



# Caractérisation de la voie de signalisation NODAL lors de la différenciation des cellules souches embryonnaires

Fabien FURFARO

## Membres du Jury :

François GALLET

Président du jury

Alice JOUNEAU

Rapportrice

Fabien MONTEL

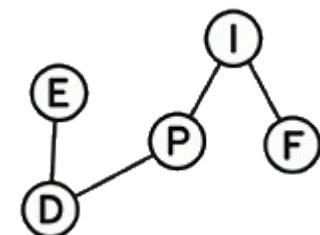
Rapporteur

Pascal HERSEN

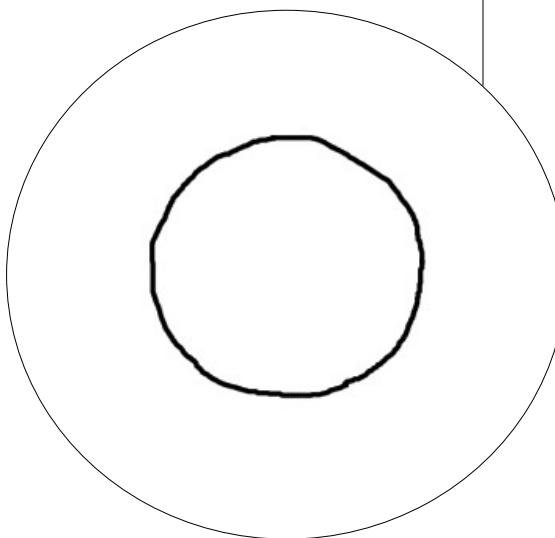
Directeur

Benoit SORRE

Co-directeur

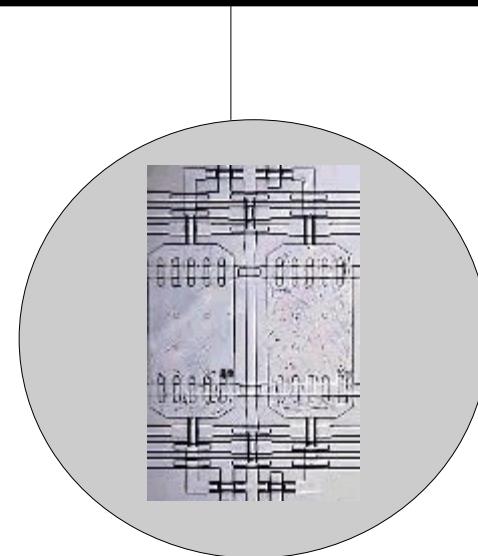


# Plan de la présentation



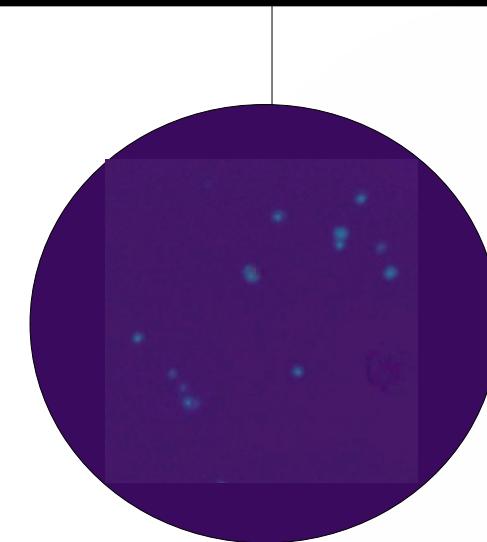
## Mise en contexte (~15min)

- Comment se différencient les cellules ?
- Comment les cellules s'organisent dans un tissu en développement ?
- Comment les cellules interprètent un signal de différenciation dynamique ?
- Quel modèle utiliser ?



## Outils expérimentaux (~5min)

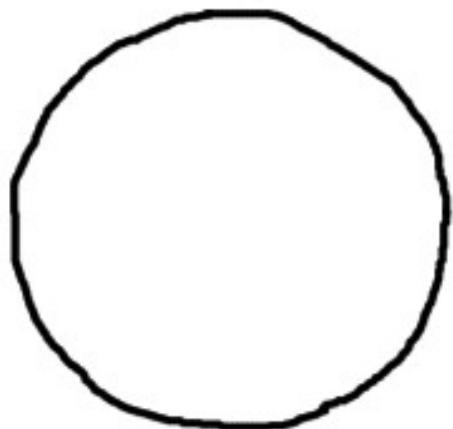
- Comment étudier la différenciation ?
- Comment générer des signaux ?
- Comment mesurer l'expression d'un gène ?



## Résultats et Conclusion (~25min)

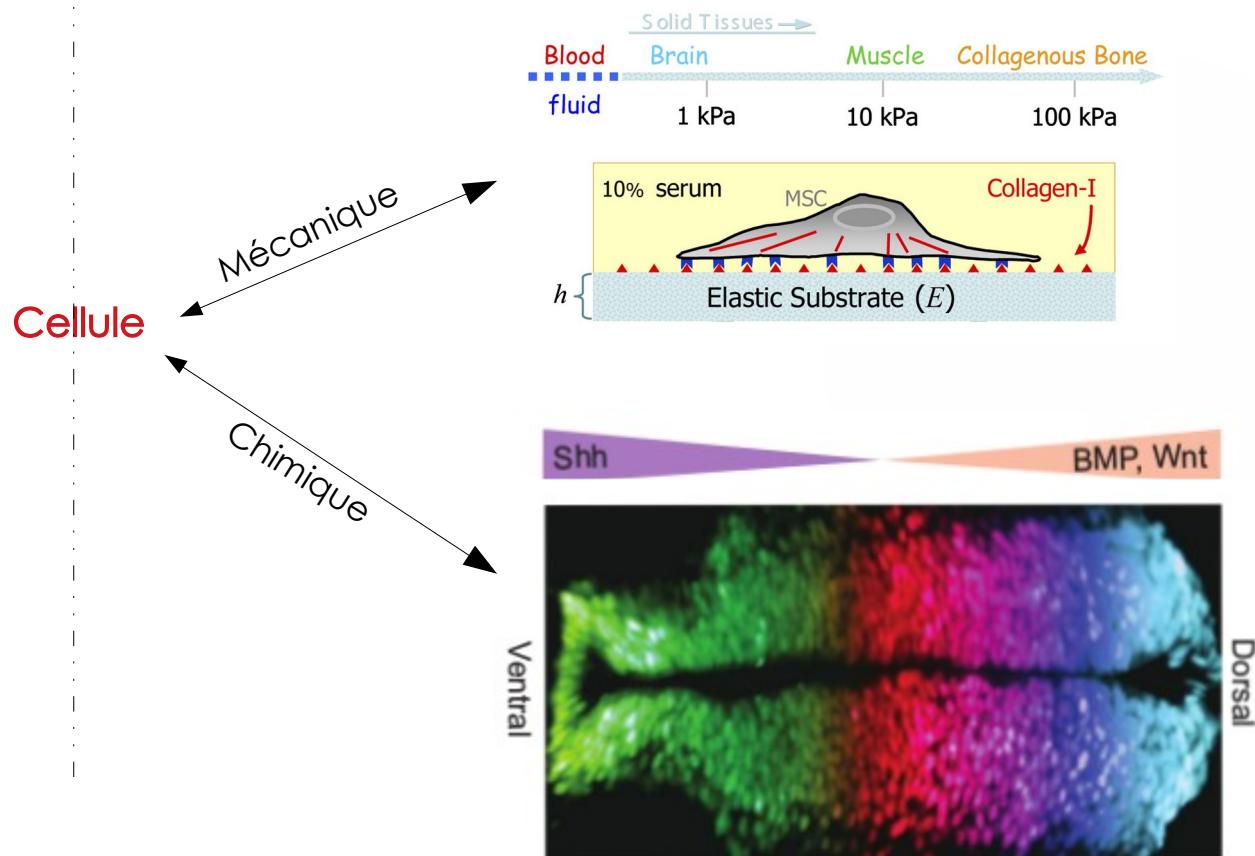
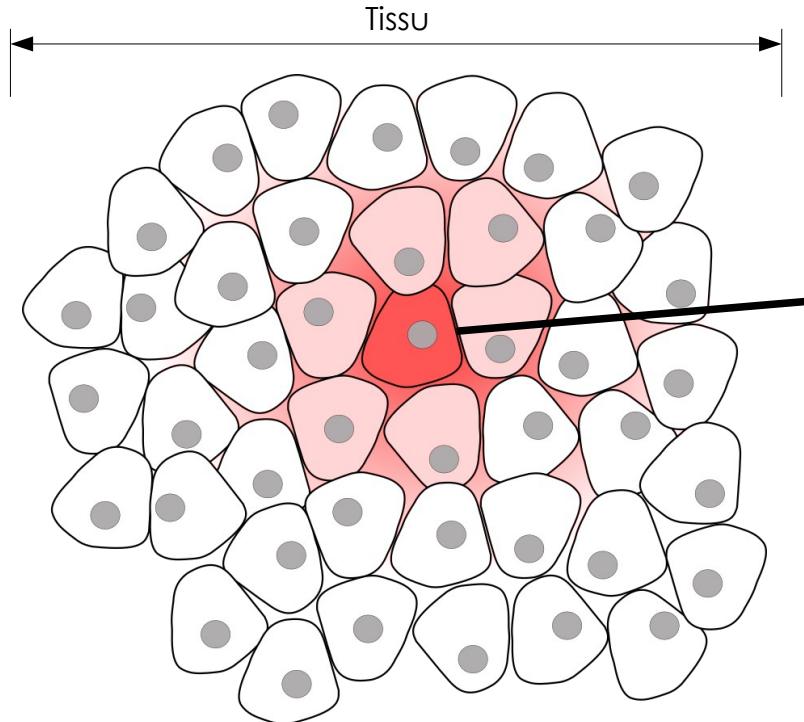
- Caractérisation de NODAL
- Caractérisation de la signalisation
- Caractérisation d'un élément de régulation
- Caractérisation de la différenciation

# Qu'est ce que la différenciation cellulaire ?



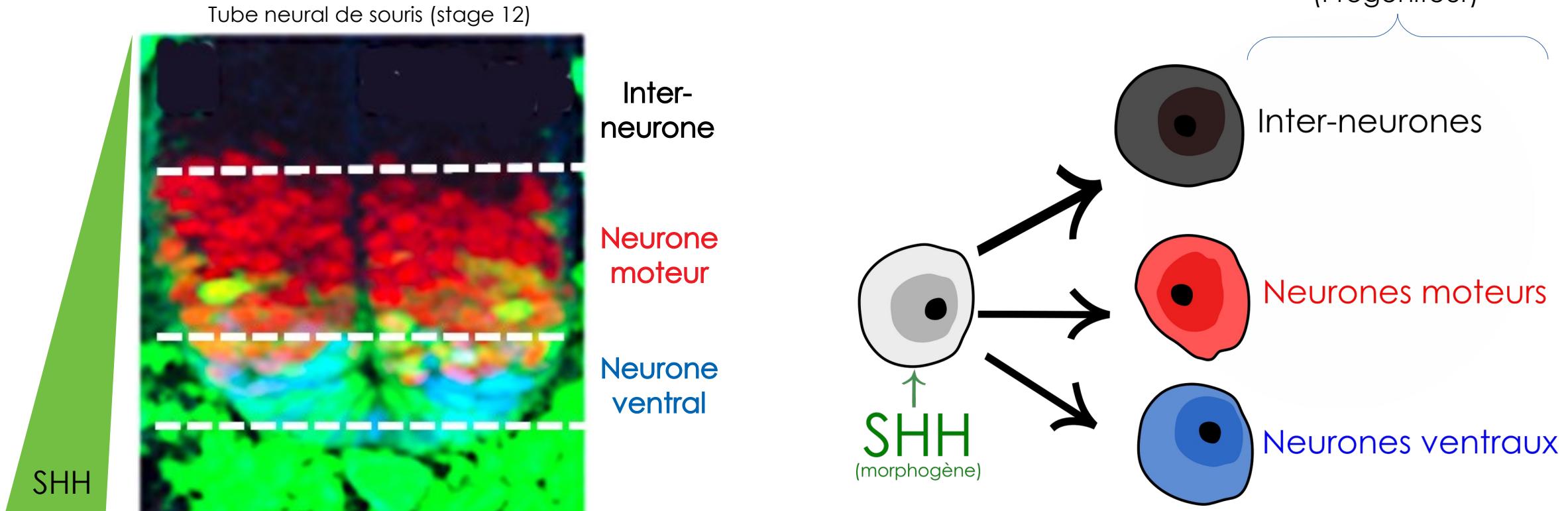
Cellules souches embryonnaires → Pluripotentes  
Différenciation → Processus donnant une identité spécifique

# Comment les cellules se différencient ?



**Signaux chimiques = Morphogènes**  
Morphogène : sécrété, diffusible, contrôle la différenciation

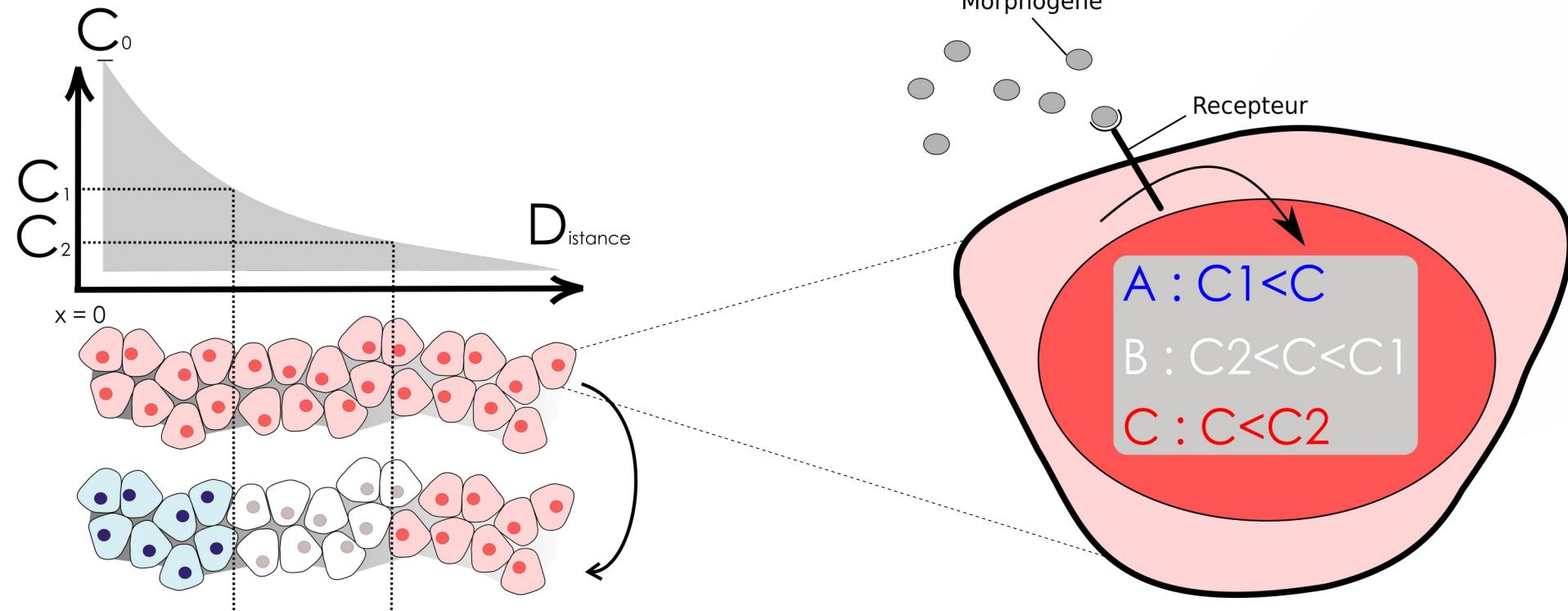
# Au cours du développement, les tissus s'organisent spatialement



1 Morphogène → 3 types cellulaires distincts et ordonnés  
Comment la cellule déduit sa position à partir de la source de morphogène?

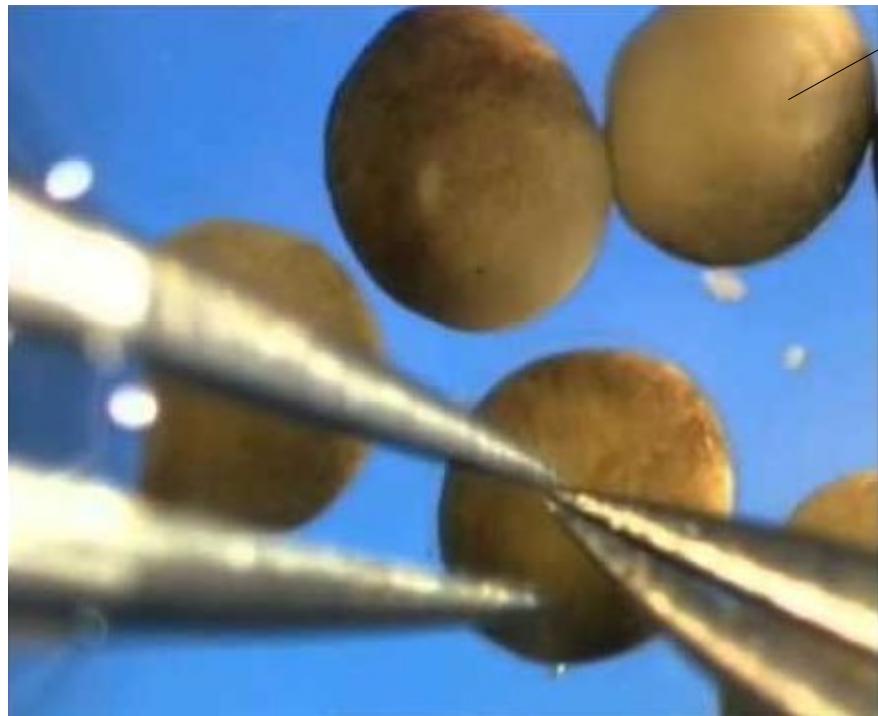
# Comment les cellules déduisent leur position dans un gradient de morphogène?

