

Université de Paris

École doctorale **Physique en Île-de-France, ED564**

*Laboratoire **Matière et Systèmes Complexes (UMR 7057)***

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

Par Fabien FURFARO

Thèse de doctorat de **Biophysique**

Dirigée par Pascal Hersen
Et par **Benoit Sorre**

Présentée et soutenue publiquement le **27 septembre 2019 à Paris**

Devant un jury composé de :

Pr François Gallet, Université Paris Diderot
Dr Alice Jouneau, Université Paris-Saclay
Dr Fabien Montel, Université de Lyon
Dr Pascal Hersen, CNRS
Dr Benoit Sorre, CNRS

Président du jury
Rapportrice
Rapporteur
Directeur de Thèse
Co-directeur



Except where otherwise noted, this is work licensed under
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

Remerciements :

Tout le travail qui est présenté ici n'aurait pas été permis sans mon directeur de thèse qui a su m'encadrer et m'inspirer durant ces quatre années.

Je commencerai par remercier les personnes qui m'ont permis de me reconvertis d'électrotechnicien à « biophysicien », c'est déjà grâce à eux que j'ai pu en arriver là.

Ensuite, je remercie mes chères camarades de la Licence jusqu'au Master, mais aussi ceux qui ont eu la bonne idée de faire une thèse dans le laboratoire MSC.

En parlant du laboratoire, merci à tous ceux qui m'ont accueilli, sans vous, je ne me serais pas autant épanoui.

Un grand merci à tous nos collaborateurs techniques et administratif du laboratoire, eux qui m'ont vu courir et siffler en passant dans les couloirs.

L'aide et les conseils de la « team 513 » a été très précieuse et m'a véritablement fait avancer dans ce projet et je les en remercie.

Je n'oublie pas nos collaborateurs à l'institut Jacques Monod, qui m'ont permis d'acquérir autant de connaissance dans le domaine.

Je remercie mes camarades de la salle 756, du 7^e étage, mais aussi ceux de la 911, qui ont fait de ces années un agréable moment.

Je remercie les personnes que j'ai rencontrées dans les bars parisiens, ces nombreuses discussions ont fait émerger l'un des chapitres de ma thèse.

Merci à celles et ceux qui m'ont aidé pour la rédaction, ainsi que pour la correction de ma thèse, j'en suis infiniment reconnaissant.

Je remercie mes amis et ma famille qui m'ont suivi depuis le début de l'aventure et qui m'ont soutenu jusqu'au bout.

Merci aussi au membre du jury, ainsi qu'à mes tuteurs de thèses qui ont accepté de prendre du temps pour évaluer mon travail.

Enfin, je vous remercie « vous » qui vous intéressait à mon travail et à tous ceux qui ont partagé un moment avec moi.

Crédits :

Adrien Hallou, Adrien Marck, Aina Ramamonjy, Alain Richer, Alexandre Pousse, Alexandre Souchaud, Alexis Coullomb, Alice Jounaud, Angéline Noclain, Anouchka Plan, Antoine Gaillard, Antoine Lafage, Arnaud Grados, Ataaillah Benhaddou, Benoit Sorre, Bouchu Lucie, Camille Gaulon, Carine Vias, Carole Barache, Caroline Derec, Céline Cordier, Charles Duchene, Chiara Fracassi, Cyrille Hamon, Darius Marin, David Martin, David Pereira, Di Palma Alexandre, Dimitrije Milunov, Estelle Vian, Etienne Moïson, Fabien Duveau, Fabien Montel, Famille Bessou, Famille Cortes, Famille Furfarò, Famille Gaspard, Florent Voisin, Florian Fage, François Gallet, Gabriel Le Doudic, Gabriel Thon, Gaelle Charron, Gaetan Mary, Hanoomie Marlène, Hélène Prunier, Jean Hubert, Jean Louis Plouhinec, Jean-Baptiste Lugagne, Jean-Marc Di Meglio, Jeanne Galice, Jeanne Volatron, Jerome Bachellerie, Jerome Collignon, Julien Dervaux, Juliette Mignot, Kalina De Haas, Kirill Anthony, Laurent Limat, Laurent Prigent, Laurent Royon, Lauriane Rohou, Léa Bourhis, Leonard Panichi, Linda Asam, Loïc Auvray, Lynda Amichi, Marguerite Benony, Mariane Cavazzi, Marie Nardon, Mathieu Oleron, Mathieu Receveur, Mathieu Rivière, Mathieu Vieira, Mathilde Badoual, Matthias Le Bec, Méliné Durande, Montastier Patrick, Nicolas Chevalier, Nicolas Desprat, Nicolas Harmand, Nicolas Porchet, Pascal Hersen, Pauline Proboeuf, Philippe Bacon, Phillippe Brunet, Quentin Roveillo, Raphaël Pontheiu, Réa Laurent, Remy Herbaut, Romain Pousse, Ruben Zakine, Ryan Felkai, Samuel Bottani, Sara Bonavia, Solene Song, Sophie Le Nagard, Sophie Parison, Souad Namane, Souramasing Oune-Saysavanh, Sylvain Pouzet, Sylvie Hénon, Thomas Aubry, Tom Wyatt, Valentin Busson, Véronique Thévenet, Victoria Reichel, Vincent Fleury, William Brett, Zaccari Ben Meriem, Zoran Marinković, etc.

Titre : Caractérisation de la voie de signalisation NODAL lors de la différenciation des cellules souches embryonnaire

Résumé :

Lors du développement d'un organisme, les cellules se différencient et les tissus s'auto-organisent spatialement pour former un être vivant complet. Ces phénomènes sont contrôlés par des signaux chimiques que l'on appelle des « morphogènes » qui sont des molécules diffusibles, secrétées dans le milieu extracellulaire et capables d'influencer la différenciation d'une cellule. Il a été montré que différentes concentrations de morphogène peuvent induire différente identité cellulaire et que la concentration de morphogène dans un tissu n'est pas homogène spatialement. Pour comprendre comment un tissu en cours de développement s'organise, il est donc nécessaire de savoir comment les cellules en cours de différenciation décodent l'information portée par les morphogènes. Parmi ces morphogènes, on s'intéresse plus particulièrement au morphogène Nodal, Nodal est un facteur important lors du développement précoce de l'embryon, car il intervient dans la spécification de l'identité cellulaire dans les lignées embryonnaires et extra-embryonnaire. Comme il est difficile d'étudier dans un embryon de manière quantitative, l'influence du profil temporel d'une stimulation d'un morphogène sur la différenciation, nous avons choisi comme système modèle les cellules souches embryonnaires de souris (mESC). Le but de ces travaux a été d'étudier l'influence de la stimulation temporelle de différent morphogènes sur l'expression du locus "Nodal" et sur la différenciation des cellules souches. Pour contrôler le profil temporel de la concentration de morphogène envoyée aux cellules, nous utilisons une puce microfluidique automatisée de culture cellulaire qui nous permet d'observer les réponses de cellules individuelles en temps réel avec le microscope à fluorescence. Cet outil nous permet de mesurer directement la dynamique de l'expression du gène Nodal grâce à différentes lignées mESC modifiées pour exprimer des rapporteurs fluorescent de l'expression de Nodal. Ce travail a permis de mettre en avant un profil de NODAL inédit en sorti de pluripotence et une forte influence de temps de stimulation sur l'activité de la voie de signalisation Nodal et sur la différenciation. Ce travail est également un premier pas vers la mise en évidence de l'influence de la densité cellulaire sur l'expression du gène Nodal, mais aussi sur la différenciation cellulaire *in vitro*.

Mots clefs : Nodal, mESC, pluripotence, différenciation, Imagerie quantitative, Microfluidique, Dynamique de signalisation, TGF- β

Title : Characterization of the NODAL signaling pathway during embryonic stem cell differentiation

Abstract :

During the development of an organism, cells differentiate and tissues self-organize spatially to form a complete living being. These phenomena are controlled by chemical signals called "morphogens" which are diffusible molecules, secreted in the extracellular medium and able to influence the differentiation of a cell. It has been shown that different concentrations of morphogen can induce different cellular identity and that the concentration of morphogen in a tissue is not spatially homogeneous. To understand how a developing tissue is organized, it is therefore necessary to know how differentiating cells decode information carried by morphogens. Among these morphogens, Nodal morphogen is of particular interest, Nodal is an important factor in the early development of the embryo, since it is involved in the specification of cell identity in embryonic and extraembryonic lineages. As it is difficult to study in an embryo quantitatively, the influence of the temporal profile of a morphogen stimulation on differentiation, we have chosen as a model system the mouse embryonic stem cells (mESC). The aim of this work was to study the influence of the temporal stimulation of different morphogens on the expression of the "Nodal" locus and on the differentiation of stem cells. To control the temporal profile of the morphogen concentration sent to cells, we use an automated microfluidic cell culture chip that allows us to observe individual cell responses in real time with the fluorescence microscope. This tool allows us to directly measure the dynamics of Nodal gene expression through different mESC lines modified to express fluorescent reporters of Nodal expression. This work made it possible to put forward an unprecedented NODAL profile out of pluripotency and a strong influence of stimulation time on the activity of the Nodal signaling pathway and on differentiation. This work is also a first step towards demonstrating the influence of cell density on the expression of the Nodal gene, but also on cell differentiation *in vitro*.

Keywords : Nodal, mESC, pluripotency, differentiation, Quantitative live-cell imaging, Microfluidics, signaling dynamics, TGF- β

Table des matières

Ma Thèse pour tous.....	10
1. De l'œuf à la naissance.....	10
2. Comment les cellules savent comment se différencier ?.....	13
3. Pourquoi comprendre le fonctionnement d'une cellule est important ?.....	17
I. Introduction.....	21
1. L'organisation spatiale des tissus au cours du développement est contrôlée par des morphogènes.....	23
Les tissus interagissent entre eux par le phénomène d'induction embryonnaire.....	25
Les mécanismes de l'induction sont moléculaires.....	27
2. Comment une cellule déduit sa position dans le tissu ?.....	29
Le <i>patterning</i> : Le modèle du drapeau français.....	29
Limitation du modèle du drapeau français : Le rôle de la dynamique de stimulation.....	31
La dynamique de stimulation peut avoir une influence aussi importante que la concentration sur la façon dont les cellules interprètent un morphogène.....	34
La réponse à une marche de ligand TGF- β 1 est adaptative et graduée.....	36
Les stimulations pulsées augmentent le débit de la voie de signalisation TGF- β et la régulation du destin cellulaire.....	38
L'activité de la voie de signalisation dépend de la vitesse d'augmentation de la concentration en TGF- β 1.....	39
La réponse adaptative de la voie de signalisation TGF- β peut extraire l'information de position sans gradient spatial.....	40
3. NODAL comme sujet d'étude.....	42
Le développement embryonnaire précoce de la souris.....	42
NODAL lors du développement précoce de la souris.....	43
Nodal, élément clé dès le début de la gastrulation.....	44
La régulation de NODAL est complexe et implique 5 enhancers.....	46
4. Système <i>in vitro</i> pour étudier le développement précoce de l'embryon de souris.....	49
Modélisation de la maturation de l'épiblaste.....	49
Approche phénoménologique pour étudier l'influence de NODAL sur la différenciation des cellules souches.....	52
Références.....	54
II. Méthodes et Système expérimental.....	59
1. Culture, différenciation et construction cellulaire.....	60
Culture des cellules souches embryonnaire (mESC).....	60
Passage des cellules.....	62
Congélation/Décongélation des cellules.....	63
Différenciation des mESC en mEpiC.....	64
2. Méthodes permettant de mesurer l'évolution temporelle d'expression d'un gène en réponse à une stimulation.....	66
Les méthodes classiques « end-point » :.....	66
Immuno-fluorescence.....	66
RT-qPCR.....	68
les méthodes permettant le suivi en temps réel de l'expression de gènes : Les rapporteurs fluorescents.....	71
Marquage des noyaux.....	73
3. La puce microfluidique pour la culture cellulaire.....	75
Puce microfluidique avec valve intégrée.....	75
Module élémentaire de la microfluidique automatisée : La valve microfluidique.....	76
Fonction permise par les valves microfluidiques.....	78

Organisation de la puce microfluidique.....	79
Fabrications détaillées de la puce microfluidique à valve.....	80
Le PDMS, un polymère pour la fabrication de puce microfluidique.....	80
La photolithographie pour la micro-fabrication de moule en silicium.....	86
Les moules en résine d'époxy pour l'utilisation long-terme.....	89
Préparation et automatisation de la puce microfluidique.....	90
Mise en place des cellules dans la puce microfluidique.....	90
Composition des systèmes de pression en amont de la puce.....	92
Automatisation du contrôle des valves.....	94
4. La microscopie de fluorescence pour la détection des rapporteurs fluorescents et la culture cellulaire.....	95
Contrôle de la microscopie pour les expériences microfluidiques.....	95
Automatisation d'une expérience microfluidique.....	97
5. Analyse d'image pour quantifier l'expression des rapporteurs fluorescents.....	99
La segmentation pour la détection des cellules sur une image.....	100
Le tracking par lignée pour suivre des populations.....	102
Analyse des données du traitement d'image.....	104
Références.....	105
III. Résultat.....	108
1. Caractérisation de l'expression de Nodal et de l'activité de la voie TGF- β au cours de la maturation des mESC vers les mEpiLC.....	108
Evolution de l'expression de Nodal au cours de la transition mESC vers mEpiLC.....	109
Contributions respectives des enhancers HBE et ASE à l'expression de Nodal en fonction du temps.....	112
2. Caractérisation de l'activité et la sensibilité de la voie TGF- β à différents moments de la transition mESC vers EpiLC.....	118
Mesure de la réponse des cellules par immunofluorescence contre Smad2/3 et p-Smad2	118
Mesure de l'activité de la voie de signalisation TGF- β par RT-qPCR.....	121
3. Caractérisation de l'activité de l'enhancer ASE au cours de la transition mESC vers mEpiLC.....	123
Influence du moment de stimulation en Activine : Les délais.....	123
Dose réponse du transgène ASE-YFP.....	127
Réponse fréquentielle du transgène ASE-YFP.....	128
Réponse impulsionnelle.....	131
Effet mémoire.....	133
4. L'effet des signaux sur la différenciation cellulaire.....	135
Marquage de la formation de la lignée primitive en temps réel : BRA-GFP (ou T-GFP).....	141
Références.....	149
IV. Discussion.....	151
Le comportement de HBE- pour les mEpiLCs est différent de celui des mEpiSCs.....	153
La signalisation TGF- β est-elle déjà adaptée en sortie du milieu « 2i » ?.....	154
L'effet mémoire observée sur ASE-YFP est-il cohérent avec le développement d'un embryon de souris ?.....	156
Comprendre les mécanismes dynamiques de différenciation des cellules sur Pattern à partir de BRA-GFP.....	158
Comment contrôler la différenciation cellulaire des mESC vers la formation des 3 feuillets embryonnaire ?.....	161
Références.....	162

Ma Thèse pour tous

Tout au long de ma thèse, on m'a souvent posé la question « C'est sur quoi ta thèse ? ». À cette question, je réponds généralement que je travaille sur les mécanismes de différenciation des cellules souches. Étrangement, cette réponse semble être suffisante pour justifier que je suis encore étudiant à 28 ans, mais souvent, ces discussions m'ont amené à réfléchir sur mon propre sujet de thèse, voire à trouver des moyens d'expliquer ma thèse plus simplement. Donc quoi de mieux que ma thèse pour retranscrire toutes ces discussions ?

Je vais donc tenter ici d'expliquer ma thèse de façon à ce qu'elle soit accessible pour le plus grand nombre. Si vous êtes déjà confirmé dans le domaine, ou que vous souhaitez rentrer dans le vif du sujet, vous pouvez passer cette partie, je vais expliquer des concepts « avec les mains ».

1. De l'œuf à la naissance.

Pour commencer simplement, qu'est-ce qu'une **cellule** ? Si on regarde la définition sur le dictionnaire libre « wiktionary », la première qui nous vient correspond à une petite pièce d'habitation, un espace clos... ce n'est pas tout à fait ce que j'étudie. Il n'est donc pas si évident qu'une cellule corresponde dans mon cas à l'unité structurale et fonctionnelle qui constitue les organismes vivants, ou dit plus simplement : la « brique de base » de tous les animaux, plantes, champignons et j'en passe. D'un côté, c'est normal, les cellules ne sont pas vraiment des choses que l'on peut voir à l'œil nu, même si elles composent vos bras, vos cheveux... en fait, vous, tout simplement. Elles sont beaucoup trop petites ($\sim 50 \mu\text{m}$), trop proches les unes des autres et trop nombreuses ($\sim 100\,000$ milliards) pour que l'on puisse se douter qu'elles sont là. Rien ne nous dit naturellement qu'on est composé d'un **assemblage** de cellule.

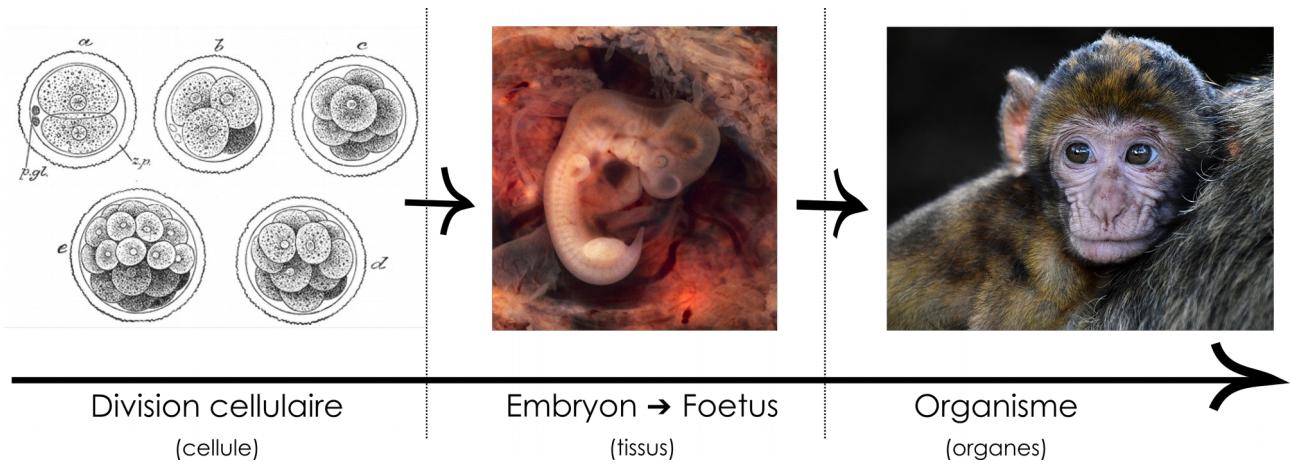


Illustration 1: **Histoire du développement de la vie.** Illustration récupérée de l'encyclopédie libre Wikipedia. A gauche, les premières étapes du développement après la fécondation de l'ovule par un spermatozoïde. Au centre, un embryon, premières grandes structures d'un être vivant. A droite, un jeune singe.

Pourtant, tout le monde, sans exception, a vécu l'expérience de n'être qu'une seule et unique cellule à un moment de sa vie, et oui je parle bien de la fusion d'un spermatozoïde et d'un ovule, et je suis sûr que ça vous parle. Mais alors comment cette simple cellule a-t-elle pu ensuite donner vous, moi et tous les autres ? Comment peut-on passer d'une seule cellule à des centaines de milliers de milliards ? Et aussi comment les cellules finissent par être différentes les unes des autres ? Voilà autant de questions auxquelles on peut répondre à l'aide de deux concepts : la **division** et la **différenciation cellulaire**.

La division et la différenciation cellulaire sont des mécanismes qu'on ne retrouve que chez les organismes vivants et qui ne sont pas si intuitifs que cela à comprendre. Pensez que la division, c'est un processus qui va faire que la cellule va se couper en deux, puis, chacune des deux cellules va reprendre sa taille initiale, un peu comme si vous coupiez un gâteau au chocolat en deux puis, si l'on attend un peu, ces deux parts vont pousser et donner deux nouveaux gâteaux, c'est un peu surprenant, n'est-ce pas ? Pour ce qui est de la différenciation, il faut imaginer que c'est un processus qui va spécialiser la cellule. Au début du développement, il y a des cellules qui sont à l'**origine de toutes les autres** et qui peuvent **donner n'importe quel type cellulaire**. On appelle ces cellules : « les **cellules souches pluripotentes** ». Puis, au cours du développement, ces cellules suivant leur environnement, vont donner des cellules de peau, d'os, de muscle... Presque comme un étudiant qui suit une formation et qui, à l'issue de son parcours, est devenu spécialiste de son domaine.

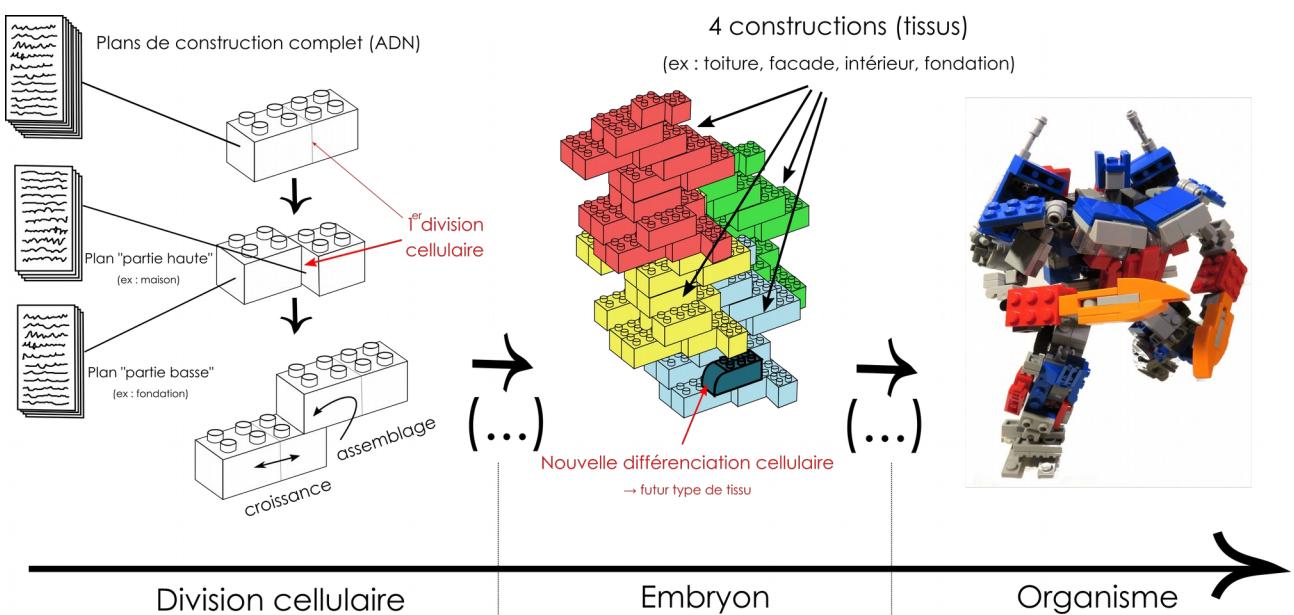


Illustration 2: Les grands concepts du développement revisité par la construction de LEGO. A gauche, les premières divisions où les cellules commencent déjà à se partager les tâches. Au centre, l'embryon à des stades plus avancés, on peut voir apparaître quatre structures et un nouveau type de cellules apparaître : celui-ci a même changé de forme. A droite, la fin du développement avec la naissance de l'organisme.

Lorsqu'on regarde le développement d'un organisme, on observe plusieurs étapes. La première est la division cellulaire : ici, l'ensemble des cellules n'ont pas vraiment d'apparence particulière, mais au fur et à mesure, plusieurs structures se forment dans lesquelles on arrive à distinguer le haut du bas du corps. Jusqu'alors, on appelle cela un **embryon**, mais lorsque les premiers organes apparaissent, et jusqu'à la naissance, on parle alors de **fœtus**. [Illustration 1 et Introduction, partie 1]

Mais là encore, rien n'explique comment les cellules, en se divisant, arrivent à donner un organisme complet ? Et surtout, quels sont les mécanismes qui conduisent à la différenciation des cellules ? Tout d'abord, il faut imaginer que la cellule contient, dès le début du développement, tous les **plans** de construction dont elle a besoin pour faire un organisme complet. Puis, tout au long des divisions, les cellules vont se partager les tâches. Lorsque ces tâches sont partagées, la cellule va « rayer » les tâches qu'elle n'a pas à faire. De même, lorsque la cellule aura accompli une tâche, elle la raye du plan. Ainsi, plus la cellule aura rayé les plans de construction, plus la cellule sera spécialisée. Les plans correspondent dans notre cas à l'**ADN**¹ de la cellule, et le fait de « rayer » correspond à rendre moins accessible une certaine région de l'ADN².

1 ADN est un abus de langage, en réalité on devrait dire « génome ».

2 L'accessibilité de l'ADN correspond à ce qu'on appelle l'épigénétique.

On peut alors se poser une nouvelle question : « Pourquoi sommes-nous composés d'autant de cellule ? ». Une première raison est que plus l'on a de cellules différentes, plus on peut se répartir le travail pour que l'organisme fonctionne, un peu à l'image des sociétés moderne, où l'on a besoin de plein de métiers différents pour que l'ensemble fonctionne. Mais une autre raison est que plus on a de cellules et plus on peut construire des **structures complexes** comme des tissus/organes. Imaginez pour cela qu'un LEGO correspondent à une cellule : si l'on ne dispose que d'une seule pièce, notre structure est simple, mais si l'on commence à superposer des LEGO les uns sur les autres, voire à ajouter des LEGO de nouvelle forme, on peut se retrouver très vite avec des structures de plus en plus complexes. Finalement, lors du développement, il se passe presque la même chose, à la différence qu'on aurait des LEGO qui s'assemblent, se multiplient et changent de forme tout seuls. [Illustration 2 et Introduction, partie 1]

2. Comment les cellules savent comment se différencier ?

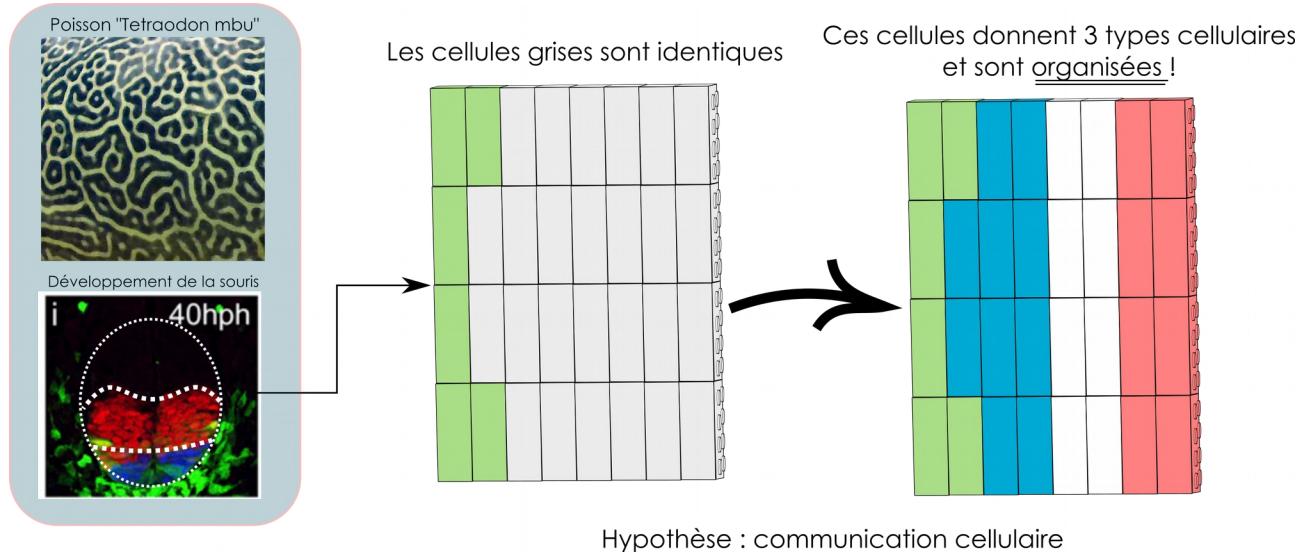


Illustration 3: Les motifs d'organisation des cellules et l'exemple du motif tricolore. A gauche, des illustrations de motifs que l'on peut observer dans le vivant, avec en haut, les motifs sur la peau d'un poisson globe (Wikipédia (Turing Alan Mathison, 1952)). En bas, une des étapes du développement d'un embryon de souris au 40e jours après la fécondation (40hph). A droite, l'illustration du motif de l'embryon de souris par des LEGO.

