone marrow detected by macroscopic colony formation in culture. *Exp Hematol* 3, 32-43.
- ISHIZUKA, T. & LAZAR, M. A. (2003). The N-CoR/histone deacetylase 3 complex is required for repression by thyroid hormone receptor. *Mol Cell Biol* 23, 5122-31.
- ITO, K., HIRAO, A., ARAI, F., MATSUOKA, S., TAKUBO, K., HAMAGUCHI, I., NOMIYAMA, K., HOSOKAWA, K., SAKURADA, K., NAKAGATA, N., IKEDA, Y., MAK, T. W. & SUDA, T. (2004). Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 431, 997-1002.
- ITO, K., HIRAO, A., ARAI, F., TAKUBO, K., MATSUOKA, S., MIYAMOTO, K., OHMURA, M., NAKA, K., HOSOKAWA, K., IKEDA, Y. & SUDA, T. (2006). Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. *Nat Med* 12, 446-51.
- IVANOVA, N. B., DIMOS, J. T., SCHANIEL, C., HACKNEY, J. A., MOORE, K. A. & LEMISCHKA, I. R. (2002). A stem cell molecular signature. *Science* 298, 601-4.
- IVANOVA, N. B., DIMOS, J. T., SCHANIEL, C., HACKNEY, J. A., MOORE, K. A., LEMISCHKA, I. R., RAMALHO-SANTOS, M., YOON, S., MATSUZAKI, Y., MULLIGAN, R. C. & MELTON, D. A. (2003). Response to Comments on " 'Stemness': Transcriptional Profiling of Embryonic and Adult Stem Cells" and "A Stem Cell Molecular Signature". *Science* 302, 393d.
- IWAMA, A., OGURO, H., NEGISHI, M., KATO, Y., MORITA, Y., TSUKUI, H., EMA, H., KAMIJO, T., KATOH-FUKUI, Y., KOSEKI, H., VAN LOHUIZEN, M. & NAKAUCHI, H. (2004). Enhanced self-renewal of hematopoietic stem cells mediated by the polycomb gene product Bmi-1. *Immunity* 21, 843-51.
- JAENISCH, R. & YOUNG, R. (2008). Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell* 132, 567-82.
- JAKOB, H., BOON, T., GAILLARD, J., NICOLAS, J. & JACOB, F. (1973). [Teratocarcinoma of the mouse: isolation, culture and properties of pluripotential cells]. *Ann Microbiol (Paris)* 124, 269-82.
- JIANG, Y., VAESSEN, B., LENVIK, T., BLACKSTAD, M., REYES, M. & VERFAILLIE, C. M. (2002). Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol* 30, 896-904.
- JIRMANOVA, L., AFANASSIEFF, M., GOBERT-GOSSE, S., MARKOSSIAN, S. & SAVATIER, P. (2002). Differential contributions of ERK and PI3-kinase to the regulation of cyclin D1 expression and to the control of the G1/S transition in mouse embryonic stem cells. *Oncogene* 21, 5515-28.
- JU, Z. & RUDOLPH, K. L. (2006). Telomeres and telomerase in stem cells during aging and disease. *Genome Dyn* 1, 84-103.
- JUDE, C. D., CLIMER, L., XU, D., ARTINGER, E., FISHER, J. K. & ERNST, P. (2007). Unique and independent roles for MLL in adult hematopoietic stem cells and progenitors. *Cell Stem Cell* 1, 324-37.
- KAERN, M., ELSTON, T. C., BLAKE, W. J. & COLLINS, J. J. (2005). Stochasticity in gene expression: from theories to phenotypes. *Nat Rev Genet* 6, 451-64.
- KAI, T. & SPRADLING, A. (2003). An empty Drosophila stem cell niche reactivates the proliferation of ectopic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4633-8.

## REFERENCES

- KALMAR, T., LIM, C., HAYWARD, P., MUNOZ-DESCALZO, S., NICHOLS, J., GARCIA-OJALVO, J. & MARTINEZ ARIAS, A. (2009). Regulated fluctuations in nanog expression mediate cell fate decisions in embryonic stem cells. *PLoS Biol* 7, e1000149.
- KAPUR, R., MAJUMDAR, M., XIAO, X., MCANDREWS-HILL, M., SCHINDLER, K. & WILLIAMS, D. A. (1998). Signaling through the interaction of membrane-restricted stem cell factor and c-kit receptor tyrosine kinase: genetic evidence for a differential role in erythropoiesis. *Blood* 91, 879-89.
- KARANU, F. N., MURDOCH, B., GALLACHER, L., WU, D. M., KOREMOTO, M., SAKANO, S. & BHATIA, M. (2000). The notch ligand jagged-1 represents a novel growth factor of human hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 192, 1365-72.
- KARP, G. (2007). The Structure and Function of the Plasma Membrane. In *Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments*, 5th Edition (ed. J. W. S. Ltd), pp. 120-179.
- KATO, Y., HABAS, R., KATSUYAMA, Y., NAAR, A. M. & HE, X. (2002). A component of the ARC/Mediator complex required for TGF beta/Nodal signalling. *Nature* 418, 641-6.
- KAWAKAMI, K., IMANAKA, K., ITOH, M. & TAIRA, M. (2004). Excision of the Tol2 transposable element of the medaka fish *Oryzias latipes* in *Xenopus laevis* and *Xenopus tropicalis*. *Gene* 338, 93-8.
- KIEL, M. J., HE, S., ASHKENAZI, R., GENTRY, S. N., TETA, M., KUSHNER, J. A., JACKSON, T. L. & MORRISON, S. J. (2007). Haematopoietic stem cells do not asymmetrically segregate chromosomes or retain BrdU. *Nature* 449, 238-42.
- KIGER, A. A., JONES, D. L., SCHULZ, C., ROGERS, M. B. & FULLER, M. T. (2001). Stem cell self-renewal specified by JAK-STAT activation in response to a support cell cue. *Science* 294, 2542-5.
- KIMBLE, J. & CRITTENDEN, S. L. (2007). Controls of germline stem cells, entry into meiosis, and the sperm/oocyte decision in *Caenorhabditis elegans*. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23, 405-33.
- KLINKEN, S. P., NICOLA, N. A. & JOHNSON, G. R. (1988). In vitro-derived leukemic erythroid cell lines induced by a raf- and myc-containing retrovirus differentiate in response to erythropoietin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 8506-10.
- KNOBLICH, J. A. (2008). Mechanisms of asymmetric stem cell division. *Cell* 132, 583-97.
- KO, M. S., NAKAUCHI, H. & TAKAHASHI, N. (1990). The dose dependence of glucocorticoid-inducible gene expression results from changes in the number of transcriptionally active templates. *EMBO J* 9, 2835-42.
- KOLBUS, A., BLAZQUEZ-DOMINGO, M., CAROTTA, S., BAKKER, W., LUEDEMANN, S., VON LINDERN, M., STEINLEIN, P. & BEUG, H. (2003). Cooperative signaling between cytokine receptors and the glucocorticoid receptor in the expansion of erythroid progenitors: molecular analysis by expression profiling. *Blood* 102, 3136-46.
- KOLLET, O., DAR, A., SHIVTIEL, S., KALINKOVICH, A., LAPID, K., SZTAINBERG, Y., TESIO, M., SAMSTEIN, R. M., GOICHBURG, P., SPIEGEL, A., ELSON, A. & LAPIDOT, T. (2006). Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells. *Nat Med* 12, 657-64.
- KOTZKA, J., LEHR, S., ROTH, G., AVCI, H., KNEBEL, B. & MULLER-WIELAND, D. (2004). Insulin-activated Erk-mitogen-activated protein kinases phosphorylate sterol regulatory element-binding Protein-2 at serine residues 432 and 455 in vivo. *J Biol Chem* 279, 22404-11.
- KOTZKA, J., MULLER-WIELAND, D., ROTH, G., KREMER, L., MUNCK, M., SCHURMANN, S., KNEBEL, B. & KRONE, W. (2000). Sterol regulatory element binding proteins (SREBP)-1a and SREBP-2 are linked to the MAP-kinase cascade. *J Lipid Res* 41, 99-108.