Modèle du « Drapeau Français » :

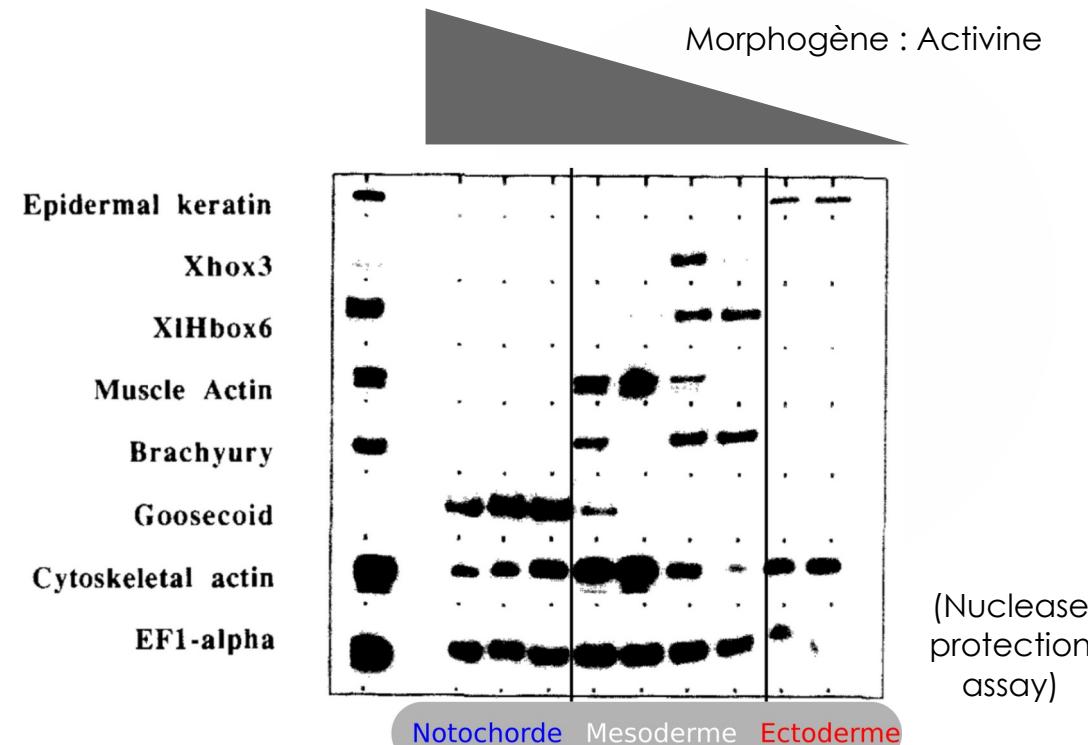


Une cellule interprète sa position par rapport à deux seuils de concentration  
 $\rightarrow 1$  morphogène = 1 motif tricolore

# Les morphogènes convertissent les cellules en fonction de la concentration

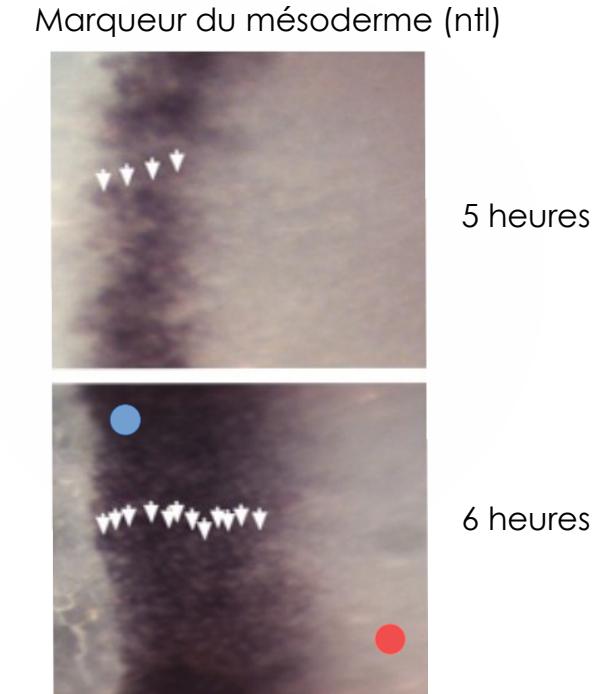
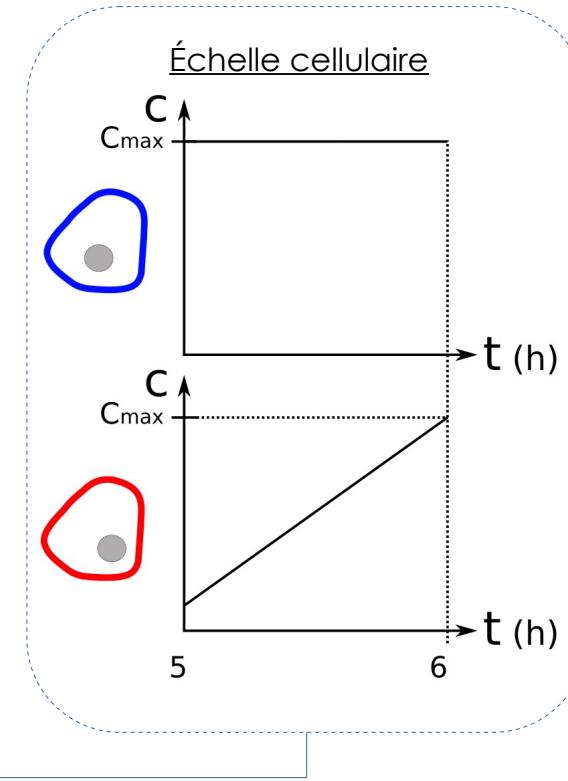
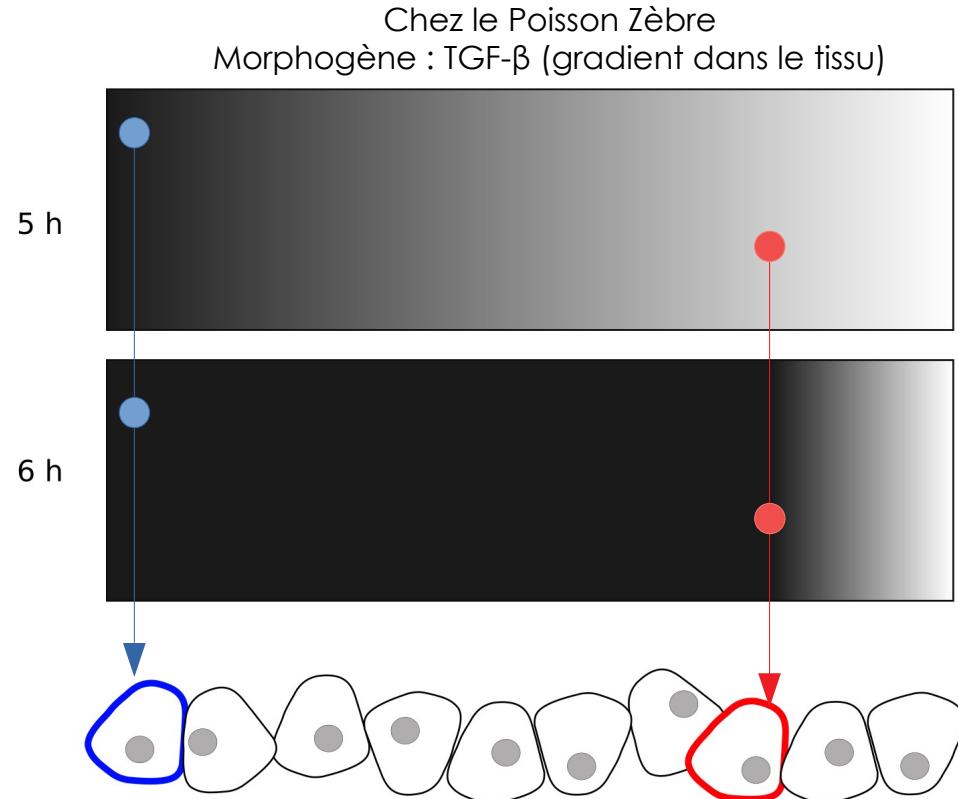


Œuf de Xénope (stade 17.5 h)



Dans l'embryon : les morphogènes changent au cours du temps

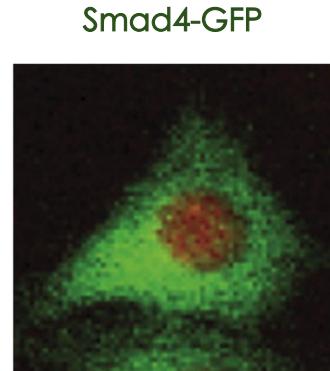
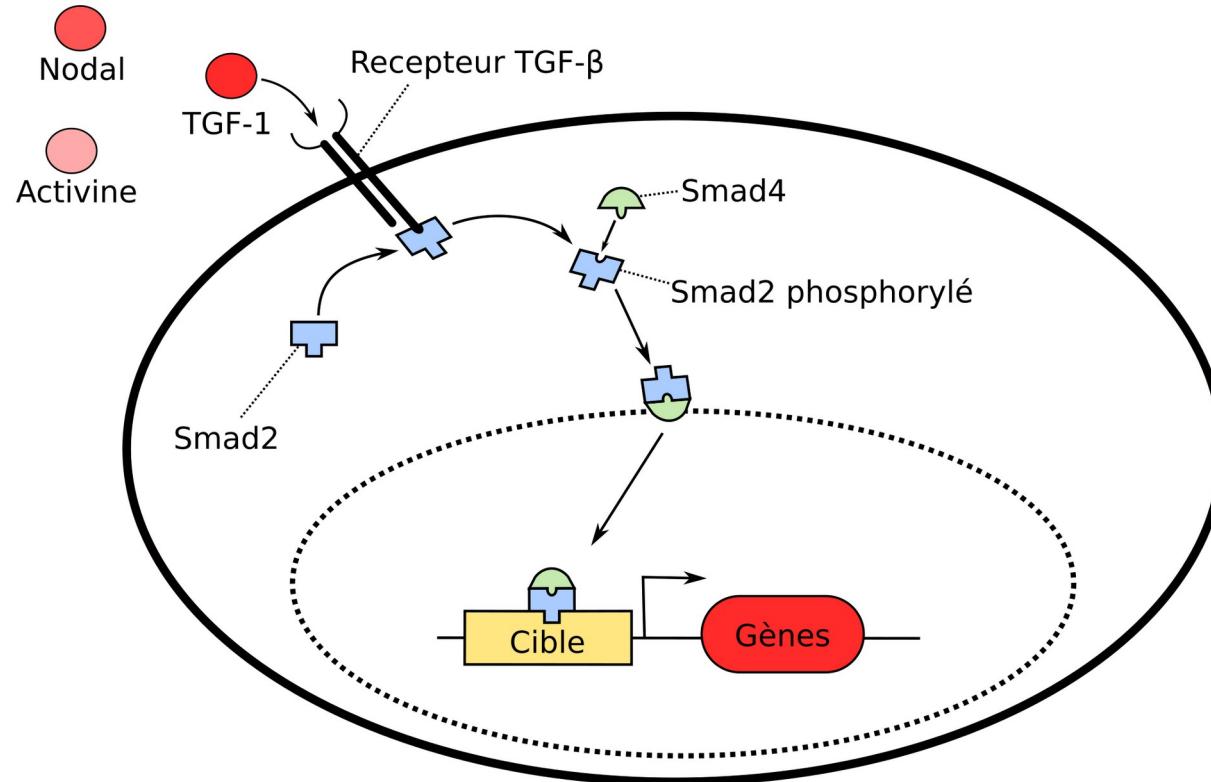
# Lors du développement, la concentration de morphogène n'est pas statique



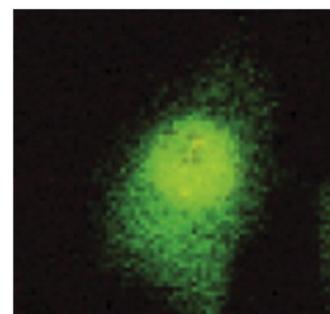
La concentration de morphogène TGF- $\beta$  augmente avec le **temps** durant la différenciation en mésoderme  
→ Gradient de morphogène **dynamique**

# Les morphogènes de la famille TGF- $\beta$

Voie de signalisation dans la cellule :



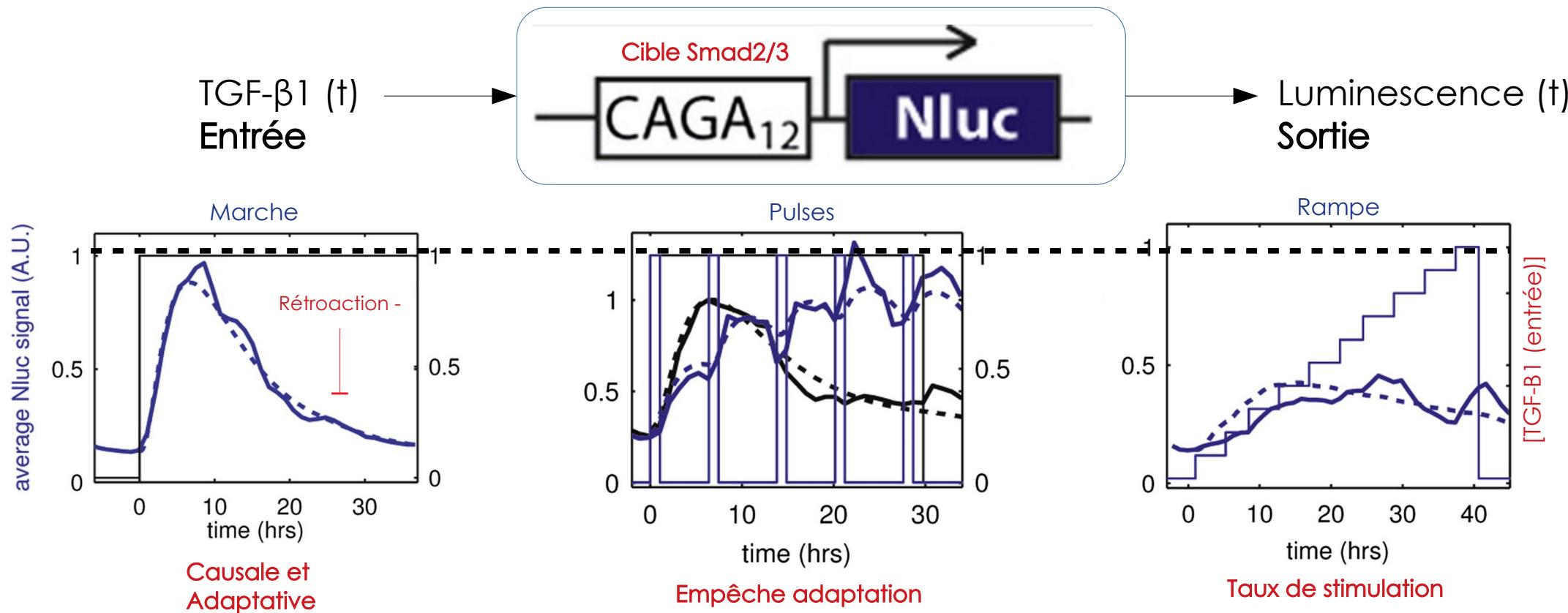
Pas de ligand :  
Smad  
cytoplasmique



Présence de ligand:  
Smad  
Nucléaire

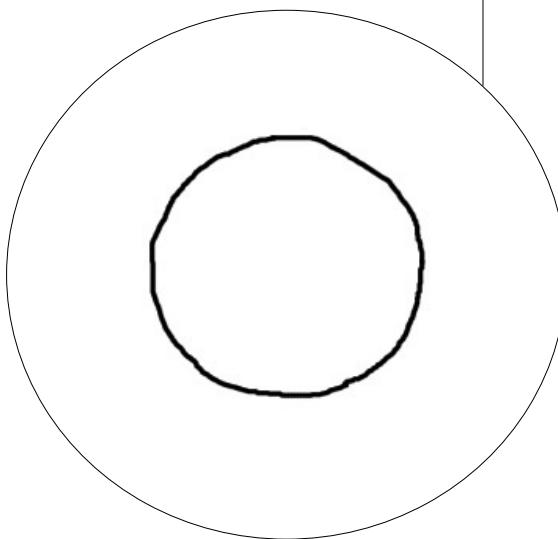
Comment une cellule interprète un signal temporel de morphogène TGF- $\beta$  ?

# La réponse cellulaire dépend du profil temporel de stimulation en TGF- $\beta$



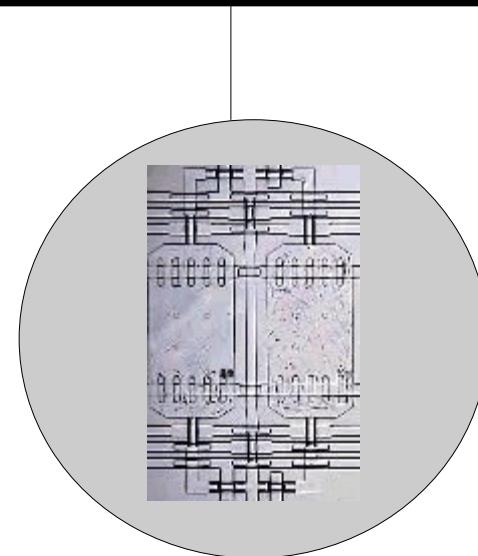
Quel est l'influence temporelle d'un activateur de la voie TGF- $\beta$  sur la différenciation ?

# Où en sommes nous dans la présentation ?



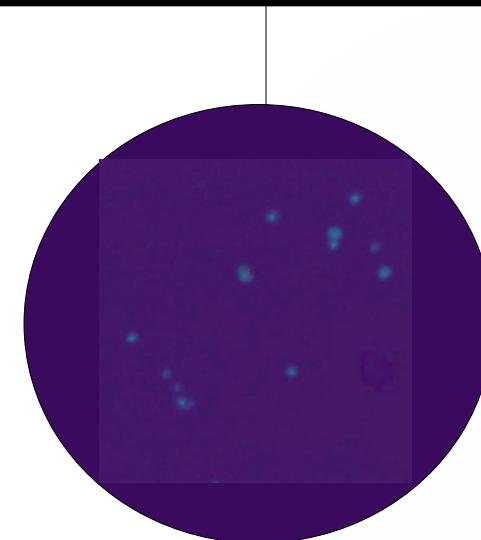
## Mise en contexte (~15min)

- Comment se différencient les cellules ?
- Comment les cellules s'organisent dans un tissu en développement ?
- Comment les cellules interprètent un signal de différenciation dynamique ?
- Quel modèle d'étude utiliser ?



## Outils expérimentaux (~10min)

- Comment étudier la différenciation ?
- Comment générer des signaux ?
- Comment mesurer l'expression d'un gène ?