On a vu que les cellules possèdent les « plans » pour se différencier en tel ou tel type cellulaire. Ces plans leur permettent d'avoir une **organisation** pour se différencier correctement dans un tissu. Mais dans un même tissu, toutes les cellules sont les mêmes ; comment font-elles alors

pour se partager les futurs plans si, dans leur environnement, toutes les cellules sont identiques ?

Lorsqu'on regarde la formation des tissus, on remarque quelque chose de vraiment intéressant : on observe des **motifs**. Ces motifs peuvent être très variés, les exemples connus sont ceux que l'on peut voir sur la peau des animaux, comme les taches des léopards ou encore les zébrures des zèbres. Mais dans le vivant, on peut observer d'autres motifs dont celui qui nous intéresse : le motif à trois bandes, plus communément appelé motif tricolore. [Illustration 3 et Introduction, partie 1 et 2.1]

Lorsque l'on regarde la formation des motifs à trois bandes dans un embryon, on remarque au début qu'il a deux structures différentes, l'une à côté de l'autre, par exemple : l'une verte à gauche et l'autre grise à droite. Mais plus tard, dans le développement, la structure grise, va former 3 nouvelles structures : dans l'ordre et de gauche à droite : « bleu, blanc et rouge ». Ici, chaque structure correspond à un type spécifique, où les cellules grise se différencient en 3 types cellulaires différents. Pour expliquer la formation de ce motif, on peut se dire que les cellules respectent leurs plans d'organisation et que suivant la distance à la frontière entre les tissus gris/vert, elles se différencient conformément au plan. Cependant, dans les faits, la cellule n'a pas d'yeux, comment peut-elle savoir où elle est dans le tissu pour effectuer la tâche qui lui revient ? La solution est la suivante : elle **communique** avec l'autre tissu par une information chimique³. [Illustration 3 et Introduction, partie 2.1]

³ L'information chimique est une molécule, par exemple : une protéine.

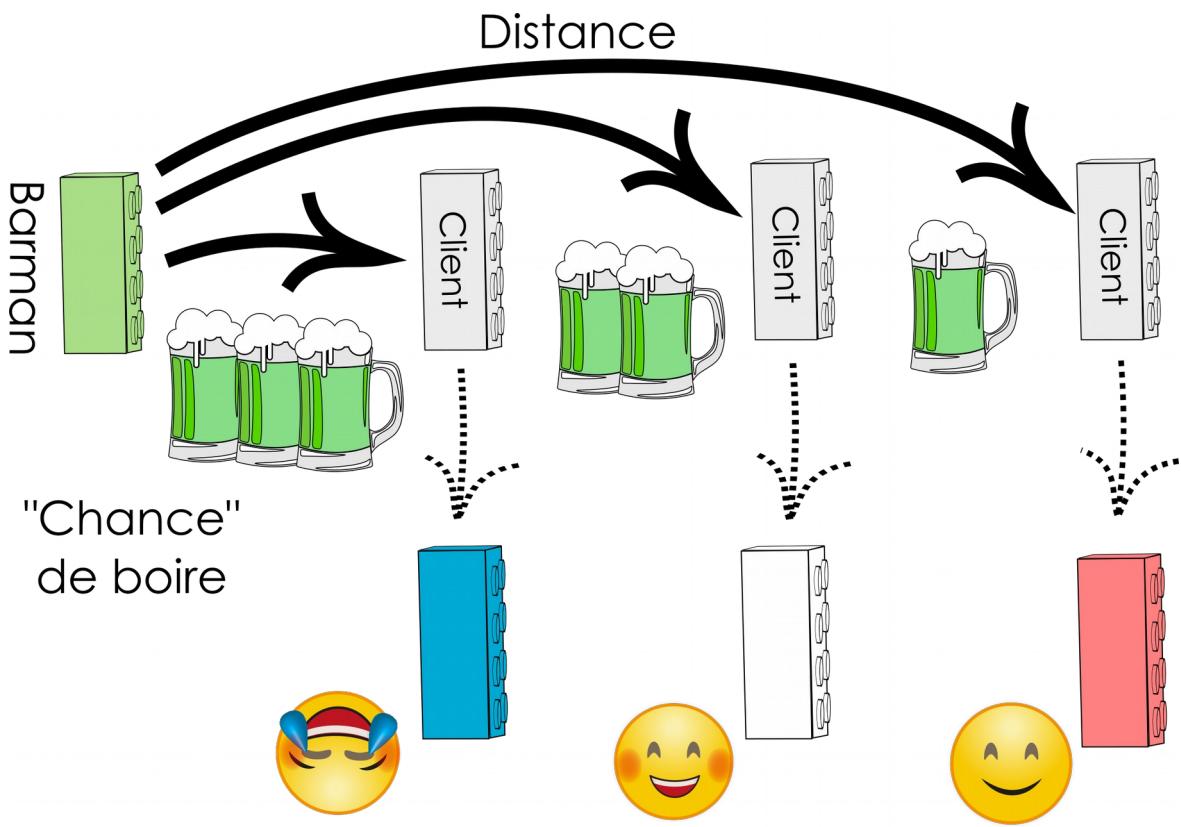


Illustration 4: **Modèle du drapeau français expliqué avec des bières dans un bar.** Plus les clients sont éloignés du barman, moins ils ont de chance de boire de bières, c'est le phénomène de diffusion. L'état d'alcoolémie des clients est caractérisé par des smileys.

Les cellules du tissu voisin vont envoyer une information chimique qui leur sont propres. Plus les cellules sont loin et moins elles reçoivent l'information, ce qui leur permet d'estimer leur position dans leur propre tissu. Mais comment une seule information chimique peut-elle donner 3 types cellulaires différents ?

Pour illustrer ce phénomène, je vous propose d'expliquer cela avec des bières, en faisant un petit jeu : Il faut imaginer que vous êtes une cellule et que vous allez dans un bar. Vous avez le choix de vous mettre n'importe où dans le bar ; mais une fois que vous avez choisi, votre place restera la même pendant toute l'expérience. Le barman est tellement sympa que plus vous êtes proches de lui, plus vous avez de chance d'avoir des bières, c'est à partir d'ici que commence le « problème » : Dans quels états allez-vous être à la fin de la soirée ?

On se retrouve avec trois configurations de distance par rapport au barman. Dans le premier cas, vous êtes au fond du bar : là vous allez peut-être prendre qu'une seule bière, vous serez donc sûrement sobre. Dans le second cas, vous êtes à une distance intermédiaire avec le barman, vous avez beaucoup plus de chance de boire une bière supplémentaire et vous serez un peu pompette ! Dans l'ultime cas, vous serez nez à nez avec le barman, vous en

prenez 3 voire peut-être plus ! Mais une chose est claire, ce n'est plus sûr que vous puissiez rentrer chez vous aussi facilement qu'en début d'expérience ! Dans notre cas, la bière est l'information chimique qui va vous faire changer d'états : sobre, pompette et complètement saoul ! Nos 3 types cellulaires sont donc obtenus par une seule information chimique. L'effet de la distance sur la chance de boire des bières dans le bar correspond au phénomène de diffusion chimique qu'il y a dans l'embryon. Comme cette information chimique contrôle la formation d'un motif, on l'appelle **morphogène**. [Illustration 4 et Introduction, partie 2.1]

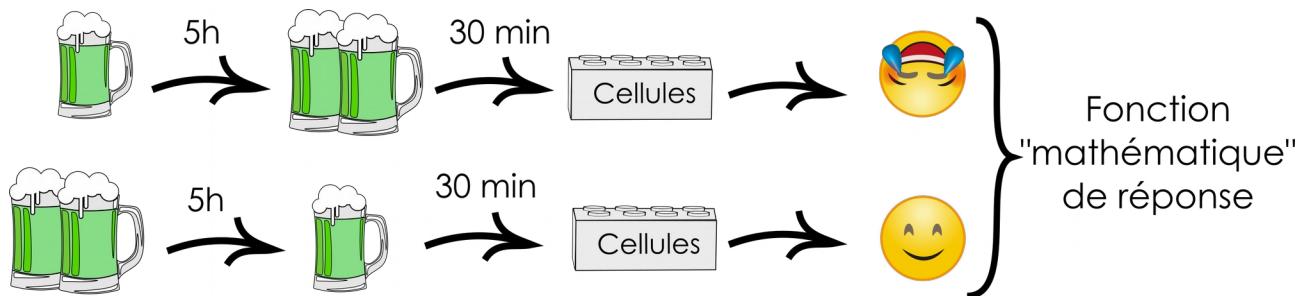


Illustration 5: **Les limites de mon explication.** On ne mesure l'état des clients-cellules qu'à partir de 5h30 après la première tournée.

Pourtant, même si ce que je viens de vous dire peut sembler cohérent, ce n'est pas tout à fait la réalité. Rappelez-vous, c'est la quantité de bière qui vous a donné l'état « sobre, pompette, saoul », pourtant dans votre vie, je suppose que vous avez déjà bu bien plus de 3 bières, et pourtant vous n'êtes pas constamment saoul ? [Introduction, partie 2.2]

Pour comprendre ce qu'il se passe, reprenons notre problème, mais cette fois, on mesurera votre état qu'à partir de 5h30 après la première tournée, un peu comme si les cellules ne se différenciaient qu'à partir d'une certaine durée. Supposons deux configurations : pour la première, on va boire une bière d'un coup, attendre 5 h, puis boire deux bières d'un coup ; et pour la seconde, on va boire deux bières d'un coup, attendre 5 h, puis boire une bière. On est d'accord qu'on a bu la même quantité de bière ici, pourtant, à 5h30, votre état de sobriété ne sera pas le même dans les deux cas. Dans le premier cas, on sera pompette alors que dans le second, on sera plus sobre. On a donc le « temps » à prendre en compte si l'on veut comprendre comment les cellules fonctionnent dans le tissu, ou dit plus scientifiquement, on doit prendre en compte la **dynamique de stimulation** des cellules par le morphogène. [Illustration 5 et Introduction, partie 2.2]

Toute l'idée de mes recherches est ici, en effet ma thèse a consisté finalement à « jouer » avec des cellules souches en les stimulant à des temps différents de l'expérience et avec des quantités de morphogène différentes, pour savoir *dans quel état elles vont être au cours du*

*temps*⁴ [Illustration 5, Introduction, partie 3 et Résultat, partie 3]. Mais pourquoi me direz-vous ? Tout simplement parce que ces résultats sont une très bonne manière de créer ce qu'on appelle des **modèles mathématiques**. Ces modèles vont « coller » le plus possible aux observations que l'on aura mesurées et dont l'idée sera de décrire la cellule par une fonction ou formule mathématique. Je précise tout de même que je n'ai pas construit de modèle durant ma thèse, car il nous reste encore beaucoup d'expérience à réaliser pour caractériser le fonctionnement de notre cellule.

3. Pourquoi comprendre le fonctionnement d'une cellule est important ?

Mais pourquoi se casser la tête à chercher la fonction mathématique de nos cellules ? Après tout, on ne leur a rien demandé aux cellules, elles vont d'elles-mêmes s'organiser et donner un organisme vivant complet. Pourquoi alors les embêter ? De mon point de vue, comprendre « comment ça marche » est largement suffisant pour me motiver à faire cette recherche, mais je peux admettre qu'une motivation purement basée sur la curiosité ne soit pas suffisante pour tout le monde. Mais que diriez-vous si je vous disais que cela pourrait être utilisé pour **contrôler la différentiation** ? [Discussion, partie 5]

L'intérêt de créer un modèle mathématique à un problème est que l'on peut **prédir la trajectoire** de la cellule. Supposons qu'on veuille contrôler la trajectoire de différenciation des cellules souches pour obtenir une cellule de muscle, et par exemple l'utiliser en vue d'une greffe de cellules cardiaques. Comment pourrait-on faire cela ?

⁴ On appelle aussi cela, la réponse cellulaire.

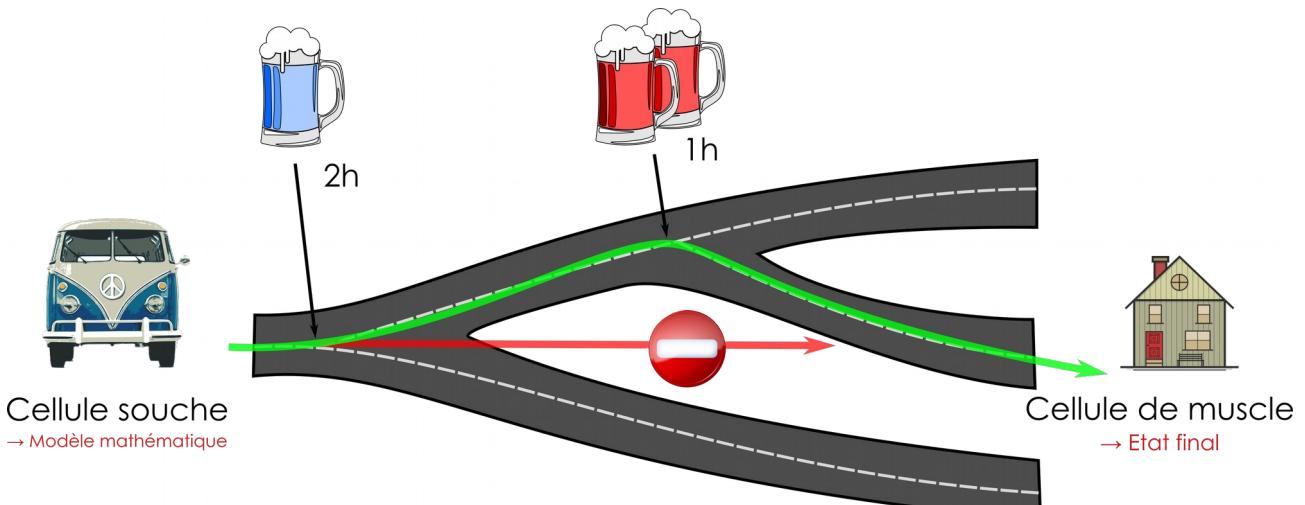


Illustration 6: Analogie du contrôle de la trajectoire cellulaire dans des chemins de différenciation par la conduite d'une voiture. A gauche, la cellule à l'état initial : pour la faire changer de trajectoire, on lui donne des morphogènes, illustrés ici par des bières, la voiture ne peut pas aller à vol d'oiseau à l'état final. L'état final de la cellule est représenté par une maison.

Pour guider la cellule « souche » jusqu'à la destination cellule « muscle », on a besoin de deux choses, connaître l'**ensemble des chemins**⁵ [Résultats, partie 4] que peuvent prendre les cellules et la fonction mathématique du modèle « cellule ». C'est là que l'on peut voir la cellule comme une voiture que l'on veut contrôler pour aller quelque part, par exemple à votre maison. Pour aller chez vous, la voiture devra passer par un certain nombre de destinations intermédiaires qui correspondent aux différents chemins empruntables, mais ne pourra pas « tricher » et prendre un chemin qui n'existe pas. Dites-vous qu'une voiture n'est rien d'autre qu'une fonction à deux entrées : l'injection de carburant avec la pédale d'accélération et l'angle des roues avec le volant de la voiture. Ce qui nous donne deux sorties/réponses mesurables : la vitesse de la voiture, et la direction qu'elle prend. [Illustration 6]

Ce qui diffère entre l'exemple simplifié de la voiture, et la cellule dans un modèle mathématique, c'est le nombre d'entrées et de sorties. Dans le cas d'une voiture, on a principalement deux entrées ; mais dans le cas d'une cellule, on en a bien plus et évidemment, la manière dont on utilise ces entrées est très différente. Pour la cellule, c'est seulement dans certains cas, aux intersections entre plusieurs chemins, qu'il faut lui dire lequel prendre en changeant de morphogène.

Bien entendu, ce n'est pas parce que l'on arrive à trouver une fonction mathématique à nos cellules que l'on va arriver à contrôler parfaitement la trajectoire des cellules : il y a des **paramètres incontrôlables** par la cellule. Un de ces cas auquel j'ai pu être confronté est

⁵ La cartographie des chemins de différenciations correspond au travail toujours en cours des biologistes du développement.

l'influence de la densité cellulaire sur l'expression d'un gène : pour deux stimulations en morphogènes identiques, j'ai obtenu deux résultats complètement différents. [Résultat, partie 1 et 4]

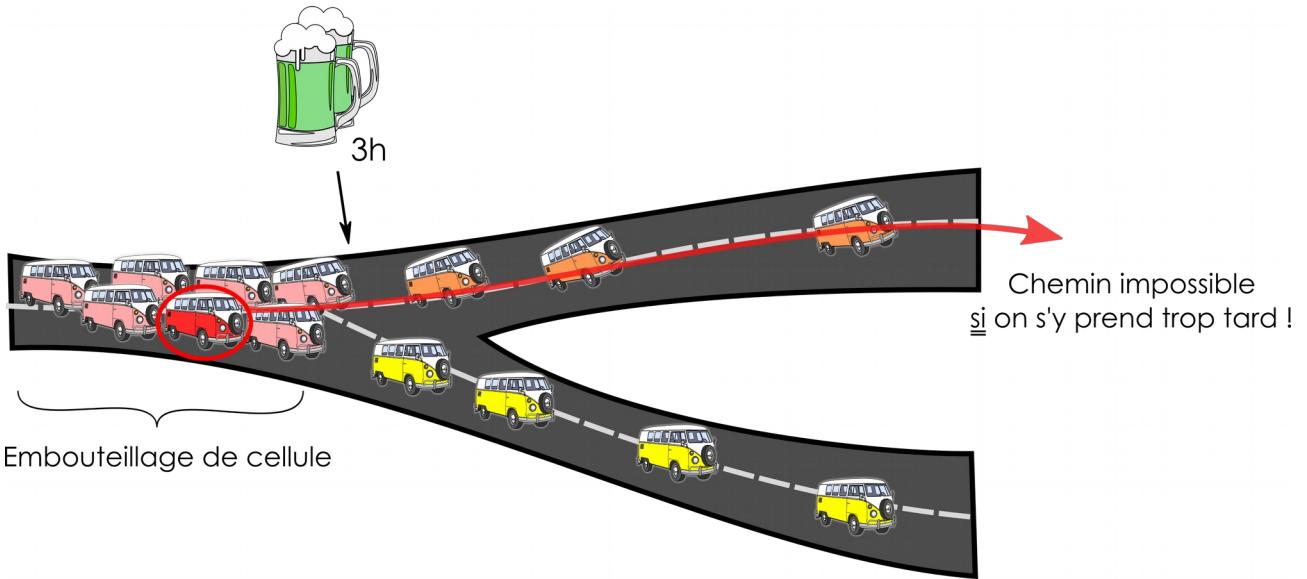


Illustration 7: L'influence des cellules voisines sur la trajectoire de différenciation. Phénomène illustrée par la trajectoire d'une voiture dans un embouteillage.

Une manière d'illustrer cela pour poursuivre avec l'exemple de la conduite, est lorsque qu'un conducteur se trompe de route et emprunte alors le mauvais chemin. Souvent, c'est parce que l'on n'a pas fait attention et que l'on a oublié de prendre la sortie, mais parfois, il arrive lors d'un embouteillage que l'on ne soit pas sur la bonne voie, et si l'on n'anticipe pas bien, on se retrouve à aller dans le mauvais chemin. Dans le cas d'une cellule, c'est très similaire, les cellules voisines vont influencer la trajectoire cellulaire, et si l'on n'a pas assez anticipé la stimulation des cellules en morphogène, les cellules ne vont pas aller au bon chemin. Mais il se peut aussi qu'il ne soit pas possible de faire en sorte que toutes les cellules aillent dans la bonne direction. Si la route est très encombrée et l'embouteillage très gênant, une partie des « cellules » ne va pas prendre le « bon » chemin. [Illustration 7 et Résultats, partie 4] Ce qui est intéressant ici, c'est que lors de ma thèse, j'ai souvent été confronté à ce genre d'inattendu, ce qui amène à de nouvelles questions sur le fonctionnement des cellules.

C'est ici que s'achève ce chapitre, j'espère que ça vous a donné envie de lire la suite. La suite est beaucoup plus technique et n'est pas vue de la même manière que ce chapitre, mais je pense qu'à partir de maintenant, il vous sera plus facile de comprendre plus en détail ma thèse. Pour ce qui est de la suite, nous verrons d'abord une mise en contexte de mon sujet au vu de la recherche actuelle, suivi de mes outils expérimentaux avec principalement le

dispositif microfluidique qui permet de contrôler l'environnement des cellules et, pour finir, l'ensemble des résultats, avec les réflexions qu'on a eues, mon directeur de thèse, nos collaborateurs à l'institut Jacques Monod et moi, pour la réalisation des expériences.

I. Introduction

L'étude du développement des organismes vivants fait partie des grands domaines de recherche en biologie et consiste à étudier les mécanismes de formation des êtres vivants multicellulaires, comme la croissance, la régulation génique, la différenciation cellulaire ou encore la morphogenèse. Mon travail s'inscrit dans ce domaine, et en particulier dans l'étude de la régulation génique lors de la différenciation des cellules souches. Dans ce chapitre, on verra d'abord un petit historique de la biologie du développement et ensuite on abordera plus en détail mon sujet de thèse.

Lorsque l'on s'intéresse un peu à l'histoire de l'embryologie, on se rend très vite compte que c'est un domaine de recherche très récent et que pendant plusieurs siècles il relevait plus de l'idéologie ou du concept que d'observations expérimentales. Les premiers à s'intéresser aux questions de formation des organismes sont les Grecs il y a plus de 2000 ans : on peut citer principalement Aristote qui amena toute la réflexion sur le développement de la vie et cela pendant plus d'un millénaire. Ce dernier proposa deux hypothèses : **Soit** tous les organismes sont préformés à la naissance et le développement correspond à un accroissement de taille, un peu à l'image d'un nouveau-né qui grandit jusqu'à l'âge adulte, **soit** les structures apparaissent progressivement où des éléments simples s'assemblent pour complexifier l'ensemble, Aristote appela ce processus l'épigénèse (Pellegrin).

Aristote défendait la seconde hypothèse et celle-ci domina la pensée européenne jusqu'au XVII^e siècle. Mais à partir du XVII^e, cette hypothèse n'allait pas dans le sens de l'idéologie chrétienne. Imaginer que des forces physico-chimiques modelaient le vivant était inconcevable, car cela pouvait permettre à la vie de ne pas être dictée par une force divine. On est donc revenu sur la première hypothèse pré-formatrice (Andrault) alors qu'à cette même période, Hooke découvrit la cellule et en donna justement le nom (Hooke, 2008), et que des observations sur l'embryon de poulet contredisaient l'hypothèse pré-formatrice (Andrault).

Dans les années 1830-1840, avec Schleiden, Schwann et Virchow, on fit une observation qui prouva une bonne fois pour toutes la validité de la seconde hypothèse d'Aristote : les cellules se divisent (Schwann, 1839). Schleiden et Schwann proposèrent ainsi leurs hypothèses : « les cellules sont l'unité structurale et fonctionnelle des animaux et des plantes, tous les organismes sont faits de petites cellules et toutes les cellules proviennent d'une autre cellule », c'est la

naissance de la « théorie cellulaire ». Aujourd'hui, c'est l'une des théories qui fonde toute la biologie avec la « sélection naturelle ».

Puis, dans les années 1880, le biologiste Weismann proposa une hypothèse très novatrice et qui influença beaucoup la recherche expérimentale de l'époque : « Tous les facteurs qui définissent le type cellulaire sont situés dans le noyau de la cellule et à chaque division les facteurs se séparent dans l'une des deux cellules » (Weismann, 1887). Indépendamment, Roux proposa une expérience pour voir l'effet de la destruction de l'une des deux cellules de la première division d'un embryon d'amphibien. Roux obtint un demi-embryon et fit l'hypothèse que le développement se fait sur la base d'une mosaïque et le devenir des cellules est déterminée à chaque division (Sander, 1997), mais Driesh fit la même expérience sur des oursins, et cette fois le résultat contredisait cette hypothèse : l'embryon était complet mais deux fois plus petit (Sander, 1992). À cette époque, on était bloqué, il fallut attendre 1900 et la compréhension du lien entre les chromosomes dans le noyau (Flemming, 1882) et les lois de l'hérédité de Mendel (Mendel). Cela permit de conclure que ce n'était pas des facteurs présents dans le noyau qui se répartissaient à chaque division qui définissait la structuration de l'embryon, mais plutôt les mécanismes de fonctionnement des chromosomes (génotype) qui influençaient la forme des embryons (phénotype) (Wilson Edmund B., 1925).