## REFERENCES

- KOURY, M. J. & BONDURANT, M. C. (1990). Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed death in erythroid progenitor cells. *Science* 248, 378-81.
- KRUGER, G. M., MOSHER, J. T., BIXBY, S., JOSEPH, N., IWASHITA, T. & MORRISON, S. J. (2002). Neural crest stem cells persist in the adult gut but undergo changes in self-renewal, neuronal subtype potential, and factor responsiveness. *Neuron* 35, 657-69.
- KUANG, S., KURODA, K., LE GRAND, F. & RUDNICKI, M. A. (2007). Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle. *Cell* 129, 999-1010.
- KUBO, M., NAKAMURA, M., TASAKI, A., YAMANAKA, N., NAKASHIMA, H., NOMURA, M., KUROKI, S. & KATANO, M. (2004). Hedgehog signaling pathway is a new therapeutic target for patients with breast cancer. *Cancer Res* 64, 6071-4.
- KUPIEC, J. J. (1983). A probabilist theory for cell differentiation, embryonic mortality and DNA C-value Paradox. *Speculations in Science and Technology* 6, 471-478.
- KUPIEC, J. J. (1997). A Darwinian theory for the origin of cellular differentiation. *Mol Gen Genet* 255, 201-8.
- KURAMOCHI, S., SUGIMOTO, Y., IKAWA, Y. & TODOKORO, K. (1990). Transmembrane signaling during erythropoietin- and dimethylsulfoxide-induced erythroid cell differentiation. *Eur J Biochem* 193, 163-8.
- LACOMBE, C. & MAYEUX, P. (1998). Biology of erythropoietin. *Haematologica* 83, 724-32.
- LADURNER, A. G. (2009). Chromatin places metabolism center stage. *Cell* 138, 18-20.
- LAFORGE, B., GUEZ, D., MARTINEZ, M. & KUPIEC, J. J. (2005). Modeling embryogenesis and cancer: an approach based on an equilibrium between the autostabilization of stochastic gene expression and the interdependence of cells for proliferation. *Prog Biophys Mol Biol* 89, 93-120.
- LAI, K., KASPAR, B. K., GAGE, F. H. & SCHAFFER, D. V. (2003). Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo. *Nat Neurosci* 6, 21-7.
- LAKSHMIPATHY, U. & VERFAILLIE, C. (2005). Stem cell plasticity. *Blood Rev* 19, 29-38.
- LE GUERNEVE, C. & AUGER, M. (1995). New approach to study fast and slow motions in lipid bilayers: application to dimyristoylphosphatidylcholine-cholesterol interactions. *Biophys J* 68, 1952-9.
- LECHLER, T. & FUCHS, E. (2005). Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin. *Nature* 437, 275-80.
- LECUYER, E. & HOANG, T. (2004). SCL: from the origin of hematopoiesis to stem cells and leukemia. *Exp Hematol* 32, 11-24.
- LEE, C. Y., ROBINSON, K. J. & DOE, C. Q. (2006). Lgl, Pins and aPKC regulate neuroblast self-renewal versus differentiation. *Nature* 439, 594-8.
- LEE, H. W., BLASCO, M. A., GOTTLIEB, G. J., HORNER, J. W., 2ND, GREIDER, C. W. & DEPINHO, R. A. (1998). Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs. *Nature* 392, 569-74.
- LEE, J. C., MAYER-PROSCHEL, M. & RAO, M. S. (2000). Gliogenesis in the central nervous system. *Glia* 30, 105-21.
- LEE, M. Y., RYU, J. M., LEE, S. H., PARK, J. H. & HAN, H. J. (2010a). Lipid rafts play an important role for maintenance of embryonic stem cell self-renewal. *J Lipid Res*.
- LEE, S. K., KIM, Y. C., SONG, S. B. & KIM, Y. S. (2010b). Stabilization and translocation of p53 to mitochondria is linked to Bax translocation to mitochondria in simvastatin-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 391, 1592-7.
- LENOX, L. E., SHI, L., HEGDE, S. & PAULSON, R. F. (2009). Extramedullary erythropoiesis in the adult liver requires BMP-4/Smad5-dependent signaling. *Exp Hematol* 37, 549-58.
- LESALT, I., QUANG, C. T., FRAMPTON, J. & GHYSDAEL, J. (2002). Direct regulation of BCL-2 by FLI-1 is involved in the survival of FLI-1-transformed erythroblasts. *Embo J* 21, 694-703.

## REFERENCES

- LESSARD, J. & SAUVAGEAU, G. (2003). Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. *Nature* 423, 255-60.
- LEVENSON, R. & HOUSMAN, D. (1981). Commitment: how do cells make the decision to differentiate? *Cell* 25, 5-6.
- LEVI, B. P. & MORRISON, S. J. (2008). Stem cells use distinct self-renewal programs at different ages. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 73, 539-53.
- LEVIN, M. (2002). Isolation and community: a review of the role of gap-junctional communication in embryonic patterning. *J Membr Biol* 185, 177-92.
- LEVSKY, J. M., SHENOY, S. M., PEZO, R. C. & SINGER, R. H. (2002). Single-cell gene expression profiling. *Science* 297, 836-40.
- LEVSKY, J. M. & SINGER, R. H. (2003). Gene expression and the myth of the average cell. *Trends Cell Biol* 13, 4-6.
- LEYCHKIS, Y., MUNZER, S. R. & RICHARDSON, J. L. (2009). What is stemness? *Stud Hist Philos Biol Biomed Sci* 40, 312-20.
- LIN, C. S., LIM, S. K., D'AGATI, V. & COSTANTINI, F. (1996). Differential effects of an erythropoietin receptor gene disruption on primitive and definitive erythropoiesis. *Genes Dev* 10, 154-64.
- LINGWOOD, D. & SIMONS, K. (2010). Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* 327, 46-50.
- LITT, M. D., SIMPSON, M., GASZNER, M., ALLIS, C. D. & FELSENFELD, G. (2001). Correlation between histone lysine methylation and developmental changes at the chicken beta-globin locus. *Science* 293, 2453-5.
- LIU, Y., ELF, S. E., MIYATA, Y., SASHIDA, G., HUANG, G., DI GIANDOMENICO, S., LEE, J. M., DEBLASIO, A., MENENDEZ, S., ANTIPIN, J., REVA, B., KOFF, A. & NIMER, S. D. (2009). p53 regulates hematopoietic stem cell quiescence. *Cell Stem Cell* 4, 37-48.
- LODISH, H., BERK, A., MATSUDAIRA, P., KAISER, C. A., KRIEGER, M., SCOTT, M. P., ZIPURSKY, S. L. & DARNELL, J. (1997). *Biologie Moléculaire de la Cellule*, 2<sup>ème</sup> édition. De Boeck Université, Bruxelles.
- LORDAN, S., MACKRILL, J. J. & O'BRIEN, N. M. (2009). Oxysterols and mechanisms of apoptotic signaling: implications in the pathology of degenerative diseases. *J Nutr Biochem* 20, 321-36.
- LOSICK, R. & DESPLAN, C. (2008). Stochasticity and cell fate. *Science* 320, 65-8.
- LOZZIO, C. B. & LOZZIO, B. B. (1975). Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* 45, 321-34.
- LUCKEN-ARDJOMANDE, S., MONTESSUIT, S. & MARTINOU, J. C. (2008). Bax activation and stress-induced apoptosis delayed by the accumulation of cholesterol in mitochondrial membranes. *Cell Death Differ* 15, 484-93.
- MA, X., WANG, Q., JIANG, Y., XIAO, Z., FANG, X. & CHEN, Y. G. (2007). Lateral diffusion of TGF-beta type I receptor studied by single-molecule imaging. *Biochem Biophys Res Commun* 356, 67-71.
- MACHOLD, R., HAYASHI, S., RUTLIN, M., MUZUMDAR, M. D., NERY, S., CORBIN, J. G., GRITLI-LINDE, A., DELLOVADE, T., PORTER, J. A., RUBIN, L. L., DUDEK, H., MCMAHON, A. P. & FISHELL, G. (2003). Sonic hedgehog is required for progenitor cell maintenance in telencephalic stem cell niches. *Neuron* 39, 937-50.
- MANDAL, L., MARTINEZ-AGOSTO, J. A., EVANS, C. J., HARTENSTEIN, V. & BANERJEE, U. (2007). A Hedgehog- and Antennapedia-dependent niche maintains *Drosophila* haematopoietic precursors. *Nature* 446, 320-4.
- MARKS, P. A. & RIFKIND, R. A. (1978). Erythroleukemic differentiation. *Annu Rev Biochem* 47, 419-48.
- MATALLANAS, D., SANZ-MORENO, V., AROZARENA, I., CALVO, F., AGUDO-IBANEZ, L., SANTOS, E., BERCIANO, M. T. & CRESPO, P. (2006). Distinct utilization of effectors