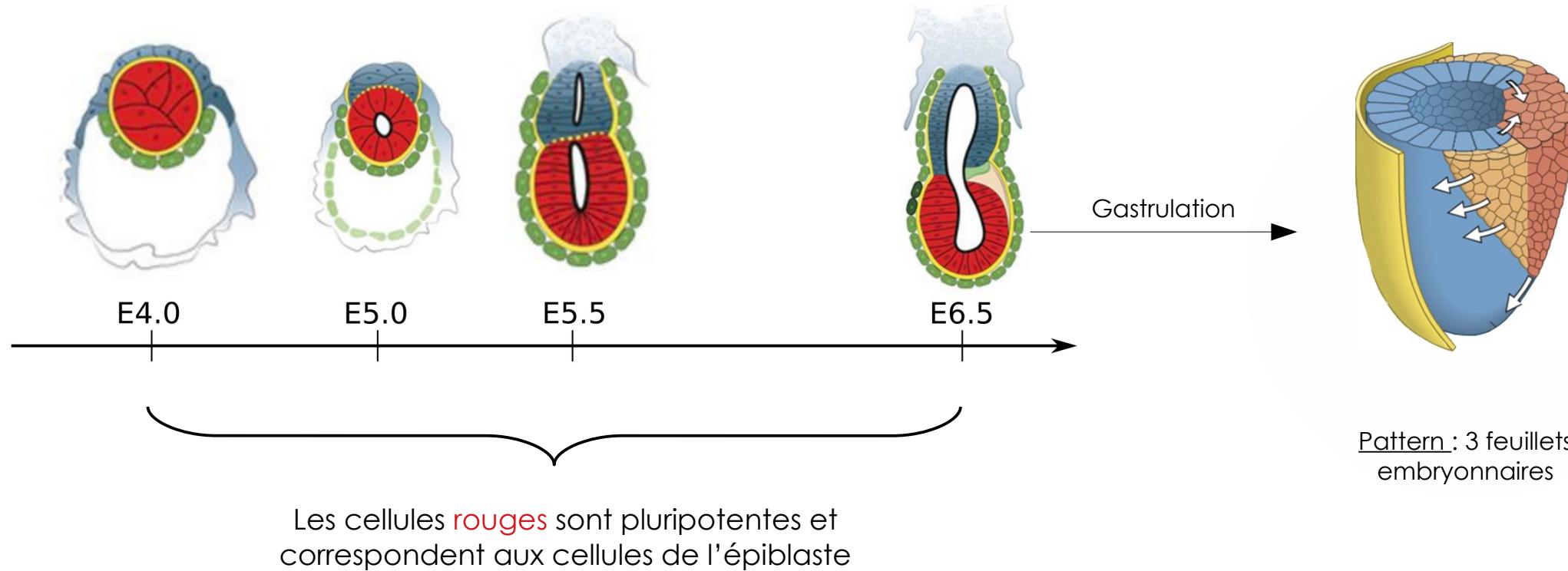
## Résultats et Conclusion (~20min)

- Caractérisation de NODAL
- Caractérisation de la signalisation
- Caractérisation d'un élément de régulation
- Caractérisation de la différenciation

Temps  
(~45min)

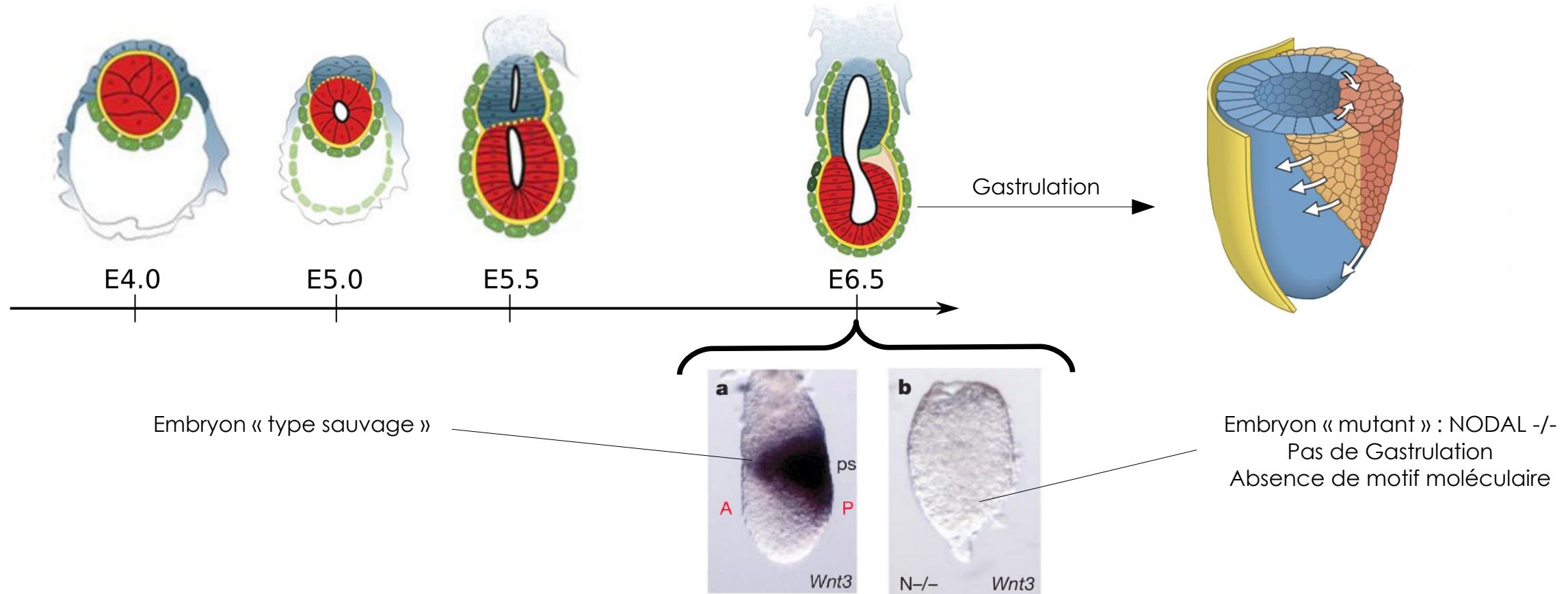
# Modèle : Développement précoce de la souris

12



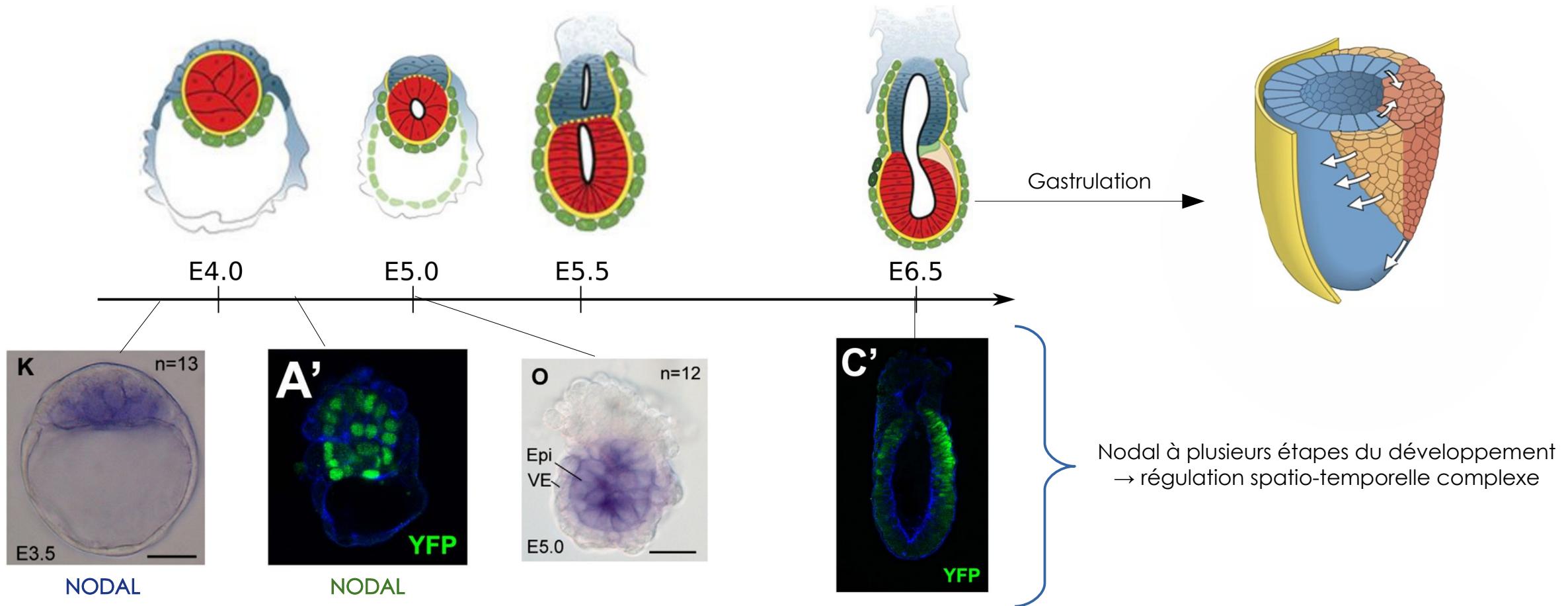
Parmi les morphogènes impliqués dans la formation des trois feuillets embryonnaires, lequel avons-nous choisi ?

# Nodal, un morphogène de la famille TGF- $\beta$ essentiel à la gastrulation de l'embryon de souris



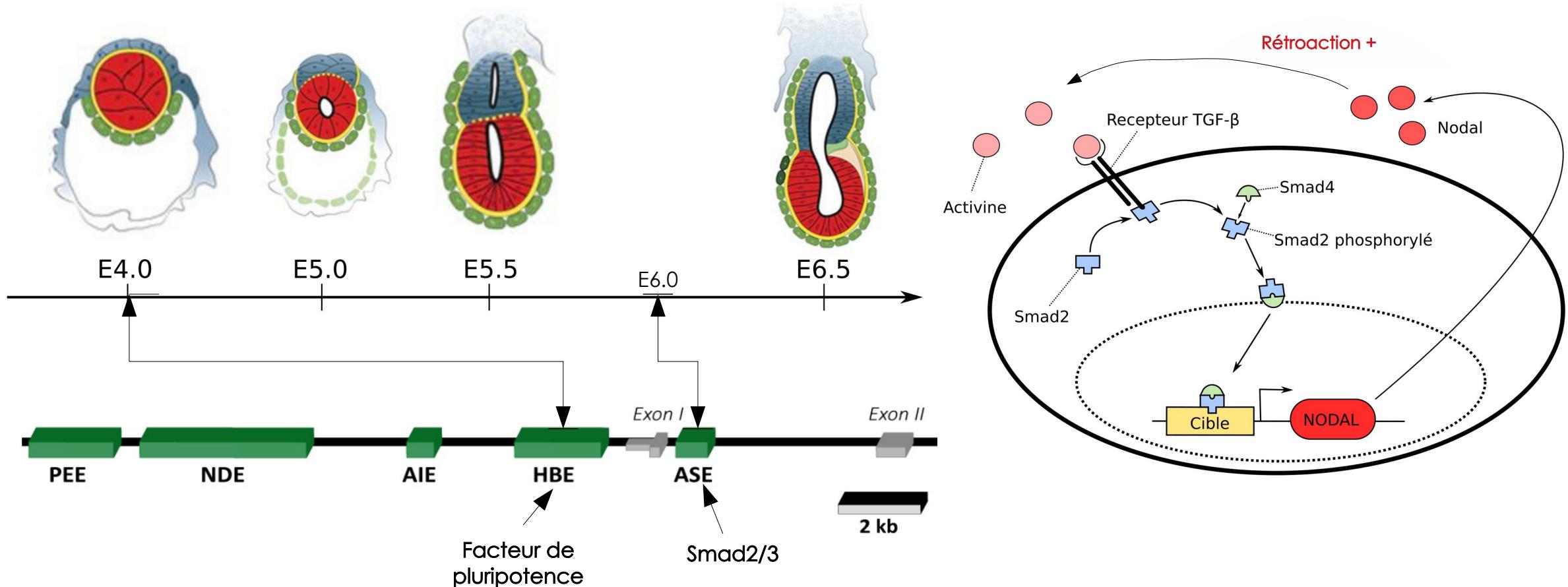
Sans Nodal, il n'y a pas de formation de feuillets embryonnaires et le développement se stoppe

# Nodal est impliqué dans le développement avant la gastrulation



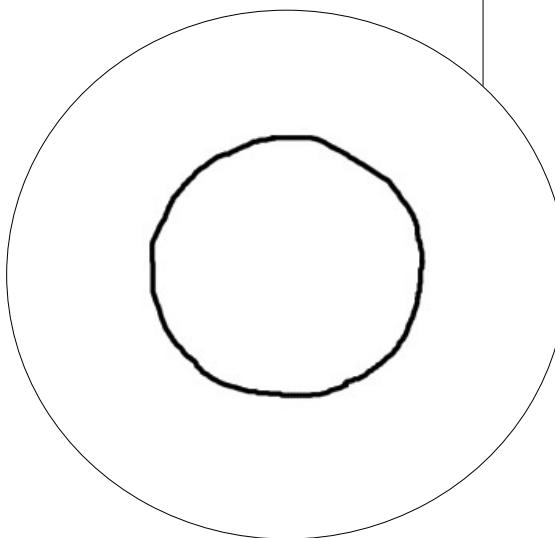
Comment est régulé NODAL au cours du développement précoce ?

# Régulation spatio-temporelle de Nodal complexe



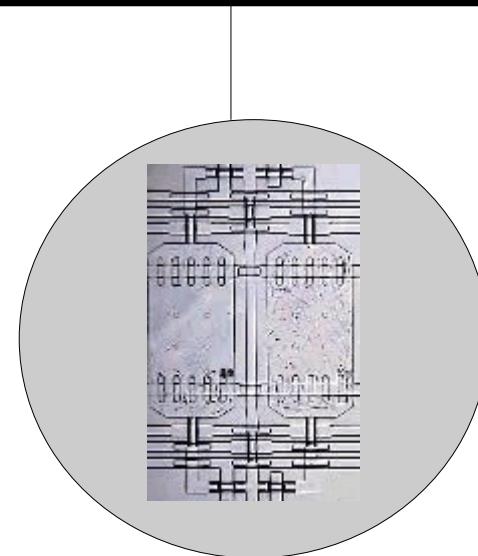
Comment la voie de signalisation TGF- $\beta$  contrôle l'expression de NODAL ?

# Où en sommes nous dans la présentation ?



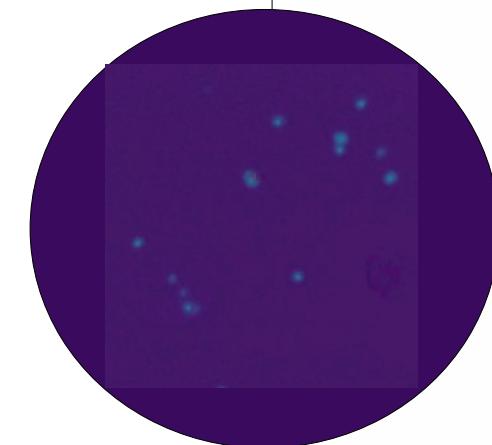
## Mise en contexte (~15min)

- Comment se différencient les cellules ?
- Comment les cellules s'organisent dans un tissu en développement ?
- Comment les cellules interprètent un signal de différenciation dynamique ?
- Quel modèle utiliser ?



## Outils expérimentaux (~10min)

- Comment étudier la différenciation ?
- Comment générer des signaux ?
- Comment mesurer l'expression d'un gène ?

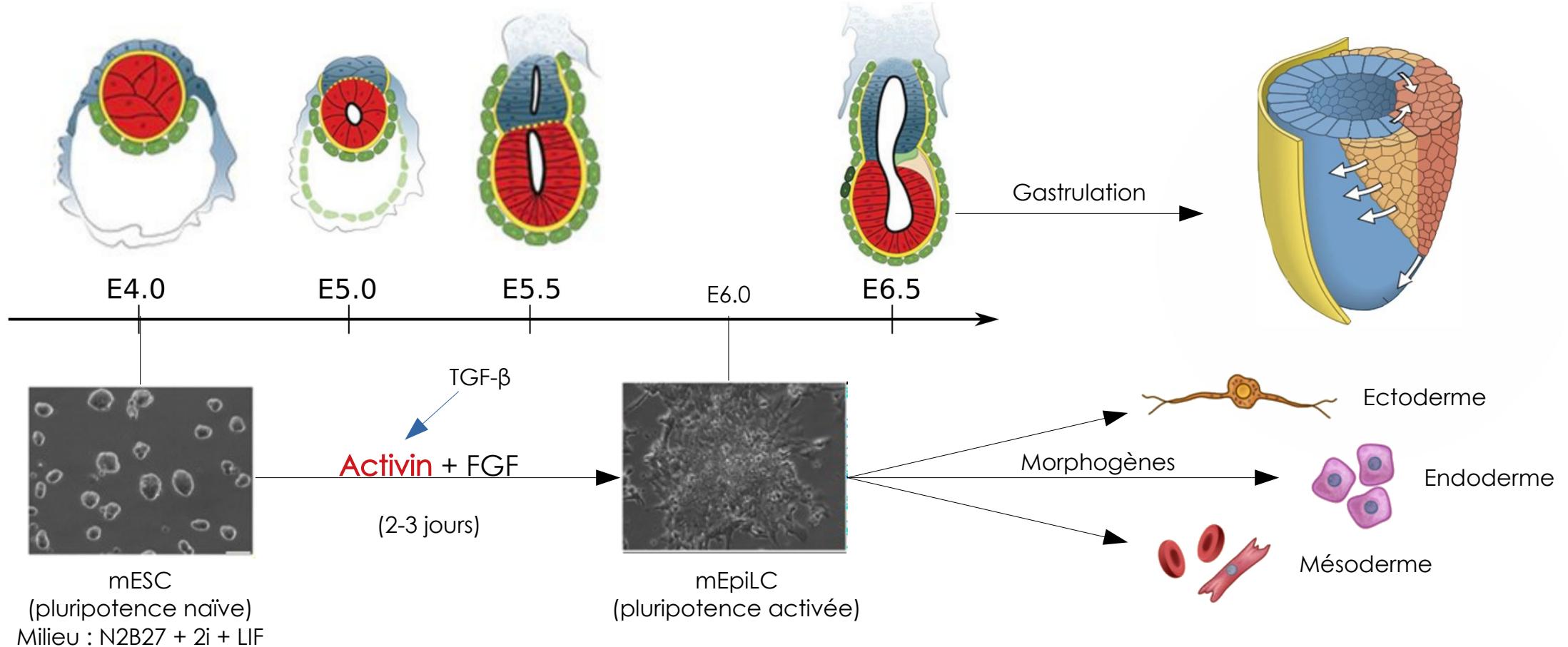


## Résultats et Conclusion (~20min)

- Caractérisation de NODAL
- Caractérisation de la signalisation
- Caractérisation d'un élément de régulation
- Caractérisation de la différenciation

Temps  
(~45min)