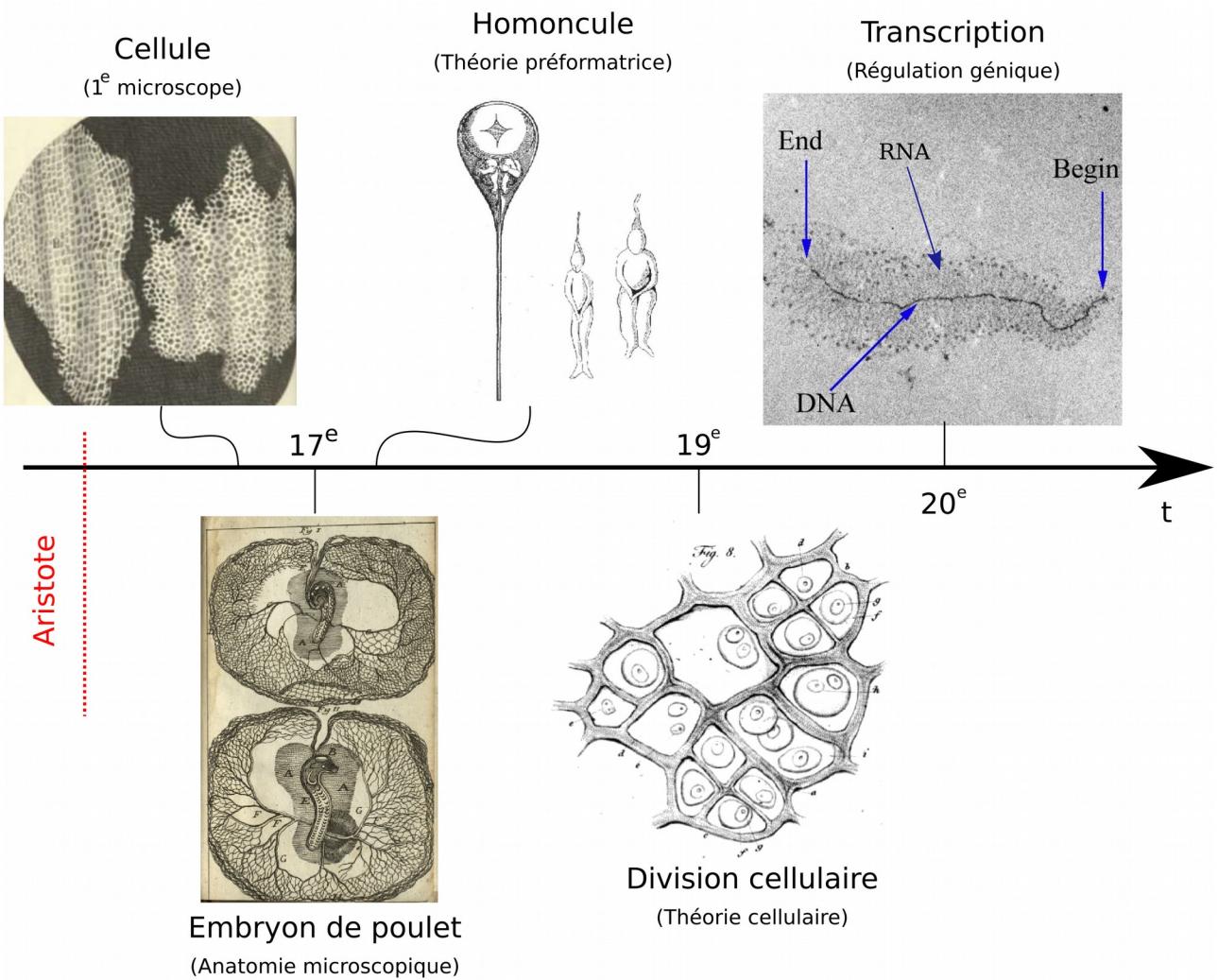


Figure 1: Frise chronologique des découvertes et des théories en biologie du développement. Illustration tirée R. Hooke, M. Malpighi, N. Hartsoeker, T. Schwann et Wikipédia.

Mais ce qui constitue peut-être la découverte la plus spectaculaire en biologie du développement a été faite au siècle dernier par les expériences de Spemann et Mangold (Spemann and Mangold, 2001). Cette découverte porte le nom « d'induction » est sera abordée dans la prochaine section. Grâce à cette expérience, on a pu comprendre les mécanismes responsables de la formation des embryons.

1. L'organisation spatiale des tissus au cours du développement est contrôlée par des morphogènes

La première fois que j'ai vu la formation d'un être vivant, j'ai tout de suite été captivé par la manière dont les structures se forment et comment les tissus bougent. C'était en 2013, lors de mon premier stage de recherche avec Vincent Fleury, pendant lequel on regardait à la loupe binoculaire l'effet d'un stress mécanique sur le développement des tissus d'un embryon de poulet. J'ai alors trouvé fascinante la manière dont les tissus s'auto-organisent dans l'embryon et ces travaux ont permis de montrer que le flambage mécanique le long de la frontière entre deux tissus influence la morphogenèse précoce de l'embryon de poulet (Fleury et al., 2015).

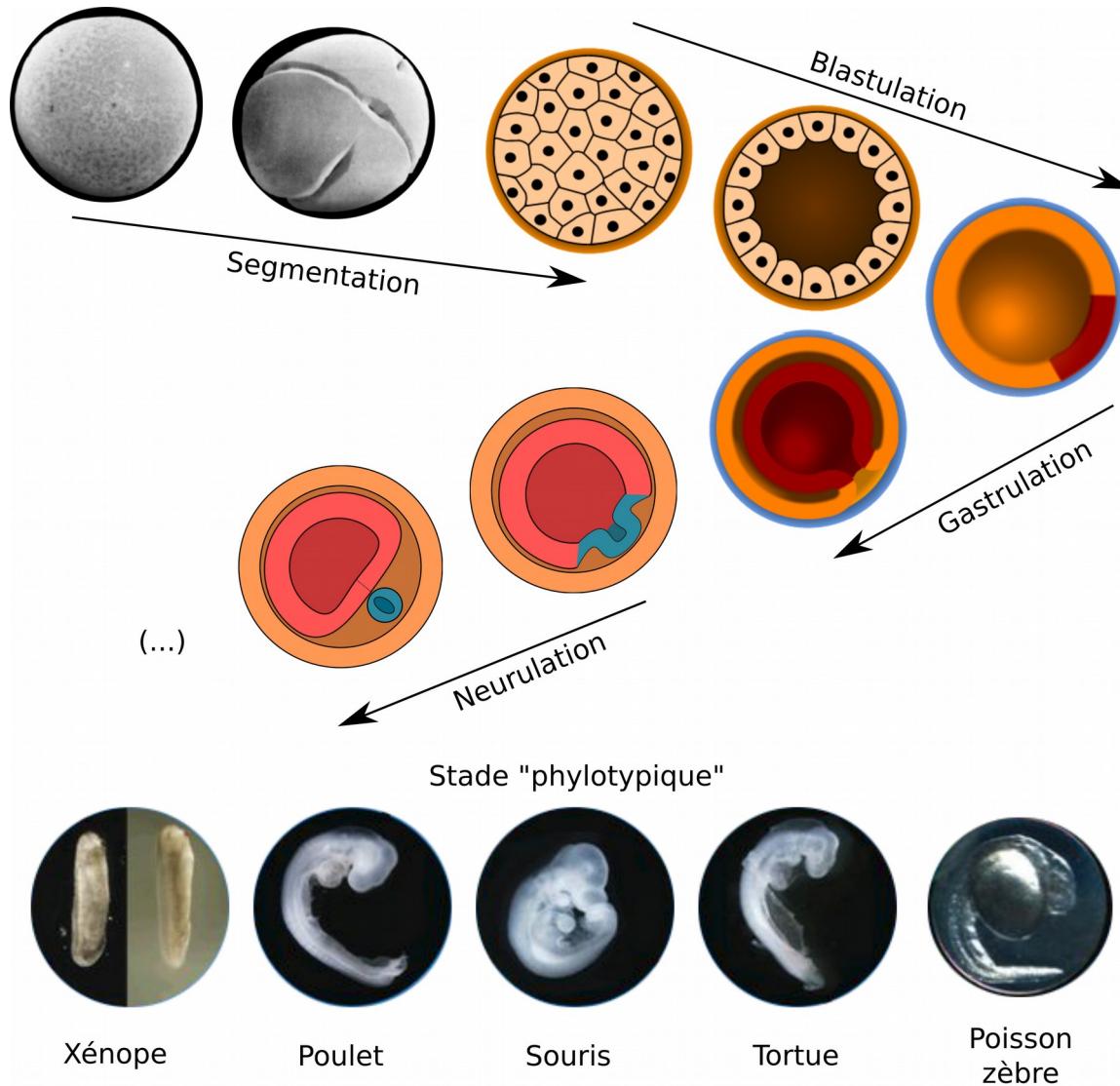


Figure 2: **Synthèse simplifiée du développement des embryons.** Représentation de la segmentation d'un embryon de Xénopé. Les étapes de la blastulation à la neurulation ne sont pas fidèles à l'observation embryonnaire : le stade phylotypique correspond à un stade de développement où le plan d'organisation des vertébrées est hautement conservé. (Irie and Kuratani, 2014; Wolpert, 2002) et Wikipédia.

Lors du développement des embryons des vertébrés, les cellules issues de la fécondation vont fusionner et avoir le plus haut potentiel de différenciation. Cette cellule va ensuite se diviser au cours du processus de Morulation. Ces cellules vont ensuite former une cavité, l'embryon est alors une blastula. Les cellules, dans un processus nommé gastrulation vont après cela se remanier et former un nouveau tissu, cela va ralentir le processus de mitose et ces mouvements vont générer 3 feuillets : l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme via la ligne primitive. La ligne primitive se termine sur un nœud où le mésoderme va s'invaginer et suivre le prolongement de la ligne, puis formée une corde dite dorsale. Plus tard, les cellules externes de l'embryon (ectoderme) vont s'invaginer le long de la corde dorsale et mettre en place le système nerveux central par le processus de neurulation. À la suite du développement, les organes commencent à se former, les axes se définissent et on remarque alors un stade d'organisation commun entre des organismes morphologiquement différents. Ce stade dit « phylotypique » implique un plan d'organisation hautement conservé chez les vertébrés [Figure 2]. À la fin du développement, les cellules se seront complètement spécialisées.

Les tissus interagissent entre eux par le phénomène d'induction embryonnaire

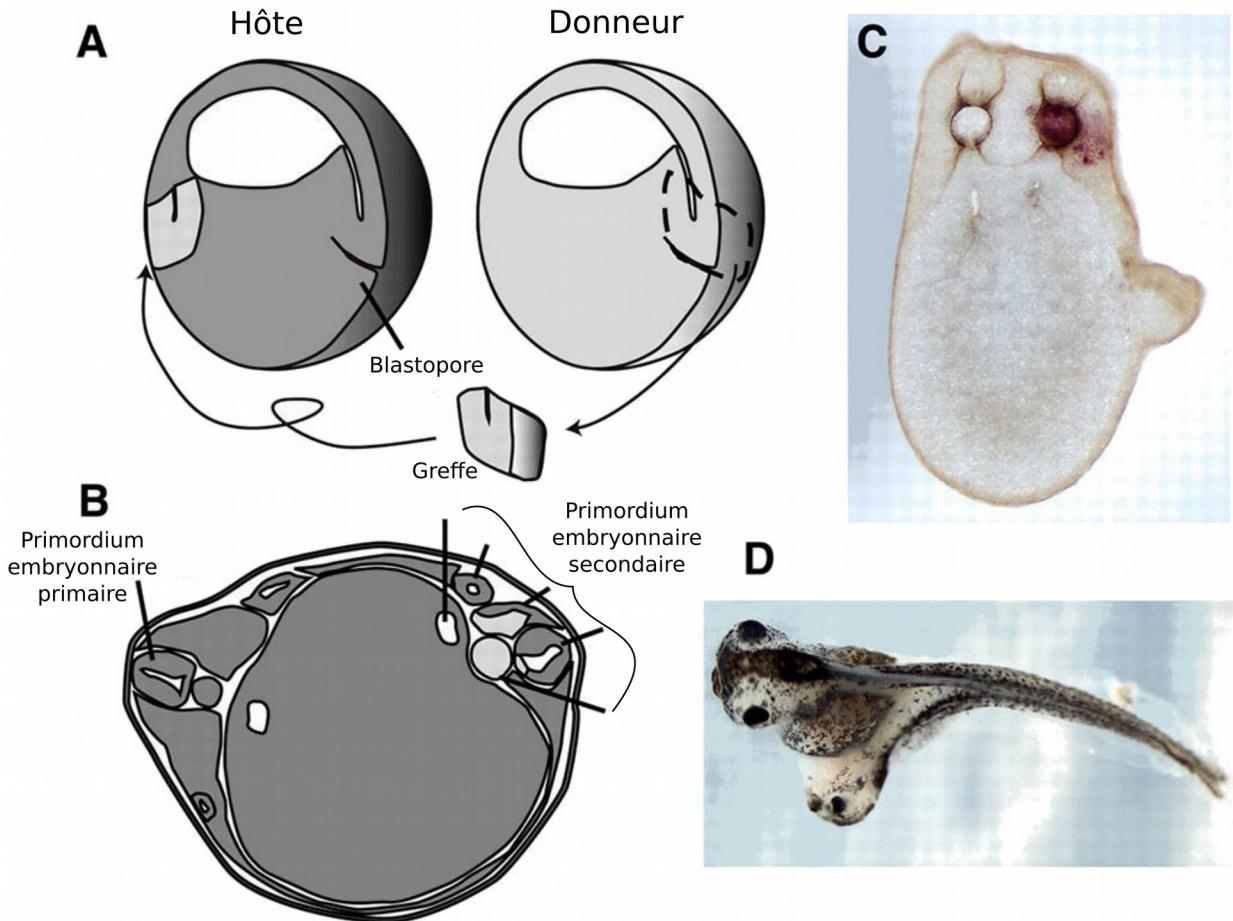


Figure 3: **Expérience de Spemann et Mangold.** A : Le protocole expérimental, B : La validation de l'hypothèse « centre d'organisation », C : Le résultat de l'expérience en vue de coupe, D : Le résultat plus tardif sur un embryon d'amphibien. (Harland, 2008)

La question de l'apparition du plan d'organisation d'un embryon et de la spécialisation des cellules au cours du développement est une des plus anciennes questions en biologie du développement. Avant même la découverte des gènes responsables des processus de développement, l'expérience de Spemann et Mangold en 1924 est sans doute la plus éclairante sur la façon dont s'organisent les tissus.

À l'époque de Spemann et Mangold, les biologistes avaient émis l'hypothèse qu'il existe une partie des embryons en développement qui servaient au « centre d'organisation ». Pour tester cette hypothèse, Spemann et Mangold ont transplanté un morceau de la lèvre supérieure du blastopore d'un embryon de Triton « cristatus » dans une région ventrale d'épiderme présomptif d'un embryon de Triton « taeniatus » [Figure 3:A]. Le Triton « cristatus » a la particularité d'être dépigmenté ce qui permet de suivre l'évolution de la greffe [Figure 3: D].

À la suite de cette greffe, ils ont observé la formation d'un primordium embryonnaire secondaire, comprenant un tube neural secondaire, une notochorde et des somites [Figure 3:

B]. Cette expérience bien qu'elle ne permette pas de connaître l'origine des mécanismes de l'organisation des structures de l'embryon a permis de mettre en avant que les mécanismes sont locaux et que des tissus dirigent le plan d'organisation des tissus voisin. On appelle ce phénomène d'interaction : l'induction embryonnaire.

Ce groupe de cellules responsable de l'induction des tissus neuraux des amphibiens est appelé « organisateur de Spemann-Mangold » et les mécanismes de son fonctionnement ont fait l'objet de décennies de recherche.

Les mécanismes de l'induction sont moléculaires

Pour expliquer les résultats de Spemann-Mangold, il a été proposé que des facteurs sécrétés diffusent d'un tissu à l'autre et induisent leur différenciation (Gurdon, 1987).

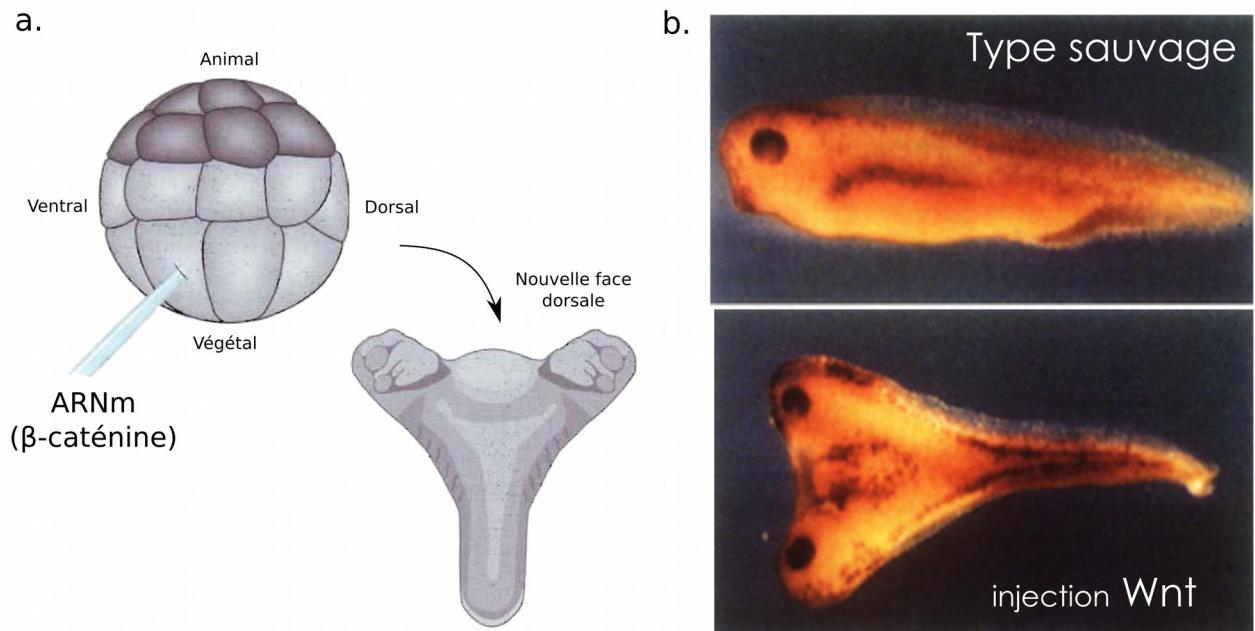


Figure 4: Résultats des injections d'ARNm dans l'une des cellules du pole végétatif d'embryon de Xénope au même stade que l'expérience de Spemann et Mangold. a. : Protocole expérimentale. b. : Comparaison entre deux embryos avec ou sans injection de β -caténine. (Wolpert, 2002)

Après la découverte de l'ADN double hélice et du lien entre mécanismes de biosynthèse des protéines et la transcription de l'ADN dans les années 1950 (Crick, 1970), les biologistes du développement ont proposé que ce sont les protéines qui permettent aux cellules de communiquer entre elles sur l'ensemble d'un tissu. Cela amène à la question des

embryologistes de cette période : « Quels sont les gènes responsables de l'organisation du plan des organismes vertébrés ? »

Il a fallu des décennies de recherche pour les généticiens pour identifier les protéines responsables de la communication extra-cellulaire, en analysant l'effet de mutations sur le plan d'organisation des embryons (Driever et al.; Haffter et al.). Grâce à leurs travaux, on sait quels sont les gènes responsables du plan d'organisation, mais quels gènes définissent une identité cellulaire spécifique (Horb and Thomsen). Ainsi on peut obtenir le même phénotype de duplication d'axe que Spemann-Mangold en injectant de l'ARNm codant pour la β -caténine dans l'une des cellules du pôle végétatif d'embryon de Xénope (Sokol et al., 1991) [Figure 4]. Mais l'induction d'une nouvelle face dorsale peut s'obtenir avec d'autre ARNm comme Vg-1 (Kessler and Melton, 1995).

Aujourd'hui, on sait qu'il existe 6 familles de signaux chimiques intercellulaires (FGF, TGF- β , Hedgehog, Wingless, Delta-Serrate et Ephrin). Ces molécules sont appelées **morphogènes**, car elles sont capables de contrôler la morphogenèse. Elles ont comme propriétés d'être des molécules secrétées par les cellules, d'agir à distance dans un tissu et d'être capable de contrôler la différenciation d'une cellule. Comme ces molécules diffusibles sont en général secrétées localement, elles forment des gradients de concentration dans les tissus en cours de développement. C'est notamment le cas lors du *patterning* du tube neural des embryons de souris (Briscoe and Small, 2015).

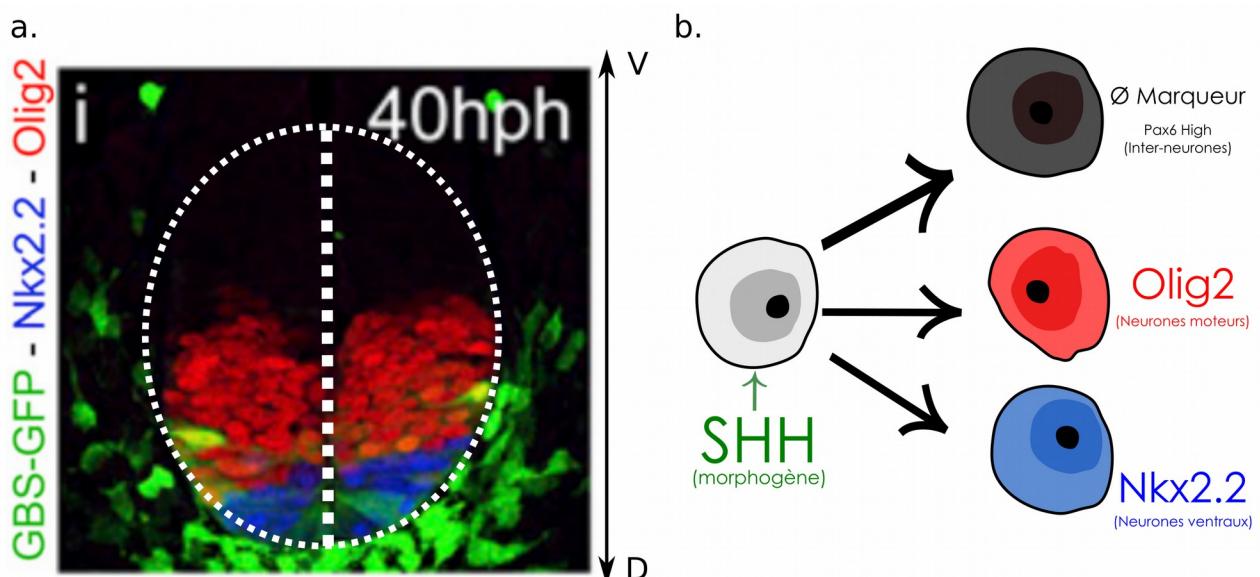


Figure 5: Profils d'expression spatiale des marqueurs cellulaires dans le tube neural précoce de la souris. a. : Embryon de souris 40 heures après fertilisation (hph) suivant l'axe dorsal (D) – Ventrale (V), en vert le morphogène SHH (Sonic Hedgehog), en rouge et bleu, les marqueurs d'identités cellulaires, absence ici de marqueurs pour le 3ème type cellulaire. b. : Schématisation de la différenciation correspondante. (Balaskas et al., 2012)

En position dorsale du tube neural, un tissu, la notochorde (corde dorsale) sécrète un morphogène (SHH : Sonic Hedgehog) qui forme un gradient de concentration suivant l'axe dorso-ventral du tube neural [Figure 5: a]. Suivant leur distance par rapport à la source de SHH et donc leur position dans le gradient, les cellules adoptent une identité cellulaire différente, révélée par l'expression de facteurs de transcription spécifiques d'une identité cellulaire de progéniteur neuraux (Balaskas et al., 2012) [Figure 5]. Pour comprendre comment un tissu s'organise, il faut donc répondre à la question « comment une cellule déduit sa position dans un gradient de morphogène ? ».

2. Comment une cellule déduit sa position dans le tissu ?

Le *patterning* : Le modèle du drapeau français

Il a été proposé que cette propriété de former un gradient de concentration pouvait être à l'origine de l'organisation spatiale des tissus. Ceci a été formalisé dans le modèle du « drapeau français » proposé par Wolpert dans les années 1960 (Wolpert, 1969). Alors même que les observations de *patterning* des cellules n'avaient pas encore été réalisées, Lewis Wolpert proposa un modèle conceptuel pour expliquer le plan d'organisation des vertébrés et cela quelle que soit sa taille.

Son modèle peut être résumé de la manière suivante : Supposons un tissu indifférencié avec à sa gauche (en $x=0$) une source d'un morphogène. Le morphogène peut diffuser à partir de la source et forme donc un gradient de concentration dans le tissu. Wolpert suppose ensuite que les cellules peuvent « interpréter » la concentration du morphogène et qu'il existe un premier seuil de concentration au-delà duquel les cellules naïves (rouge) changent d'identité et deviennent blanche et un deuxième seuil où elles deviennent bleues, d'où le « drapeau français » [Figure 6 ; Figure 7: a].

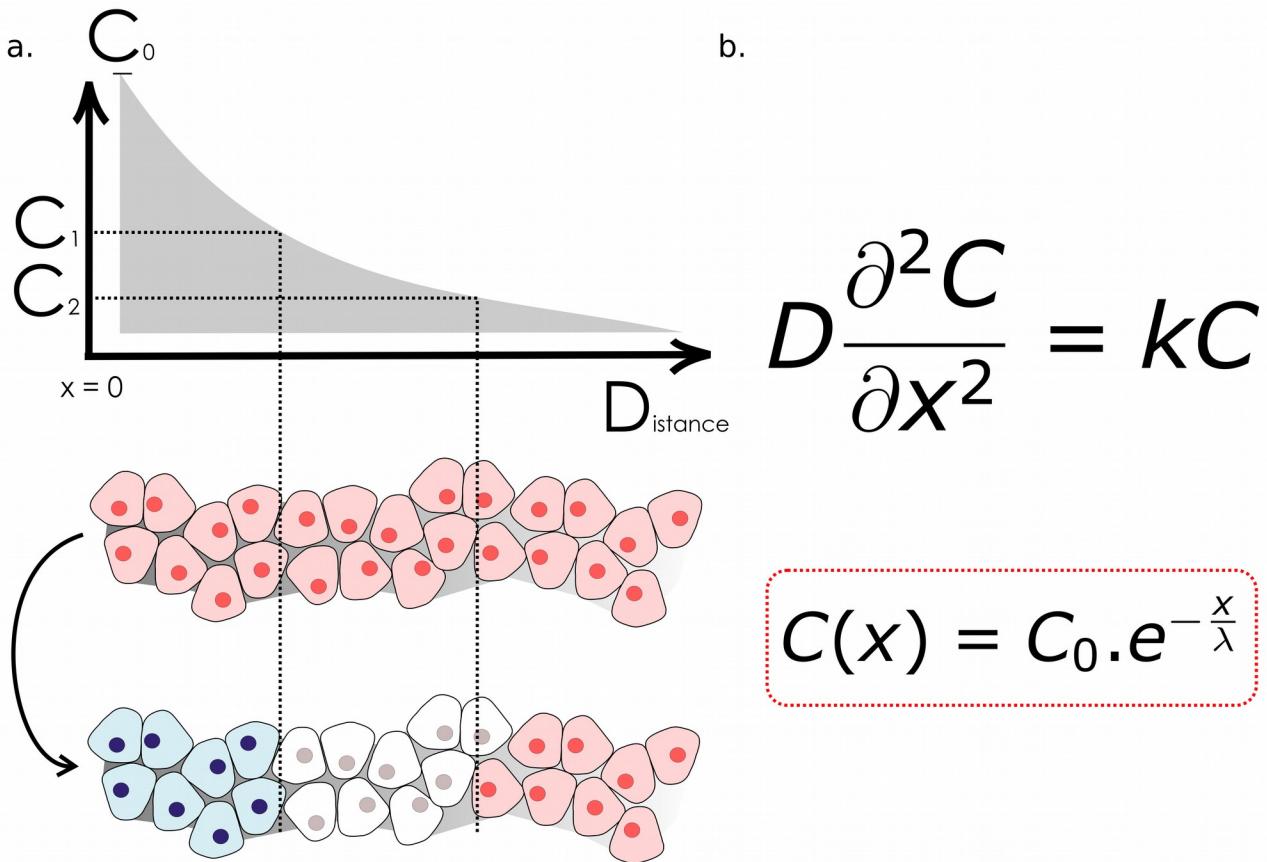


Figure 6: Illustration du modèle diffusif "French Flag". a.: Diffusion du morphogène (gris) dans le tissu et seuillage. b.: Modélisation 1D de la diffusion, en encadré rouge, la solution de l'équation de diffusion. (Wolpert, 1969)

Par la suite, il a effectivement montré *in vitro* que des cellules pouvaient adopter une identité cellulaire différente en fonction de la dose de morphogène à laquelle elles étaient soumises (Green et al., 1992). Dans cette expérience, ils ont stimulé des cellules *in vitro* de la callotte animale de Xénope avec le morphogène Activine (famille TGF-β) suivant plusieurs concentrations, ils ont obtenu des progéniteurs de l'ectoderme pour des concentrations comprises entre 7,2 et 12 U/ml et du mésoderme entre 0,9 et 4,3 U/μl et pour des concentrations inférieures, ils ont obtenu des cellules du Notochorde [Figure 7: b].