## REFERENCES

- and biological outcomes resulting from site-specific Ras activation: Ras functions in lipid rafts and Golgi complex are dispensable for proliferation and transformation. *Mol Cell Biol* 26, 100-16.
- MAXIMOW, A. (1909). Der Lymphozyt als gemeinsame Stammzelle der verschiedenen Blutelemente in der embryonalen Entwicklung und im postfetalen Leben der Säugetiere. In *Folia Haematologica*, vol. 8, pp. 125-141. Verlag Von August Hirschwald, Leipzig.
- MCCARTHUR, G. A., LONGMORE, G. D., KLINGLER, K. & JOHNSON, G. R. (1995). Lineage-restricted recruitment of immature hematopoietic progenitor cells in response to Epo after normal hematopoietic cell transfection with EpoR. *Exp Hematol* 23, 645-54.
- MCCARTHUR, G. A., ROHRSCHEIDER, L. R. & JOHNSON, G. R. (1994). Induced expression of c-fms in normal hematopoietic cells shows evidence for both conservation and lineage restriction of signal transduction in response to macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 83, 972-81.
- MCCCLINTOCK, B. (1938). The Production of Homozygous Deficient Tissues with Mutant Characteristics by Means of the Aberrant Mitotic Behavior of Ring-Shaped Chromosomes. *Genetics* 23, 315-76.
- MCDONALD, J. C. & WHITESIDES, G. M. (2002). Poly(dimethylsiloxane) as a material for fabricating microfluidic devices. *Acc Chem Res* 35, 491-9.
- MCMAHON, K. A., HIEW, S. Y., HADJUR, S., VEIGA-FERNANDES, H., MENZEL, U., PRICE, A. J., KIOUSSIS, D., WILLIAMS, O. & BRADY, H. J. (2007). Mll has a critical role in fetal and adult hematopoietic stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell* 1, 338-45.
- MEJIA-POUS, C., VINUELAS, J., FAURE, C., KOSZELA, J., KAWAKAMI, K., TAKAHASHI, Y. & GANDRILLON, O. (2009). A combination of transposable elements and magnetic cell sorting provides a very efficient transgenesis system for chicken primary erythroid progenitors. *BMC Biotechnol* 9, 81.
- MELETIS, K., WIRTA, V., HEDE, S. M., NISTER, M., LUNDEBERG, J. & FRISEN, J. (2006). p53 suppresses the self-renewal of adult neural stem cells. *Development* 133, 363-9.
- MELLO, C. C., SCHUBERT, C., DRAPER, B., ZHANG, W., LOBEL, R. & PRIESS, J. R. (1996). The PIE-1 protein and germline specification in *C. elegans* embryos. *Nature* 382, 710-2.
- MENDENHALL, E. M. & BERNSTEIN, B. E. (2008). Chromatin state maps: new technologies, new insights. *Curr Opin Genet Dev* 18, 109-15.
- MERCHANT, A., JOSEPH, G., WANG, Q., BRENNAN, S. & MATSUI, W. (2010). Gli1 regulates the proliferation and differentiation of HSC and myeloid progenitors. *Blood*.
- MESHORER, E., YELLAJOSHULA, D., GEORGE, E., SCAMBLER, P. J., BROWN, D. T. & MISTELI, T. (2006). Hyperdynamic plasticity of chromatin proteins in pluripotent embryonic stem cells. *Dev Cell* 10, 105-16.
- METCALF, D. (1999). Stem cells, pre-progenitor cells and lineage-committed cells: are our dogmas correct? *Ann N Y Acad Sci* 872, 289-303; discussion 303-4.
- METCALF, D. & NICOLA, N. A. (1984). The regulatory factors controlling murine erythropoiesis in vitro. *Prog Clin Biol Res* 148, 93-105.
- METZ, T. & GRAF, T. (1991). v-myb and v-ets transform chicken erythroid cells and cooperate both in trans and in cis to induce distinct differentiation phenotypes. *Genes Dev* 5, 369-80.
- MEY, A., GANDRILLON, O., MCNAGNY, K. M., CLEGG, D. O. & SAMARUT, J. (2002). The v-erbA oncogene blocks expression of alpha2/beta1 integrin a normal inhibitor of erythroid progenitor proliferation. *Oncogene* 21, 2864-72.
- MIRANDA-SAAVEDRA, D. & GOTTGENS, B. (2008). Transcriptional regulatory networks in haematopoiesis. *Curr Opin Genet Dev* 18, 530-5.
- MIYAMOTO, K., ARAKI, K. Y., NAKA, K., ARAI, F., TAKUBO, K., YAMAZAKI, S., MATSUOKA, S., MIYAMOTO, T., ITO, K., OHMURA, M., CHEN, C., HOSOKAWA, K., NAKAUCHI, H.,

## REFERENCES

- NAKAYAMA, K., NAKAYAMA, K. I., HARADA, M., MOTOYAMA, N., SUDA, T. & HIRAO, A. (2007). Foxo3a is essential for maintenance of the hematopoietic stem cell pool. *Cell Stem Cell* 1, 101-12.
- MOLOFSKY, A. V., PARDAL, R., IWASHITA, T., PARK, I. K., CLARKE, M. F. & MORRISON, S. J. (2003). Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation. *Nature* 425, 962-7.
- MOLOFSKY, A. V., PARDAL, R. & MORRISON, S. J. (2004). Diverse mechanisms regulate stem cell self-renewal. *Curr Opin Cell Biol* 16, 700-7.
- MONTERO, J., MORALES, A., LLACUNA, L., LLUIS, J. M., TERRONES, O., BASANEZ, G., ANTONSSON, B., PRIETO, J., GARCIA-RUIZ, C., COLELL, A. & FERNANDEZ-CHECA, J. C. (2008). Mitochondrial cholesterol contributes to chemotherapy resistance in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 68, 5246-56.
- MOORE, K. A. & LEMISCHKA, I. R. (2006). Stem cells and their niches. *Science* 311, 1880-5.
- MORAND, O. H., AEBI, J. D., DEHMLow, H., Ji, Y. H., GAINS, N., LENGSELD, H. & HIMBER, J. (1997). Ro 48-8.071, a new 2,3-oxidosqualene:lanosterol cyclase inhibitor lowering plasma cholesterol in hamsters, squirrel monkeys, and minipigs: comparison to simvastatin. *J Lipid Res* 38, 373-90.
- MORRIS, C. E. & HOMANN, U. (2001). Cell surface area regulation and membrane tension. *J Membr Biol* 179, 79-102.
- MORRISON, S. J., HEMMATI, H. D., WANDYCYZ, A. M. & WEISSMAN, I. L. (1995). The purification and characterization of fetal liver hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 10302-6.
- MORRISON, S. J., PROWSE, K. R., HO, P. & WEISSMAN, I. L. (1996). Telomerase activity in hematopoietic cells is associated with self-renewal potential. *Immunity* 5, 207-16.
- MORRISON, S. J. & SPRADLING, A. C. (2008). Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell* 132, 598-611.
- MORRISON, S. J., WHITE, P. M., ZOCK, C. & ANDERSON, D. J. (1999). Prospective identification, isolation by flow cytometry, and in vivo self-renewal of multipotent mammalian neural crest stem cells. *Cell* 96, 737-49.
- MOTOYAMA, K., KAMEYAMA, K., ONODERA, R., ARAKI, N., HIRAYAMA, F., UEKAMA, K. & ARIMA, H. (2009). Involvement of PI3K-Akt-Bad pathway in apoptosis induced by 2,6-di-O-methyl-beta-cyclodextrin, not 2,6-di-O-methyl-alpha-cyclodextrin, through cholesterol depletion from lipid rafts on plasma membranes in cells. *Eur J Pharm Sci* 38, 249-61.
- MULLER, A. M., MEDVINSKY, A., STROUBOULIS, J., GROSELD, F. & DZIERZAK, E. (1994). Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo. *Immunity* 1, 291-301.
- MURPHY, M. & BARTLETT, P. F. (1993). Molecular regulation of neural crest development. *Mol Neurobiol* 7, 111-35.
- MURPHY, S. C., SAMUEL, B. U., HARRISON, T., SPEICHER, K. D., SPEICHER, D. W., REID, M. E., PROHASKA, R., LOW, P. S., TANNER, M. J., MOHANDAS, N. & HALDAR, K. (2004). Erythrocyte detergent-resistant membrane proteins: their characterization and selective uptake during malarial infection. *Blood* 103, 1920-8.
- MYERS, C. E., MCGUIRE, W. P., LISS, R. H., IFRIM, I., GROTZINGER, K. & YOUNG, R. C. (1977). Adriamycin: the role of lipid peroxidation in cardiac toxicity and tumor response. *Science* 197, 165-7.
- NA NAKORN, T., TRAVER, D., WEISSMAN, I. L. & AKASHI, K. (2002). Myeloerythroid-restricted progenitors are sufficient to confer radioprotection and provide the majority of day 8 CFU-S. *J Clin Invest* 109, 1579-85.