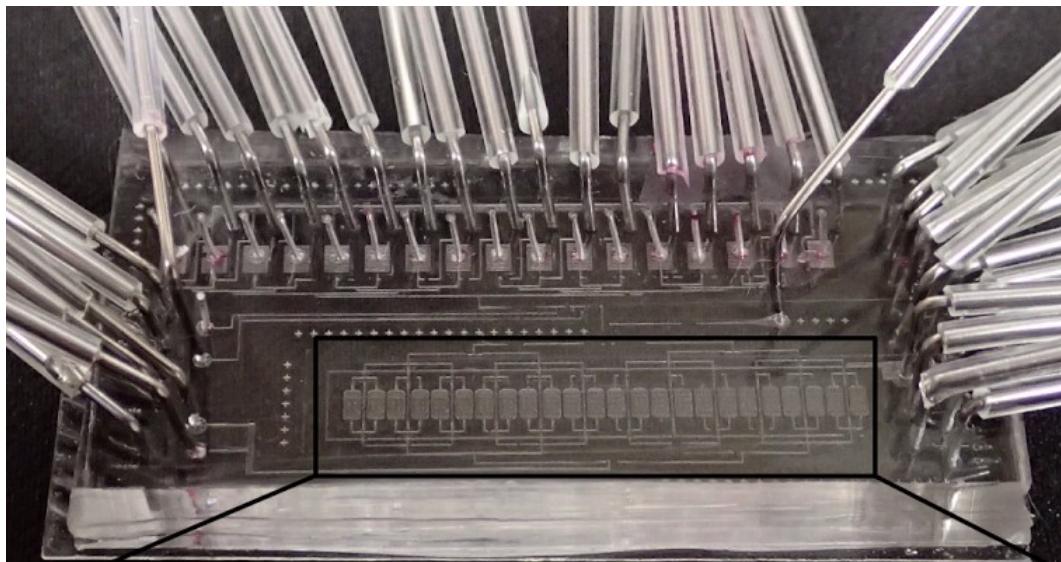
# Modélisation *in vitro* pour étudier comment la cellule interprète le morphogène Nodal



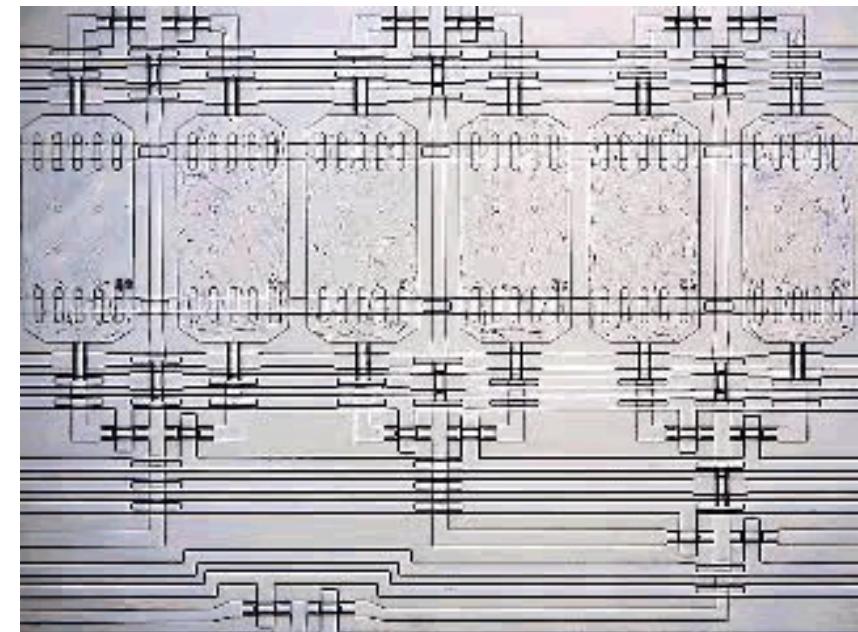
Quel est l'influence d'un signal temporel d'Activine sur l'activité de la voie NODAL et son effet sur la différenciation ?

# La puce microfluidique de culture cellulaire pour appliquer des signaux temporels complexes

PDMS : Polymère Biocompatible



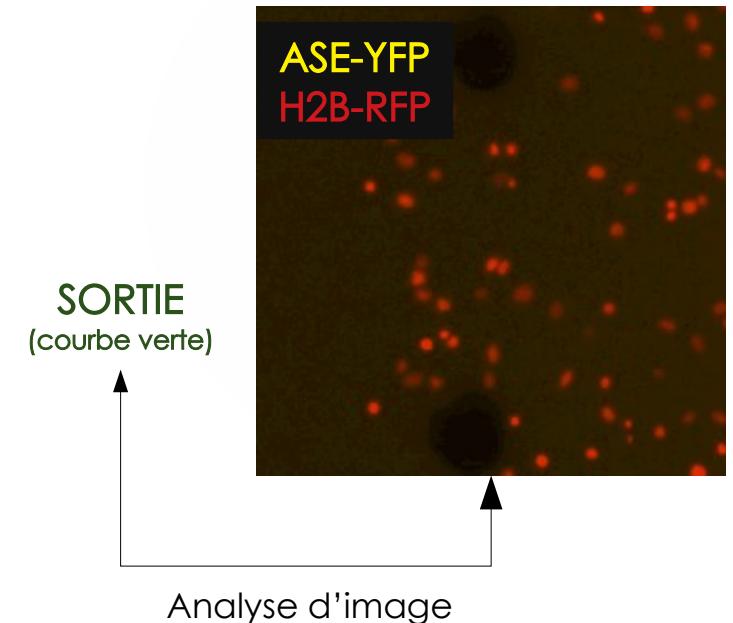
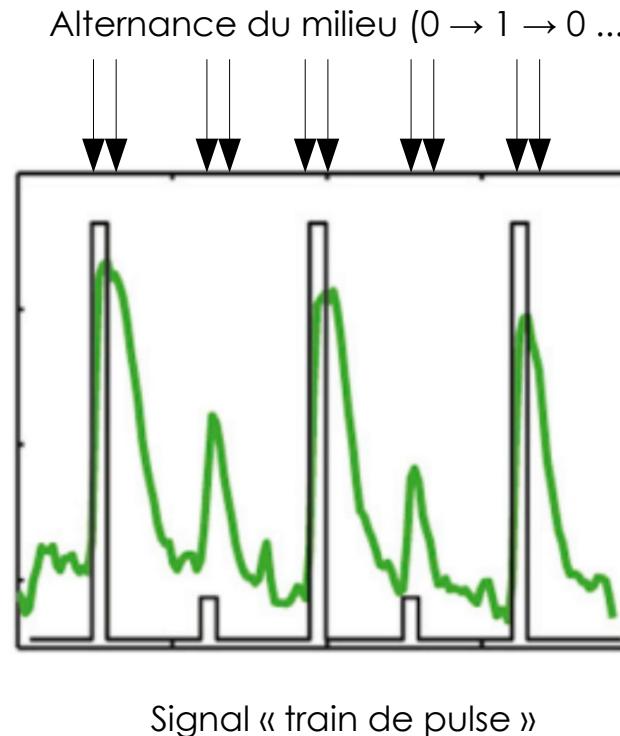
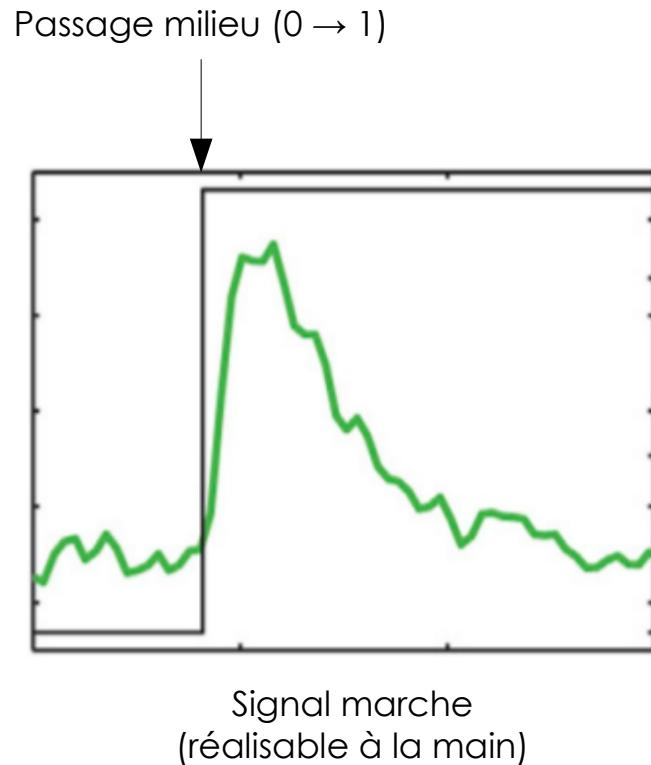
Chambre de culture pour cellules mammifères  
**24 chambres indépendantes de (1\*1mm\*40µm)**



Changement de milieu automatisé

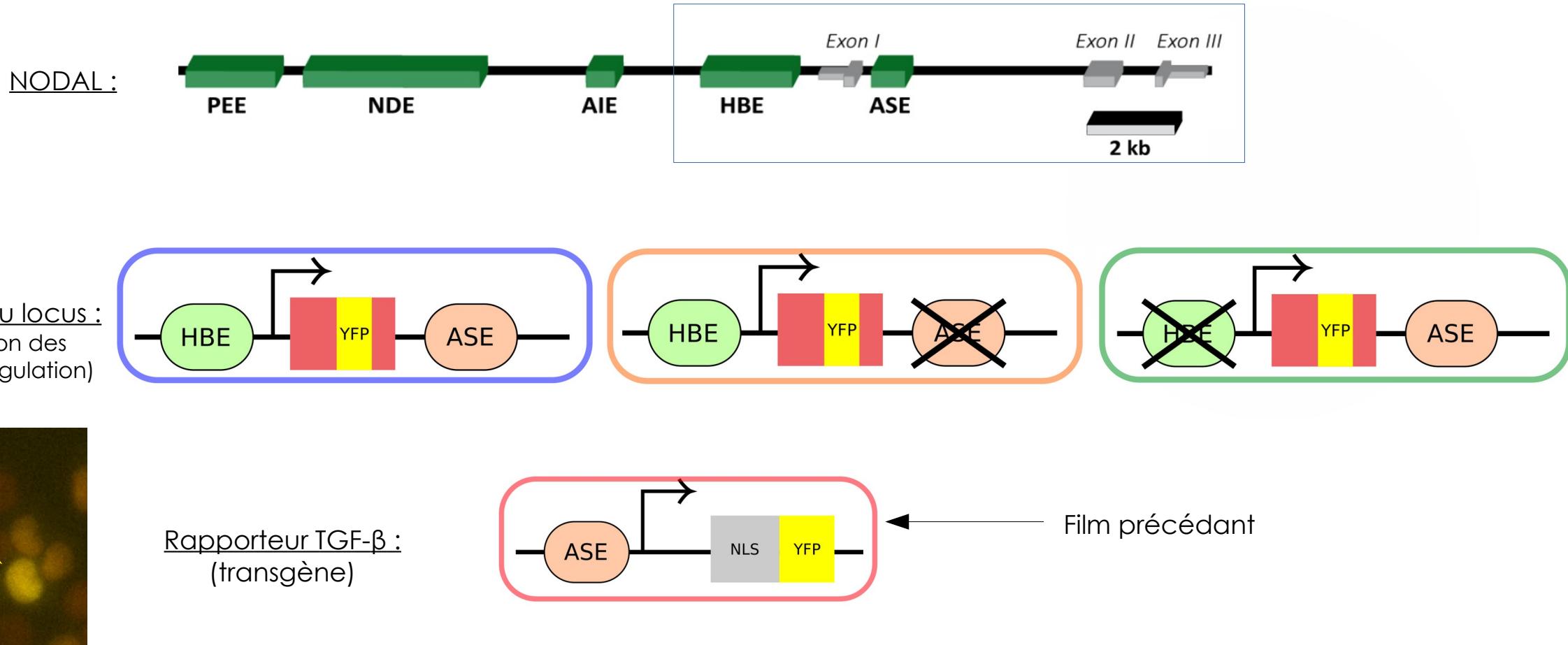
Les chambres de culture sont traitées avec de la *fibronectine* pour l'adhésion cellulaire

# Système expérimental pour mesurer la dynamique de la signalisation NODAL

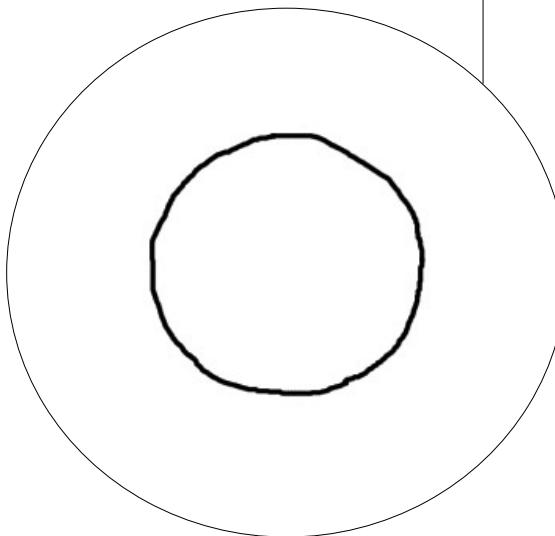


Microscope à fluorescence pour la mesure des protéines fluorescente (FP)

# Rapporteur fluorescent pour la mesure de l'activité de NODAL

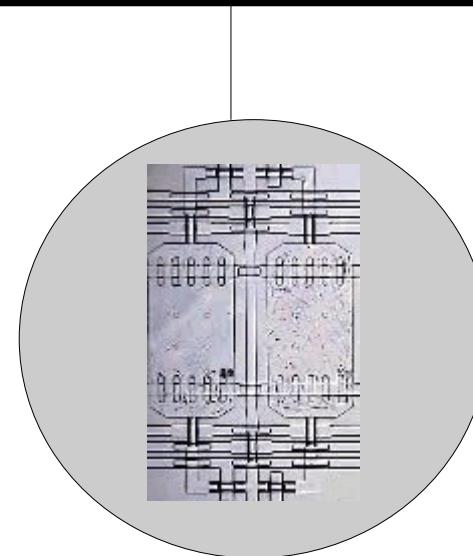


# Où en sommes nous dans la présentation ?



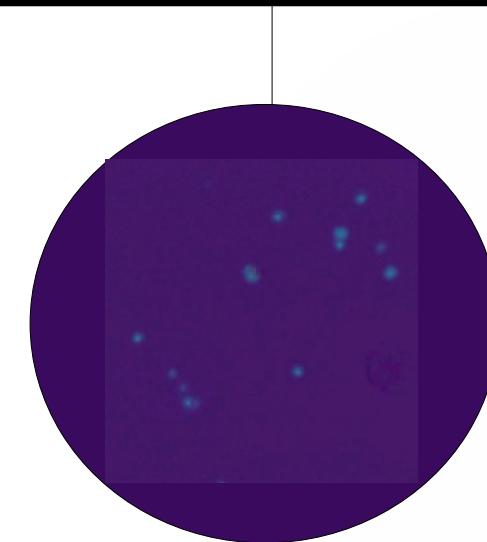
## Mise en contexte (~15min)

- Comment se différencient les cellules ?
- Comment les cellules s'organisent dans un tissu en développement ?
- Comment les cellules interprètent un signal de différenciation dynamique ?
- Quel modèle utiliser ?



## Outils expérimentaux (~10min)

- Comment étudier la différenciation ?
- Comment générer des signaux ?
- Comment mesurer l'expression d'un gène ?

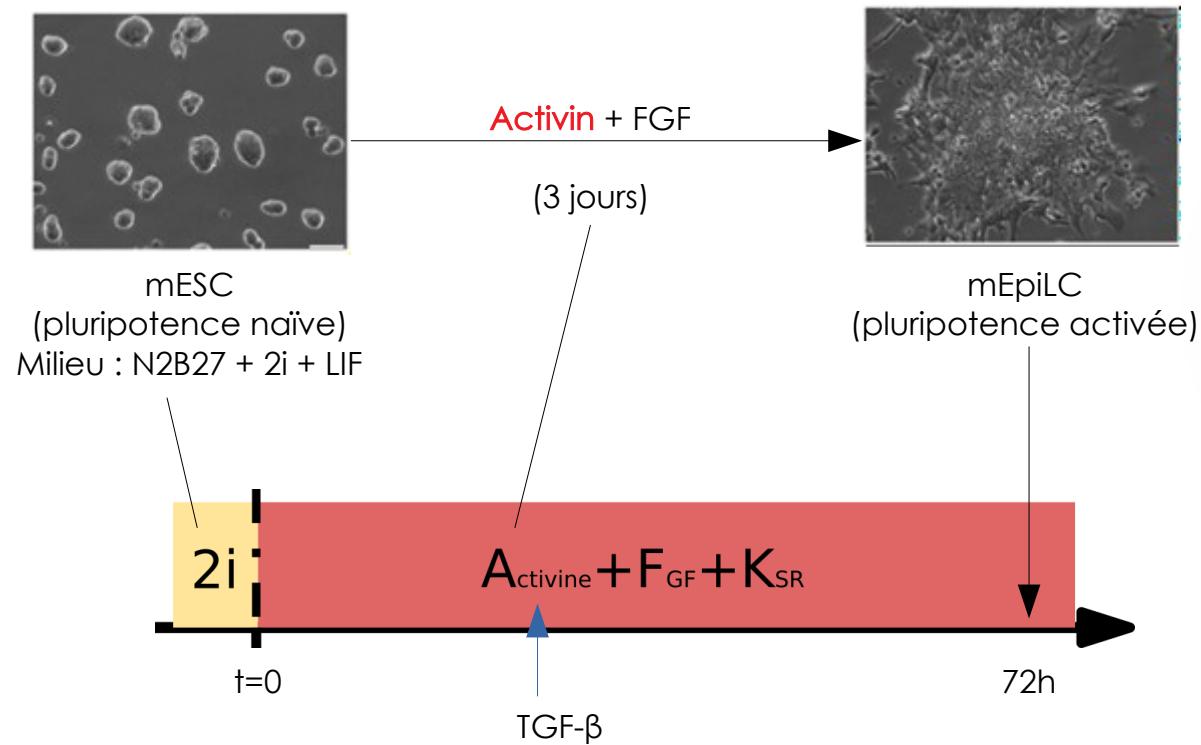


## Résultats et Conclusion (~20min)

- **Caractérisation de NODAL**
- **Caractérisation de la signalisation**
- Caractérisation d'un élément de régulation
- Caractérisation de la différenciation