Enfin, pour expliquer l'existence de seuils définissant les types cellulaires, des motifs minimaux de réseaux de régulation génétiques ont été proposés (Cherry and Adler, 2000; Saka and Smith, 2007). Un exemple serait le suivant : Les cellules sont par défaut rouges, les cellules sont capables d'exprimer deux gènes interconnectés, l'un pour le type cellulaire « A » marqueur de l'identité « bleue » et l'autre pour le type cellulaire « B » marqueur de l'identité « blanc ». Le morphogène active les deux gènes « A » et « B », chacun des gènes s'auto-actives et le gène « A » inhibe l'expression du gène « B » [Figure 7: c]. De cette façon, si on adapte bien les paramètres d'activation-inhibition, on peut reproduire le phénomène de seuillage.

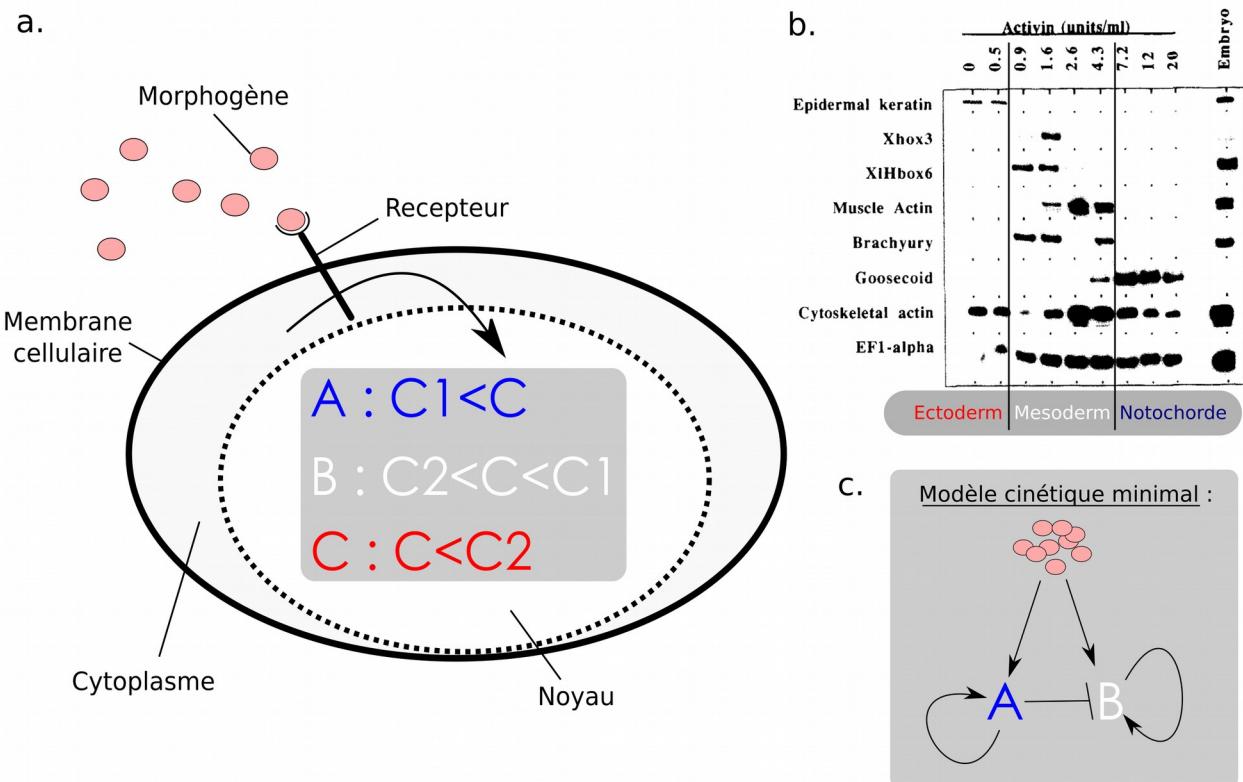


Figure 7: Les morphogènes convertissent les cellules en fonction de la dose. a. : Représentation simplifiée de la communication intracellulaire : la lecture de la concentration se fait à partir d'un récepteur cellulaire qui va activer les mécanismes de seuillage dans la cellule. b. : L'expérience de Green caractérisant l'effet de la dose sur la réponse cellulaire. c. : Modèle cinétique minimal de patterning. (Green et al., 1992)

Limitation du modèle du drapeau français : Le rôle de la dynamique de stimulation

La principale remarque que l'on puisse faire au modèle de Wolpert est qu'il ne tient pas compte de la dynamique. En effet, l'émergence des rapporteurs et des techniques de microscopie a récemment permis de mesurer le dynamique des voies de signalisation au cours du développement et elles ont en général montré que lors du développement la concentration n'est jamais statique (Kerszberg and Wolpert, 2007; Lee et al., 2001; Schohl and Fagotto, 2002).

En particulier lors du développement du poisson zèbre entre 5 et 6 heures après la fertilisation (hpf), le gradient de morphogène NODAL (famille TGF- β) n'est pas statique (Harvey and Smith, 2009), les cellules latérales de l'embryon dont la signalisation Smad2 est marquée en fluorescence ont des intensités nucléaires supérieures à 6 hpf par rapport à 5 hpf [Figure 8], ce qui implique que les cellules subissent des niveaux croissants de signalisation Nodal pendant

cette période. Ils ont quantifié l'expression d'ARNm par *hybridation in situ* (Gall and Pardue, 1969) que l'élévation croissante de la signalisation Nodal correspond à l'extension du domaine d'un marqueur précoce du mésoderme *no-tail* (*ntl*) (Schulte-Merker et al., 1994) : *ntl* se propage latéralement d'une profondeur de 3 à 5 cellules à 5 hpf à une profondeur maintenue à environs 12 à 14 cellules à 6 hpf [Figure 8 : a : B-C].

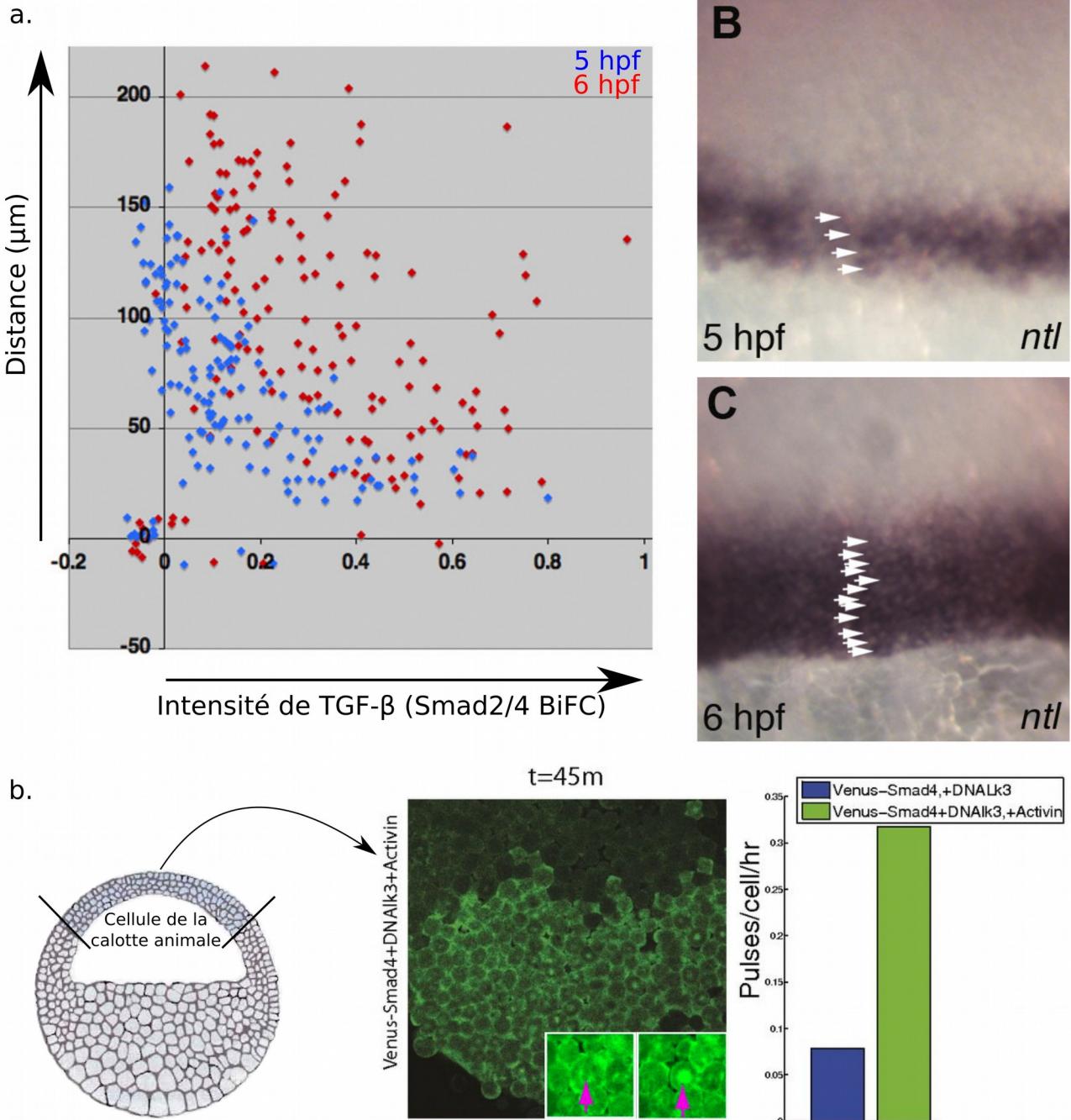


Figure 8: Les profils de morphogènes peuvent être en augmentation monotone ou pulsatile. a.: La visualisation et la quantification du gradient de morphogène Nodal chez le poisson zèbre, à gauche, la quantification de Nodal exogène comparé entre 5 et 6 hpf et à droite, l'induction de *ntl* par Nodal. b.: Caractérisation des pulses de smad4 induit par BMP ou l'Activin chez le Xénope, à gauche, le protocole de dissection des cellules de la calotte animale, au centre, le profil de smad4 des cellules de l'explant ayant subi une injection ARNm marquant les Smad4 et inhibant la voie BMP4 (DNAalk3) et stimulé en Activin et à gauche, la proportion de pulses/cellules/heures comparé avec ou sans Activin. (Harvey and Smith, 2009; Warmflash et al., 2012)

Dans d'autres cas, la dynamique peut être encore plus complexe : des oscillations pendant la somitogénèse (Aulehla and Pourquié, 2010) ou encore des pulsations observées dans la calotte animale de Xénope (Warmflash et al., 2012). Cette dernière a permis de mettre en

avant le caractère pulsatile de la voie de signalisation TGF- β et montre qu'un traitement Activine augmente la proportion de pulsation des Smad4 par cellule et par heure [Figure 8 : b].

La dynamique de stimulation peut avoir une influence aussi importante que la concentration sur la façon dont les cellules interprètent un morphogène

Comment les cellules déduisent leurs positions alors même que le gradient est dynamique ? Répondre à cette question, est malheureusement difficile, car il est souvent impossible de contrôler la concentration de morphogène dans un tissu avec suffisamment de résolution.

Dans ce cas, on peut alors se tourner vers un système modèle comme une lignée cellulaire et ainsi explorer le rôle de la dynamique de stimulation sur la réponse de cellules en étant être extrêmement précis dans la concentration des morphogènes qu'on veut appliquer. Récemment, des expériences ont ainsi été menées pour mesurer l'effet d'une stimulation temporelle du morphogène TGF- β 1 sur la réponse de cellules de la lignée myoblastique C2C12. Ces cellules sont connues pour être sensible au morphogène TGF- β 1 qui inhibe leur différentiation en myotube. Les expériences ont montré que la réponse cellulaire est adaptative et dépendait plus de la vitesse de stimulation que de la concentration absolue.

Le morphogène TGF- β a été découvert dans les années 1978-1981 pour son activité cancéreuse et sa capacité à transformer de manière réversible l'immortalisation des fibroblastes (Moses et al., 2016). Les récepteurs de TGF- β fonctionnent sous forme de dimère dont la fixation du ligand TGF- β 1 entraîne sa dimérisation. Dans les années 1990, les expériences de mutation par ARNm codant de la sous-unité du récepteur à l'Activine de Xenope « XAR1 » ont montré qu'elles bloquaient la formation du mésoderme (Hemmati-Brivanlou and Melton, 1992).

Depuis, on sait que la réponse transcriptionnelle à la signalisation TGF- β est guidé par le complexe d'un Smad activé par un récepteur (R-Smad) avec le co-régulateur Smad4. La liaison du ligand aux récepteurs du TGF- β conduit à la phosphorylation des R-Smad, à la formation de complexes avec Smad4 et à la translocation nucléaire (Massagué et al., 2005). Les smads passent en permanence du noyau au cytoplasme, mais lorsque ceux-ci sont phosphorylés, l'export des smads du noyau est ralenti (Schmierer and Hill, 2007). R-Smad2 / 3 répond spécifiquement aux ligands Activine, Nodal et TGF- β 1 alors que R-Smad1/ 5/8 répond aux morphogènes BMP (Bone morphogenetic protein) et GDFs (Growth and Differentiation

Factors). Le complexe SMAD hétérotrimérique peut se fixer à l'ADN et induire l'expression de gènes cibles en agissant comme co-activateurs de la transcription (Ross et al., 2006) [Figure 9].

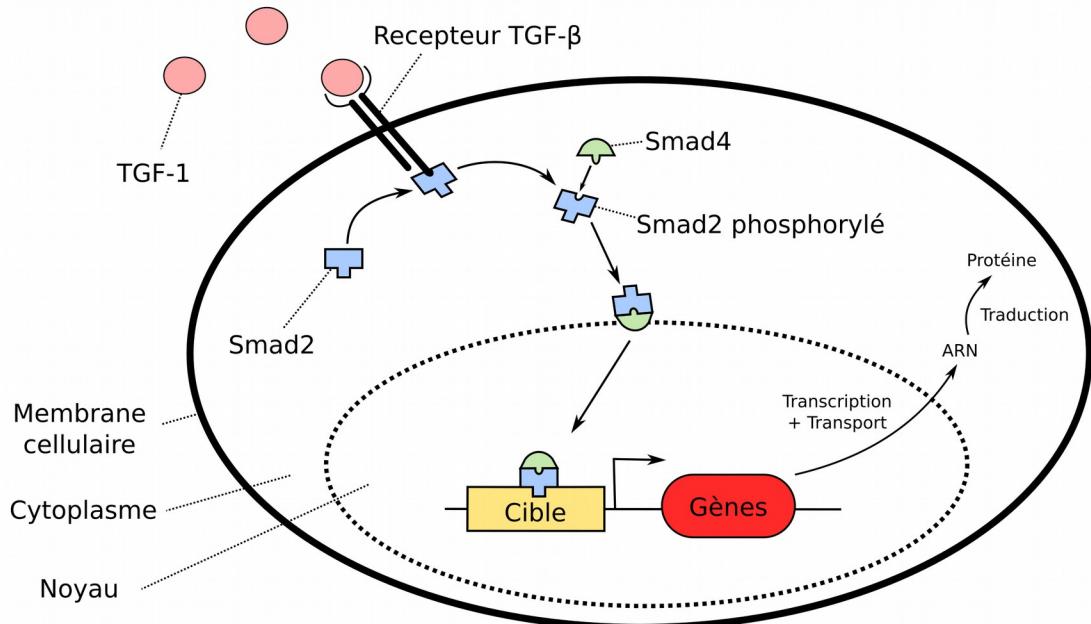


Figure 9: Composant de la voie de la cascade de transduction TGF- β dans une cellule. La voie BMP, conduisant la phosphorylation des R-Smad1/5/8 n'est pas représentée ici. Les smads1/5/8 formeraient aussi un complexe avec les Smad4. Les smads sont des facteurs de transcription, car ils participent au processus de formation de l'ARN à partir de paires de bases (pb) d'ADN (80pb/sec), qui vont être ensuite traduit en chaîne d'acide aminée (aa) formant des protéines (20aa/sec). (Ben-Ari et al., 2010)

Pour mesurer l'effet d'une stimulation temporelle du morphogène TGF- β 1 sur la réponse des cellules C2C12, ils ont utilisé deux lignées : les GFP-Smad4 et les CAGA₁₂-Nluc. Les GFP-Smad4 rapportent l'activité de la translocation nucléaire des complexes Smads en fluorescence (Watanabe et al., 2000), elles ont été insérées dans le génome par la méthode des vecteurs ePiggyBac (Lacoste et al., 2009). Les CAGA₁₂-Nluc rapportent l'activité transcriptionnelle de la voie smad2/3 en luminescence, elles sont construites à partir de la construction GFP-Smad4, où est insérée à la place un promoteur synthétique de Smad3 « CAGA₁₂ » tagué avec une luciférase pour une détection optimisée (Hall et al., 2012). La luminescence a été choisie pour éviter les problèmes immuno-fluorescence et permet une durée d'exposition plus longues, ce qui augmente la sensibilité de mesure, mais Nluc est instable en condition de culture. Le rapporteur synthétique a été choisi pour éliminer les réactions de transcriptions pouvant moduler des promoteurs naturels.

Pour générer des signaux temporels de morphogène TGF- β 1 et renouveler les milieux contenant Nluc, ils ont utilisé une puce microfluidique de culture. La puce a la particularité de disposer d'un système de valve intégrée permettant le choix du chemin d'écoulement du milieu et de chambres de cultures miniaturisé. La puce permet la culture automatisée et l'observation au microscope (Gómez-Sjöberg et al., 2007; Mehling and Tay, 2014), elle sera détaillée plus tard [Chapitre 2, Partie 3].

La réponse à une marche de ligand TGF- β 1 est adaptative et graduée

Avant cette étude, il avait été montré avec GFP-Smad4 que la réponse à une marche augmente en TGF- β 1 et qu'elle était transitoire et adaptative : Même si les R-Smad, Smad2 et Smad3 restaient phosphorylées et localisés dans le noyau via le ligand TGF- β 1 en solution, la mesure de la transcription de cible endogènes ou synthétique par RT-qPCR (*Reverse Transcriptase-quantitative Polymerase Chain Reaction*) montre qu'elle se termine après 4 h de stimulation (Warmflash et al., 2012).

Mais pour comprendre comment l'activité de la voie de signalisation des smads2/3 est interprétée au niveau de l'expression des gènes, ils ont observé l'expression du rapporteur synthétique CAGA₁₂-Nluc suivant les mêmes conditions que GFP-Smad4 [Figure 10 : b-c].

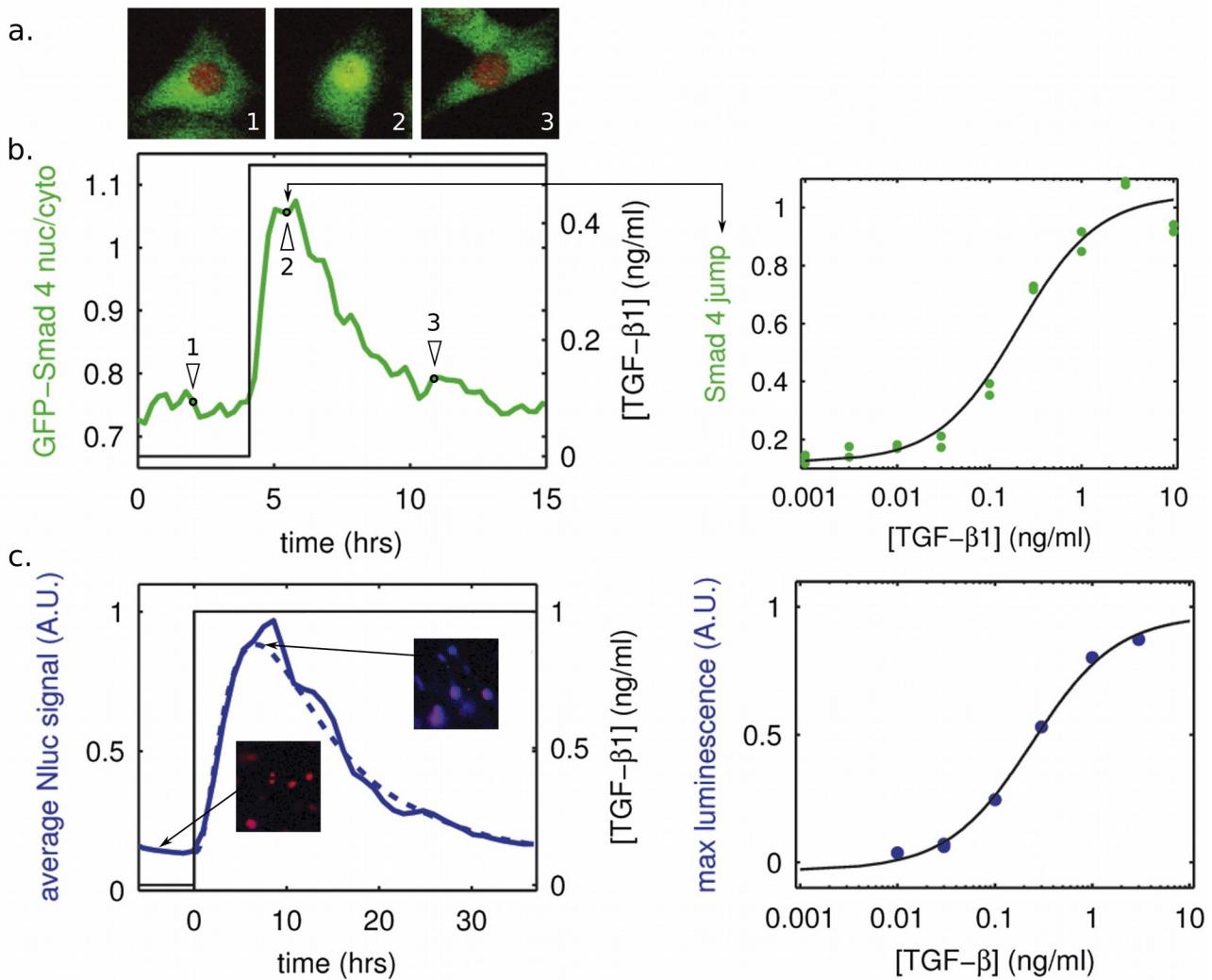


Figure 10: La réponse de la voie de signalisation TGF- β à une marche de ligand TGF- β 1 est adaptative et graduée. a. Image en fluorescence, l'évolution des smads est représentée en vert sur l'image, les noyaux sont marqués en rouge. b. : Moyenne du ratio cytoplasmique de GFP-Smad4 en fonction du temps et courbe dose-réponse du maximum d'amplitude du ratio cytoplasmique de GFP-Smad4. c. : Moyenne de la réponse transcriptionnelle de TGF- β en fonction du temps et courbe dose-réponse du maximum d'amplitude de la luminescence, l'évolution des Nanoluciferase (Nluc) est représentée en bleu sur l'image. (Sorre et al., 2014)

Enfin, pour déterminer comment les cellules C2C12 codent différents niveaux de morphogène et s'assurer que les cellules se comportent de la même manière, ils ont mesuré comment les cellules réagissaient à une augmentation graduelle du ligand TGF- β 1 à différentes concentrations.

Cette mesure fournit un étalonnage dose-réponse de référence aux stimulations temporelles plus complexes et montre que la réponse transcriptionnelle par CAGA₁₂-Nluc est cohérente avec la translocation nucléaire des smads par GFP-Smad4 [Figure 10 : b-c : droite].

Les stimulations pulsées augmentent le débit de la voie de signalisation TGF-β et la régulation du destin cellulaire

Les expériences menées sur des cellules de la calotte du Xénope ont montré que les Smad4 émettent des impulsions répétitives (Warmflash et al., 2012). Pour étudier la conséquence d'une impulsion, ils ont stimulé leurs deux lignées cellulaires (GFP-Smad4, CAGA₁₂-Nluc) avec des impulsions d'une heure de TGF-β1 séparée de 6 heures et mesuré leur réponse cellulaire.

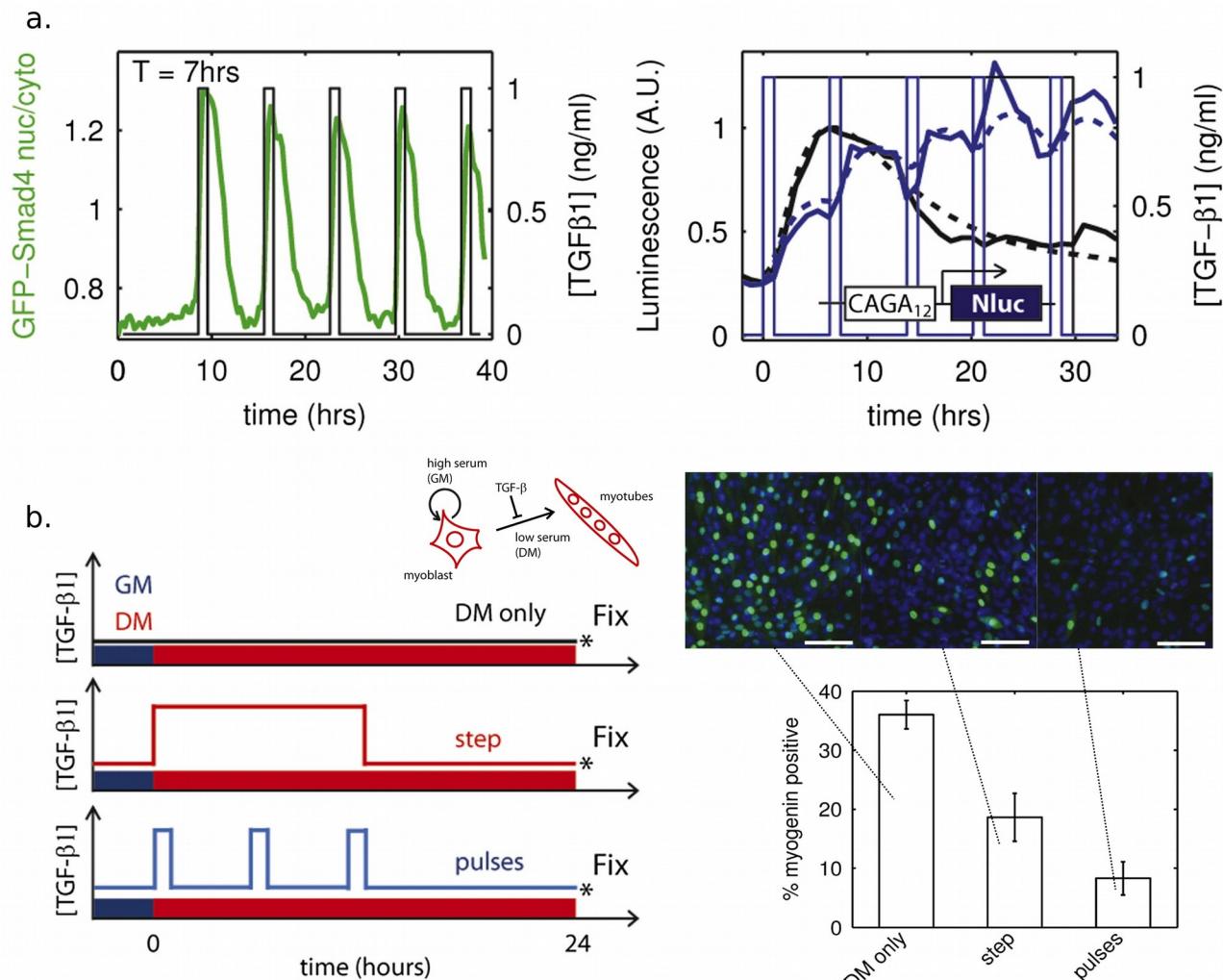


Figure 11: **Effet des pulses sur la voie TGF-β et la différenciation des Myoblastes.** a. : Les profils de la voie TGF-β et sa transcription : à gauche, l'évolution du rapport nucléaire/cytoplasmique des GFP-Smad4 et à droite l'activité transcriptionnel en aval de la voie TGF-β par le rapporteur CAGA12-Nluc. b. : Effet des stimulations sur la spécialisation des Myoblaste par la Myogénine. (Sorre et al., 2014)

TGF-β1 est connu pour inhiber la différenciation des Myoblastes vers les Myotubes. Pour étudier la conséquence de ces stimulations pulsées sur la spécialisation des cellules, ils ont aussi mesuré par Immunofluorescence la fraction des cellules exprimant de la Myogénine, un

marqueur précoce de l'engagement terminal des Myoblastes vers les Myotubes (Tapscott, 2005), puis les ont comparé à une stimulation continue et non stimulée.