## REFERENCES

- NAGAO, E., SEYDEL, K. B. & DVORAK, J. A. (2002). Detergent-resistant erythrocyte membrane rafts are modified by a *Plasmodium falciparum* infection. *Exp Parasitol* 102, 57-9.
- NAKAGAWA, T., NABESHIMA, Y. & YOSHIDA, S. (2007). Functional identification of the actual and potential stem cell compartments in mouse spermatogenesis. *Dev Cell* 12, 195-206.
- NAKAHATA, T. & OGAWA, M. (1982). Identification in culture of a class of hemopoietic colony-forming units with extensive capability to self-renew and generate multipotential hemopoietic colonies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 3843-7.
- NAVARRO, S., MEZA, N. W., QUINTANA-BUSTAMANTE, O., CASADO, J. A., JACOME, A., MCALLISTER, K., PUERTO, S., SURRELLES, J., SEGOVIA, J. C. & BUEREN, J. A. (2006). Hematopoietic dysfunction in a mouse model for Fanconi anemia group D1. *Mol Ther* 14, 525-35.
- NEILDEZ-NGUYEN, T. M., PARISOT, A., VIGNAL, C., RAMEAU, P., STOCKHOLM, D., PICOT, J., ALLO, V., LE BEC, C., LAPLACE, C. & PALDI, A. (2008). Epigenetic gene expression noise and phenotypic diversification of clonal cell populations. *Differentiation* 76, 33-40.
- NIE, Y., HAN, Y. C. & ZOU, Y. R. (2008). CXCR4 is required for the quiescence of primitive hematopoietic cells. *J Exp Med* 205, 777-83.
- NIEMCZYK, E., MAJCAK, A., HALLMANN, A., KEDZIOR, J., WOZNIAK, M. & WAKABAYASHI, T. (2004). A possible involvement of plasma membrane NAD(P)H oxidase in the switch mechanism of the cell death mode from apoptosis to necrosis in menadione-induced cell injury. *Acta Biochim Pol* 51, 1015-22.
- NIJNIK, A., WOODBINE, L., MARCHETTI, C., DAWSON, S., LAMBE, T., LIU, C., RODRIGUES, N. P., CROCKFORD, T. L., CABUY, E., VINDIGNI, A., ENVER, T., BELL, J. I., SLIJEPCEVIC, P., GOODNOW, C. C., JEGGO, P. A. & CORNALL, R. J. (2007). DNA repair is limiting for haematopoietic stem cells during ageing. *Nature* 447, 686-90.
- NISHINO, J., KIM, I., CHADA, K. & MORRISON, S. J. (2008). Hmga2 promotes neural stem cell self-renewal in young but not old mice by reducing p16Ink4a and p19Arf Expression. *Cell* 135, 227-39.
- NIWA, H., MIYAZAKI, J. & SMITH, A. G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 24, 372-6.
- ORY, D. S. (2004). Nuclear receptor signaling in the control of cholesterol homeostasis: have the orphans found a home? *Circ Res* 95, 660-70.
- OTTERSBUCH, K., SMITH, A., WOOD, A. & GOTTGENS, B. (2010). Ontogeny of haematopoiesis: recent advances and open questions. *Br J Haematol* 148, 343-55.
- OYAMADA, Y., KOMATSU, K., KIMURA, H., MORI, M. & OYAMADA, M. (1996). Differential regulation of gap junction protein (connexin) genes during cardiomyocytic differentiation of mouse embryonic stem cells in vitro. *Exp Cell Res* 229, 318-26.
- PAIK, J. H., KOLLIPARA, R., CHU, G., JI, H., XIAO, Y., DING, Z., MIAO, L., TOTHOVA, Z., HORNER, J. W., CARRASCO, D. R., JIANG, S., GILLILAND, D. G., CHIN, L., WONG, W. H., CASTRILLON, D. H. & DEPINHO, R. A. (2007). FoxOs are lineage-restricted redundant tumor suppressors and regulate endothelial cell homeostasis. *Cell* 128, 309-23.
- PAIN, B., WOODS, C. M., SAEZ, J., FLICKINGER, T., RAINES, M., PEYROL, S., MOSCOVICI, C., MOSCOVICI, M. G., KUNG, H. J., JURDIC, P. & ET AL. (1991). EGF-R as a hemopoietic growth factor receptor: the c-erbB product is present in chicken erythrocytic progenitors and controls their self-renewal. *Cell* 65, 37-46.
- PAPPENHEIM, A. (1896). Ueber Entwicklung und Ausbildung der Erythroblasten. *Virchows Archiv* 145, 587-643.



## REFERENCES

- PARDAL, R., CLARKE, M. F. & MORRISON, S. J. (2003). Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer* 3, 895-902.
- PARK, I. K., HE, Y., LIN, F., LAERUM, O. D., TIAN, Q., BUMGARNER, R., KLUG, C. A., LI, K., KUHR, C., DOYLE, M. J., XIE, T., SCHUMMER, M., SUN, Y., GOLDSMITH, A., CLARKE, M. F., WEISSMAN, I. L., HOOD, L. & LI, L. (2002). Differential gene expression profiling of adult murine hematopoietic stem cells. *Blood* 99, 488-98.
- PARK, I. K., QIAN, D., KIEL, M., BECKER, M. W., PIHALJA, M., WEISSMAN, I. L., MORRISON, S. J. & CLARKE, M. F. (2003). Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature* 423, 302-5.
- PEDERSON, T. (2001). Protein mobility within the nucleus--what are the right moves? *Cell* 104, 635-8.
- PEETERS, S. D., VAN DER KOLK, D. M., DE HAAN, G., BYSTRYKH, L., KUIPERS, F., DE VRIES, E. G. & VELLENGA, E. (2006). Selective expression of cholesterol metabolism genes in normal CD34+CD38- cells with a heterogeneous expression pattern in AML cells. *Exp Hematol* 34, 622-30.
- PERRY, J. M., HARANDI, O. F., PORAYETTE, P., HEGDE, S., KANNAN, A. K. & PAULSON, R. F. (2009). Maintenance of the BMP4-dependent stress erythropoiesis pathway in the murine spleen requires hedgehog signaling. *Blood* 113, 911-8.
- PFAFFL, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45.
- PHILLIPS, R. L., ERNST, R. E., BRUNK, B., IVANOVA, N., MAHAN, M. A., DEANEHAN, J. K., MOORE, K. A., OVERTON, G. C. & LEMISCHKA, I. R. (2000). The genetic program of hematopoietic stem cells. *Science* 288, 1635-40.
- PLESCIA, C., ROGLER, C. & ROGLER, L. (2001). Genomic expression analysis implicates Wnt signaling pathway and extracellular matrix alterations in hepatic specification and differentiation of murine hepatic stem cells. *Differentiation* 68, 254-69.
- PLOEMACHER, R. E., MAYEN, A. E., DE KONING, A. E., KRENACS, T. & ROSENDAAL, M. (2000). Hematopoiesis: Gap Junction Intercellular Communication is Likely to be Involved in Regulation of Stroma-dependent Proliferation of Hemopoietic Stem Cells. *Hematology* 5, 133-147.
- POMMIER, A. J., ALVES, G., VIENNOIS, E., BERNARD, S., COMMUNAL, Y., SION, B., MARCEAU, G., DAMON, C., MOUZAT, K., CAIRA, F., BARON, S. & LOBACCARO, J. M. (2010). Liver X Receptor activation downregulates AKT survival signaling in lipid rafts and induces apoptosis of prostate cancer cells. *Oncogene*.
- PORCHER, C., SWAT, W., ROCKWELL, K., FUJIWARA, Y., ALT, F. W. & ORKIN, S. H. (1996). The T cell leukemia oncoprotein SCL/tal-1 is essential for development of all hematopoietic lineages. *Cell* 86, 47-57.
- PORTER, J. A., EKKER, S. C., PARK, W. J., VON KESSLER, D. P., YOUNG, K. E., CHEN, C. H., MA, Y., WOODS, A. S., COTTER, R. J., KOONIN, E. V. & BEACHY, P. A. (1996a). Hedgehog patterning activity: role of a lipophilic modification mediated by the carboxy-terminal autoprocessing domain. *Cell* 86, 21-34.
- PORTER, J. A., YOUNG, K. E. & BEACHY, P. A. (1996b). Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development. *Science* 274, 255-9.
- POTTEN, C. S. & LOEFFLER, M. (1990). Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 110, 1001-20.
- PRASHER, J. M., LALAI, A. S., HEIJMANS-ANTONISSEN, C., PLOEMACHER, R. E., HOEIJMAKERS, J. H., TOUW, I. P. & NIEDERNHOFER, L. J. (2005). Reduced hematopoietic reserves in DNA interstrand crosslink repair-deficient Ercc1-/- mice. *EMBO J* 24, 861-71.