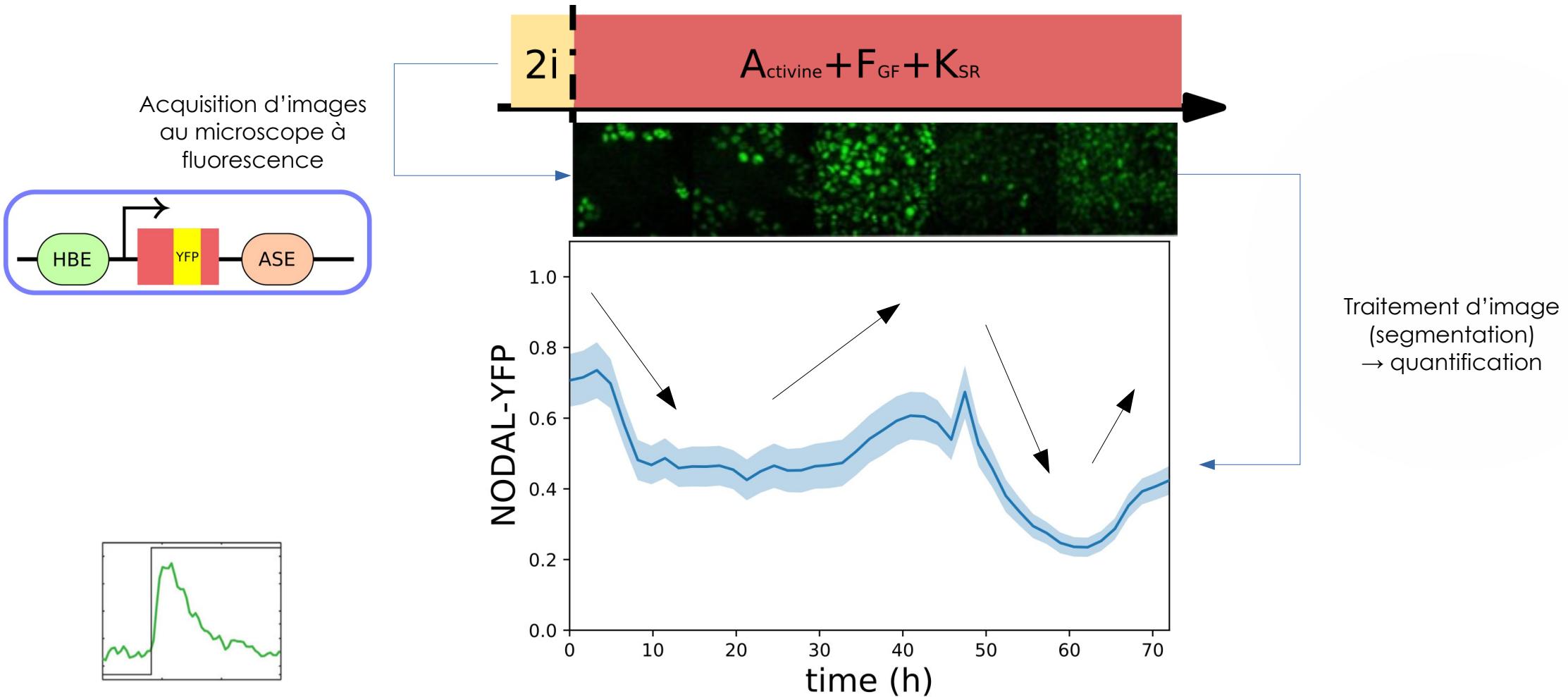
Temps  
(~45min)

# Quel est le rôle d'un profil temporel de stimulation de la voie TGF-β dans la régulation de Nodal ?



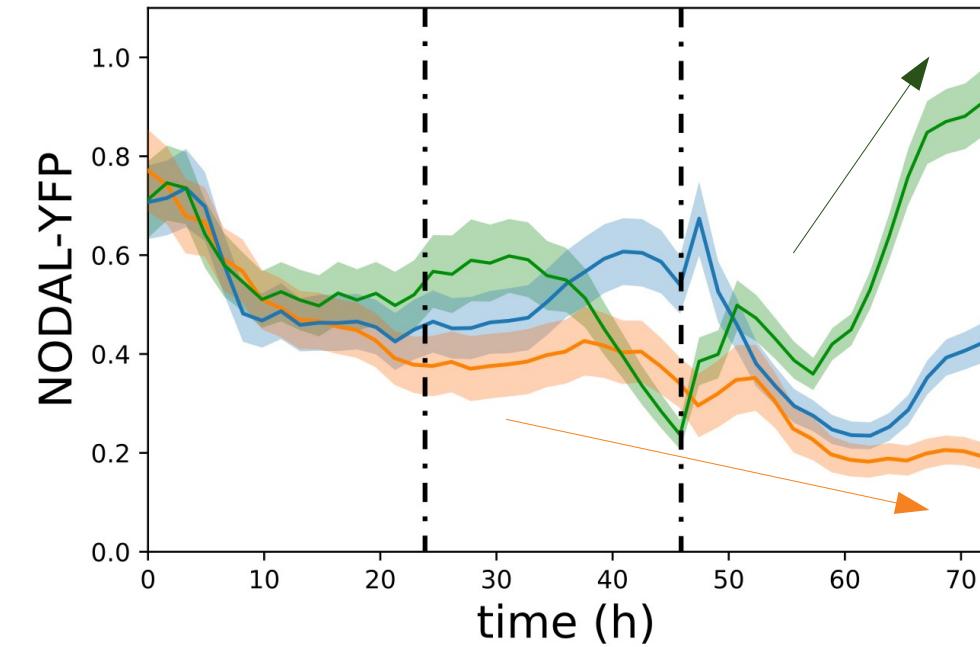
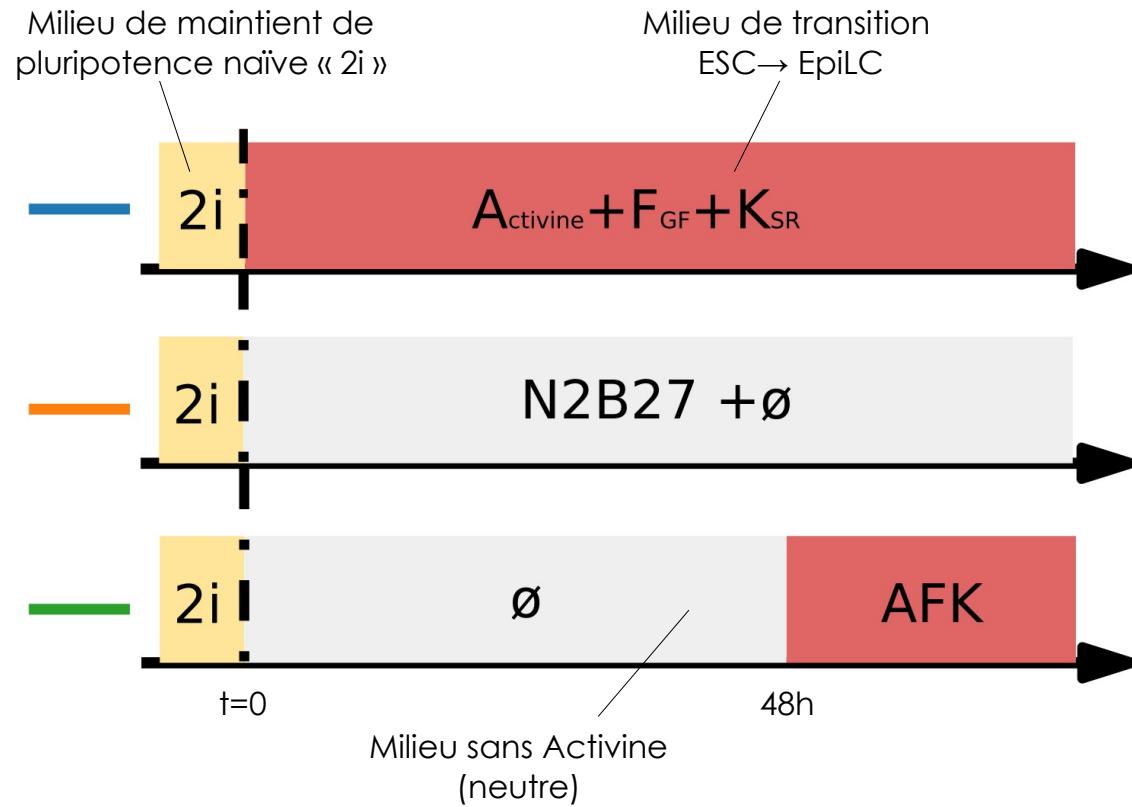
La maturation de l'épiblaste est déclenchée par le remplacement du milieu « 2i » par un milieu contenant de l'Activine

# Comment évolue le profil de Nodal lorsqu'on stimule les cellules souches embryonnaires avec de l'Activine ?



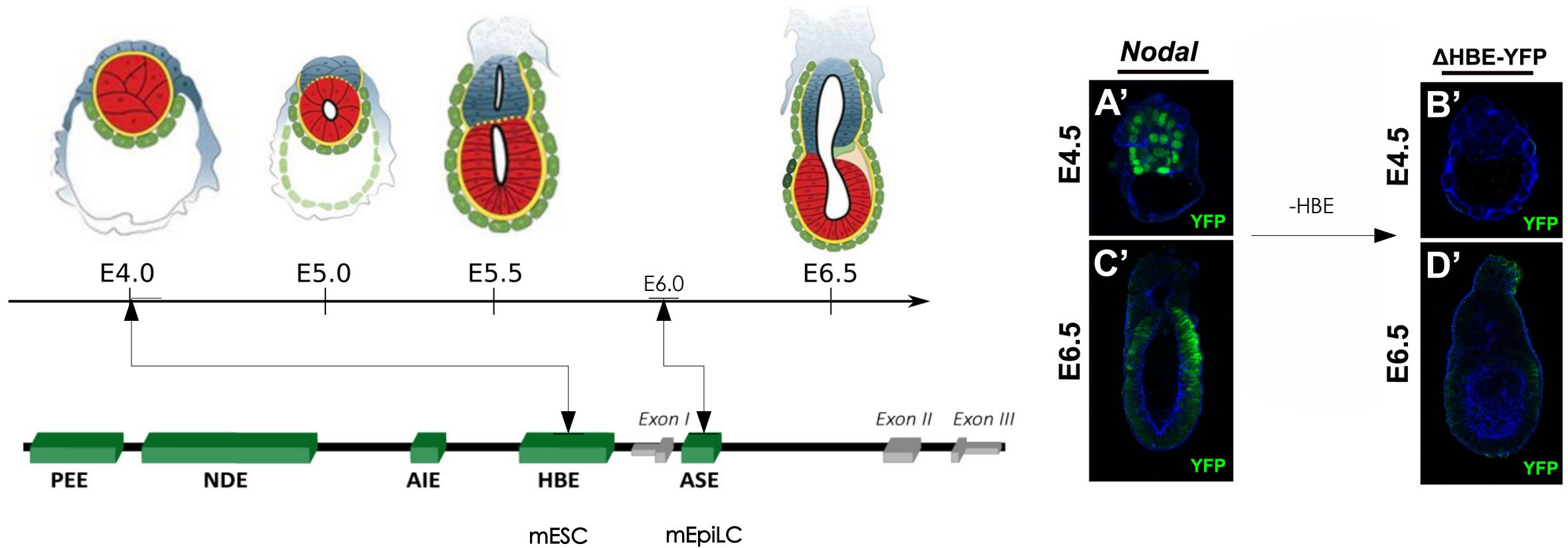
L'expression de Nodal semble indépendante de l'Activine  
→ Nodal n'a pas le profil d'une cible directe de la voie TGF-β

# Comment varie l'expression de Nodal au cours de la transition mESC vers mEpiLC ?



Nodal devient dépendant de l'Activine au moins 48h après l'arrêt de la pluripotence naïve

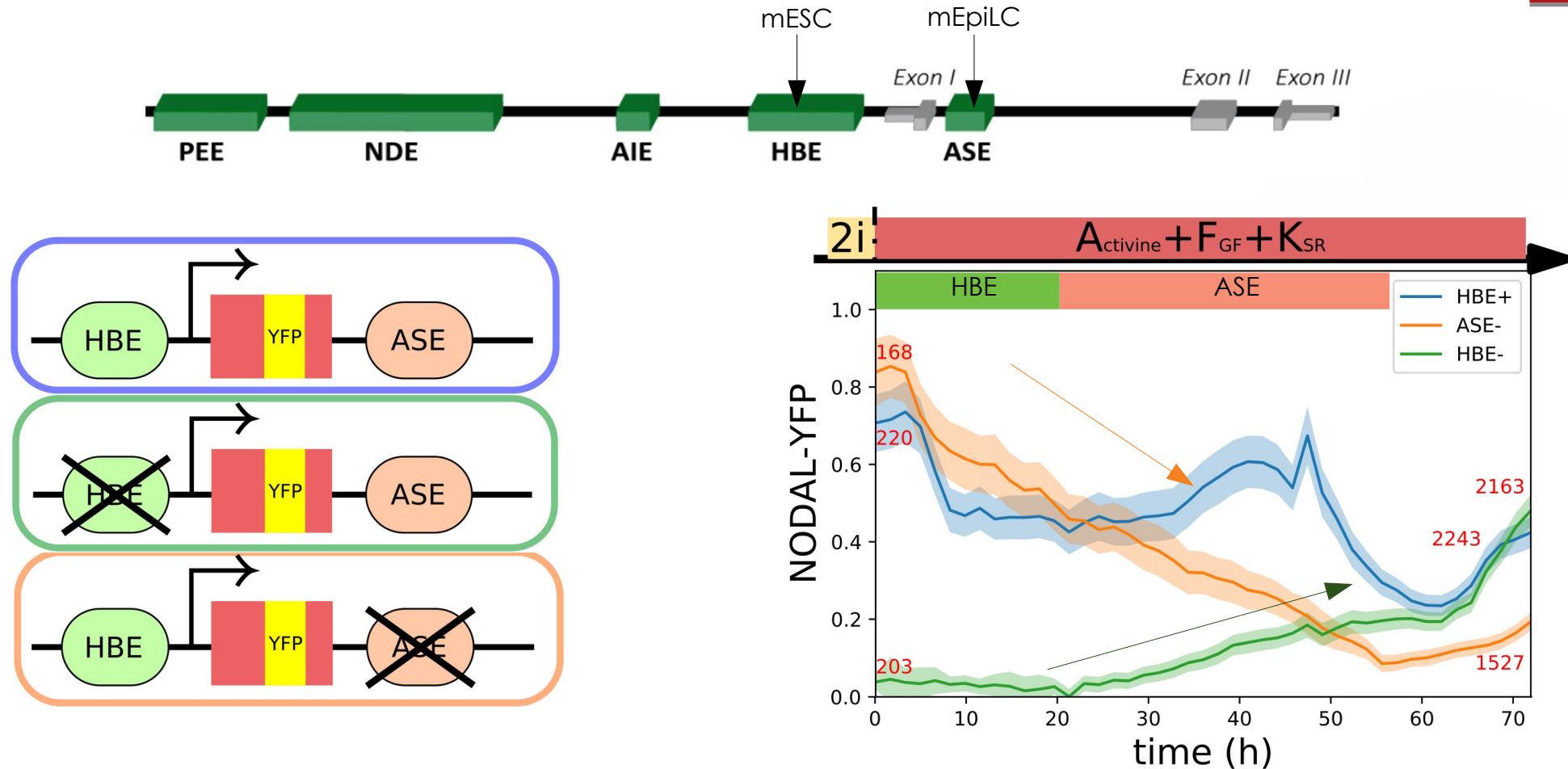
# La transition de régulation *in vivo* expliquerait le profil de Nodal *in vitro*



Au stade 4.0 : Nodal est régulé par **HBE** (cible facteur pluripotence)  
A partir du stade 6.0 : Nodal est régulé par **ASE** (cible TGF-β)

# Contribution *in vitro* des éléments de régulation

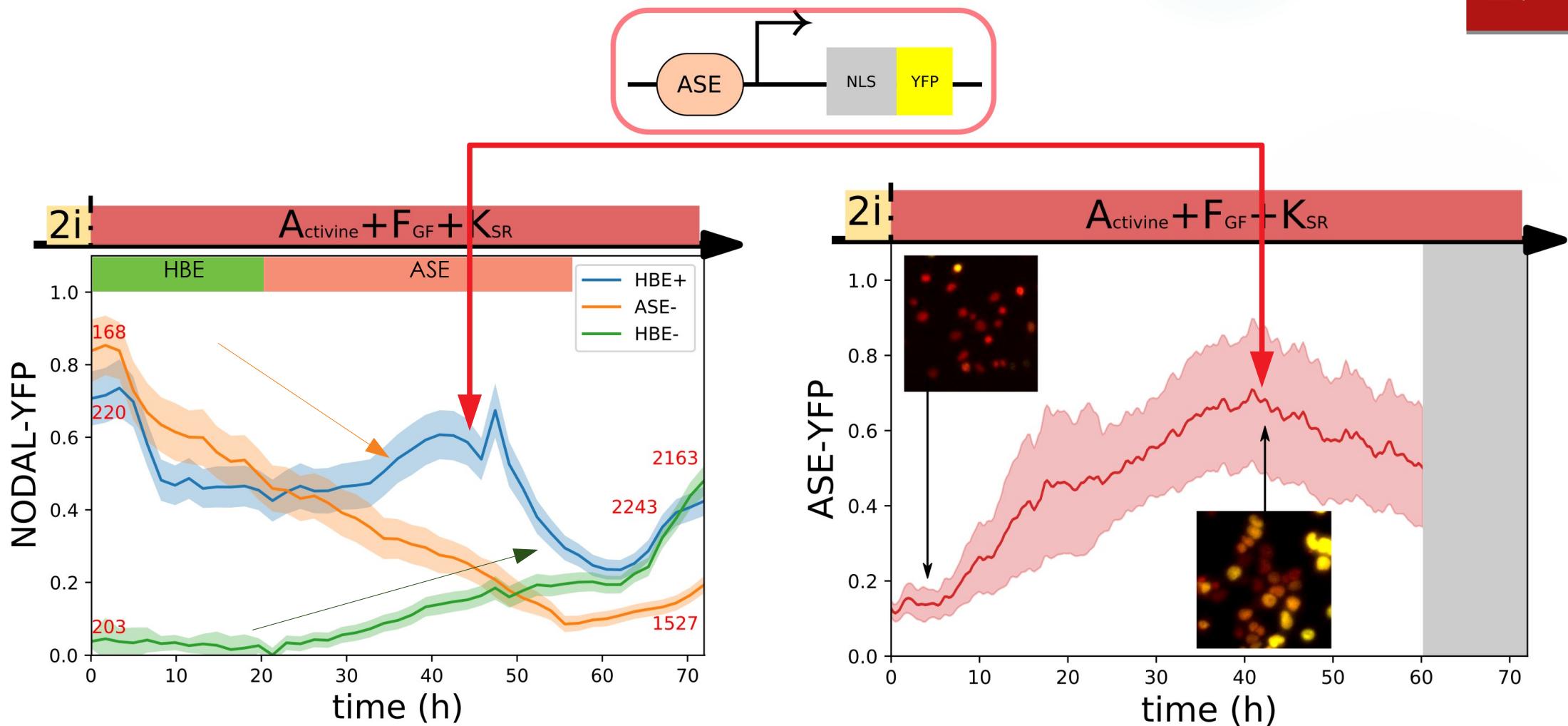
26



Nodal passe d'une régulation **HBE** (pluripotence) vers **ASE** (TGF- $\beta$ )

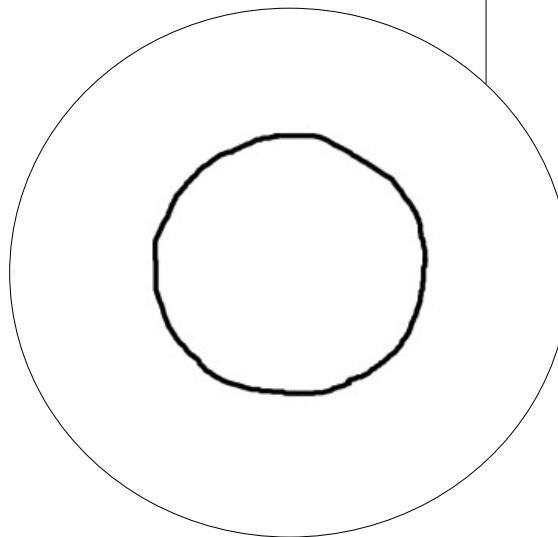
# Contribution *in vitro* de l'élément ASE via ASE-YFP

27



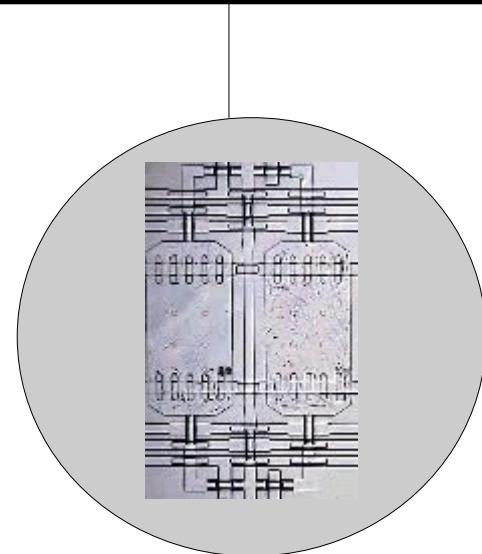
ASE-YFP compatible avec la transition de la régulation, mais devrait y être insensible  
→ caractérisation voie TGF-β

# Où en sommes nous dans la présentation ?



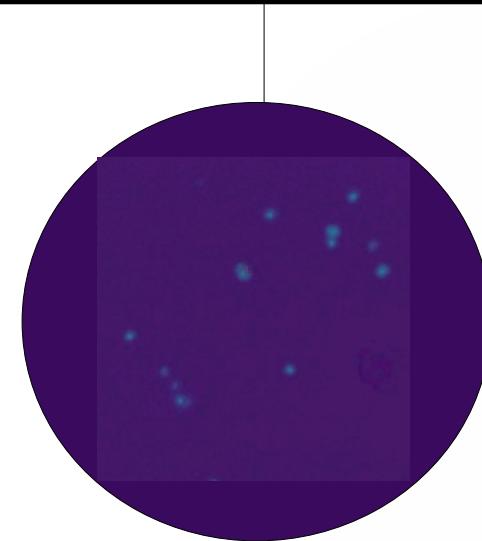
## Mise en contexte (~15min)

- Comment se différencient les cellules ?
- Comment les cellules s'organisent dans un tissu en développement ?
- Comment les cellules interprètent un signal de différenciation dynamique ?
- Quel modèle utiliser ?