Les stimulations pulsées montrent une réponse transitoire des Smad4 pour chaque impulsion, mais une augmentation doublée de la transcription pour chaque pulse par le rapporteur luminescent CAGA₁₂-Nluc et finit par saturer [Figure 11 : a]. Cette observation pourrait expliquer les impulsions présentes des cellules de la calotte du Xénope pour surmonter l'adaptation de la voie TGF- β à une stimulation continue et augmenter le débit de la voie pour la différenciation.

Les marquages de la Myogénine vont dans ce sens, la comparaison d'une stimulation neutre, continue et pulsé de TGF- β 1 montre que la stimulation pulsée est plus efficace de 2,5 fois pour bloquer la spécialisation des Myoblastes vers des Myotubes [Figure 11 : b].

L'activité de la voie de signalisation dépend de la vitesse d'augmentation de la concentration en TGF- β 1

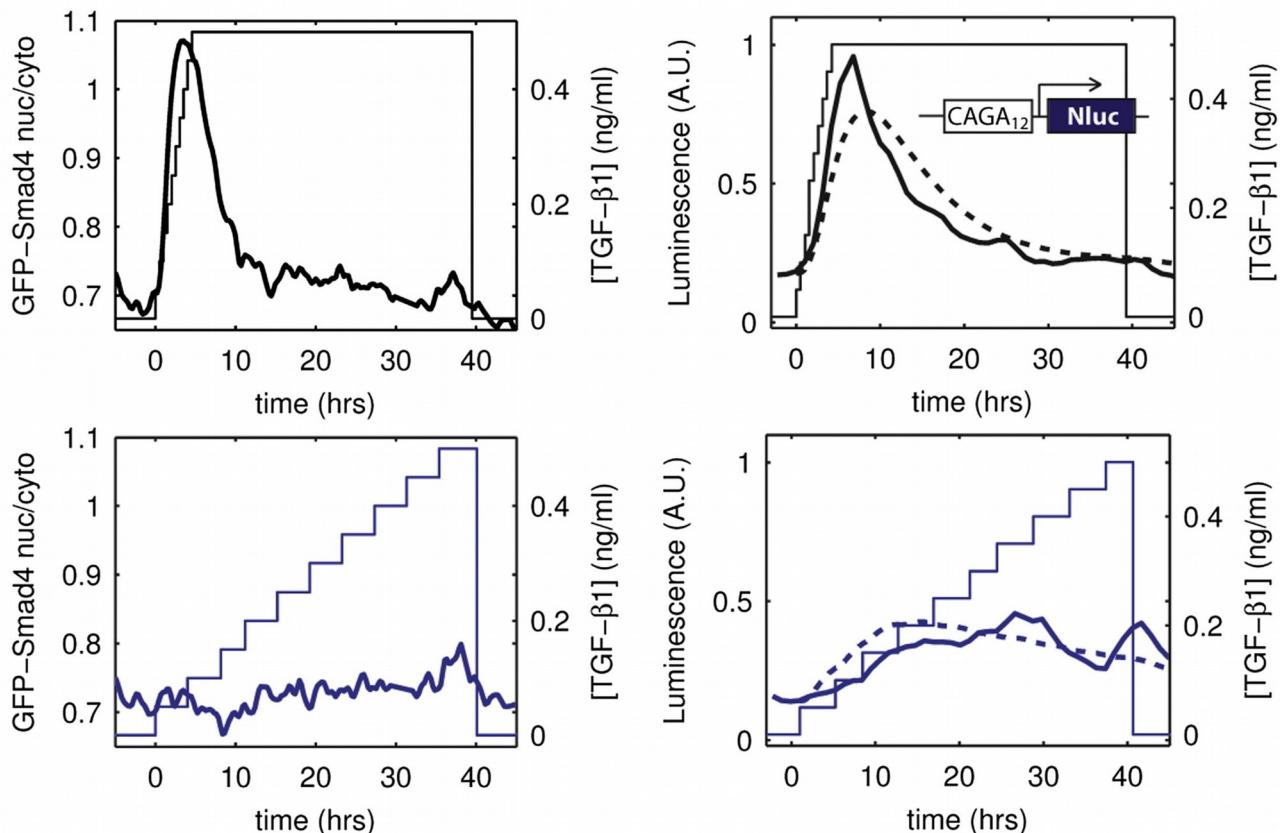


Figure 12: L'activité de la voie dépend fortement du taux d'augmentation de la concentration. En haut, les stimulations rapides, en bas les stimulations lentes. A gauche, l'évolution du rapport nucléaire/cytoplasmique des GFP-Smad4 et à droite, l'évolution de l'activité transcriptionnelle en aval de la stimulation TGF- β . (Sorre et al., 2014)

L'adaptation à une marche de stimulation suggère que le système filtre les signaux d'entrée qui changent lentement (Tu et al., 2008), dans ce cas, la réponse dépend aussi bien du niveau de concentration que de son taux de stimulation. Pour étudier cette propriété sur les cellules C2C12, ils ont stimulé leurs lignées (GFP-Smad4, CAGA₁₂-Nluc) avec des rampes linéaires de ligands TGF-β1 à différentes vitesses d'augmentation de concentration.

Les stimulations « rampes » de morphogène TGF-β1 montrent que c'est uniquement lorsque la pente est forte que les cellules répondent, aussi bien dans la voie de signalisation que dans la transcription [Figure 12]. Ainsi, la réponse à un *niveau* donné peut être « tout ou rien » en fonction de la *vitesse* à laquelle la concentration a été augmentée.

La réponse adaptative de la voie de signalisation TGF-β peut extraire l'information de position sans gradient spatial

L'observation selon laquelle la vitesse d'augmentation de la concentration est aussi pertinente que la concentration en elle-même a des conséquences importantes sur la manière dont les cellules interprètent le morphogène TGF-β1. Pour comprendre et appliquer ce phénomène lors du développement embryonnaire, ils ont proposé un modèle de différenciation diffusif formant un gradient et dont la réponse cellulaire est adaptative dans un cas et linéaire dans l'autre.

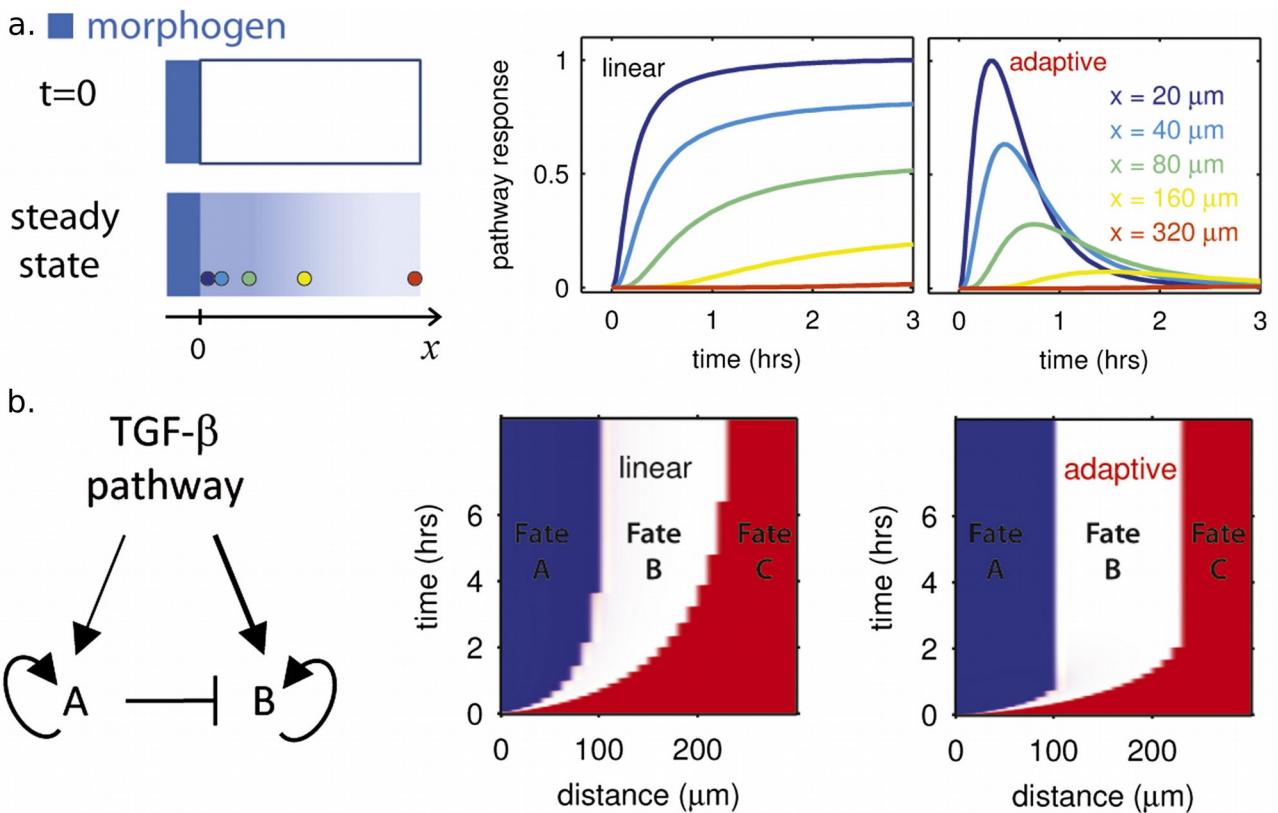


Figure 13: Modélisation « Speed Fating » de la différenciation des cellules à réponse adaptative. a. : Le modèle diffusif avec à droite, les réponses au modèle linéaire ($y' = l - c.y$) et au modèle adaptatif ($y' = l - c.y - 0,25c^2.X$; avec $x' = y$) en fonction de la position dans le gradient. b. : La différenciation des cellules suivant le réseau de régulation génique minimal, avec à sa gauche l'établissement des identités cellulaires suivant la réponse linéaire et la réponse adaptative. (Sorre et al., 2014)

Leur hypothèse était que les cellules à réponse adaptative atteignent un état stationnaire avant les cellules à réponse linéaire, ce qui leurs confèrent une plus grande rapidité à prendre une décision et se différencier. Pour tester cette idée, ils ont utilisé un réseau de régulation génique minimal (GRN) correspondant à celui qu'on a vu précédemment (Saka and Smith, 2007) : répression mutuelle entre destins cellulaires et instabilité, avec le facteur « B » plus sensible à TGF- β et le facteur « A » réprimant « B » le plus fortement [Figure 13 : b : gauche].

Le résultat de leur modèle montre que la configuration finale du drapeau français est atteinte 3 fois plus rapidement dans le cas de la réponse adaptative, ce qui confirme leur hypothèse [Figure 13 : b : droite].

La réponse dynamique de la voie adaptative a aussi l'avantage d'être insensible à la dynamique des ligands : même si les ligands sont dégradés dans l'environnement, la réponse cellulaire est relativement inchangée, ce qui n'est pas le cas pour une réponse linéaire. Ils ont ainsi nommé leur modèle : « Speed Fating », car il implique que les cellules peuvent récupérer

une information spatiale à partir de la vitesse d'augmentation de la concentration de morphogène, et pas seulement de sa concentration à l'état stationnaire.

Cette étude montre clairement que si l'on veut comprendre la dynamique spatiale différenciation des cellules dans un « pattern », il est nécessaire de comprendre aussi la dynamique temporelle de différenciation.

Mon travail s'inscrit dans la continuité de ces travaux. Nous avons voulu comprendre le rôle de la dynamique des morphogènes dans un système plus proche de l'embryon où je m'intéresse à la différenciation des cellules souches embryonnaire de souris. Ces cellules ont le potentiel de donner toutes les cellules d'un organisme final et qui se différencient initialement en 3 identités différentes : l'ectoderme, le mésoderme et enfin l'endoderme.

3. NODAL comme sujet d'étude

Nous avons choisi d'étudier NODAL, un morphogène de la famille des TGF- β impliqué dans le développement des embryons au stade précoce des bilatériens (Grande et al., 2015; Shen, 2007).

Le développement embryonnaire précoce de la souris

Le développement embryonnaire de la souris commence par une cellule œuf fécondée totipotente et dure entre 19 et 21 jours. La cellule œuf va ensuite se diviser successivement à masse constante jusqu'à atteindre le stade morula (E2.5 – E3.0) et se déplacer le long de la paroi de l'utérus.

L'embryon commence alors sa première spécification : les cellules extérieures adoptent un destin trophectoderme, qui formeront le placenta (Fleming, 1987) et les cellules intérieures formant la masse cellulaire interne (ICM).

Une cavité va ensuite se former au sein de l'embryon (blastocèle) et les cellules de la masse cellulaire interne vont donner naissance à 2 tissus distincts : l'épiblaste apolaire au centre qui formera le fœtus (Diwan and Stevens, 1976; Papaioannou et al., 1975) et l'endoderme primitif polarisé au contact du blastocèle qui formera les membranes extracellulaires (Gardner and Rossant, 1979) [Figure 14].

L'embryon s'implante ensuite dans la muqueuse utérine (E4.5 – E4.75), l'épiblaste se polarise pour ensuite former une lame basale et du côté apical, une cavité pseudo-amniotique. Les cellules de l'épiblaste sont qualifiées de pluripotentes, car elles donneront naissance aux trois feuillets embryonnaires. À terme, les trois feuillets embryonnaires vont se différencier jusqu'à perdre leurs potentialités et former qu'un seul type cellulaire.

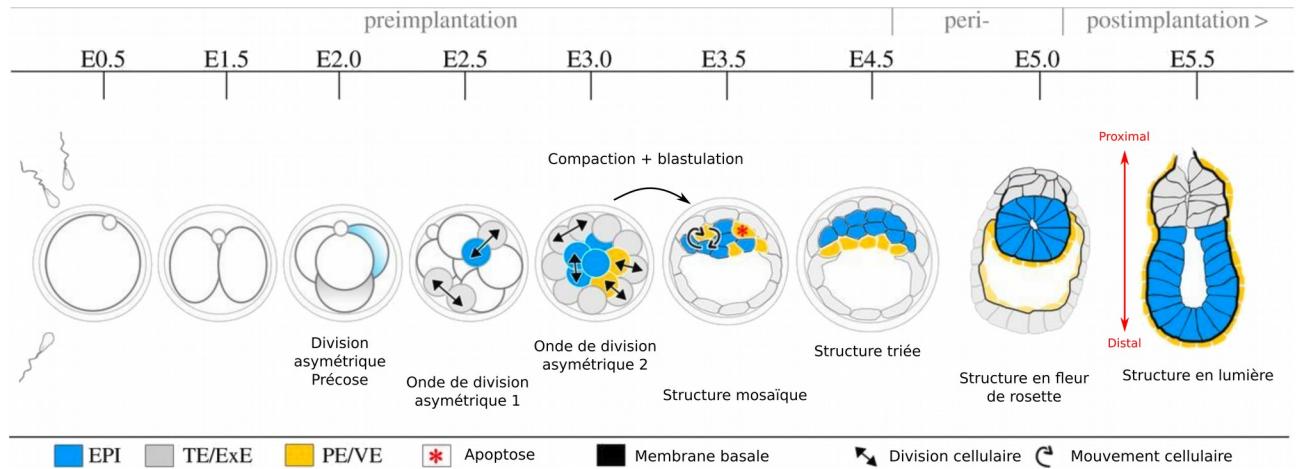


Figure 14: **Aperçu du développement précoce de la souris.** Abréviation : Trophectoderme extra-embryonnaire (TE), masse cellulaire interne pluripotente (ICM), épiblaste pluripotent (EPI), ectoderme extra-embryonnaire (ExE), endoderme primitif (PE) et endoderme viscéral (VE). (Bedzhov et al., 2014)

Les cellules souches embryonnaires murines peuvent être dérivées à partir des cellules d'épiblaste (EPI, E5.5) (mEpiSC : mouse Epiblast stem cells) ou des cellules de la masse interne (ICM) pré-préimplantatoire (E3.5 à E4.5) (mESC : mouse embryonic stem cells).

NODAL lors du développement précoce de la souris

Différentes voies de signalisation sont impliquées dans la mise en place des différents tissus de l'embryon au stade précoce, où l'on a la signalisation FGF, LIF-JAK-STAT et BMP/NODAL. On retrouve FGF exprimée au ICM au stade morula (Rappolee et al., 1994) où il sert à la ségrégation de l'endoderme primitif (Chazaud et al., 2006) et sur l'épiblaste après implantation où il va promouvoir la différenciation (Goldin and Papaioannou, 2003). La signalisation LIF-JAK-STAT est essentielle à la survie des cellules de l'embryon et ralentit le processus de maturation vers l'épiblaste (Nichols et al., 2001). Enfin la voie TGF-β qu'on a vue précédemment avec les Smad2/3 pour Nodal et les Smad1/5/8 pour BMP.

Les voies de signalisation NODAL et BMP, via leurs effecteurs (smad2/3 et smad1/5/8 respectivement), sont en compétition pour former un complexe avec Smad4 (Galvin et al., 2010) et ont des rôles très différents, par exemple lors de la formation de la ligne primitive, on a séquentiellement : Nodal dans l'épiblaste qui va induire BMP4 dans l'endoderme extra-embryonnaire, puis BMP4 qui va activer WNT dans l'épiblaste et pour finir, WNT qui va spécifier les cellules de l'épiblaste en mésoderme (Ben-Haim et al., 2006). Dans notre cas, on s'est intéressé plus particulièrement à NODAL, principalement pour la maturation des cellules de l'épiblaste, mais aussi jusqu'à la formation des 3 feuillets embryonnaires.

NODAL a été découvert pour la première fois en 1993, où il a été observé lors de la gastrulation, plus particulière lors de la formation de la ligne primitive (Zhou et al., 1993). Depuis, on l'a retrouvé impliqué dans la formation de l'asymétrie gauche-droite (Hamada et al., 2002), où les antagonistes de Nodal, LEFTY2 et PITX2, bloquent les récepteurs et assurent que le signal soit contenu au côté gauche de l'embryon (Saijoh et al., 2005). Cela a été observé aussi bien chez les vertébrés que chez certains invertébrés, où l'on peut citer l'expérience impressionnante d'inhibition de NODAL lors du développement d'un escargot, ce dernier continue de se développer sans briser sa symétrie gauche-droite et forme un escargot sans spirale (Grande and Patel, 2009). Plus récemment, NODAL a été découvert avant l'implantation, là où les cellules sont à l'état de pluripotence naïve (Granier et al., 2011).

Nodal, élément clé dès le début de la gastrulation

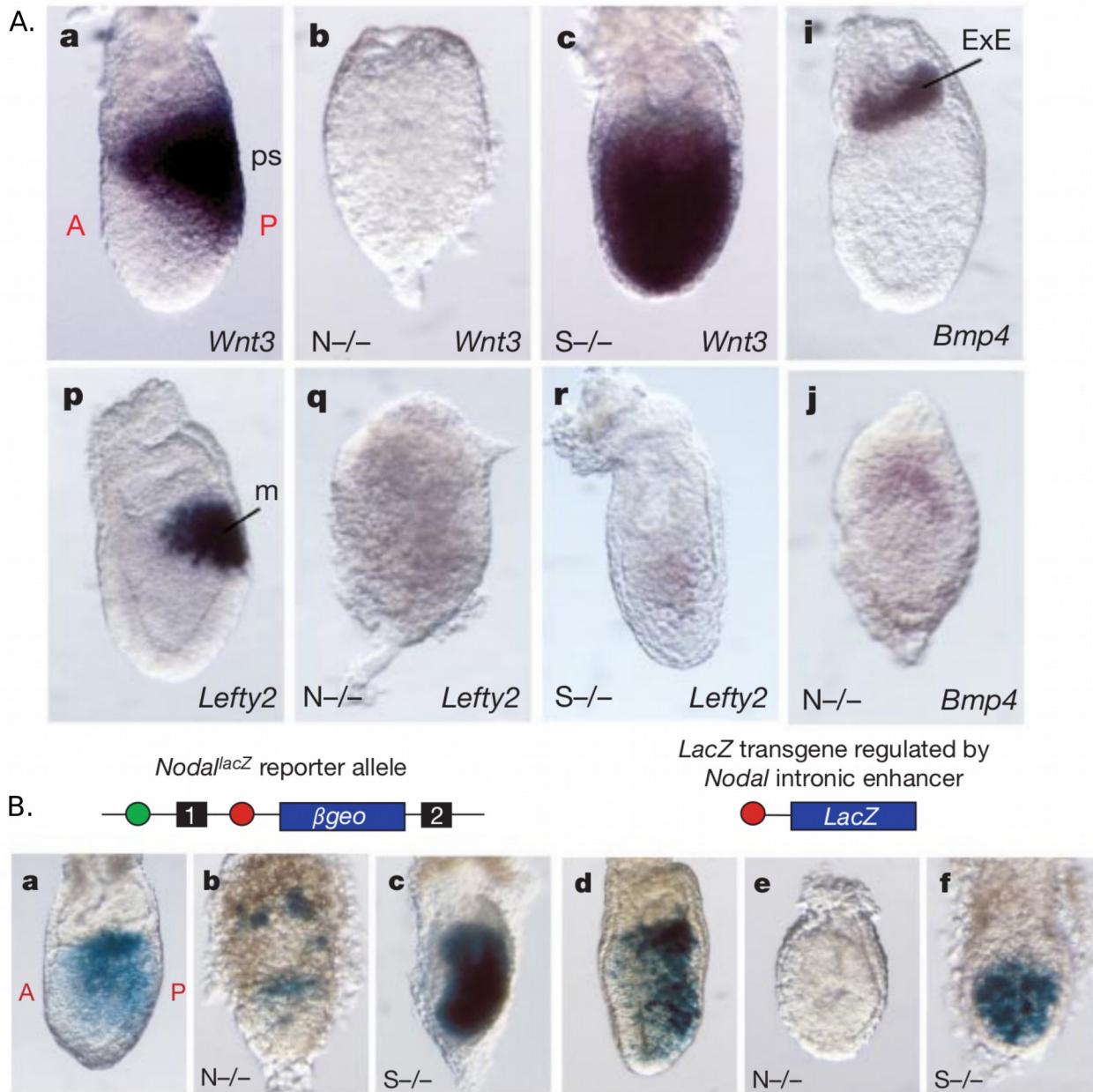


Figure 15: La signalisation NODAL dans l'épiblaste module le développement précoce de l'embryon de souris.
A. : Les hybridation in situ de 3 motifs moléculaires (Wnt, Bmp4 et Lefty2) suivant les délétions de Nodal ou des Smad2 (respectivement N-/- et S-/-). B. : Expressions des rapporteurs enzymatiques LacZ suivant les délétions de Nodal ou des Smad2. Abréviation : Antérieur (A) et Postérieur (P) (Brennan et al., 2001)

Peu de temps après l'implantation, l'embryon de souris comprend trois couches de tissu : l'épiblaste, l'ectoderme extra-embryonnaire et l'endoderme viscéral (E5.5) [Figure 14]. La structure de l'embryon présente plusieurs motifs moléculaires le long de l'axe proximal-distal, où l'on peut distinguer Wnt, BMP4 et Nodal (Beddington and Robertson, 1999). Plus tard, Nodal est requis pour la formation de l'axe antéro-postérieur (E6.5) où des mouvements de cellules vont faire pivoter l'axe proximal-distal préexistant (Schier and Shen, 2000). Il a été montré que pour l'embryon Nodal -/-, il n'y a pas de formation de ligne primitive (Conlon, 1994).

Dans une étude de 2001, il a été observé que les signaux de l'épiblaste sont responsables de l'initiation de la polarité proximale-distale et que Nodal agit pour favoriser le destin des cellules postérieures dans l'épiblaste et maintenir les motifs moléculaires dans l'ectoderme extra-embryonnaire adjacent et cela, indépendamment de Smad2 (Brennan et al., 2001).

Pour cela, ils ont observé, premièrement par *hybridation in situ* l'expression des voies de signalisation Wnt, Bmp4 et Lefty2 dans le cas où Nodal ou Smad2 est délété (-/-) ou non (+/+) [Figure 15: A] et secondement, l'expression des rapporteurs enzymatique LacZ de Nodal au locus et sur un transgène régulé par un enhancer de Nodal lors de la formation de la ligne primitive (Beddington and Robertson, 1999) [Figure 15: B]. Leurs expériences montrent que sans Nodal, les motifs Wnt et Bmp4 n'apparaissent pas et ne forment pas de polarité proximale-distale, ce qui suggère que Nodal est essentiel à la gastrulation et donc à la formation des trois feuillets embryonnaires.

La régulation de NODAL est complexe et implique 5 enhancers

L'expression du gène Nodal est régulée tout au long du développement dans plusieurs processus où des signalisations (Nodal, Wnt/βcaténine et NOTCH), des facteurs de transcriptions et des modificateurs de chromatines sont impliquées. Pour que son expression soit garantie lors du développement, Nodal repose sur 5 éléments de régulation (enhancers) connues à ce jour et dont les rôles sont différents au cours des étapes embryonnaires.

L'élément de régulation HBE (Highly Bound Element) est le premier enhancer actif connu au cours du développement embryonnaire de la souris. Il est actif dans l'embryon dès E3.5 et fixe plusieurs facteurs de pluripotence comme NANOG, OCT4, SOX2 ou KLF4 (Papanayotou et al., 2014). Dans l'embryon, on le retrouve dans la régulation de Nodal des cellules de masse interne (E4.5) et sa délétion à ce stade provoque une diminution flagrante de l'expression de Nodal lors de la formation de la ligne primitive (E6.5). Cette dernière observation montre, qu'HBE permet le maintien de l'expression de Nodal dans l'épiblaste pluripotent [Figure 14 ; Figure 16 : (A',B',C',D')].