## REFERENCES

- PROST, S., BELLAMY, C. O., CLARKE, A. R., WYLLIE, A. H. & HARRISON, D. J. (1998). p53-independent DNA repair and cell cycle arrest in embryonic stem cells. *FEBS Lett* 425, 499-504.
- PURI, M. C. & BERNSTEIN, A. (2003). Requirement for the TIE family of receptor tyrosine kinases in adult but not fetal hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12753-8.
- QIAN, H., BUZA-VIDAS, N., HYLAND, C. D., JENSEN, C. T., ANTONCHUK, J., MANSSON, R., THOREN, L. A., EKBLUM, M., ALEXANDER, W. S. & JACOBSEN, S. E. (2007). Critical role of thrombopoietin in maintaining adult quiescent hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 1, 671-84.
- RAJASEKHAR, V. K. & HOLLAND, E. C. (2004). Postgenomic global analysis of translational control induced by oncogenic signaling. *Oncogene* 23, 3248-64.
- RAJASEKHAR, V. K., VIALE, A., SOCCI, N. D., WIEDMANN, M., HU, X. & HOLLAND, E. C. (2003). Oncogenic Ras and Akt signaling contribute to glioblastoma formation by differential recruitment of existing mRNAs to polysomes. *Mol Cell* 12, 889-901.
- RAJENDRAN, L. & SIMONS, K. (2005). Lipid rafts and membrane dynamics. *J Cell Sci* 118, 1099-102.
- RAMALHO-SANTOS, M., YOON, S., MATSUZAKI, Y., MULLIGAN, R. C. & MELTON, D. A. (2002). "Stemness": transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells. *Science* 298, 597-600.
- RAO, B. M. & ZANDSTRA, P. W. (2005). Culture development for human embryonic stem cell propagation: molecular aspects and challenges. *Curr Opin Biotechnol* 16, 568-76.
- RASER, J. M. & O'SHEA, E. K. (2004). Control of stochasticity in eukaryotic gene expression. *Science* 304, 1811-4.
- REESE, J. S., LIU, L. & GERSON, S. L. (2003). Repopulating defect of mismatch repair-deficient hematopoietic stem cells. *Blood* 102, 1626-33.
- REYA, T. & CLEVERS, H. (2005). Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 434, 843-50.
- REYA, T., DUNCAN, A. W., AILLES, L., DOMEN, J., SCHERER, D. C., WILLERT, K., HINTZ, L., NUSSE, R. & WEISSMAN, I. L. (2003). A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 423, 409-14.
- REYA, T., MORRISON, S. J., CLARKE, M. F. & WEISSMAN, I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 105-11.
- REYES, M., DUDEK, A., JAHAGIRDAR, B., KOODIE, L., MARKER, P. H. & VERFAILLIE, C. M. (2002). Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest* 109, 337-46.
- REYES, M., LUND, T., LENVIK, T., AGUIAR, D., KOODIE, L. & VERFAILLIE, C. M. (2001). Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 98, 2615-25.
- REYNOLDS, B. A. & WEISS, S. (1996). Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Dev Biol* 175, 1-13.
- RINGROSE, L. & PARO, R. (2004). Epigenetic regulation of cellular memory by the Polycomb and Trithorax group proteins. *Annu Rev Genet* 38, 413-43.
- RIQUELME, P. A., DRAPEAU, E. & DOETSCH, F. (2008). Brain micro-ecologies: neural stem cell niches in the adult mammalian brain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363, 123-37.
- RIZZO, M. A., KRAFT, C. A., WATKINS, S. C., LEVITAN, E. S. & ROMERO, G. (2001). Agonist-dependent traffic of raft-associated Ras and Raf-1 is required for activation of the mitogen-activated protein kinase cascade. *J Biol Chem* 276, 34928-33.

## REFERENCES

- ROLINK, A., KUDO, A., KARASUYAMA, H., KIKUCHI, Y. & MELCHERS, F. (1991). Long-term proliferating early pre B cell lines and clones with the potential to develop to surface Ig-positive, mitogen reactive B cells in vitro and in vivo. *EMBO J* 10, 327-36.
- ROSENFELD, N., YOUNG, J. W., ALON, U., SWAIN, P. S. & ELOWITZ, M. B. (2005). Gene regulation at the single-cell level. *Science* 307, 1962-5.
- ROSSI, D. J., BRYDER, D., SEITA, J., NUSSENZWEIG, A., HOEIJMAKERS, J. & WEISSMAN, I. L. (2007). Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age. *Nature* 447, 725-9.
- ROTH, G., KOTZKA, J., KREMER, L., LEHR, S., LOHAUS, C., MEYER, H. E., KRONE, W. & MULLER-WIELAND, D. (2000). MAP kinases Erk1/2 phosphorylate sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1a at serine 117 in vitro. *J Biol Chem* 275, 33302-7.
- ROVERA, G. & SURREY, S. (1978). Use of resistant or hypersensitive variant clones of Friend cells in analysis of mode of action of inducers. *Cancer Res* 38, 3737-44.
- ROWE, A. H., ARGMAN, C. A., EDWARDS, J. Y., SAWYEZ, C. G., MORAND, O. H., HEGELE, R. A. & HUFF, M. W. (2003). Enhanced synthesis of the oxysterol 24(S),25-epoxycholesterol in macrophages by inhibitors of 2,3-oxidosqualene:lanosterol cyclase: a novel mechanism for the attenuation of foam cell formation. *Circ Res* 93, 717-25.
- ROY, S., LUETTERFORST, R., HARDING, A., APOLLONI, A., ETHERIDGE, M., STANG, E., ROLLS, B., HANCOCK, J. F. & PARTON, R. G. (1999). Dominant-negative caveolin inhibits H-Ras function by disrupting cholesterol-rich plasma membrane domains. *Nat Cell Biol* 1, 98-105.
- ROZENTAL, R., MORALES, M., MEHLER, M. F., URBAN, M., KREMER, M., DERMIETZEL, R., KESSLER, J. A. & SPRAY, D. C. (1998). Changes in the properties of gap junctions during neuronal differentiation of hippocampal progenitor cells. *J Neurosci* 18, 1753-62.
- RUBENSTEIN, J. L., BRICE, A. E., CIARANELLO, R. D., DENNEY, D., PORTEUS, M. H. & USDIN, T. B. (1990). Subtractive hybridization system using single-stranded phagemids with directional inserts. *Nucleic Acids Res* 18, 4833-42.
- RUBIN, H. (2002). The disparity between human cell senescence in vitro and lifelong replication in vivo. *Nat Biotechnol* 20, 675-81.
- RUBIOLO, C., PIAZZOLLA, D., MEISSL, K., BEUG, H., HUBER, J. C., KOLBUS, A. & BACCARINI, M. (2006). A balance between Raf-1 and Fas expression sets the pace of erythroid differentiation. *Blood* 108, 152-9.
- RUDOLPH, K. L., CHANG, S., LEE, H. W., BLASCO, M., GOTTLIEB, G. J., GREIDER, C. & DEPINHO, R. A. (1999). Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice. *Cell* 96, 701-12.
- RUTHERFORD, T., CLEGG, J. B., HIGGS, D. R., JONES, R. W., THOMPSON, J. & WEATHERALL, D. J. (1981). Embryonic erythroid differentiation in the human leukemic cell line K562. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 348-52.
- RUZANKINA, Y., PINZON-GUZMAN, C., ASARE, A., ONG, T., PONTANO, L., COTSARELIS, G., ZEDIAK, V. P., VELEZ, M., BHANDoola, A. & BROWN, E. J. (2007). Deletion of the developmentally essential gene ATR in adult mice leads to age-related phenotypes and stem cell loss. *Cell Stem Cell* 1, 113-26.
- SABAPATHY, K., KLEMM, M., JAENISCH, R. & WAGNER, E. F. (1997). Regulation of ES cell differentiation by functional and conformational modulation of p53. *EMBO J* 16, 6217-29.
- SACCHETTI, B., FUNARI, A., MICHENZI, S., DI CESARE, S., PIERSANTI, S., SAGGIO, I., TAGLIAFICO, E., FERRARI, S., ROBEY, P. G., RIMINUCCI, M. & BIANCO, P. (2007). Self-