## Outils expérimentaux (~10min)

- Comment étudier la différenciation ?
- Comment générer des signaux ?
- Comment mesurer l'expression d'un gène ?

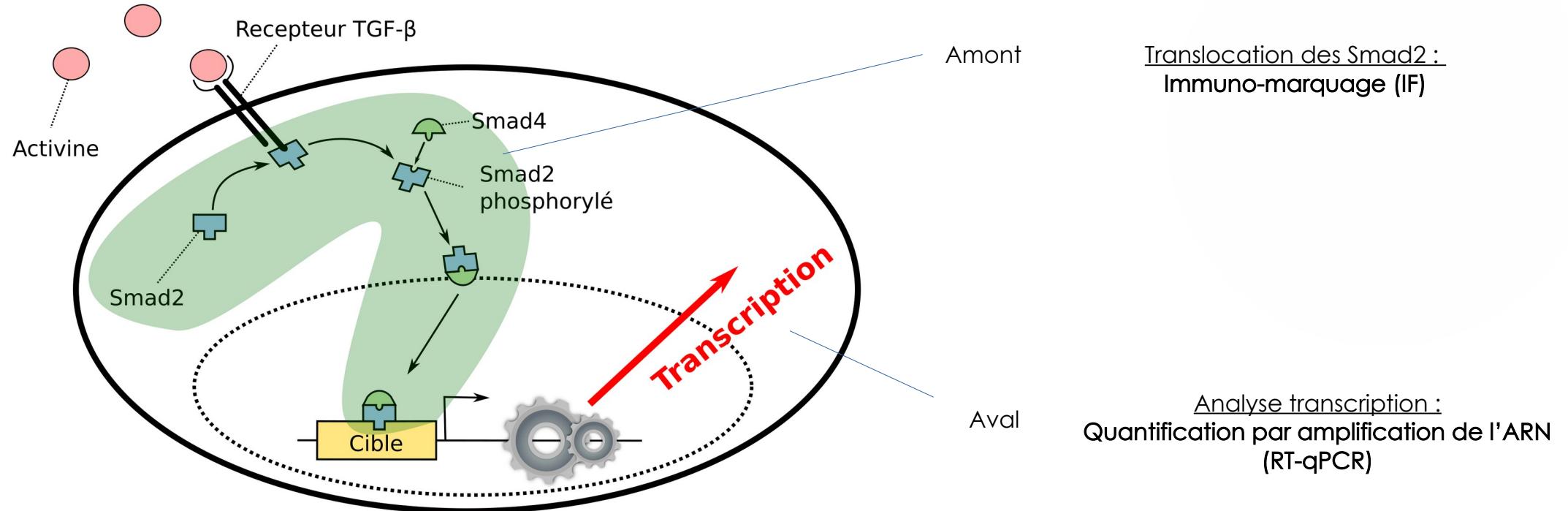


## Résultats et Conclusion (~20min)

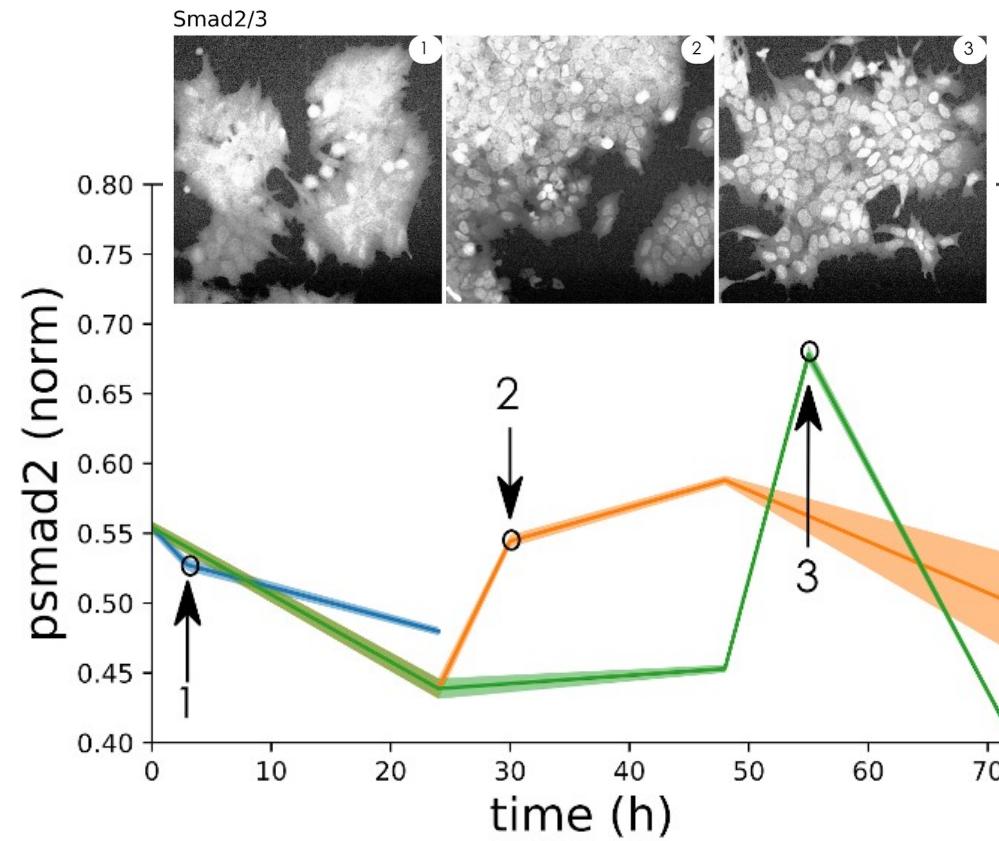
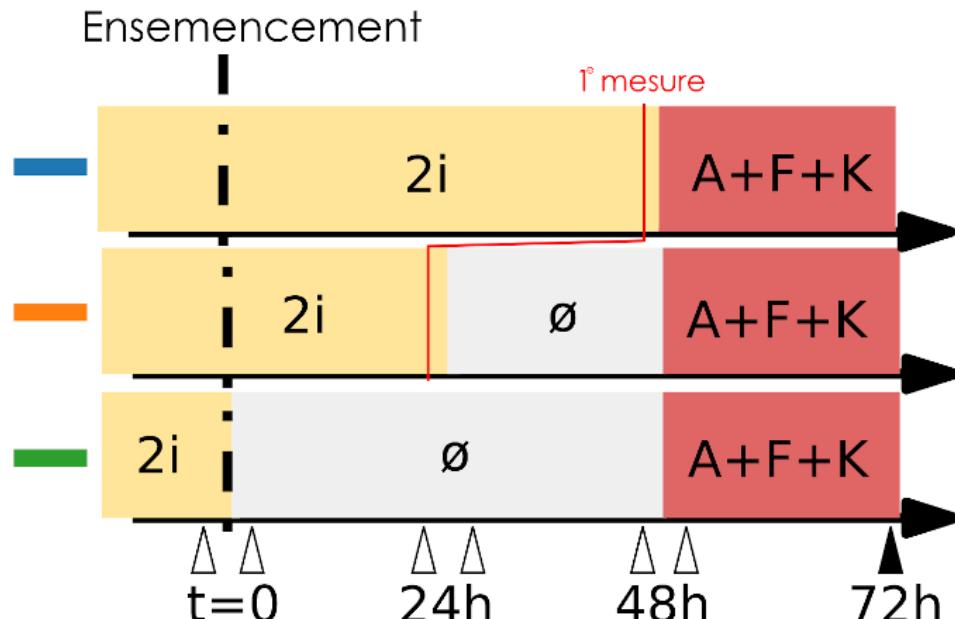
- Caractérisation de NODAL
- Caractérisation de la signalisation
- **Caractérisation de l'élément de régulation ASE et la signalisation**
- Caractérisation de la différenciation

Temps  
(~45min)

# Caractérisation de l'activité de la voie TGF-β à différents moments du protocole *in vitro*

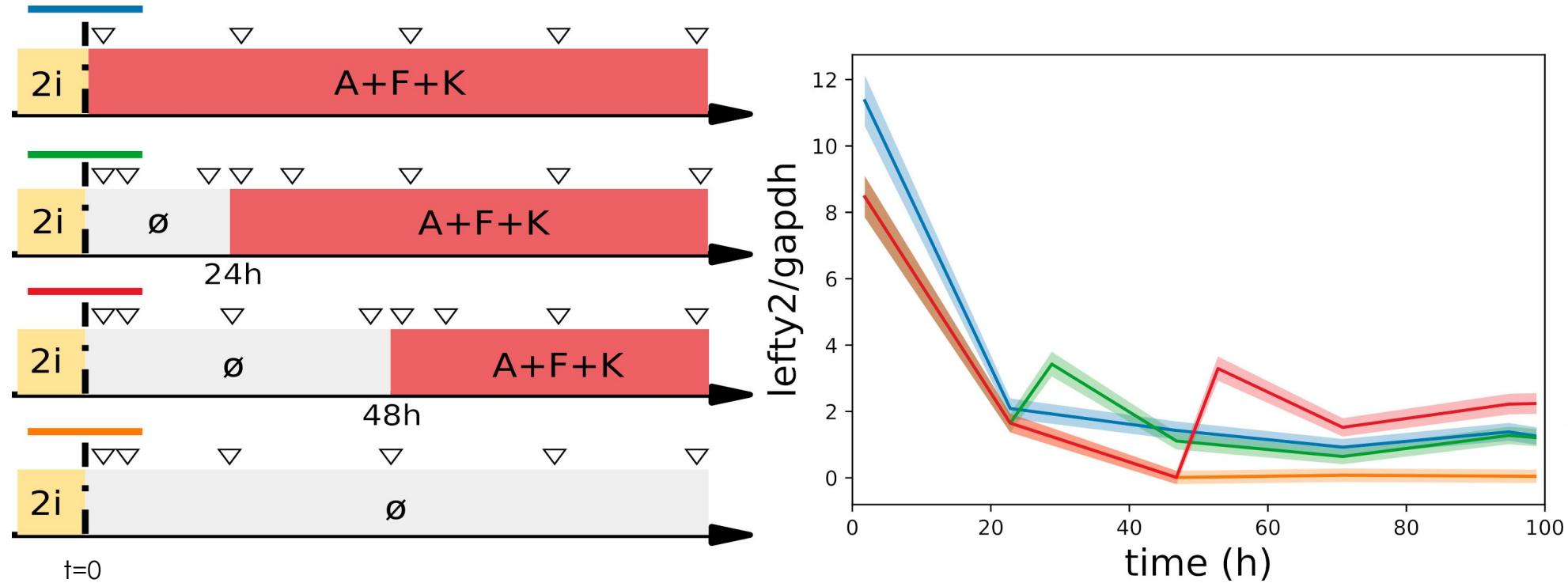


# Les immuno-pSmad2 pour la caractérisation en amont de la voie TGF- $\beta$



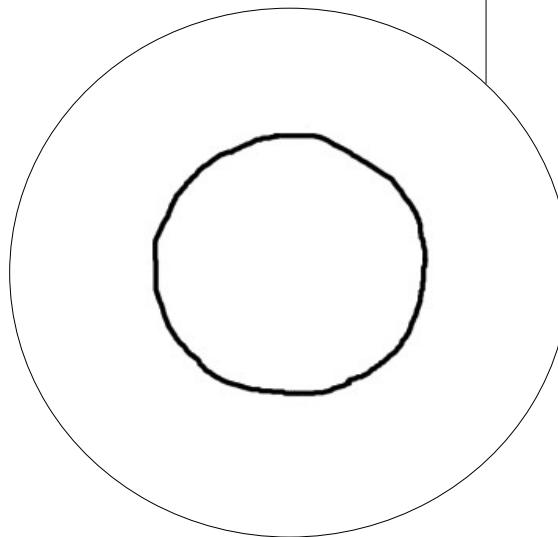
Pas d'effet d'une stimulation Activine à t=0 sur la localisation des psmad2 dans le noyau  
 Réponse adaptative des pSmad2 à partir de 24h

# Les RT-qPCR « LEFTY2 » pour la caractérisation en aval de la voie TGF- $\beta$



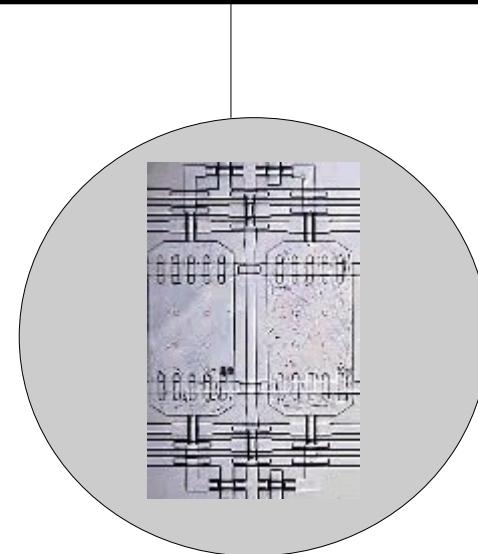
Caractérisation en aval compatible avec la caractérisation en amont de la voie TGF- $\beta$   
 → Voie de signalisation activable mais la sensibilité change

# Où en sommes nous dans la présentation ?



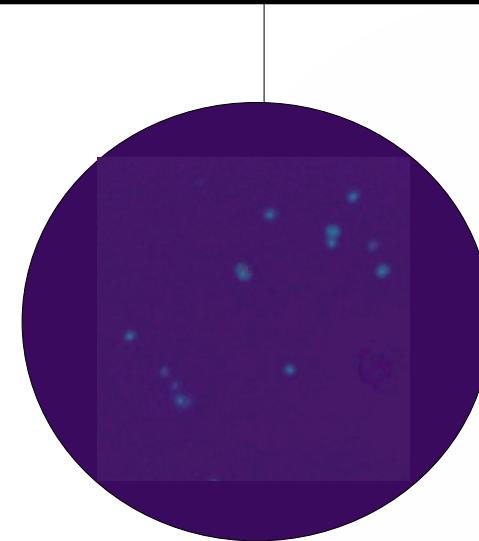
## Mise en contexte (~15min)

- Comment se différencient les cellules ?
- Comment les cellules s'organisent dans un tissu en développement ?
- Comment les cellules interprètent un signal de différenciation dynamique ?
- Quel modèle utiliser ?



## Outils expérimentaux (~10min)

- Comment étudier la différenciation ?
- Comment générer des signaux ?
- Comment mesurer l'expression d'un gène ?