L'élément de régulation ASE (ASymmetric Enhancer) est actif peu avant l'implantation de l'embryon et se situe au sein du premier intron du gène Nodal. Il est sensible à la signalisation Nodal où il recrute les facteurs de transcription Smad2/3 et FOXH1 qui vont activer son activité *in vivo*. Suivant ce schéma, il a la capacité d'amplifier la signalisation NODAL et former une boucle de rétro-action positive. ASE est principalement connu pour la mise en place de l'asymétrie gauche-droite de l'embryon et pour être actif au niveau de la formation de la

ligne primitive (Hamada et al., 2002; Yamamoto et al., 2001). La mesure de l'expression d'un rapporteur transgéniques de l'activité d'ASE *in vivo* a aussi montré qu'ASE pouvait aussi être actif à des stades très précoce au niveau des ICM (E3.5), mais de façon très hétérogène (Granier et al., 2011) [Figure 14 ; Figure 16 : (c,E)].

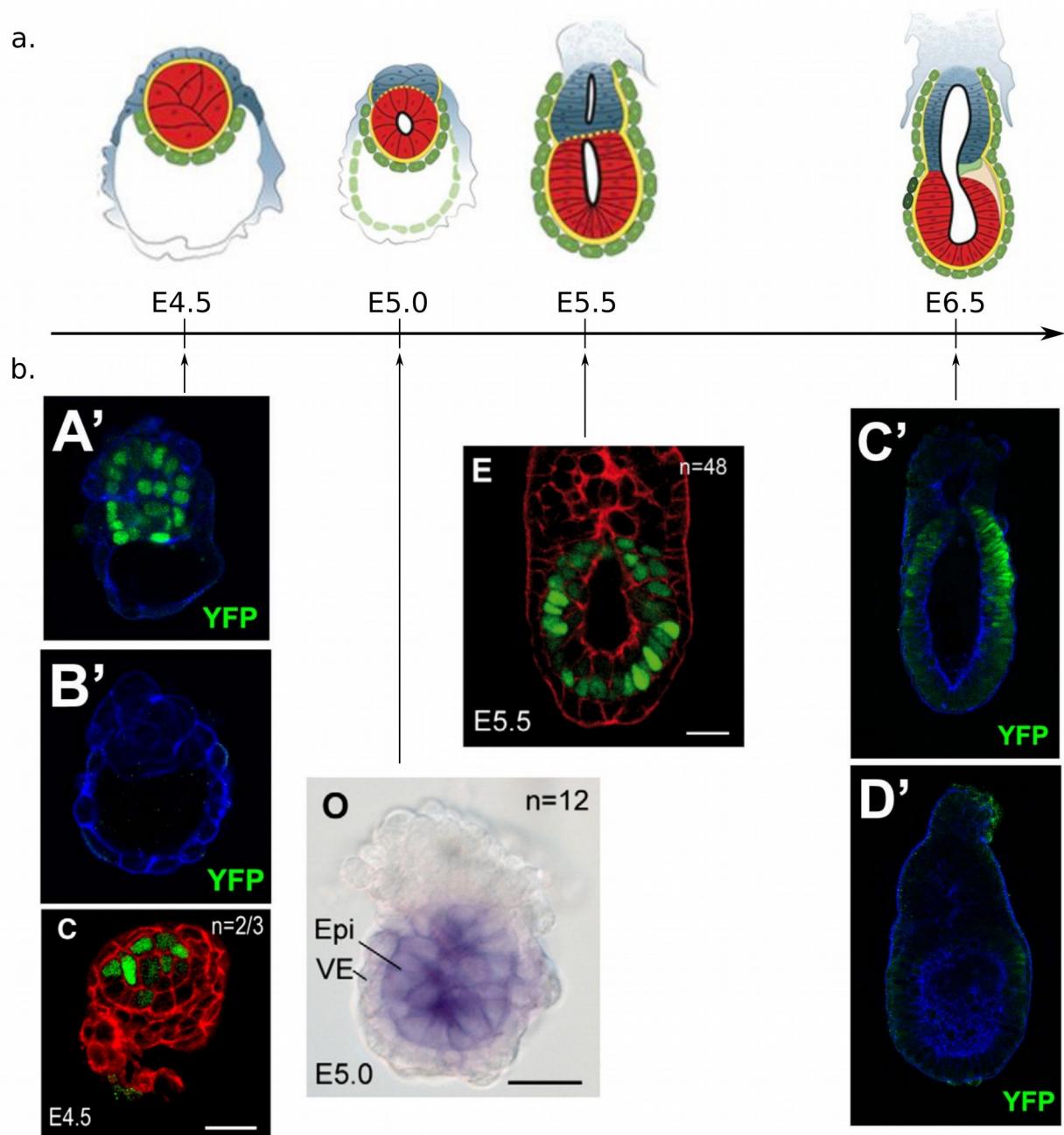


Figure 16: *Synthèse de la régulation de Nodal au stade précoce (E4.5-E6.5)*. (A', B', C', D') : Rapporteur de Nodal au locus en fluorescence, WT : (A',C'), HBE déleté : (B',D'). (C, E) : Rapporteur transgénique fluorescent d'ASE. O : Nodal en hybridation *in situ* (Granier et al., 2011; Harrison et al., 2017; Papanayotou et al., 2014)

L'élément de régulation PEE (Proximal Enhancer Element) est actif dans l'épiblaste post-implantatoire et dans la ligne primitive et peut induire une activation de l'expression de Nodal en réponse à l'activation de la signalisation Wnt/βcaténine par la fixation des facteurs de transcription de la famille TCF/LEF (Granier et al., 2011; Norris et al., 2002).

L'élément de régulation AIE (Asymmetric Initiatior Element), aussi nommé LSE (Left Side specific Enhancer) est actif dans la plaque latérale du mésoderme gauche et il est comme ASE, sensible à la signalisation Nodal, il a donc la capacité d'activer positivement sa propre expression (Saijoh et al., 2005; Vincent et al., 2004).

Enfin, l'élément de régulation NDE (NoDe Enhancer) est activé à E7.5 lors de la formation du nœud en terminaison de la ligne primitive et est sensible à la signalisation NOTCH (Adachi et al., 1999).

Comme on vient de voir, Nodal intervient dans beaucoup de mécanismes de spécialisation où sa régulation spatio-temporelle est complexe au cours du développement. Si on s'intéresse à la différenciation des cellules souches embryonnaires de souris jusqu'à la formation des feuillets embryonnaires, il est nécessaire de comprendre les mécanismes de régulation de NODAL mis en jeu.

Pour cela, une caractérisation des mécanismes de régulation, en particulier de HBE et ASE est nécessaire. Lorsque les cellules de l'ICM matures vers les cellules de l'épiblaste, on passe d'un état de pluripotence naïf vers actif : les facteurs de pluripotence vont en partie disparaître et laisser place à des facteurs plus favorables à la différenciation des cellules. Ce changement de facteur provoque la mise en place d'un nouveau paysage épigénétique au locus : on suppose que les facteurs de pluripotence, en particulier Nanog, se fixent sur HBE et l'activent, mais inhibent ASE, en bloquant la fixation des smad2/3, mais lorsque les cellules se différencient, Nanog est diminué, ce qui permet maintenant l'activation d'ASE, mais la désactivation d'HBE [Figure 17]. Notre hypothèse est que la régulation de NODAL transite d'un élément de régulation HBE vers ASE par réorganisation de la chromatine.

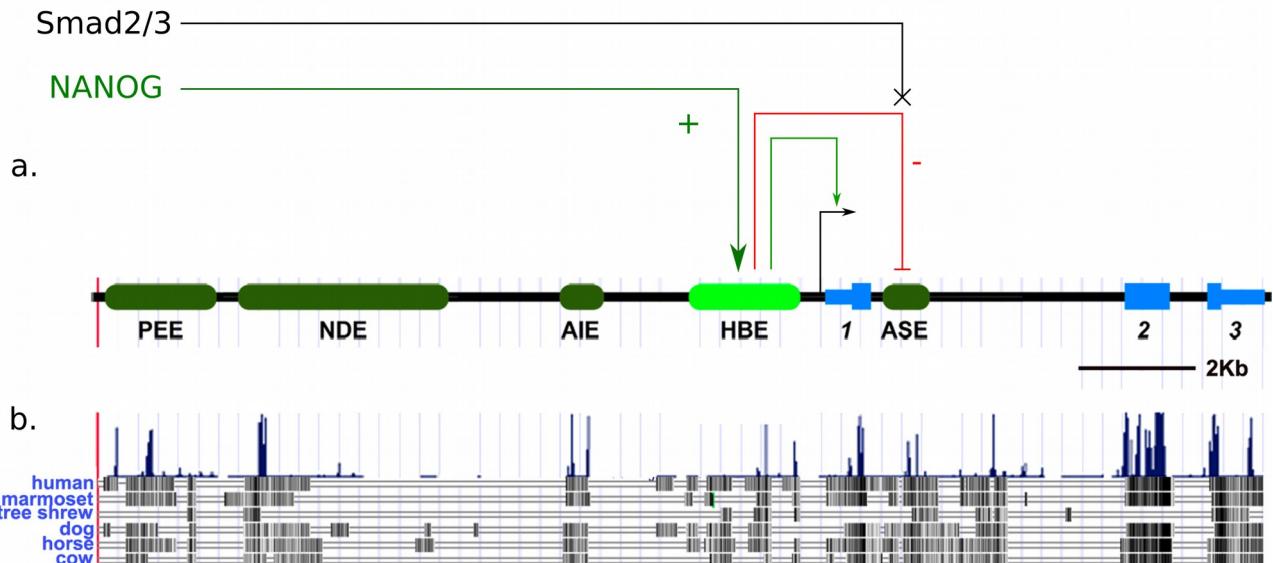


Figure 17: Vue d'ensemble du locus Nodal alignée au navigateur de génome UCSC. a. : Le locus Nodal alignée aux données de ChIP-chip et l'hypothèse de réorganisation de la chromatine. b. : Les données issues de la méthode ChIP-chip (Aparicio et al., 2004) du navigateur de génome montrant la conservation des éléments de régulation chez 5 mammifères. (Papanayotou et al., 2014)

Mon travail s'inscrit dans la continuité des travaux menée sur HBE et ASE par l'équipe de Jérôme Collignon, où l'on va mesurer le profil temporel d'expression d'un rapporteur de NODAL suivant des délétions de l'un de ces éléments de régulation. L'analyse de la réorganisation de la chromatine c'est réalisé pendant la thèse de Mathieu Vieira, où nos travaux se complète. Aussi, on a mesuré l'expression d'un rapporteur transgénique d'ASE, car celui-ci intervient tout au long de la différenciation des cellules souches embryonnaires de souris jusqu'à la gastrulation et rapporte l'activité transcriptionnelle de la voie de signalisation TGF- β .

4. Système *in vitro* pour étudier le développement précoce de l'embryon de souris

Modélisation de la maturation de l'épiblaste

La maturation de l'épiblaste correspond à l'ensemble des changements que subit ce tissu lors du passage de l'état pluripotent naïf (E3.5) à un état pluripotent activé (E6.5). Pour comprendre ces mécanismes, il est possible de dériver des cellules de celui-ci, qu'on appelle

souches embryonnaires. Ces cellules ont la capacité de s'auto-renouveler et se maintenir indéfiniment, ce qui est une propriété intéressante pour la culture cellulaire. Pour dériver et maintenir ces cellules pluripotentes, plusieurs méthodes sont possibles. Les cellules dérivées à E3.5-4.5 correspondent au « mouse Embryonic Stem Cells » (mESC) et à E5.5 au « mouse Epiblast Stem Cells » (mEpiSC).

Les premières méthodes de cultures de cellules souches embryonnaires se faisait avec du sérum de veau, des cellules nourricières (feeders) et du LIF (Leukemia Inhibitor Factor) (Evans and Kaufman, 1981; Smith et al., 1988). Pour s'affranchir de la variabilité du sérum, plusieurs équipes ont cherché à mettre au point un milieu défini chimiquement, dont un premier milieu contenant du LIF et du BMP4 vue le jour. Le BMP4 a été choisi pour inhiber la neuralisation, car les cellules sans LIF ont une tendance naturelle à former des progéniteurs neuraux (Ying et al., 2003). Depuis, il a été identifié que la différentiation des mESC est induite par FGF4 (voie ERK/MAPK) et résiduellement par WNT/β-CATENIN (GSK3) et que leur deux inhibiteurs respectifs « PD0325901 » et « CHIR99021 » permettraient la culture des mESC à l'état de pluripotence naïve (Ying et al., 2008). Ce milieu nommé « 2i+LIF » est celui que nous avons utilisé pour la culture cellulaire et dont la composition est plus détaillée au prochain chapitre. Les mESCs dans ce milieu sont plus homogènes qu'en milieu sérum.

Pour comprendre le processus embryonnaire de maturation de l'épiblaste, nous avons utilisé un protocole *in vitro*, formant des cellules similaires aux EpiSC à partir d'une population homogène de mESC : les EpiSC-like (ou EpiLC) (Hayashi et al., 2011) [Figure 18 : a]. Nous n'utilisons donc pas de mESCs en sérum car celle-ci sont dans un état pluripotent pouvant aller d'un état pluripotent naïf, à un état intermédiaire dit formatif, où il a été mesuré une variation de la méthylation d'histone de H3K27me3 chez ces cellules (Kalkan et al., 2017; Marks et al., 2012).

Pour effectuer la différenciation de mESCs 2i en EpiLCs, les cellules en culture sont placées dans un environnement similaire à celui des EpiSCs (Activine + bFGF) et atteignent l'état EpiLC en 2-3 jours, mais ensuite les cellules rentrent en apoptose si aucune différenciation n'est favorisée et se stabilise au bout de 10 jours (Guo et al., 2009). La mortalité suppose qu'une sous-population de cellules a été éliminée.

Par contre, les EpiLC au 3^e jours comparées au EpiSC établie sont les seules à pouvoir être différencier en précurseurs germinales et leurs profils transcriptionnel est plus proche des cellules directement extraites de l'épiblaste [Figure 18 : b]. On peut constater par ailleurs que les cellules EpiSC sont très hétérogènes et cela a été observé par le rapporteur Oct4-GFP (Han et al., 2010), ce qui implique que l'analyse transcriptionnel moyennée peut être faussé.

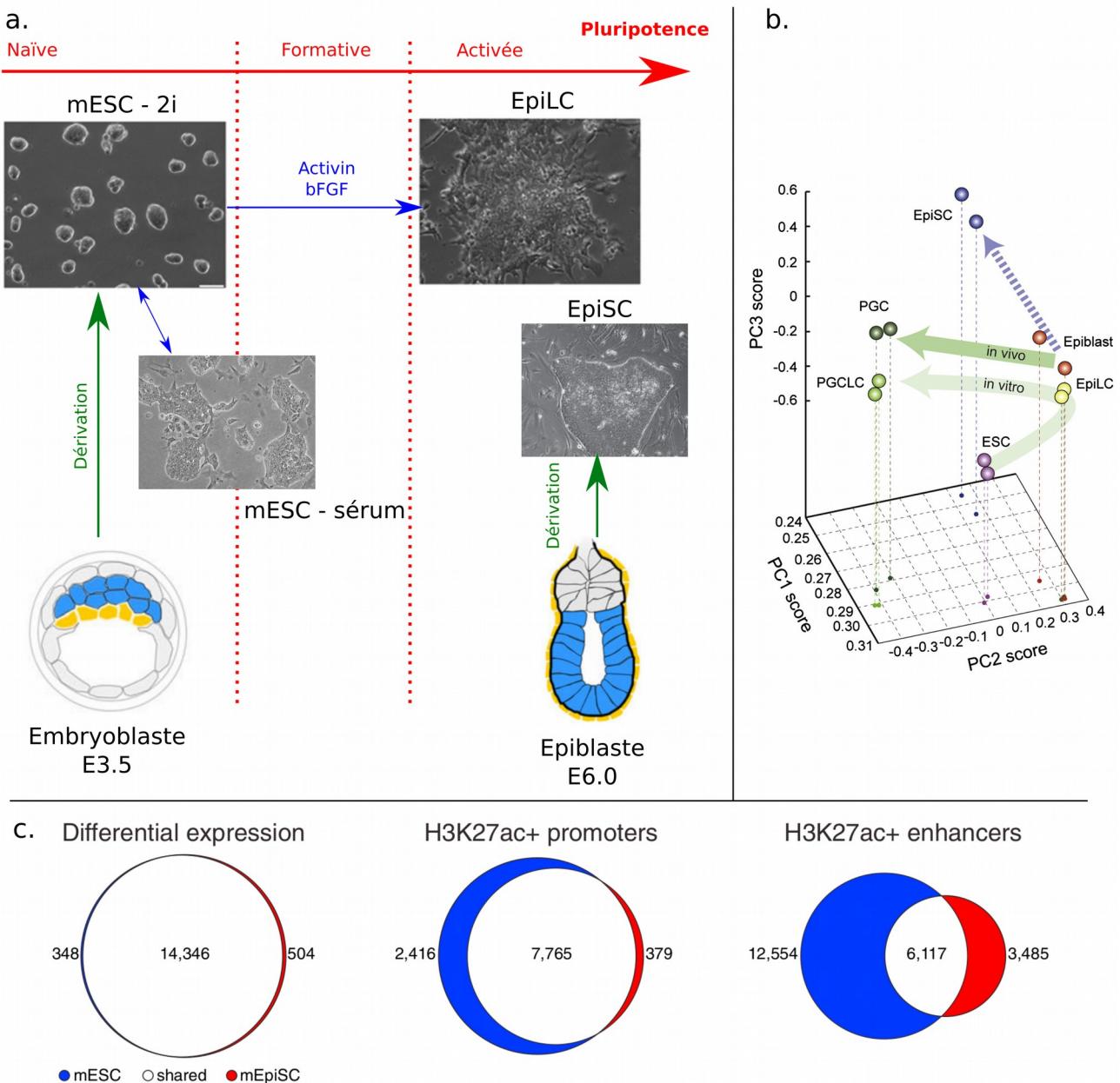


Figure 18: Vue d'ensemble de la différenciation des mESCs vers EpiLCs. a. : L'états des cellules *in vitro* au cours de la différenciation et comparaison au état *in vivo*. (Bedzhov et al., 2014; Hayashi et al., 2011; Rugg-Gunn, 2017; Tamm et al., 2013) b. : États transcriptomiques des cellules lors de la différenciation *in vivo* et *in vitro*. c. : Diagrammes de Venn montrant le nombre de recouvrements d'expression d'ARN et de marque de la chromatine aux promoteurs et aux enhancers (Factor et al., 2014).

Au cours de la différenciation des cellules mESCs naïves en EpiLCs, le répertoire d'expression génique va être modifié : près de 6 % des gènes exprimés dans ces deux états de pluripotence sont spécifiques de l'état naïf ou de l'état activé (Factor et al., 2014), mais c'est surtout en mesurant la marque de la chromatine « H3K27ac » en interaction avec l'ADN par les

données de Chip-Seq (Barski et al., 2007) et RNA-seq (Morin et al., 2008) sur les promoteurs et les éléments de régulation qu'on observe les changements les plus importants (22,9 % pour les promoteurs et 67,2 % pour les enhancers) [Figure 18 : c].

Dans notre cas, ces observations montrent que la culture en 2i est la plus fidèle pour reproduire l'état cellulaire de pluripotence naïf, et de même pour la modélisation de maturation de l'épiblaste. Cela nous donne des pistes pour comprendre les mécanismes dynamiques de réponse des cellules à une stimulation Activine/Nodal. Nos expériences se basent sur ce modèle de différenciation où l'on modifiera principalement le profil temporel de concentration d'Activine.

Approche phénoménologique pour étudier l'influence de NODAL sur la différenciation des cellules souches

On a vu que pour comprendre les mécanismes de différenciation des cellules souches, on a besoin d'étudier la dynamique temporelle de stimulation en morphogène d'une part et les mécanismes de régulation dans la cellule d'autre part. Pour répondre à ce besoin, nous avons étudié les cellules souches embryonnaires comme des systèmes entrées/sorties, où en entrée l'on a stimulé les cellules avec des signaux d'Activine et en sortie, on a mesuré en fluorescence l'expression en temps réel de rapporteurs de la voie de signalisation TGF- β , de NODAL et d'un gène lié à la différenciation cellulaire [Figure 19]. Cette approche est dite phénoménologique, car on ne prend pas en compte toute la complexité de la cellule.

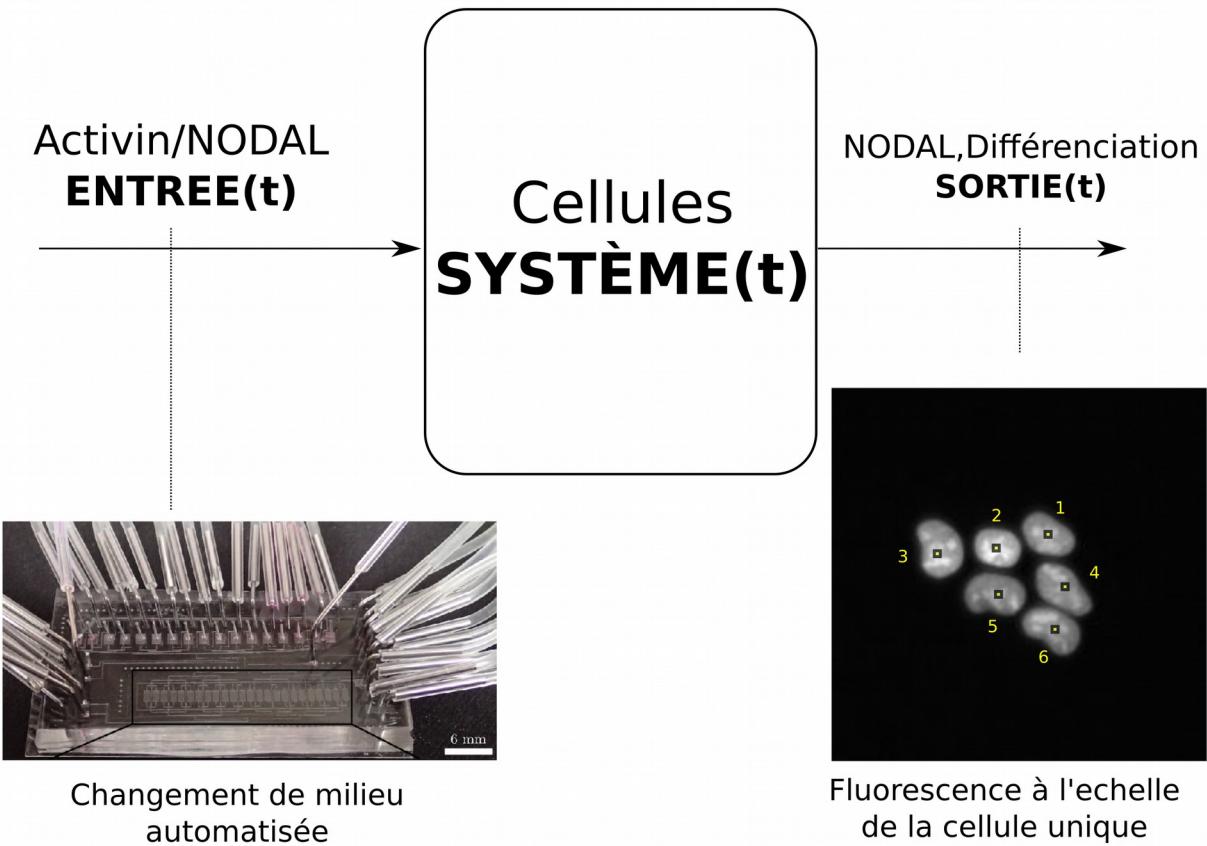


Figure 19: **Schématisation du principe expérimental.** Sont représentées, la puce microfluidique et une acquisition au microscope d'une image ayant subi une segmentation.

Pour générer des signaux, nous avons utilisé la puce microfluidique mentionnée précédemment, avec quelques optimisations pour l'adapter aux cellules souches embryonnaires [Chapitre 2, Partie 3]. La mesure de la fluorescence se fait au microscope par le biais de marqueurs de noyau, ce qui permet l'analyse « cellule unique » et une quantification des hétérogénéités éventuelle. Le système microfluidique et les lignées cellulaires sont décrites au prochain chapitre.

Pour étudier la différenciation, nous avons choisi l'analyse du profil de BRACHYURY, une protéine encodée par le gène TBXT (Edwards et al., 1996), qui joue le rôle de facteurs de transcription de la famille des gènes T-box (Scholz and Technau, 2003), très conservé chez les organismes bilatériens. Dans notre cas, nous disposons d'un rapporteur fluorescent de Brachyury et qui correspond à un marqueur précoce de la ligne primitive et donc du type cellulaire « mes-endoderme » (Herrmann, 1991) [Figure 20].

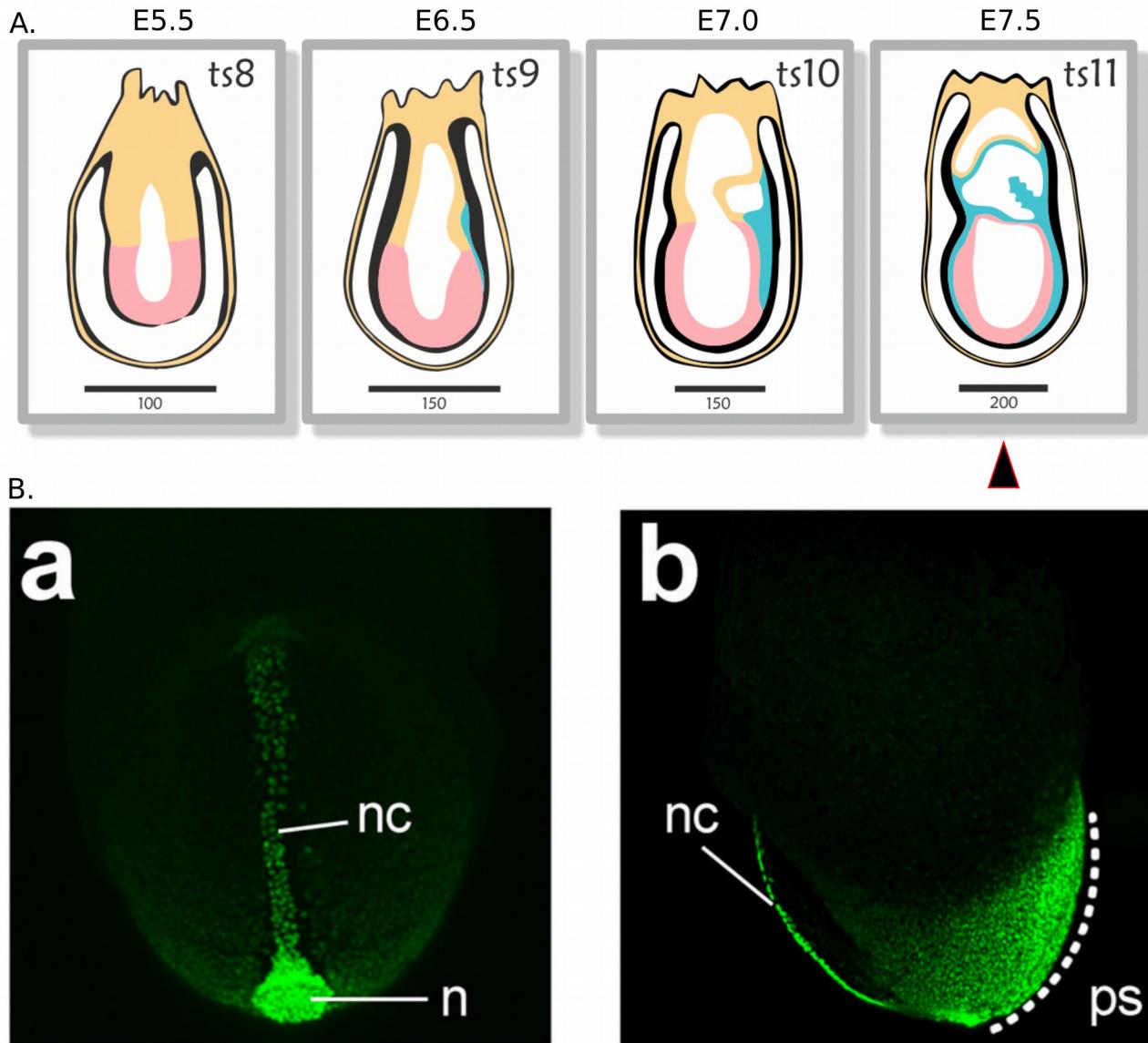


Figure 20: **Brachyury, marqueur de la formation de la ligne primitive.** A. : Stades du développement de la souris de E5.5 à E7.5 (www.emouseatlas.org). B. : Expression du rapporteur fluorescent de Brachyury à la T-box. Abréviation : n : nœud ; nc : Notochorde ; ps : primitive streak. (Imuta et al., 2013)

Dans la suite, on abordera les méthodes que j'ai mises en place pour répondre à la question fondamentale de ma thèse : « Quel est l'influence de la stimulation temporel de NODAL sur l'activité, la régulation et l'expression de NODAL des cellules souches embryonnaires, ainsi que sur leur différenciation jusqu'à la formation de la ligne primitive ? »

Références

- Adachi, H., Saijoh, Y., Mochida, K., Ohishi, S., Hashiguchi, H., Hirao, A., and Hamada, H. (1999). Determination of left/right asymmetric expression of nodal by a left side-specific enhancer with sequence similarity to a lefty-2 enhancer. *Genes Dev.* 13, 1589–1600.