## REFERENCES

- renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell* 131, 324-36.
- SAHA, K., KEUNG, A. J., IRWIN, E. F., LI, Y., LITTLE, L., SCHAFFER, D. V. & HEALY, K. E. (2008). Substrate modulus directs neural stem cell behavior. *Biophys J* 95, 4426-38.
- SAHA, S., JI, L., DE PABLO, J. J. & PALECEK, S. P. (2006). Inhibition of human embryonic stem cell differentiation by mechanical strain. *J Cell Physiol* 206, 126-37.
- SALZER, U., HINTERDORFER, P., HUNGER, U., BORKEN, C. & PROHASKA, R. (2002). Ca(++)-dependent vesicle release from erythrocytes involves stomatin-specific lipid rafts, synexin (annexin VII), and sorcin. *Blood* 99, 2569-77.
- SALZER, U. & PROHASKA, R. (2001). Stomatin, flotillin-1, and flotillin-2 are major integral proteins of erythrocyte lipid rafts. *Blood* 97, 1141-3.
- SAMARUT, J. & BOUABDELLI, M. (1980). In vitro development of CFU-E and BFU-E in cultures of embryonic and post-embryonic chicken hematopoietic cells. *J Cell Physiol* 105, 553-63.
- SAMUEL, B. U., MOHANDAS, N., HARRISON, T., MCMANUS, H., ROSSE, W., REID, M. & HALDAR, K. (2001). The role of cholesterol and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins of erythrocyte rafts in regulating raft protein content and malarial infection. *J Biol Chem* 276, 29319-29.
- SANDELL, L. L. & ZAKIAN, V. A. (1993). Loss of a yeast telomere: arrest, recovery, and chromosome loss. *Cell* 75, 729-39.
- SATO, N., SANJUAN, I. M., HEKE, M., UCHIDA, M., NAEF, F. & BRIVANLOU, A. H. (2003). Molecular signature of human embryonic stem cells and its comparison with the mouse. *Dev Biol* 260, 404-13.
- SATO, T., MAEKAWA, T., WATANABE, S., TSUJI, K. & NAKAHATA, T. (2000). Erythroid progenitors differentiate and mature in response to endogenous erythropoietin. *J Clin Invest* 106, 263-70.
- SATO, Y., KASAI, T., NAKAGAWA, S., TANABE, K., WATANABE, T., KAWAKAMI, K. & TAKAHASHI, Y. (2007). Stable integration and conditional expression of electroporated transgenes in chicken embryos. *Dev Biol* 305, 616-24.
- SAVATIER, P., LAPILLONNE, H., JIRMANOVA, L., VITELLI, L. & SAMARUT, J. (2002). Analysis of the cell cycle in mouse embryonic stem cells. *Methods Mol Biol* 185, 27-33.
- SAVATIER, P., LAPILLONNE, H., VAN GRUNSVEN, L. A., RUDKIN, B. B. & SAMARUT, J. (1996). Withdrawal of differentiation inhibitory activity/leukemia inhibitory factor up-regulates D-type cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors in mouse embryonic stem cells. *Oncogene* 12, 309-22.
- SCHMIDT, J. A., MARSHALL, J., HAYMAN, M. J., DODERLEIN, G. & BEUG, H. (1986). Monoclonal antibodies to novel erythroid differentiation antigens reveal specific effects of oncogenes on the leukaemic cell phenotype. *Leuk Res* 10, 257-72.
- SHANER, N. C., STEINBACH, P. A. & TSIEN, R. Y. (2005). A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Methods* 2, 905-9.
- SHARPLESS, N. E. & DEPINHO, R. A. (2007). How stem cells age and why this makes us grow old. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 703-13.
- SHERLEY, J. L., STADLER, P. B. & JOHNSON, D. R. (1995). Expression of the wild-type p53 antioncogene induces guanine nucleotide-dependent stem cell division kinetics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 136-40.
- SHERR, C. J. & ROBERTS, J. M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13, 1501-12.
- SIEWEKE, M. H. & GRAF, T. (1998). A transcription factor party during blood cell differentiation. *Curr Opin Genet Dev* 8, 545-51.
- SIMONS, K. & EHEHALT, R. (2002). Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J Clin Invest* 110, 597-603.

## REFERENCES

- SIMONS, K. & IKONEN, E. (2000). How cells handle cholesterol. *Science* 290, 1721-6.
- SIMONS, K. & TOOMRE, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 31-9.
- SLOTTE, J. P. & BIERMAN, E. L. (1988). Depletion of plasma-membrane sphingomyelin rapidly alters the distribution of cholesterol between plasma membranes and intracellular cholesterol pools in cultured fibroblasts. *Biochem J* 250, 653-8.
- SMITH, A. G. (2001). Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17, 435-62.
- SMITH, K. P., LUONG, M. X. & STEIN, G. S. (2009). Pluripotency: toward a gold standard for human ES and iPS cells. *J Cell Physiol* 220, 21-9.
- SMITH, L. L., COLLER, H. A. & ROBERTS, J. M. (2003). Telomerase modulates expression of growth-controlling genes and enhances cell proliferation. *Nat Cell Biol* 5, 474-9.
- SOCOLOVSKY, M. (2007). Molecular insights into stress erythropoiesis. *Curr Opin Hematol* 14, 215-24.
- SONG, X. & XIE, T. (2003). Wingless signaling regulates the maintenance of ovarian somatic stem cells in *Drosophila*. *Development* 130, 3259-68.
- SPANGRUDE, G. J., HEIMFELD, S. & WEISSMAN, I. L. (1988). Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 241, 58-62.
- STANTON, J. A., MACGREGOR, A. B. & GREEN, D. P. (2003). Gene expression in the mouse preimplantation embryo. *Reproduction* 125, 457-68.
- STEAD, E., WHITE, J., FAAST, R., CONN, S., GOLDSTONE, S., RATHJEN, J., DHINGRA, U., RATHJEN, P., WALKER, D. & DALTON, S. (2002). Pluripotent cell division cycles are driven by ectopic Cdk2, cyclin A/E and E2F activities. *Oncogene* 21, 8320-33.
- STEINLEIN, P., DEINER, E., LEUTZ, A. & BEUG, H. (1994). Recombinant murine erythropoietin receptor expressed in avian erythroid progenitors mediates terminal erythroid differentiation in vitro. *Growth Factors* 10, 1-16.
- STERN, S., DROR, T., STOLOVICKI, E., BRENNER, N. & BRAUN, E. (2007). Genome-wide transcriptional plasticity underlies cellular adaptation to novel challenge. *Mol Syst Biol* 3, 106.
- STOCKHOLM, D., BENCHAOUIR, R., PICOT, J., RAMEAU, P., NEILDEZ, T. M., LANDINI, G., LAPLACE-BUILHE, C. & PALDI, A. (2007). The origin of phenotypic heterogeneity in a clonal cell population in vitro. *PLoS One* 2, e394.
- STOCKINGER, A., EGER, A., WOLF, J., BEUG, H. & FOISNER, R. (2001). E-cadherin regulates cell growth by modulating proliferation-dependent beta-catenin transcriptional activity. *J Cell Biol* 154, 1185-96.
- STOPKA, T., ZIVNY, J. H., STOPKOVA, P., PRCHAL, J. F. & PRCHAL, J. T. (1998). Human hematopoietic progenitors express erythropoietin. *Blood* 91, 3766-72.
- SUAREZ-FARINAS, M., NOGGLE, S., HEKE, M., HEMMATI-BRIVANLOU, A. & MAGNASCO, M. O. (2005). Comparing independent microarray studies: the case of human embryonic stem cells. *BMC Genomics* 6, 99.
- SUBRAMANIAN, A., HEGDE, S., PORAYETTE, P., YON, M., HANKEY, P. & PAULSON, R. F. (2008). Friend virus utilizes the BMP4-dependent stress erythropoiesis pathway to induce erythroleukemia. *J Virol* 82, 382-93.
- SUGIYAMA, T., KOHARA, H., NODA, M. & NAGASAWA, T. (2006). Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* 25, 977-88.
- TAMBOURIN, P., WENDLING, F. & MOREAU-GACHELIN, F. (1981). Friend leukemia as a multiple-step disease. *Blood Cells* 7, 133-44.
- TEKIPPE, M., HARRISON, D. E. & CHEN, J. (2003). Expansion of hematopoietic stem cell phenotype and activity in Trp53-null mice. *Exp Hematol* 31, 521-7.