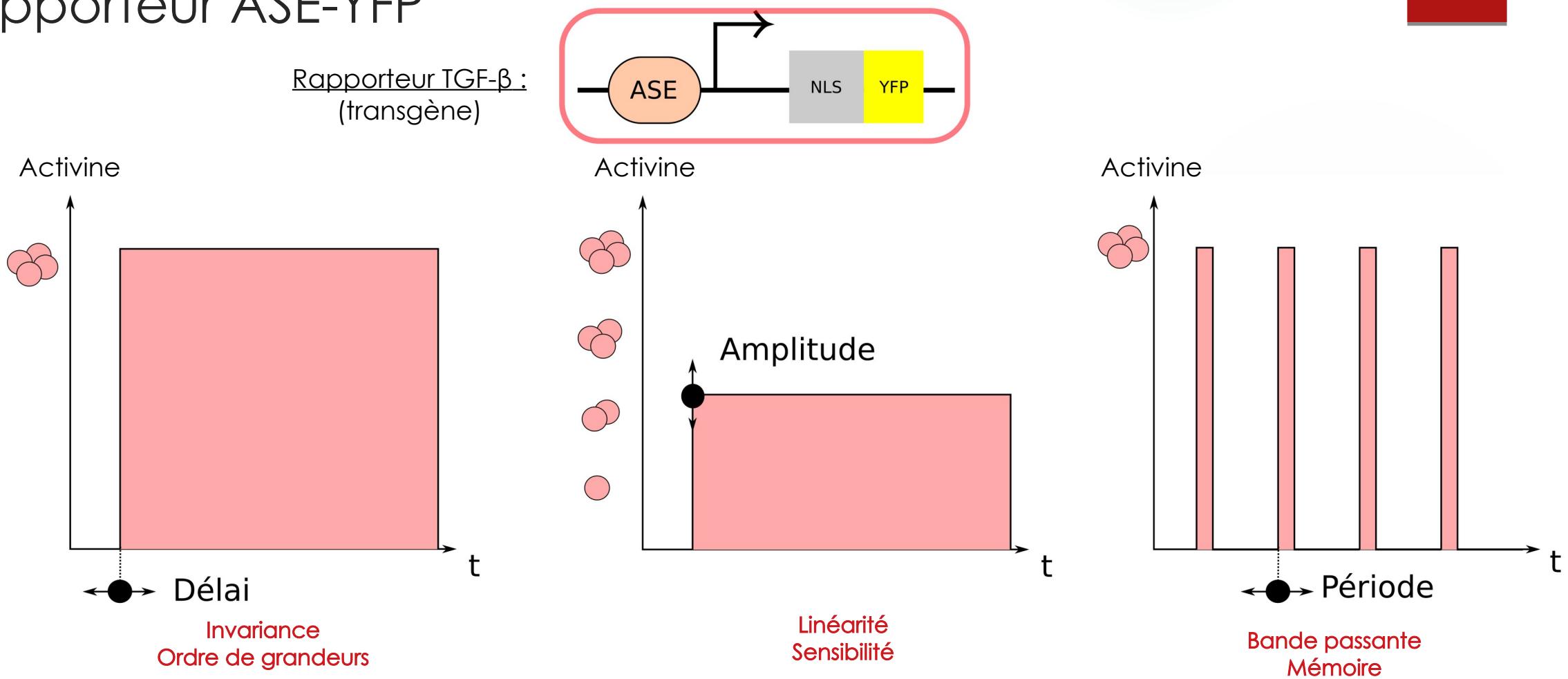


## Résultats et Conclusion (~20min)

- Caractérisation de NODAL
- Caractérisation de la signalisation
- **Caractérisation de l'élément de régulation ASE et la signalisation**
- Caractérisation de la différenciation

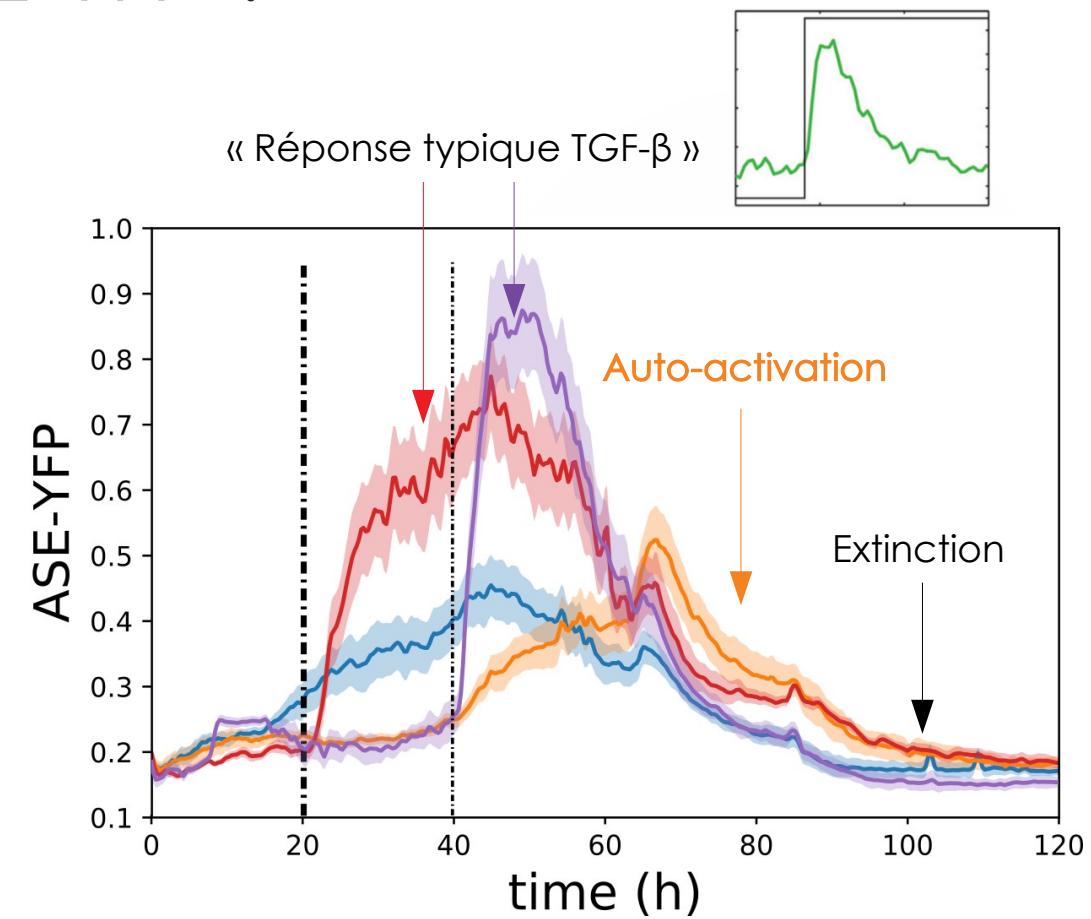
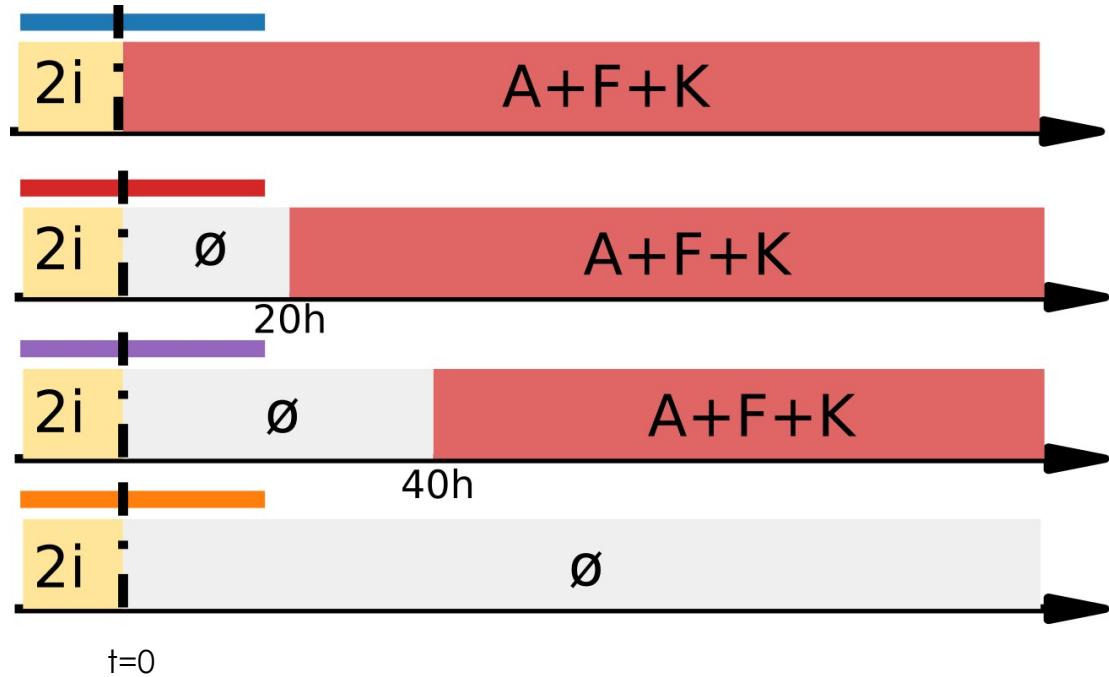
Temps  
(~45min)

# Caractérisation de la dynamique de réponse du rapporteur ASE-YFP



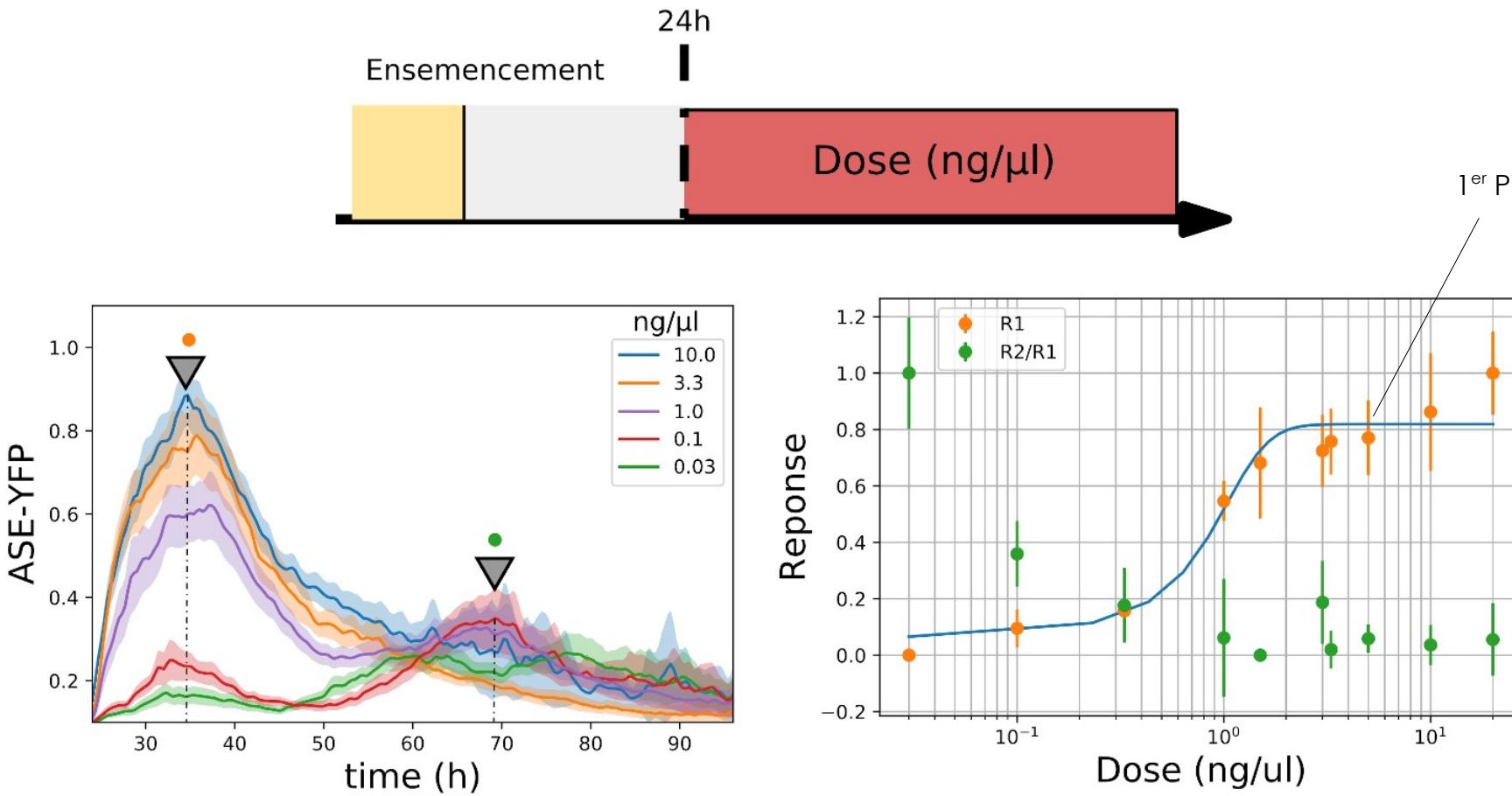
Comment ASE-YFP intègre une stimulation temporelle de la voie de stimulation TGF- $\beta$  ?

# Quel est l'influence d'un délai de stimulation d'Activine sur la réponse d'ASE-YFP ?

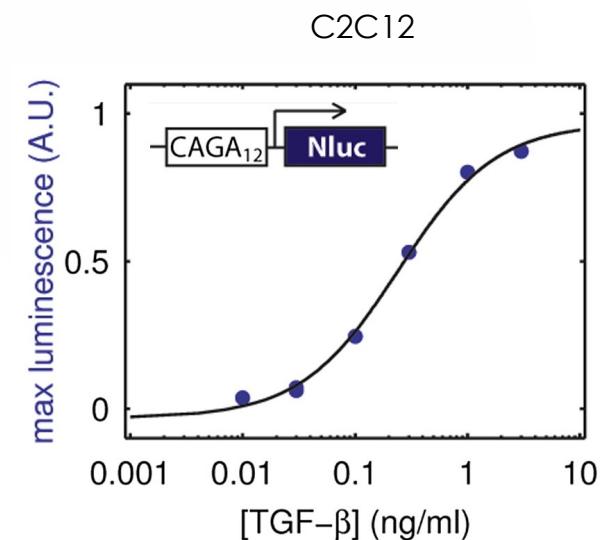


Réponse typique de la voie de signalisation TGF- $\beta$  à partir de 20h

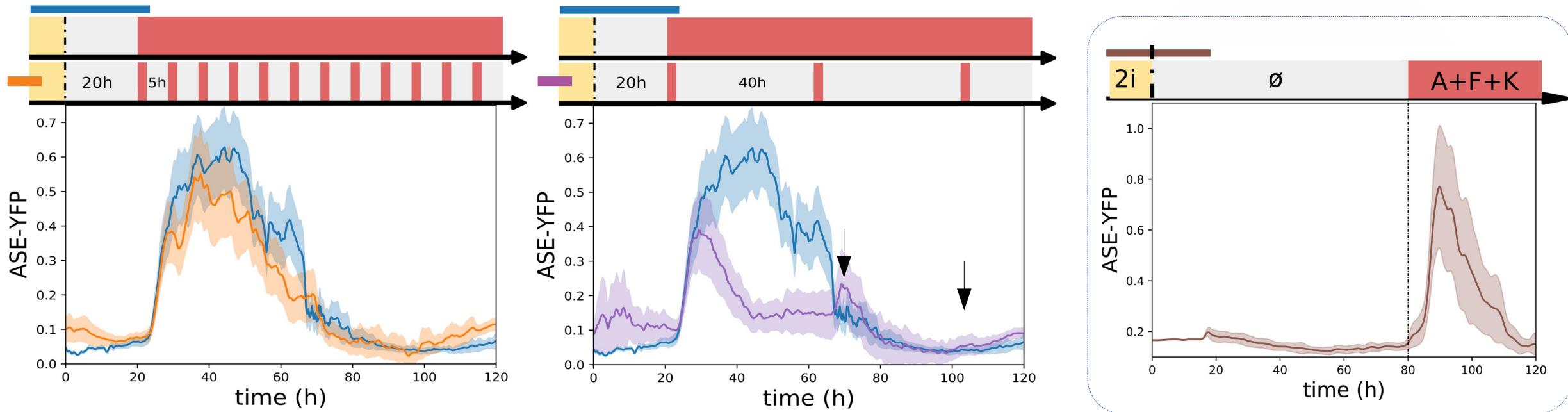
# Quel est l'influence de la concentration d'Activine sur la réponse d'ASE-YFP ?



1<sup>er</sup> réponse linéaire  
Balance de réponse → Effet mémoire

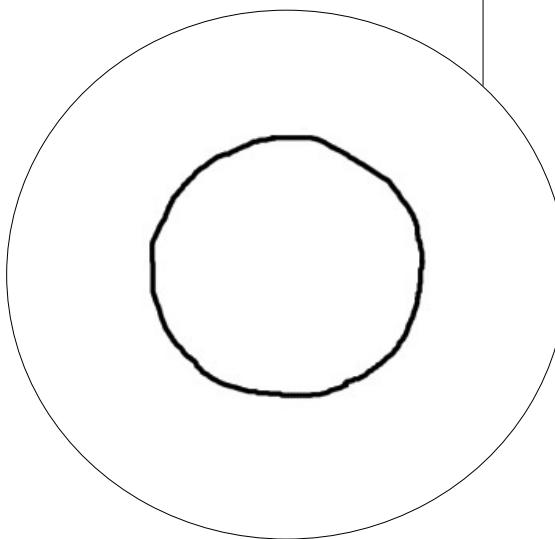


# Quel est l'influence d'un « train de pulse » de stimulation Activine sur la réponse d'ASE-YFP ?



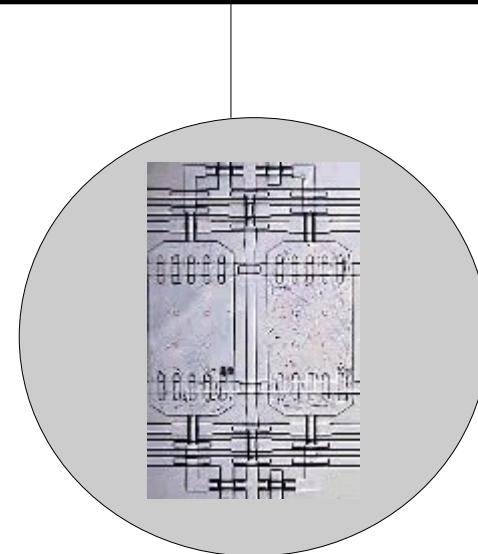
La réponse suit l'enveloppe d'un délai de 20h  
Effet mémoire d'une brève stimulation à 20h pendant plus de 40h

# Où en sommes nous dans la présentation ?



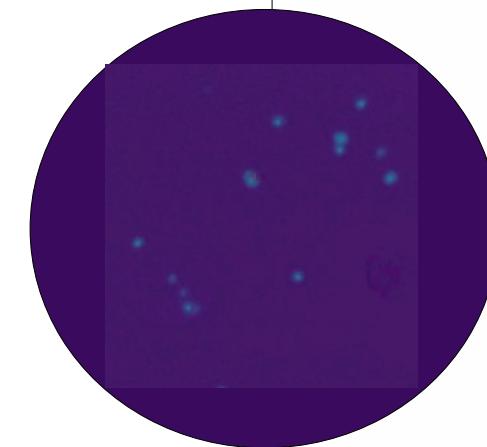
## Mise en contexte (~15min)

- Comment se différencient les cellules ?
- Comment les cellules s'organisent dans un tissu en développement ?
- Comment les cellules interprètent un signal de différenciation dynamique ?
- Quel modèle utiliser ?



## Outils expérimentaux (~10min)

- Comment étudier la différenciation ?
- Comment générer des signaux ?
- Comment mesurer l'expression d'un gène ?