- Andrault, R. Nicolas Hartsoeker, *Essai de dioptrique*, 1694. 7.
- Andrault, R. Marcello Malpighi, *De la manière dont se forme le poulet dans l'œuf*, 1686. 7.
- Aparicio, O., Geisberg, J.V., and Struhl, K. (2004). Chromatin Immunoprecipitation for Determining the Association of Proteins with Specific Genomic Sequences In Vivo. *Current Protocols in Cell Biology* 23, 17.7.1-17.7.23.
- Aulehla, A., and Pourquié, O. (2010). Signaling Gradients during Paraxial Mesoderm Development. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2.
- Balaskas, N., Ribeiro, A., Panovska, J., Dessaad, E., Sasai, N., Page, K.M., Briscoe, J., and Ribes, V. (2012). Gene Regulatory Logic for Reading the Sonic Hedgehog Signaling Gradient in the Vertebrate Neural Tube. *Cell* 148, 273–284.
- Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.-Y., Schones, D.E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I., and Zhao, K. (2007). High-Resolution Profiling of Histone Methylation in the Human Genome. *Cell* 129, 823–837.
- Beddington, R.S.P., and Robertson, E.J. (1999). Axis Development and Early Asymmetry in Mammals. *Cell* 96, 195–209.
- Bedzhov, I., Graham, S.J.L., Leung, C.Y., and Zernicka-Goetz, M. (2014). Developmental plasticity, cell fate specification and morphogenesis in the early mouse embryo. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 369, 20130538–20130538.
- Ben-Ari, Y., Brody, Y., Kinor, N., Mor, A., Tsukamoto, T., Spector, D.L., Singer, R.H., and Shav-Tal, Y. (2010). The life of an mRNA in space and time. *J Cell Sci* 123, 1761–1774.
- Ben-Haim, N., Lu, C., Guzman-Ayala, M., Pescatore, L., Mesnard, D., Bischofberger, M., Naef, F., Robertson, E.J., and Constam, D.B. (2006). The Nodal Precursor Acting via Activin Receptors Induces Mesoderm by Maintaining a Source of Its Convertases and BMP4. *Developmental Cell* 11, 313–323.
- Brennan, J., Lu, C.C., Norris, D.P., Rodriguez, T.A., Beddington, R.S.P., and Robertson, E.J. (2001). Nodal signalling in the epiblast patterns the early mouse embryo. *Nature* 411, 965–969.
- Briscoe, J., and Small, S. (2015). Morphogen rules: design principles of gradient-mediated embryo patterning. *Development* 142, 3996–4009.
- Chazaud, C., Yamanaka, Y., Pawson, T., and Rossant, J. (2006). Early Lineage Segregation between Epiblast and Primitive Endoderm in Mouse Blastocysts through the Grb2-MAPK Pathway. *Developmental Cell* 10, 615–624.
- Cherry, J.L., and Adler, F.R. (2000). How to make a Biological Switch. *Journal of Theoretical Biology* 203, 117–133.
- Conlon, F.L. (1994). A primary requirement for nodal in the formation and maintenance of the primitive streak in the mouse. *Trends in Genetics* 10, 308–308.
- Crick, F. (1970). Central Dogma of Molecular Biology. *Nature* 227, 561.
- Diwan, S.B., and Stevens, L.C. (1976). Development of Teratomas From the Ectoderm of Mouse Egg Cylinders. *J Natl Cancer Inst* 57, 937–942.
- Driever, W., Solnica-Krezel, L., Schier, A.F., Neuhauss, S.C.F., Malicki, J., Stemple, D.L., Stainier, D.Y.R., Zwartkruis, F., Abdelilah, S., Rangini, Z., et al. A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. 10.
- Edwards, Y.H., Putt, W., Lekoape, K.M., Stott, D., Fox, M., Hopkinson, D.A., and Sowden, J. (1996). The human homolog T of the mouse T(Brachyury) gene; gene structure, cDNA sequence, and assignment to chromosome 6q27. *Genome Res.* 6, 226–233.
- Evans, M.J., and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154–156.
- Factor, D.C., Corradin, O., Zentner, G.E., Saiakhova, A., Song, L., Chenoweth, J.G., McKay, R.D., Crawford, G.E., Scacheri, P.C., and Tesar, P.J. (2014). Epigenomic Comparison Reveals Activation of "Seed" Enhancers during Transition from Naive to Primed Pluripotency. *Cell Stem Cell* 14, 854–863.
- Fleming, T.P. (1987). A quantitative analysis of cell allocation to trophectoderm and inner cell mass in the mouse blastocyst. *Developmental Biology* 119, 520–531.
- Flemming, W. (1882). *Zellsubstanz, kern und zelltheilung..* (Leipzig, F. C. W. Vogel).
- Fleury, V., Chevalier, N.R., Furfaro, F., and Duband, J.-L. (2015). Buckling along boundaries of elastic contrast as a mechanism for early vertebrate morphogenesis. *The European Physical Journal E* 38.
- Gall, J.G., and Pardue, M.L. (1969). FORMATION AND DETECTION OF RNA-DNA HYBRID MOLECULES IN CYTOLOGICAL PREPARATIONS*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 63, 378–383.
- Galvin, K.E., Travis, E.D., Yee, D., Magnuson, T., and Vivian, J.L. (2010). Nodal Signaling Regulates the Bone Morphogenic Protein Pluripotency Pathway in Mouse Embryonic Stem Cells. *J. Biol. Chem.* 285, 19747–19756.
- Gardner, R.L., and Rossant, J. (1979). Investigation of the fate of 4·5 day post-coitum mouse inner cell mass cells by blastocyst injection. *Development* 52, 141–152.

- Goldin, S.N., and Papaioannou, V.E. (2003). Paracrine action of FGF4 during periimplantation development maintains trophectoderm and primitive endoderm. *Genesis* *36*, 40–47.
- Gómez-Sjöberg, R., Leyrat, A.A., Pirone, D.M., Chen, C.S., and Quake, S.R. (2007). Versatile, Fully Automated, Microfluidic Cell Culture System. *Analytical Chemistry* *79*, 8557–8563.
- Grande, C., and Patel, N.H. (2009). Nodal signalling is involved in left-right asymmetry in snails. *Nature* *457*, 1007–1011.
- Grande, C., Martín-Durán, J.M., Kenny, N.J., Truchado-García, M., and Hejnol, A. (2015). Evolution, divergence and loss of the Nodal signalling pathway: new data and a synthesis across the Bilateria. *Int. J. Dev. Biol.* *58*, 521–532.
- Granier, C., Gurchenkov, V., Perea-Gomez, A., Camus, A., Ott, S., Papanayotou, C., Iranzo, J., Moreau, A., Reid, J., Koentges, G., et al. (2011). Nodal cis-regulatory elements reveal epiblast and primitive endoderm heterogeneity in the peri-implantation mouse embryo. *Developmental Biology* *349*, 350–362.
- Green, J.B.A., New, H.V., and Smith, J.C. (1992). Responses of embryonic *xenopus* cells to activin and FGF are separated by multiple dose thresholds and correspond to distinct axes of the mesoderm. *Cell* *71*, 731–739.
- Guo, G., Yang, J., Nichols, J., Hall, J.S., Eyres, I., Mansfield, W., and Smith, A. (2009). Klf4 reverts developmentally programmed restriction of ground state pluripotency. *Development* *136*, 1063–1069.
- Gurdon, J.B. (1987). Embryonic induction — molecular prospects. *Development* *99*, 285–306.
- Haffter, P., Granato, M., Brand, M., Mullins, M.C., Hammerschmidt, M., Kane, D.A., Odenthal, J., Kelsh, R.N., Furutani-Seiki, M., Vogelsang, E., et al. The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *17*.
- Hall, M.P., Unch, J., Binkowski, B.F., Valley, M.P., Butler, B.L., Wood, M.G., Otto, P., Zimmerman, K., Vidugiris, G., Machleidt, T., et al. (2012). Engineered Luciferase Reporter from a Deep Sea Shrimp Utilizing a Novel Imidazopyrazinone Substrate. *ACS Chem Biol* *7*, 1848–1857.
- Hamada, H., Meno, C., Watanabe, D., and Saijoh, Y. (2002). Establishment of vertebrate left-right asymmetry. *Nature Reviews Genetics* *3*, 103–113.
- Han, D.W., Tapia, N., Joo, J.Y., Greber, B., Araúzo-Bravo, M.J., Bernemann, C., Ko, K., Wu, G., Stehling, M., Do, J.T., et al. (2010). Epiblast Stem Cell Subpopulations Represent Mouse Embryos of Distinct Pregastrulation Stages. *Cell* *143*, 617–627.
- Harland, R. (2008). Induction into the Hall of Fame: tracing the lineage of Spemann's organizer. *Development* *135*, 3321–3323.
- Harrison, S.E., Sozen, B., Christodoulou, N., Kyprianou, C., and Zernicka-Goetz, M. (2017). Assembly of embryonic and extraembryonic stem cells to mimic embryogenesis in vitro. *Science* *356*, eaal1810.
- Harvey, S.A., and Smith, J.C. (2009). Visualisation and Quantification of Morphogen Gradient Formation in the Zebrafish. *PLoS Biology* *7*, e1000101.
- Hayashi, K., Ohta, H., Kurimoto, K., Aramaki, S., and Saitou, M. (2011). Reconstitution of the Mouse Germ Cell Specification Pathway in Culture by Pluripotent Stem Cells. *Cell* *146*, 519–532.
- Hemmati-Brivanlou, A., and Melton, D.A. (1992). A truncated activin receptor inhibits mesoderm induction and formation of axial structures in *Xenopus* embryos. *Nature* *359*, 609.
- Hermann, B.G. (1991). Expression pattern of the Brachyury gene in whole-mount TWis/TWis mutant embryos. *Development* *113*, 913–917.
- Hooke, R. (2008). Special Collections featured item for March 2008 by Fiona Barnard, Rare Books Librarian. *9*.
- Horb, M.E., and Thomsen, G.H. A vegetally localized T-box transcription factor in *Xenopus* eggs specifies mesoderm and endoderm and is essential for embryonic mesoderm formation. *11*.
- Imuta, Y., Kiyonari, H., Jang, C.-W., Behringer, R.R., and Sasaki, H. (2013). Generation of knock-in mice that express nuclear enhanced green fluorescent protein and tamoxifen-inducible Cre recombinase in the notochord from *Foxa2* and *T* loci: Mouse Lines Expressing EGFP and Inducible CRE. *Genesis* *51*, 210–218.
- Irie, N., and Kuratani, S. (2014). The developmental hourglass model: a predictor of the basic body plan? *Development* *141*, 4649–4655.
- Kalkan, T., Olova, N., Roode, M., Mulas, C., Lee, H.J., Nett, I., Marks, H., Walker, R., Stunnenberg, H.G., Lilley, K.S., et al. (2017). Tracking the embryonic stem cell transition from ground state pluripotency. *Development* *144*, 1221–1234.
- Kerszberg, M., and Wolpert, L. (2007). Specifying Positional Information in the Embryo: Looking Beyond Morphogens. *Cell* *130*, 205–209.
- Kessler, D.S., and Melton, D.A. (1995). Induction of dorsal mesoderm by soluble, mature Vg1 protein. *Development* *121*, 2155–2164.

- Lacoste, A., Berenshteyn, F., and Brivanlou, A.H. (2009). An Efficient and Reversible Transposable System for Gene Delivery and Lineage-Specific Differentiation in Human Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell* *5*, 332–342.
- Lee, M.A., Heasman, J., and Whitman, M. (2001). Timing of endogenous activin-like signals and regional specification of the *Xenopus* embryo. *Development* *128*, 2939–2952.
- Marks, H., Kalkan, T., Menafra, R., Denissov, S., Jones, K., Hofemeister, H., Nichols, J., Kranz, A., Francis Stewart, A., Smith, A., et al. (2012). The Transcriptional and Epigenomic Foundations of Ground State Pluripotency. *Cell* *149*, 590–604.
- Massagué, J., Seoane, J., and Wotton, D. (2005). Smad transcription factors. *Genes Dev.* *19*, 2783–2810.
- Mehling, M., and Tay, S. (2014). Microfluidic cell culture. *Current Opinion in Biotechnology* *25*, 95–102.
- Mendel, G. EXPERIMENTS IN PLANT HYBRIDIZATION (1865). 41.
- Morin, R.D., Bainbridge, M., Fejes, A., Hirst, M., Krzywinski, M., Pugh, T.J., McDonald, H., Varhol, R., Jones, S.J.M., and Marra, M.A. (2008). Profiling the HeLa S3 transcriptome using randomly primed cDNA and massively parallel short-read sequencing. *BioTechniques* *45*, 81–94.
- Moses, H.L., Roberts, A.B., and Deryck, R. (2016). The Discovery and Early Days of TGF- β : A Historical Perspective. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* *8*, a021865.
- Nichols, J., Chambers, I., Taga, T., and Smith, A. (2001). Physiological rationale for responsiveness of mouse embryonic stem cells to gp130 cytokines. *Development* *128*, 2333–2339.
- Norris, D.P., Brennan, J., Bikoff, E.K., and Robertson, E.J. (2002). The Foxh1-dependent autoregulatory enhancer controls the level of Nodal signals in the mouse embryo. *Development* *129*, 3455–3468.
- Papaioannou, V.E., McBurney, M.W., Gardner, R.L., and Evans, M.J. (1975). Fate of teratocarcinoma cells injected into early mouse embryos. *Nature* *258*, 70.
- Papanayotou, C., Benhaddou, A., Camus, A., Pereira-Gomez, A., Jouneau, A., Mezger, V., Langa, F., Ott, S., Sabéran-Djoneidi, D., and Collignon, J. (2014). A Novel Nodal Enhancer Dependent on Pluripotency Factors and Smad2/3 Signaling Conditions a Regulatory Switch During Epiblast Maturation. *PLoS Biology* *12*, e1001890.
- Pellegrin, P. *Histoire des animaux*. 69.
- Rappolee, D.A., Basilico, C., Patel, Y., and Werb, Z. (1994). Expression and function of FGF-4 in peri-implantation development in mouse embryos. *Development* *120*, 2259–2269.
- Ross, S., Cheung, E., Petrakis, T.G., Howell, M., Kraus, W.L., and Hill, C.S. (2006). Smads orchestrate specific histone modifications and chromatin remodeling to activate transcription. *EMBO J* *25*, 4490–4502.
- Rugg-Gunn, P. (2017). Derivation and Culture of Epiblast Stem Cell (EpiSC) Lines. *Cold Spring Harbor Protocols* *2017*, pdb.prot093971.
- Saijoh, Y., Oki, S., Tanaka, C., Nakamura, T., Adachi, H., Yan, Y.-T., Shen, M.M., and Hamada, H. (2005). Two nodal-responsive enhancers control left-right asymmetric expression of Nodal. *Developmental Dynamics* *232*, 1031–1036.
- Saka, Y., and Smith, J.C. (2007). A mechanism for the sharp transition of morphogen gradient interpretation in *Xenopus*. *BMC Dev Biol* *7*, 47.
- Sander, K. (1992). Shaking a concept: Hans Driesch and the varied fates of sea urchin blastomeres. *Roux's Arch. Dev. Biol.* *201*, 265.
- Sander, K. (1997). “Mosaic work” and “assimilating effects” in embryogenesis: Wilhelm Roux’s conclusions after disabling frog blastomeres. In *Landmarks in Developmental Biology 1883–1924: Historical Essays from Roux’s Archives*, K. Sander, ed. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 13–15.
- Schier, A.F., and Shen, M.M. (2000). Nodal signalling in vertebrate development. *Nature* *403*, 385.
- Schmierer, B., and Hill, C.S. (2007). TGF β -SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *8*, 970–982.
- Schohl, A., and Fagotto, F. (2002). β -catenin, MAPK and Smad signaling during early *Xenopus* development. *Development* *129*, 37–52.
- Scholz, C.B., and Technau, U. (2003). The ancestral role of Brachyury: expression of NemBra1 in the basal cnidarian *Nematostella vectensis* (Anthozoa). *Dev. Genes Evol.* *212*, 563–570.
- Schulte-Merker, S., Hammerschmidt, M., Beuchle, D., Cho, K.W., Robertis, E.M.D., and Nusslein-Volhard, C. (1994). Expression of zebrafish goosecoid and no tail gene products in wild-type and mutant no tail embryos. *Development* *120*, 843–852.
- Schwann, T. (1839). *Mikroskopische Untersuchungen über die Uebereinstimmung in der Struktur und dem Wachsthum der Thiere und Pflanzen* (Berlin: Sander).
- Shen, M.M. (2007). Nodal signaling: developmental roles and regulation. *Development* *134*, 1023–1034.
- Smith, A.G., Heath, J.K., Donaldson, D.D., Wong, G.G., Moreau, J., Stahl, M., and Rogers, D. (1988). Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* *336*, 688.

- Sokol, S., Christian, J.L., Moon, R.T., and Melton, D.A. (1991). Injected Wnt RNA induces a complete body axis in *Xenopus* embryos. *Cell* *67*, 741–752.
- Sorre, B., Warmflash, A., Brivanlou, A.H., and Siggia, E.D. (2014). Encoding of Temporal Signals by the TGF- β Pathway and Implications for Embryonic Patterning. *Developmental Cell* *30*, 334–342.
- Spemann, H., and Mangold, H. (2001). Induction of embryonic primordia by implantation of organizers from a different species. 1923. *Int. J. Dev. Biol.* *45*, 13–38.
- Tamm, C., Pijuan Galitó, S., and Annerén, C. (2013). A Comparative Study of Protocols for Mouse Embryonic Stem Cell Culturing. *PLoS ONE* *8*, e81156.
- Tapscott, S.J. (2005). The circuitry of a master switch: Myod and the regulation of skeletal muscle gene transcription. *Development* *132*, 2685–2695.
- Tu, Y., Shimizu, T.S., and Berg, H.C. (2008). Modeling the chemotactic response of *Escherichia coli* to time-varying stimuli. *PNAS* *105*, 14855–14860.
- Vincent, S.D., Norris, D.P., Ann Le Good, J., Constam, D.B., and Robertson, E.J. (2004). Asymmetric Nodal expression in the mouse is governed by the combinatorial activities of two distinct regulatory elements. *Mechanisms of Development* *121*, 1403–1415.
- Warmflash, A., Zhang, Q., Sorre, B., Vonica, A., Siggia, E.D., and Brivanlou, A.H. (2012). Dynamics of TGF- β signaling reveal adaptive and pulsatile behaviors reflected in the nuclear localization of transcription factor Smad4. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *109*, E1947–E1956.
- Watanabe, M., Masuyama, N., Fukuda, M., and Nishida, E. (2000). Regulation of intracellular dynamics of Smad4 by its leucine-rich nuclear export signal. *EMBO Rep* *1*, 176–182.
- Weismann, A. (1887). Ueber die Zahl der Richtungskörper und über ihre Bedeutung für die Vererbung. (Jena: G. Fischer).
- Wilson Edmund B. (1925). *The Cell In Development And Heredity*.
- Wolpert, L. (1969). Positional Information and the Spatial Pattern of Cellular Differentiation. *47*.
- Wolpert, L. (2002). *Principles of development* (Oxford: Oxford University Press).
- Yamamoto, M., Meno, C., Sakai, Y., Shiratori, H., Mochida, K., Ikawa, Y., Saijoh, Y., and Hamada, H. (2001). The transcription factor FoxH1 (FAST) mediates Nodal signaling during anterior-posterior patterning and node formation in the mouse. *Genes Dev.* *15*, 1242–1256.
- Ying, Q.-L., Nichols, J., Chambers, I., and Smith, A. (2003). BMP Induction of Id Proteins Suppresses Differentiation and Sustains Embryonic Stem Cell Self-Renewal in Collaboration with STAT3. *Cell* *115*, 281–292.
- Ying, Q.-L., Wray, J., Nichols, J., Battle-Morera, L., Doble, B., Woodgett, J., Cohen, P., and Smith, A. (2008). The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* *453*, 519–523.
- Zhou, X., Sasaki, H., Lowe, L., Hogan, B.L.M., and Kuehn, M.R. (1993). Nodal is a novel TGF- β -like gene expressed in the mouse node during gastrulation. *Nature* *361*, 543.

II. Méthodes et Système expérimental

Dans ce chapitre, je détaille toutes les méthodes que j'ai utilisées durant ma thèse. Les premières sections porteront sur des méthodes standards en biologie (culture cellulaire, différenciation, immunofluorescence et RT-qPCR). Je présenterai ensuite les méthodes plus spécifiques à mon projet de thèse : des rapporteurs fluorescents pour suivre en temps réel la réponse des cellules par l'expression de gènes ou l'activité d'une voie de signalisation et une puce microfluidique permettant de stimuler les cellules avec des profils temporels complexes de morphogènes. Enfin, je discuterai des algorithmes d'analyse d'image que j'ai utilisés pour traiter mes données.

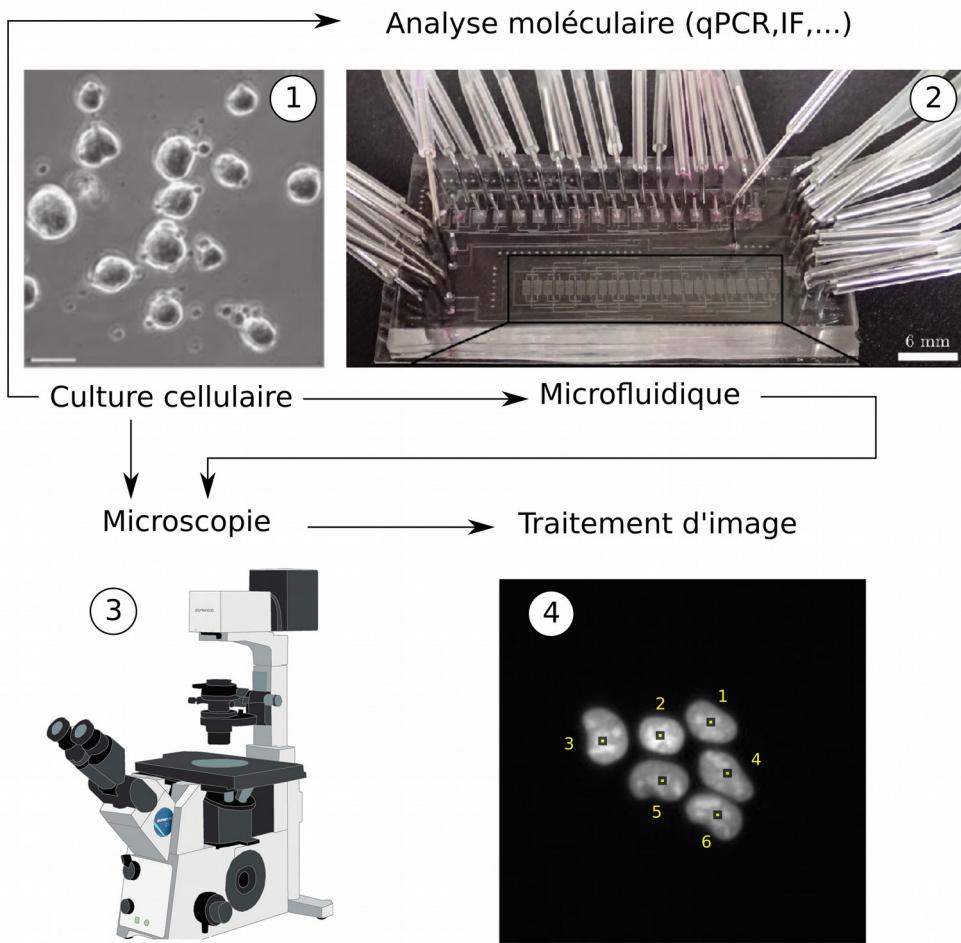


Figure 21: Vue d'ensemble des méthodes pour répondre à nos questions. De 1 à 4, l'ordre de réalisation d'une expérience jusqu'à son analyse. 1 : Des cellules souches embryonnaire de souris, image tirée d'Hayashi, 2 : La puce microfluidique, en encadré noir, on retrouve les chambres de cultures, 3 : Le microscope à fluorescence IX81 et 4 : Une image d'acquisition de noyau de cellule avec sa segmentation.

1. Culture, différenciation et construction cellulaire

Culture des cellules souches embryonnaire (mESC)

Pour étudier *in vitro* la dynamique de voies de signalisation au cours de la maturation de l'épiblaste, il n'est évidemment pas réaliste d'extraire des cellules d'un embryon pour chacune de nos expériences. Heureusement pour nous, il est possible de multiplier des cellules embryonnaires en conservant leur état pluripotent.

Les premières méthodes pour faire proliférer des cellules embryonnaires de souris en cultures ont été développées dans les années 1980 (Evans and Kaufman, 1981). Des cellules extraites par dissection de la masse cellulaire interne (ICM) d'un embryon de souris à 4 jours après la fertilisation (E4.0) sont mise en co-culture avec des cellules fibroblastes embryonnaires (mouse embryonic fibroblasts, MEF) dans un milieu nutritif contenant du sérum de veau fœtal (FBS) et du Leukemia Inhibition Factor (LIF). Les MEFs permettent de fournir tous les facteurs de prolifération pour la cellule, le LIF inhibe la différenciation des cellules souches (Williams et al., 1988). Aujourd'hui, on sait que le « LIF » est naturellement exprimé par les cellules entourant l'embryoblaste (le trophectoderme) (Salleh and Giribabu, 2014).