## REFERENCES

- TERSKIKH, A. V., EASTERDAY, M. C., LI, L., HOOD, L., KORNBLUM, H. I., GESCHWIND, D. H. & WEISSMAN, I. L. (2001). From hematopoiesis to neurogenesis: evidence of overlapping genetic programs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 7934-9.
- THATTAI, M. & VAN OUDENAARDEN, A. (2004). Stochastic gene expression in fluctuating environments. *Genetics* 167, 523-30.
- THOREN, L. A., LIUBA, K., BRYDER, D., NYGREN, J. M., JENSEN, C. T., QIAN, H., ANTONCHUK, J. & JACOBSEN, S. E. (2008). Kit regulates maintenance of quiescent hematopoietic stem cells. *J Immunol* 180, 2045-53.
- TILL, J. E. & MCCULLOCH, E. A. (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 14, 213-22.
- TILL, J. E., MCCULLOCH, E. A. & SIMINOVITCH, L. (1964). A Stochastic Model of Stem Cell Proliferation, Based on the Growth of Spleen Colony-Forming Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 51, 29-36.
- TOREN, A., BIELORAI, B., JACOB-HIRSCH, J., FISHER, T., KREISER, D., MORAN, O., ZELIGSON, S., GIVOL, D., YITZHAKY, A., ITSKOVITZ-ELDOR, J., KVENTSEL, I., ROSENTHAL, E., AMARIGLIO, N. & REHAVI, G. (2005). CD133-positive hematopoietic stem cell "stemness" genes contain many genes mutated or abnormally expressed in leukemia. *Stem Cells* 23, 1142-53.
- TOTHOVA, Z. & GILLILAND, D. G. (2007). FoxO transcription factors and stem cell homeostasis: insights from the hematopoietic system. *Cell Stem Cell* 1, 140-52.
- TROPEPE, V., HITOSHI, S., SIRARD, C., MAK, T. W., ROSSANT, J. & VAN DER KOOY, D. (2001). Direct neural fate specification from embryonic stem cells: a primitive mammalian neural stem cell stage acquired through a default mechanism. *Neuron* 30, 65-78.
- TSIFTSOGLU, A. S., BARNETT, R. J. & SARTORELLI, A. C. (1979). Eucleation of differentiated murine erythroleukemia cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 6381-5.
- TSIFTSOGLU, A. S., TSAMADOU, A. I. & PAPADOPOULOU, L. C. (2006). Heme as key regulator of major mammalian cellular functions: molecular, cellular, and pharmacological aspects. *Pharmacol Ther* 111, 327-45.
- TULINA, N. & MATUNIS, E. (2001). Control of stem cell self-renewal in *Drosophila* spermatogenesis by JAK-STAT signaling. *Science* 294, 2546-9.
- TURPEN, J. B., KELLEY, C. M., MEAD, P. E. & ZON, L. I. (1997). Bipotential primitive-definitive hematopoietic progenitors in the vertebrate embryo. *Immunity* 7, 325-34.
- VAN MEER, G., VOELKER, D. R. & FEIGENSON, G. W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 112-24.
- VAN SLOUN, P. P., JANSEN, J. G., WEEDA, G., MULLENDERS, L. H., VAN ZEELAND, A. A., LOHMAN, P. H. & VRIELING, H. (1999). The role of nucleotide excision repair in protecting embryonic stem cells from genotoxic effects of UV-induced DNA damage. *Nucleic Acids Res* 27, 3276-82.
- VAN STEENSEL, B., SMOGORZEWSKA, A. & DE LANGE, T. (1998). TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* 92, 401-13.
- VAZIRI, H., DRAGOWSKA, W., ALLSOPP, R. C., THOMAS, T. E., HARLEY, C. B. & LANSDORP, P. M. (1994). Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 9857-60.
- VEENING, J. W., SMITS, W. K. & KUIPERS, O. P. (2008). Bistability, epigenetics, and bet-hedging in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 62, 193-210.
- VELCULESCU, V. E., ZHANG, L., VOGELSTEIN, B. & KINZLER, K. W. (1995). Serial analysis of gene expression. *Science* 270, 484-7.
- VERDUN, R. E. & KARLSEDER, J. (2006). The DNA damage machinery and homologous recombination pathway act consecutively to protect human telomeres. *Cell* 127, 709-20.

## REFERENCES

- VERFAILLIE, C. M. (2002). Hematopoietic stem cells for transplantation. *Nat Immunol* 3, 314-7.
- VILLAGRA, A., ULLOA, N., ZHANG, X., YUAN, Z., SOTOMAYOR, E. & SETO, E. (2007). Histone deacetylase 3 down-regulates cholesterol synthesis through repression of lanosterol synthase gene expression. *J Biol Chem* 282, 35457-70.
- WAKIMOTO, B. T. (1998). Beyond the nucleosome: epigenetic aspects of position-effect variegation in *Drosophila*. *Cell* 93, 321-4.
- WATT, F. M. & HOGAN, B. L. (2000). Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* 287, 1427-30.
- WEISS, M. J., YU, C. & ORKIN, S. H. (1997). Erythroid-cell-specific properties of transcription factor GATA-1 revealed by phenotypic rescue of a gene-targeted cell line. *Mol Cell Biol* 17, 1642-51.
- WEISSMAN, I. L. (2000a). Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 100, 157-68.
- WEISSMAN, I. L. (2000b). Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science* 287, 1442-6.
- WELLEN, K. E., HATZIVASSILIOU, G., SACHDEVA, U. M., BUI, T. V., CROSS, J. R. & THOMPSON, C. B. (2009). ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation. *Science* 324, 1076-80.
- WESSELY, O., DEINER, E. M., BEUG, H. & VON LINDERN, M. (1997). The glucocorticoid receptor is a key regulator of the decision between self-renewal and differentiation in erythroid progenitors. *EMBO J* 16, 267-80.
- WILMUT, I., SCHNIEKE, A. E., MCWHIR, J., KIND, A. J. & CAMPBELL, K. H. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385, 810-3.
- WILSON, A., LAURENTI, E., OSER, G., VAN DER WATH, R. C., BLANCO-BOSE, W., JAWORSKI, M., OFFNER, S., DUNANT, C. F., ESHKIND, L., BOCKAMP, E., LIO, P., MACDONALD, H. R. & TRUMPP, A. (2008). Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell* 135, 1118-29.
- WOBUS, A. M. & BOHELER, K. R. (2005). Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol Rev* 85, 635-78.
- WONG, J., QUINN, C. M., GELISSEN, I. C. & BROWN, A. J. (2008). Endogenous 24(S),25-epoxycholesterol fine-tunes acute control of cellular cholesterol homeostasis. *J Biol Chem* 283, 700-7.
- WU, A. M., TILL, J. E., SIMINOVITCH, L. & MCCULLOCH, E. A. (1967). A cytological study of the capacity for differentiation of normal hemopoietic colony-forming cells. *J Cell Physiol* 69, 177-84.
- WU, H., LIU, X., JAENISCH, R. & LODISH, H. F. (1995). Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell* 83, 59-67.
- YAMASHITA, Y. M., JONES, D. L. & FULLER, M. T. (2003). Orientation of asymmetric stem cell division by the APC tumor suppressor and centrosome. *Science* 301, 1547-50.
- YAMASHITA, Y. M., MAHOWALD, A. P., PERLIN, J. R. & FULLER, M. T. (2007). Asymmetric inheritance of mother versus daughter centrosome in stem cell division. *Science* 315, 518-21.
- YANG, F., VOUGHT, B. W., SATTERLEE, J. S., WALKER, A. K., JIM SUN, Z. Y., WATTS, J. L., DEBEAUMONT, R., SAITO, R. M., HYBERTS, S. G., YANG, S., MACOL, C., IYER, L., TJIAN, R., VAN DEN HEUVEL, S., HART, A. C., WAGNER, G. & NAAR, A. M. (2006). An ARC/Mediator subunit required for SREBP control of cholesterol and lipid homeostasis. *Nature* 442, 700-4.

## REFERENCES

- YILMAZ, O. H., VALDEZ, R., THEISEN, B. K., GUO, W., FERGUSON, D. O., WU, H. & MORRISON, S. J. (2006). Pten dependence distinguishes haematopoietic stem cells from leukaemia-initiating cells. *Nature* 441, 475-82.
- YODER, M. C. & HIATT, K. (1997). Engraftment of embryonic hematopoietic cells in conditioned newborn recipients. *Blood* 89, 2176-83.
- YOSHIHARA, H., ARAI, F., HOSOKAWA, K., HAGIWARA, T., TAKUBO, K., NAKAMURA, Y., GOMEI, Y., IWASAKI, H., MATSUOKA, S., MIYAMOTO, K., MIYAZAKI, H., TAKAHASHI, T. & SUDA, T. (2007). Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche. *Cell Stem Cell* 1, 685-97.
- YOSHIMOTO, M. & YODER, M. C. (2009). Developmental biology: Birth of the blood cell. *Nature* 457, 801-3.
- ZECHNER, D., FUJITA, Y., HULSKEN, J., MULLER, T., WALTHER, I., TAKETO, M. M., CRENSHAW, E. B., 3RD, BIRCHMEIER, W. & BIRCHMEIER, C. (2003). beta-Catenin signals regulate cell growth and the balance between progenitor cell expansion and differentiation in the nervous system. *Dev Biol* 258, 406-18.
- ZHANG, J., NIU, C., YE, L., HUANG, H., HE, X., TONG, W. G., ROSS, J., HAUG, J., JOHNSON, T., FENG, J. Q., HARRIS, S., WIEDEMANN, L. M., MISHINA, Y. & LI, L. (2003). Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 425, 836-41.
- ZHANG, Y. & KALDERON, D. (2001). Hedgehog acts as a somatic stem cell factor in the *Drosophila* ovary. *Nature* 410, 599-604.
- ZHOU, X., JOHNSTON, T. P., JOHANSSON, D., PARINI, P., FUNA, K., SVENSSON, J. & HANSSON, G. K. (2009). Hypercholesterolemia leads to elevated TGF-beta1 activity and T helper 3-dependent autoimmune responses in atherosclerotic mice. *Atherosclerosis* 204, 381-7.
- ZIEGLER, A., JONASON, A. S., LEFFELL, D. J., SIMON, J. A., SHARMA, H. W., KIMMELMAN, J., REMINGTON, L., JACKS, T. & BRASH, D. E. (1994). Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature* 372, 773-6.
- ZIPORI, D. (2004). The nature of stem cells: state rather than entity. *Nat Rev Genet* 5, 873-8.
- ZWAKA, T. P. (2006). Breathing chromatin in pluripotent stem cells. *Dev Cell* 10, 1-2.