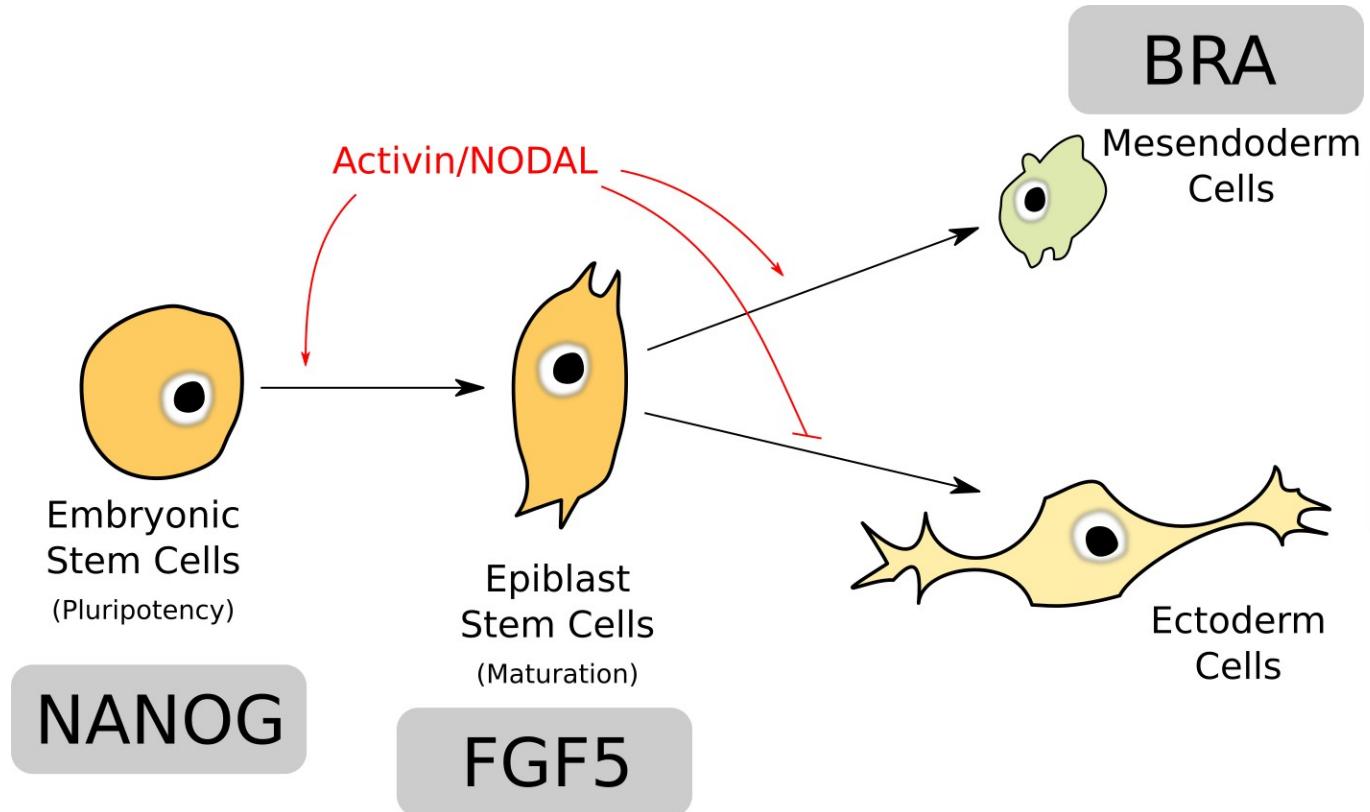


## Résultats et Conclusion (~20min)

- Caractérisation de NODAL
- Caractérisation de la signalisation
- Caractérisation de l'élément de régulation ASE et la signalisation
- **Caractérisation de la différenciation**

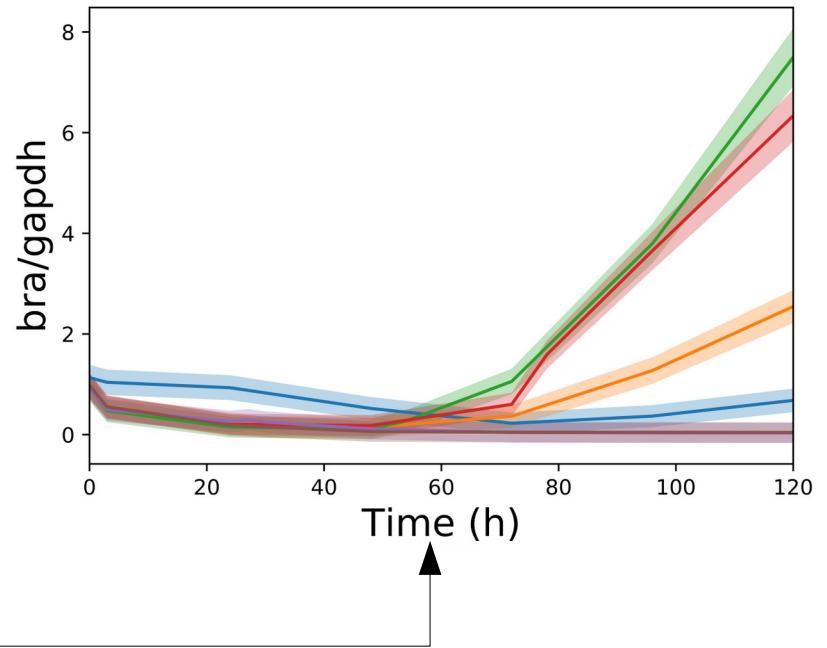
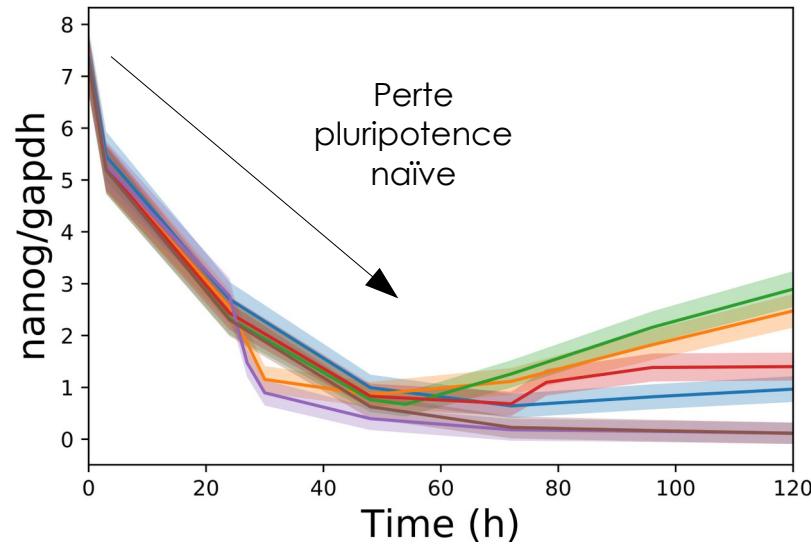
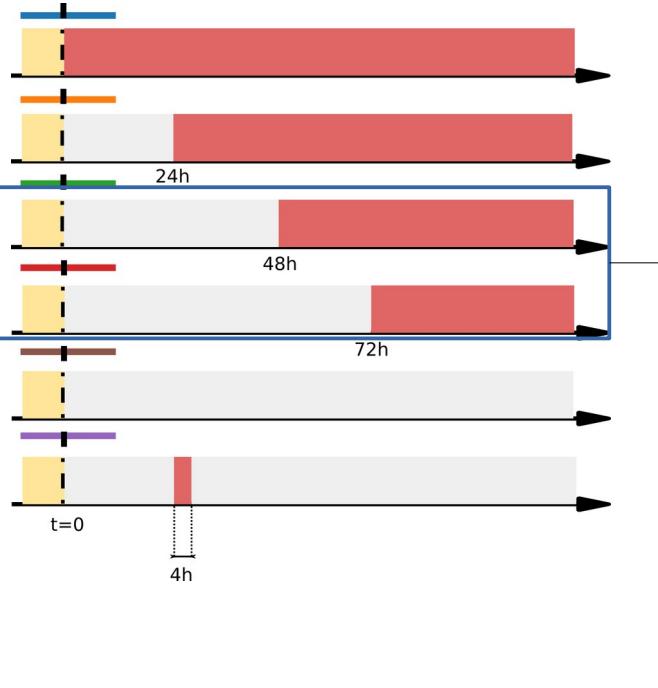
Temps  
(~45min)

# L'Activine différencie les cellules vers le mésendoderme



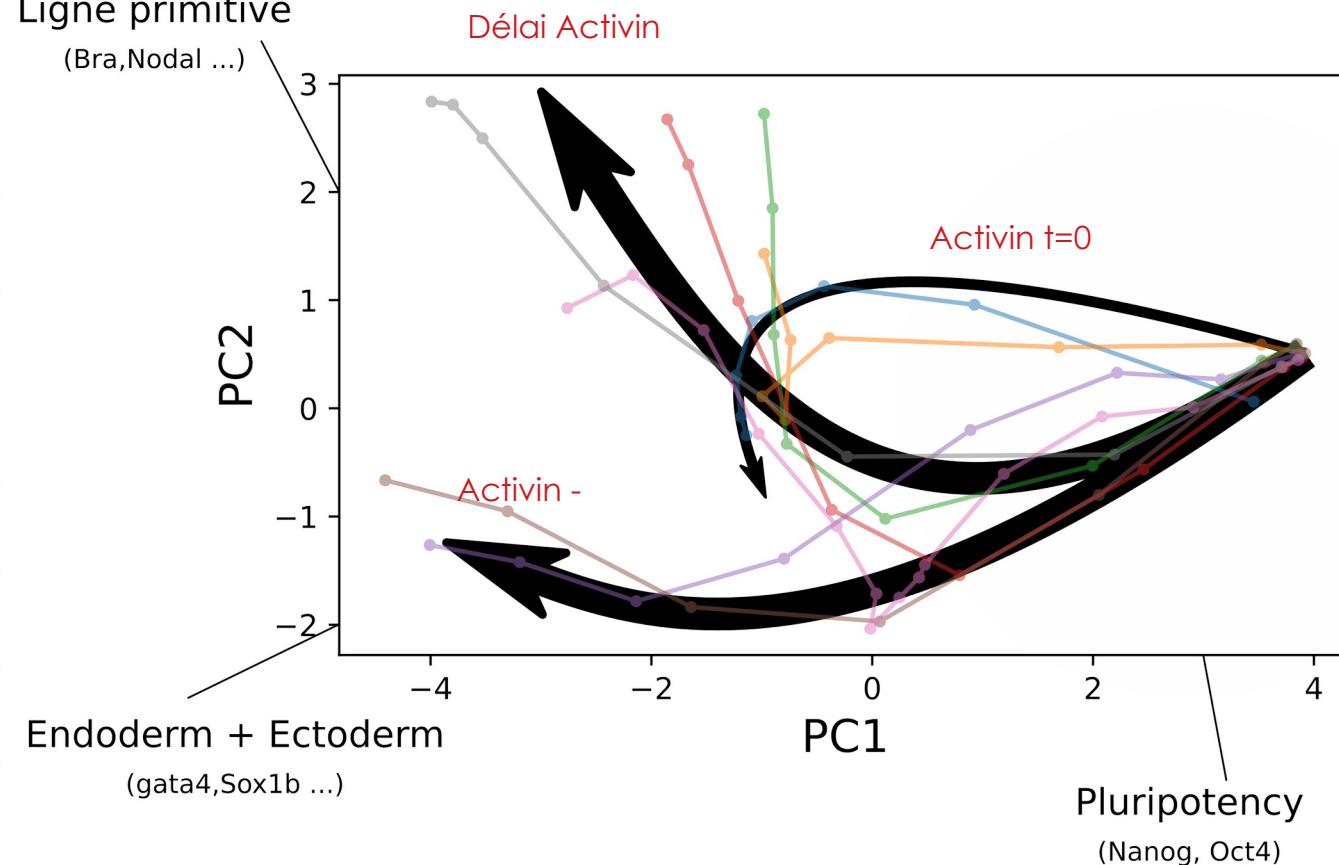
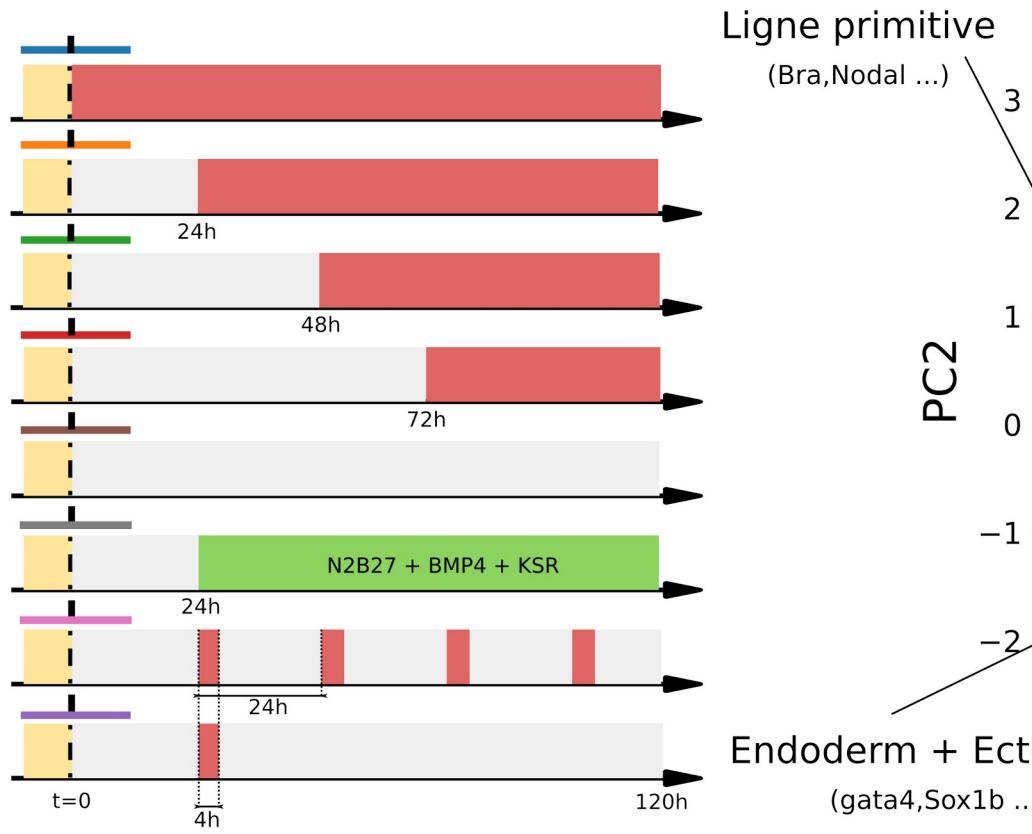
Quel est l'effet d'un signal Activine( $t$ ) sur la trajectoire de différenciation ?

# Quel est l'effet d'un signal d'Activine sur l'identité cellulaire?



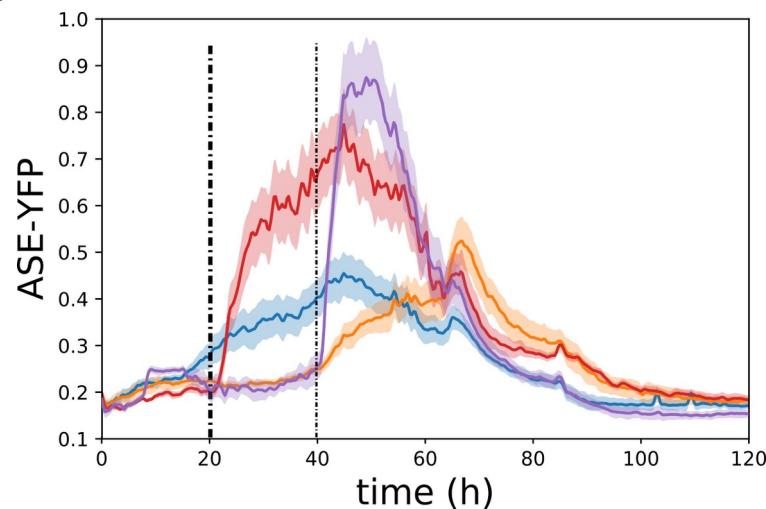
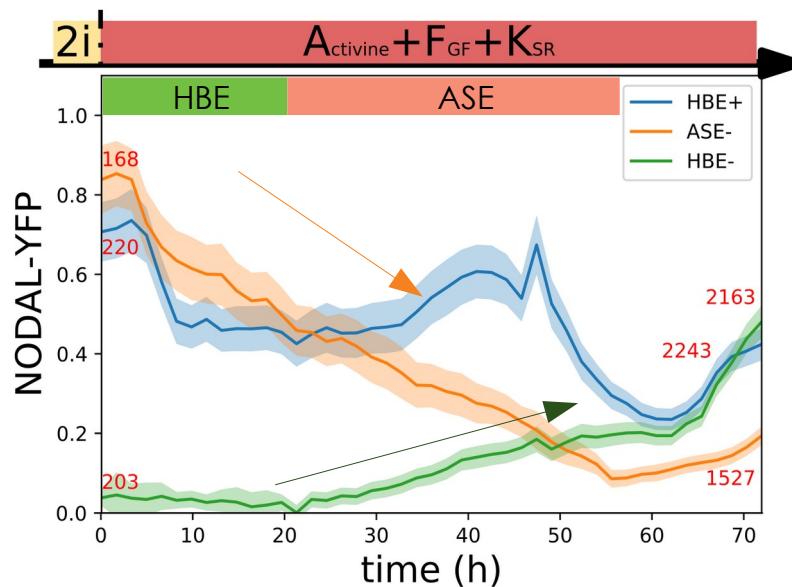
Délai d'Activine plus efficace pour mésendoderme ; Pas d'effet mémoire  
Pas assez de marqueurs pour conclure

# Comment évolue la trajectoire de transcription ?



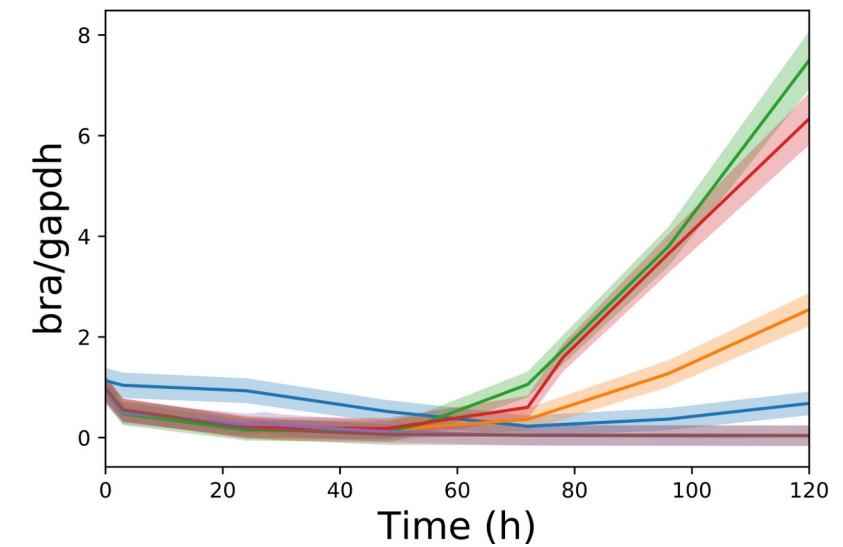
3 grandes trajectoires : Ligne primitive, « Endo/Ecto » et Épiblaste  
 Le moment où l'on stimule avec de l'Activine est important pour la différenciation

*Conclusion : Les cellules interprètent différemment l'Activine au cours du développement*



Transition de la régulation de NODAL

Adaptation, Auto-activation et Mémoire



Effet de temporalité d'Activine sur la différenciation

# Contribution

## Membres du Jury :

François GALLET

Alice JOUNEAU

Fabien MONTEL

Pascal HERSEN

Benoît SORRE

## Équipe Benoit :

Jean-Louis Plouhinec

Sara Bonavia

Tom Wyatt

Gabriel Thon

## Équipe IJM :

Jérôme Collignon

Mathieu Vieira

Attaillah Benhaddou

Nicolas Porchet

*Merci à tous !*