## 5 ANNEXES

### 5.1 Glossaire

**Bipotente** : Qualifie une cellule capable de générer des cellules de deux lignages.

**Compartiment** : Population ou ensemble de cellules. Sa taille renseigne le nombre de cellules dans cette population.

**Devenir cellulaire** : Ensemble des états vers lesquels une cellule peut évoluer (autorenouvellement, différenciation, apoptose, *etc.*)

**Homéostasie** : l'homéostasie est la capacité que peut avoir un système quelconque (ouvert ou fermé) à conserver son équilibre de fonctionnement en dépit des contraintes qui lui sont extérieures. En biologie, il s'agit du processus par lequel l'environnement interne de l'organisme tend à rester stable et équilibré.

**Lignage (cellulaire ou de différenciation)** : Histoire du développement (ontogenèse) de certains types de cellules différenciées, remontant jusqu'à la cellule souche d'origine chez l'adulte ou dans l'embryon.

**Master Switch** : Ensemble défini de gènes suffisants et nécessaires pour contrôler les événements en amont du passage d'un état d'autorenouvellement à un état de différenciation.

**Métazoaires** : organismes eucaryotes pluricellulaires mobiles et hétérotrophes.

**Monopotente (ou unipotente)** : Qualifie une cellule capable de générer des cellules d'un lignage donné.

**Multipotente** : Qualifie une cellule capable de générer des cellules de plusieurs lignages. Exemple : la cellule souche hématopoïétique.

**Néoplasique (transformation cellulaire néoplasique)** : Changements dans les cellules se manifestant par l'échappement aux mécanismes de contrôle, l'augmentation du potentiel de prolifération, des altérations de l'expression des marqueurs et récepteurs de surface, des anomalies caryotypiques, morphologiques et biochimiques, et d'autres attributs conférant la capacité à envahir et former des métastases.

**Pluripotente** : Qualifie une cellule capable de générer des cellules appartenant aux trois feuilletts embryonnaires (endoderme, ectoderme, et mésoderme). Exemple : la cellule souche embryonnaire.

**Potentiel (de différenciation)** : Evaluation qualitative des lignages pouvant être obtenus à partir d'une cellule souche ou d'un progéniteur, déterminée par l'ensemble des types cellulaires trouvés dans leur descendance

**Radiation (adaptative ou évolutive)**: Evolution rapide à partir d'un ancêtre commun d'un ensemble d'espèces caractérisées par une grande diversité écologique et morphologique. Chaque nouvelle espèce est adaptée à une niche particulière.

**Sénescence** : Vieillesse cellulaire

**Souchitude** (Stemness) : Ensemble des propriétés conférant à une cellule le caractère de cellule souche. Ce mot anglais n'admet a priori pas de meilleure traduction en français.

**Tératocarcinomes** : Tumeurs du testicule renfermant à la fois des tissus différenciés et des cellules de type embryonnaire.

**Transcriptome** : Ensemble des transcrits (ARNm), correspondant à l'ensemble de gènes exprimés, à un moment donné dans une cellule (ou une population de cellules).

**Transdifférenciation** : Processus de commutation d'un type de cellule différenciée dans un autre type de cellule avec une autre forme et/ou fonction.

## 5.2 Liste des abréviations

<b>24,25EC</b>	: 24(S),25-époxycholestérol
<b>AEV</b>	: Avian Erythroblastosis Virus
<b>ARNm</b>	: ARN messenger
<b>CMP</b>	: Common Myeloid Progenitor
<b>CSE</b>	: Cellule Souche Embryonnaire
<b>CSH</b>	: Cellule Souche Hématopoïétique
<b>CSN</b>	: Cellule Souche Nerveuse
<b>DRM</b>	: Detergent-Resistant Membrane
<b>DRO</b>	: Dérivés Réactifs de l'Oxygène (pour <i>Reactive oxygen species</i> , ROS)
<b>Epo</b>	: Erythropoïétine
<b>EpoR</b>	: Recepteur à l'érythropoïétine
<b>EST</b>	: Expressed Sequence Tag
<b>GR</b>	: Glucocorticoid Receptor
<b>LDL</b>	: Low Density Lipoprotein
<b>LSS</b>	: Lanostérol Synthase
<b>LXR</b>	: Liver X Receptor
<b>MAPC</b>	: Multipotent Adult Progenitor Cell
<b>M-CSF</b>	: macrophage colony-timulating Factor
<b>MEL</b>	: Murine Erythroleukemia
<b>OSC</b>	: Oxydosqualène cyclase
<b>Rb</b>	: Protéine du Retinoblastome
<b>RXR</b>	: Retinoic acid X Receptor
<b>SAGE</b>	: Serial Analysis of Gene Expression
<b>SREBP</b>	: Sterol Response Element Binding Protein
<b>T2ECs</b>	: TGF- $\alpha$ /TGF- $\beta$ - induced Erythrocytic Cells
<b>TERT</b>	: TElomerase Reverse Transcriptase,
<b>TH</b>	: Thyroid Hormone
<b>THR</b>	: Thyroid Hormone Receptor

DISCIPLINE : Biologie Cellulaire et Moléculaire.

TITRE : Bases moléculaires du contrôle de l'équilibre entre autorenouvellement et différenciation.

RESUME : L'autorenouvellement est une propriété fondatrice du concept de cellule souche. Cependant, malgré l'avancée des connaissances actuelles, les mécanismes moléculaires sous-jacents restent mal compris. Nous nous sommes donc intéressés à cette question, en étudiant l'équilibre entre autorenouvellement et différenciation dans des progéniteurs érythrocytaires primaires. D'une part, grâce à une étude combinant des approches pharmacologiques et de génétique fonctionnelle, nos résultats montrent que le contrôle de la synthèse cellulaire du cholestérol joue un rôle essentiel dans la régulation du basculement de l'autorenouvellement vers la différenciation. D'autre part, nous avons étudié la nature stochastique de l'expression génique au cours du passage de l'autorenouvellement vers la différenciation. En effet, contrairement au caractère déterministe initialement attribué à l'expression des gènes, les données accumulées au cours des dernières années démontrent que cette expression repose sur des processus stochastiques. Nous avons en particulier œuvré à la conception et à la mise en place d'un dispositif permettant de suivre en temps réel l'expression génique dans des cellules individualisées, afin de pouvoir mesurer et évaluer cette stochasticité.

Au final, l'ensemble de ces travaux participent à la compréhension des bases moléculaires de l'autorenouvellement et du contrôle des choix du devenir cellulaire.

MOTS-CLEFS : autorenouvellement ; cholesterol ; différenciation ; erythropoïèse ; expression génique ; stochasticité ; OSC 2,3-oxydosqualene (lanosterol cyclase) ; poulet ; progéniteur érythrocytaire.

---

DISCIPLINE : Cellular and Molecular Biology.

TITLE : Molecular bases controlling the self-renewal/differentiation balance.

ABSTRACT : Self-renewal is a key property of the stem cell concept. However, despite the recent advances in this field, the underlying molecular bases are not yet properly understood. We tackled this question by studying the balance between self-renewal and differentiation, in primary erythroid progenitors. Our work is twofold. First, by combining pharmacologic approaches and functional genetics, we have shown that the control of cellular cholesterol synthesis plays a central role in the regulation between self-renewal and differentiation. Second, we have studied the stochastic nature of gene expression along the transition from self-renewal to differentiation. Indeed, while gene expression was initially deemed to be deterministic, more and more data tend to show that it relies on stochastic processes. In particular, we participated to the design of an experimental method allowing to measure gene expression in a single cell, in real-time.

All in all, the work presented here brings new elements towards the understanding of molecular bases controlling self-renewal and cell fate choices.

KEYWORDS : chicken ; cholesterol ; differentiation ; erythroid progenitor ; erythropoiesis ; gene expression ; OSC 2,3-oxidosqualene (lanosterol cyclase) ; self-renewal ; stochasticity.

---

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE :

Equipe *Bases Moléculaires de l'Autorenouvellement et de ses Altérations*

Centre de Génétique Moléculaire et Cellulaire

UMR5535 Université Claude Bernard Lyon1 – CNRS

16, Rue Raphaël Dubois

69100 – Villeurbanne