L'utilisation de MEF et du FBS pour cultiver les cellules peut être source de variabilité. Pour améliorer la reproductibilité et pouvoir travailler avec des cultures de qualité constante, des milieux dont la composition chimique est entièrement définie ont depuis été développés (Ying et al., 2008) dont le plus utilisé, le milieu « 2i ». Le milieu « 2i » est composé des milieux « N2 » (Moliner et al., 2008) et « B27 » (Tropepe et al., 2001) et des inhibiteurs « PD0325901 » de la voie de signalisation kinase MAPK/ERK/MEK, « CHIR99021 » de la voie de signalisation GSK3 et le « LIF » et favorise l'auto-renouvellement cellulaire (Ying et al., 2008).

La culture des cellules s'est réalisée dans les conditions de cultures standards à 37 °C et 5 % CO₂, où l'on a limité le nombre maximal de passage à 10-15 de façons à limiter les instabilités génomiques et la perte de pluripotence (Giachino et al., 2013; Tamm et al., 2013).

Milieu de culture « 2i » pour 200 ml (En gras, lors de l'inoculation du milieu) :

- 1 ml de N2 (Lifetech #17502-048).
- 2 ml de B27 (Lifetech #17504-044).
- 2 ml de Penstrep (Lifetech #15140-122).
- 2 ml de L-Glutamin (Lifetech #25030-024).
- 0.1mM β -mercaptoethanol.(Life Technologies 31350-010)
- 1.3ml BSA 7,5 % (Lifetech #15260-037).
- 100 ml DMEM/F12 (Lifetech #21331-020).
- 100 ml Neurobasal medium (Lifetech #21103-049).
- 3 μ M CHIR99021 (Cell guidance system SM13-10).
- 1 μ M PD0325901 (Cell guidance system SM26-10).

- 1 000 U/ml LIF (Millipore ESG1107).

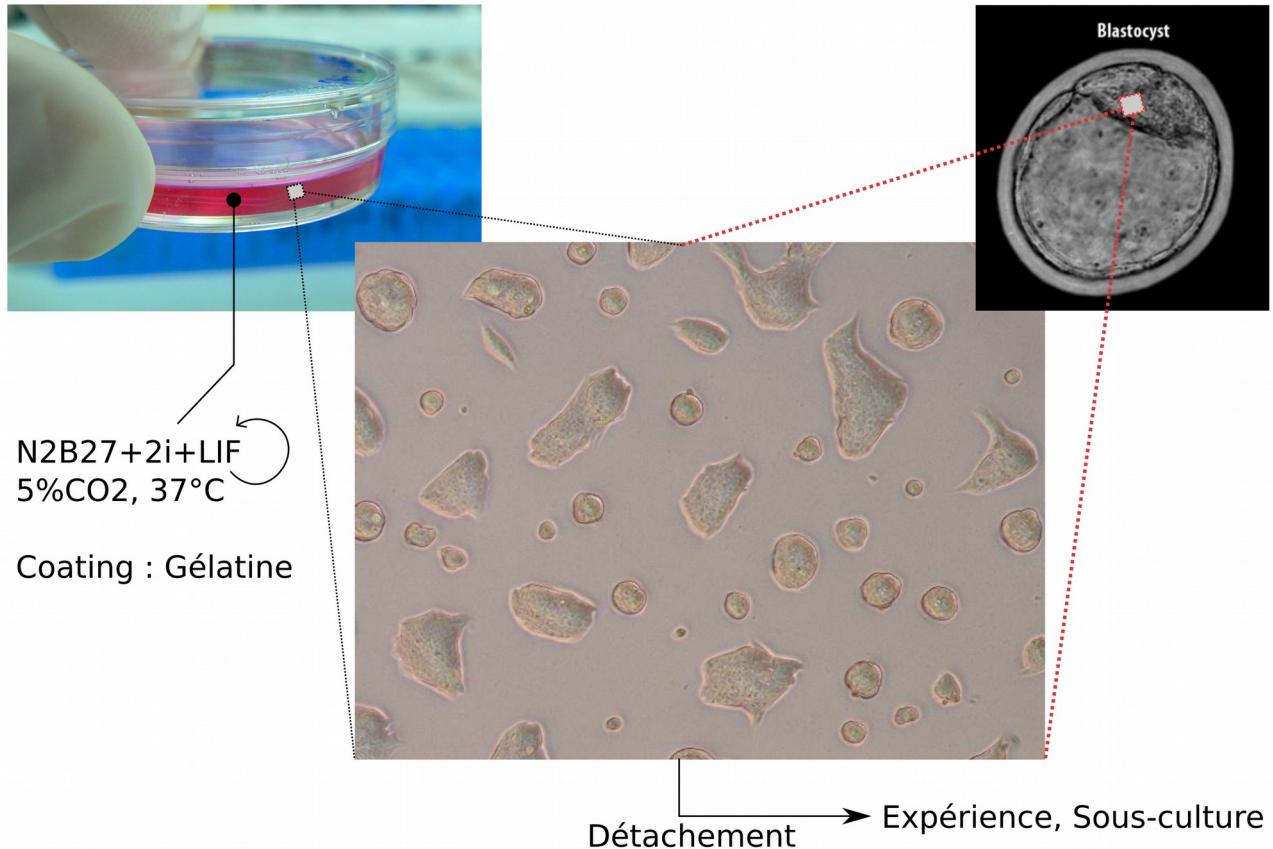


Figure 22: **Culture cellulaire avec équivalence dans l'embryon de souris.** En haut à gauche, une boîte de Pétri avec le milieu de culture, au milieu, une photo de cellule vue au microscope et en haut à droite, un embryon de souris au 4ème jours. (Wolpert, 2002)

Passage des cellules

Les cellules se divisant toutes les 15-20h elles doivent être « passées » ou « repiquées » pour être maintenues en culture. Lorsque les cellules forment de « grosses » colonies soit entre 30 et 100 cellules (~6 divisions) elles doivent être passées, cela consiste à détacher des cellules de la boîte de Pétri et de transférer une petite partie de ces cellules dans une nouvelle boîte de Pétri [Figure 22]. Généralement, la dilution est d'un facteur 20 à 200, mais le nombre de cellules transférées dépend du nombre de cellules nécessaires aux expériences. Il est conseillé de compter les cellules lors des passages, par exemple,ensemencer 10 000 cellules dans une boîte de 35 mm de diamètre permet de passer un week-end du vendredi au lundi matin et 50 000 cellules si on veut une boîte pleine 2 jours plus tard. On a constaté que le nombre de cellules qu'on ensemence ne doit pas être trop élevée, sinon les cellules ne forment pas de

colonie, mais s'étaisent sur la surface, on ne peut donc pas avoir une densité initiale trop élevée.

Protocole de passage cellulaire :

1. Préparation des boites de pétri en les recouvrant d'une solution de gélatine 0.15 % pour faciliter l'adhérence.
2. Aspirer les milieux de cultures de la boite de Pétri. Le rinçage des cellules avec une solution tampon PBS (*Phosphate buffered saline*) est déconseillé, car les mESC n'adhèrent pas bien au substrat lorsqu'elle forme de grosse colonie.
3. Inoculer une solution de Trypsine 0.05 % pendant 3-4 minutes à 37 °C. La quantité de milieu ne doit pas être trop élevée pour que l'action de la Trypsine soit plus efficace (0.5ml pour une boite de 35 mm de diamètre). Vérifier au microscope si nécessaire, à forte densité, les amas de cellule sont visibles à l'œil nu.
4. Mélanger la Trypsine pour casser les agrégats de cellule et la désactiver avec un milieu DMEM + sérum 15 % FBS d'un volume deux fois supérieur à celui de la Trypsine et centrifuger le tout pendant 3 minutes à 300 RCF.
5. Aspirer le surnageant et mélanger avec 1 ml de Milieu N2B27 sans 2i, sauf si l'on utilise tout le milieu de culture, ou dans le cas des expériences en puce microfluidique (voir Partie 3). Compter les cellules à l'aide d'un Hématimètre de Malassez au microscope.
6. En fonction de la quantité de cellule souhaité, diluer une proportion du mélange avec du milieu N2B27+2i+LIF (PD0325901, 0.4 mM ; CHIR99021, 3 mM ; LIF 1 000 u/ml) et inoculer le mélange sur une boite de pétri.

Congélation/Décongélation des cellules

Une proportion des cellules du passage cellulaire peut également être placée dans le milieu sérum DMEM + sérum 40 % FBS supplémenté de 10 % DMSO pour être congelées à une densité de 6×10^6 cellules par ml en moyenne. Les ampoules de cellules sont ensuite placées dans une boite en polystyrène dans un congélateur à – 80 °C pendant 24 heures, puis dans l'azote liquide pour la conservation à long terme.

Pour décongeler les cellules, on dilue le DMSO avec le milieu sérum dans un volume au moins deux fois supérieur à celui de la congélation. On centrifuge pendant 3 minutes à 300 RCF le mélange, la suite correspond aux mêmes étapes 5 et 6 du passage cellulaire.

Différenciation des mESC en mEpiLC

Depuis que les mESC sont disponibles, des protocoles ont été publiés pour les différencier dans n'importe quels types cellulaires, généralement en s'inspirant des voies de signalisation impliquées dans l'embryon pour obtenir le tissu en question (Keller, 2005). Pour modéliser la maturation de l'épiblaste qui nous a intéressé pendant ma thèse, plusieurs protocoles de différenciation de cellule embryonnaire ont été publiés (Guo et al., 2009; Hayashi and Saitou, 2013; Ohinata et al., 2009; Tesar et al., 2007). Dans ce protocole, le milieu maintenant la pluripotence (N2B27+2i) est remplacé par un milieu contenant de l'Activine, un morphogène activant la voie de signalisation Nodal et du FGF, qui sont deux voies de signalisation connues pour être activées durant la maturation de l'épiblaste. Après 72 h, une population homogène de cellules dont le profil transcriptionnel est proche de l'épiblaste post-implantatoire est obtenue que les auteurs de l'étude ont appelé Epiblast like cells ou « EpiLC » [voir Chapitre 1, Partie 4] [Figure 23]. Parmi les autres protocoles existants, celui-ci à l'avantage de différencier des cellules à une durée équivalente de ce qu'on peut observer dans l'embryon.

Ce protocole est donc à la base de notre étude pour mesurer l'effet de la dynamique de stimulation de la voie de signalisation Nodal sur la différenciation des cellules souches. Nous le modifierons principalement en changeant le profil temporel de la concentration en Activine.

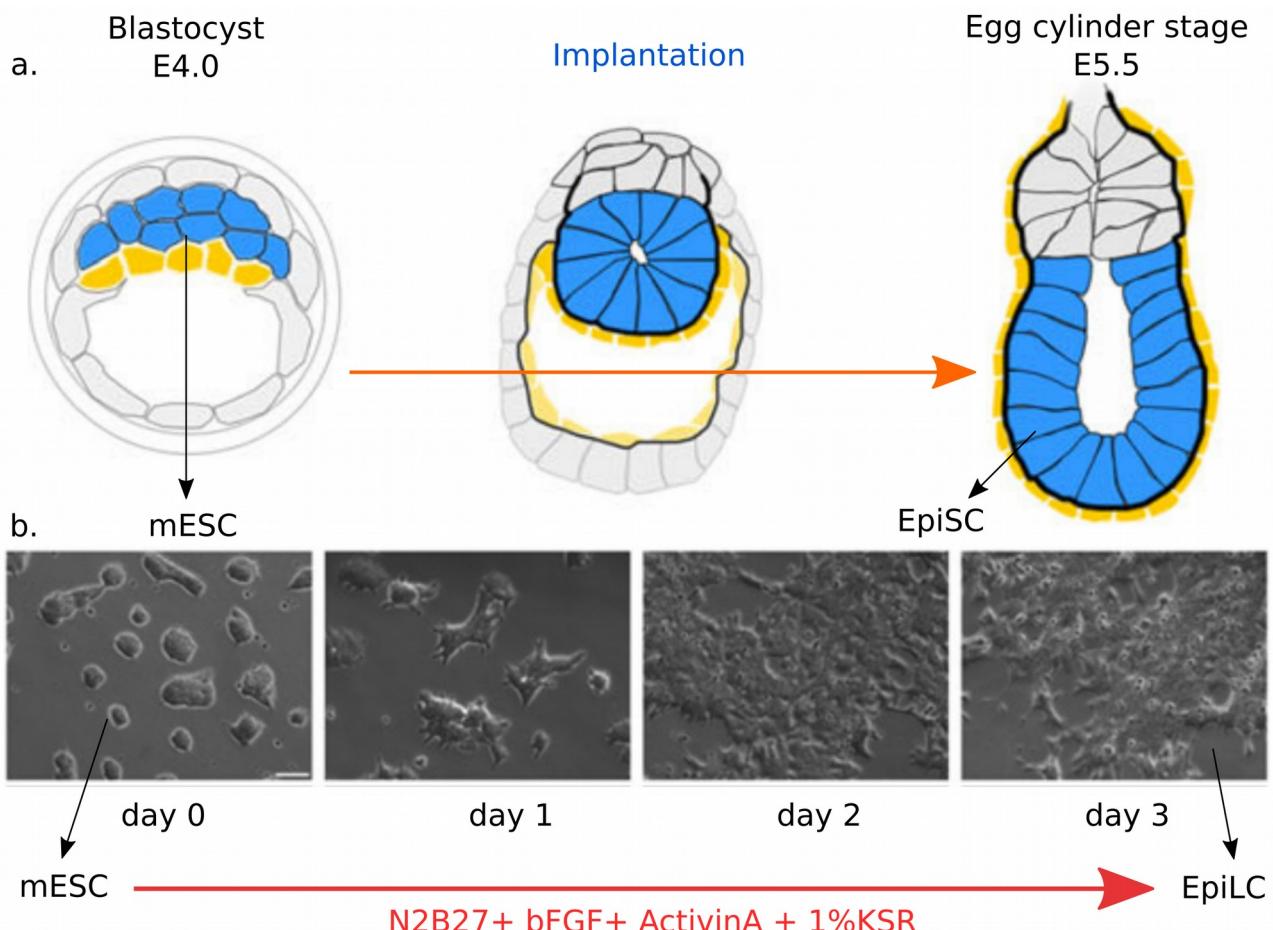


Figure 23: **mESC vers EpiLC**, un modèle pour étudier la maturation de l'épiblaste. a. : Représentation de la différenciation des cellules bleues dans l'embryon. En bas, photographie des cellules cultivé en boîte de pétri au différent jours de différenciation. (Bedzhov et al., 2014; Hayashi et al., 2011)

Protocole d'Hayashi :

1. Préparation des boîtes de pétri en les recouvrant d'une solution PBS + Fibronectine (20 µg/ml).
2. Passage des cellules. Re-suspension des cellules dans du milieu N2B27 (sans 2i).
3. Compter le nombre de cellules nécessaire pour la différenciation, puis diluer la proportion de cellule dans du milieu N2B27+ ActivineA 20 ng/ml (Cell guidance system GFM29) + bFGF 12 ng/ml (Cell guidance system GFM12) + KSR 1 % (GIBCO 10828010).
4. Inoculer le nouveau milieu sur une boîte de pétri.
5. Le milieu est renouvelé tous les jours. On obtient des cellules souches de l'épiblaste-like au bout de 72 h et celles-ci peuvent ensuite être analysées.

2. Méthodes permettant de mesurer l'évolution temporelle d'expression d'un gène en réponse à une stimulation

Les méthodes classiques « end-point » :

C'est à partir des années 1950-1960 que les biologistes ont appris à isoler, caractériser et manipuler les composants moléculaires des cellules et des organismes (Morange, 2000). Classiquement, la détection de l'évolution de l'expression d'un gène en fonction d'une stimulation peut se faire soit au niveau de l'ARN messager, soit de la protéine. Nous aborderons deux techniques très utilisées en biologie moléculaire, l'une pour mesurer la localisation de protéine dans une cellule et l'autre pour quantifier l'expression d'un gène par une population de cellule.

Immuno-fluorescence

La détection d'une protéine fait en général appel à un anticorps primaire spécifique de cette protéine (Coons, 1949). La protéine peut être détectée soit en lysat cellulaire (western Blots) soit directement sur des tissus fixés comme en immuno-fluorescence. C'est principalement cette dernière technique que nous avons utilisée, car elle permet de mesurer la présence de protéine à l'échelle de la cellule unique et donc la variabilité entre cellules. L'immunofluorescence en culture cellulaire que nous avons utilisée correspond aux techniques standard [Figure 24].

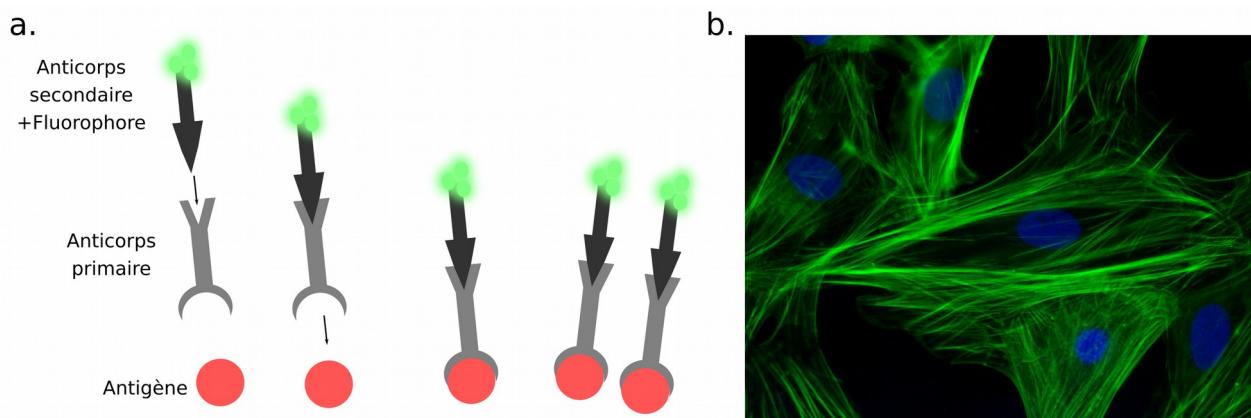


Figure 24: **Principe simplifié de l'immunofluorescence.** a. : Ordre de fixation des protéines pour réaliser une expérience d'Immunofluorescence. b. : Exemple d'images « type » qu'on peut obtenir en immunofluorescence, en vert, les filaments d'actine et en bleu les noyaux en DAPI (Ps1415, Wikipedia)

Protocole d'immunofluorescence :

1. Fixation rapide des cellules par l'agent réticulant PFA 4 % (Paraformaldéhyde) pendant 20 minutes.
2. Rinçage deux fois des cellules avec une solution de PBS afin d'enlever les résidus de PFA.
3. **Dénaturation des protéines cellulaires par de détergent SDS 1 % pendant 30 minutes à 37 °C.**
4. Saturation des sites non spécifiques avec une solution perméabilisant avec Albumine PBT (BSA 1 % + Triton X-100 dans PBS), deux fois pendant 30 minutes.
5. Dilution des anticorps primaire dans une solution PBT. Les anticorps sont dilués selon les recommandations du fabricant (1:500 pour pSmad2 et Smad2/3). Incuber toute la nuit à 4 °C.
6. Rinçage deux fois 30 minutes des cellules avec une solution PBT pour enlever le superflu d'anticorps primaire.
7. Dilution des anticorps secondaire et du DAPI dans une solution PBT. Les anticorps et le DAPI sont dilués selon les recommandations du fabricant (1:1000 pour les anticorps et 1:500 pour le DAPI). Incuber 2-3h à température ambiante à l'abri de la lumière.
8. Rinçage deux fois 30 minutes des cellules avec une solution de PBS.
9. Montage de l'échantillon sur lame avec le milieu de conservation ProLong® Gold antifade reagent (P36931).

Les protocoles d'immunofluorescence peuvent être très différents suivants les types d'expériences, par exemple, l'étape de dénaturation avec du SDS 1 % est obligatoire dans le cas où l'on utilise un anticorps pSmad2, mais pas nécessaire dans les cas où l'on ne mesure pas l'activité d'une protéine non phosphorylée.

RT-qPCR

La méthode d'immunofluorescence, souffre de deux limitations importantes : elle ne permet de détecter qu'au maximum 4 protéines simultanément et un bon anticorps n'est pas toujours disponible pour chaque protéine.

Pour mesurer l'expression d'un grand panel de gènes pour une même expérience, une des techniques très utilisée est la RT-qPCR (*Reverse Transcriptase – quantitative Polymerase Chain Reaction*) qui détecte la présence d'ARN messager. Après avoir lysé les cellules, on purifie leur ARNm, qu'on va ensuite convertir en ADN grâce à une « Transcriptase inverses » (RT) (Baltimore, 1970). La présence d'un ADN est ensuite détectée par l'amplification PCR avec des amorce spécifiques du gène d'intérêt (Mullis et al., 1989). Le résultat peut être analysé par électrophorèse sur gel d'agarose, ou grâce à un appareil de PCR quantitative (qPCR) qui a l'avantage de donner une mesure de la quantité d'ADN présent dans l'échantillon. C'est cette dernière méthode que nous avons utilisée qui se sépare en deux étapes, la RT puis la qPCR.

L'extraction de l'ARN est effectuée à partir du culot de cellule via le kit Nuclospin RNA (Macherey Nagel 740955). L'extraction est effectuée conformément aux recommandations du fabricant et l'élution finale est réalisée dans 50 μ l d'eau stérile distillée à température ambiante deux fois sur la colonne de silice fournie. Les ARN sont stockés au - 80 °C pour la conservation.

La réaction de transcription est réalisée à l'aide de la Superscript Vilo (Thermo Fisher 11754050) dans un volume final de 10 μ l avec 400 ng d'ARN. La réaction est incubée pendant 1 h à 42 °C avant d'être inactivée à 85 °C pendant 5 minutes.

Les qPCR sont réalisées à l'aide de 3.5 μ l de SyBR Green (Roche 04707516001), 0.75 μ l de chaque primer à 5 μ M et 2 μ l de cDNA dilués au 1/50. Chaque réaction est réalisée en duplicat et une gamme étalon de 6 dilutions de cDNA de 1/10 à 1/320 est effectuée pour chaque amorce afin de réaliser la quantification relative des échantillons. Dans chaque

expérience un gène est choisi pour normaliser la quantité de cDNA placée dans chacune des conditions. Les qPCR sont effectuées dans un LightCycler 480 et analysées soit à l'aide des outils logiciels du LightCycler480 soit à l'aide d'un code « home-made » en python.

Les Oligos (amorces) ont été choisies par l'équipe de Jérôme Collignon, Jean-Louis Plouhinec et la base de donnée libre MGI (<http://www.informatics.jax.org/>) dont la liste est la suivante :

Séquence amplifiée	Primer sens	Primer Anti-sens
GAPDH	TTCAACAGCAACTCCCACTCTTC	CCCTGTTGCTGTAGCCGTATT
Nodal	CTGTGAGGGCGAGTGCCTA	CAGTGGCTGGTCTCACGG
Lefty1	AGGGTGCAGACCTGTAGCTG	GGAAGCAAAGAGCACACACA
Fgf5	TGTACTGCAGAGTGGGCATC	ACAATCCCCTGAGACACAGC
Bra	AAGAACGGCAGGAGGATGT	TCACGAAGTCCAGCAAGAAA
Nanog	TTGCTTACAAGGGTCTGCTACT	ACTGGTAGAAGAACATCAGGGCT
Oct4	AGTTGGCGTGGAGACTTGC	CAGGGCTTCACTGCTCTGG
Id1	GAGTCTGAAGTCGGGACCAC	GAGTCCATCTGGTCCCTCAG
Foxa2	GAGCAGCAACATCACCACAG	CGTAGGCCCTTGAGGTCCAT
Hand1	AAAAGGGAGTTGCCTCAGCA	CGGCGTTGGCCTGGTC
Sox2	GCTCCGAGACCTACATGAAC	GCCTCGGACTTGACCAACAG
Cdx2	TAGGAAGCCAAGTGAAAACCACCT	CTGATGGTGATGTATCG
Wnt3	CTAATGCTGGCTTGACGAGG	ACATGGTAGAGAGTGCAGGC
Otx2	GGAGAGGACGACATTACTAGG	TTCTGACCTCCATTCTGCTG
Gsc	GGAGACGAAGTACCCAGACG	CGGCGGTTCTAAACCAAG
p63	GCATGGATTGTATCCGCATG	GCCCCAGGTTCTGTACTGT
Tbx6	ACCGCTACCCTGATTGGATA	AGATGGGAGAAGGGGCAAAG
Sox1b	CAAGATGGCCCAGGAAAAC	TCGGACATGACCTCCACTC
Sfrp2	ATCCTGGAGACAAAGAGCAAGACCT	TGACCAAGATACTGGAGCGTTGATG
Gata4	TCAACCGGCCCTCATTAAG	GTGGTGGTAGTCTGGCAGT
Stella	TTCAAAGCGCCTTCCCAA	ACATCTGAATGGCTCACTG
Noggin	CTCGGGGGCCACTACGAC	GCACGAGCACTGCACACTCG
Pitx2	GTCCGTGAACTCGACCTTTT	GCAGCCGTTGAATGTCTCTTC

Au cours de l'expérience dans la machine à qPCR, l'ADN de nos échantillons va être amplifié par deux à chaque cycle de polymérisation et l'appareil va mesurer la fluorescence du produit de qPCR au cours du temps de l'amplification. Cette machine va aussi mesurer la courbe de fusion, mais cela correspond à une étape de vérification qui permet de voir s'il y a ou non plusieurs produits de PCR qui ont été amplifiés, pour cela, à la fin de l'étape d'amplification de l'ADN, la machine va passer de 45 °C à 75 °C par palier de 0.1 °C et cela en faisant l'acquisition de l'intensité de fluorescence en continu.

L'avantage de la qPCR est qu'elle permet de déterminer la quantité initiale d'ADN qu'on a par échantillon, en effet, lorsqu'on mesure en temps réel le profil de fluorescence, on peut savoir à partir de quel cycle commence la croissance exponentielle de l'amplification de l'ADN. La courbe de fluorescence a le profil d'une sigmoïde, lorsque le nombre de produit de

PCR est trop faible, on n'a pas assez de produit pour que la machine détecte la fluorescence et lorsque la quantité d'ADN est trop forte, on est en régime de saturation à cause de l'apparition de facteur limitant (quantité de polymérase, nombre d'amorce, fluorophore). Les courbes de cinétique d'amplification d'ADN par cycle sont ajustés par une sigmoïde pour chaque échantillon, de cette façon, on peut récupérer la valeur du « cycle seuil » (C_t) relatif à la quantité d'ADN initiale.

La valeur de la quantité d'ADN initiale relative est caractérisée par la gamme d'étalonnage des 6 dilutions de cDNA de 1/10 à 1/320. Avec cette méthode, chaque « C_t » sera décalé d'un cycle et lorsqu'on reporte ces « c_t » sur un axe en échelles semi-log, on se retrouve avec une courbe de références affine. À partir de la fonction affine obtenue, on peut d'une part savoir si l'ADN a été amplifié deux fois par cycle par le coefficient directeur et la quantité d'ADN par l'ordonnée à l'origine. Les quantités d'ADN sont ensuite normalisées par le nombre de cellules par un gène exprimé de manière constante par les cellules, la gamme GAPDH (Iglesias and Losada, 1988) [Figure 25].

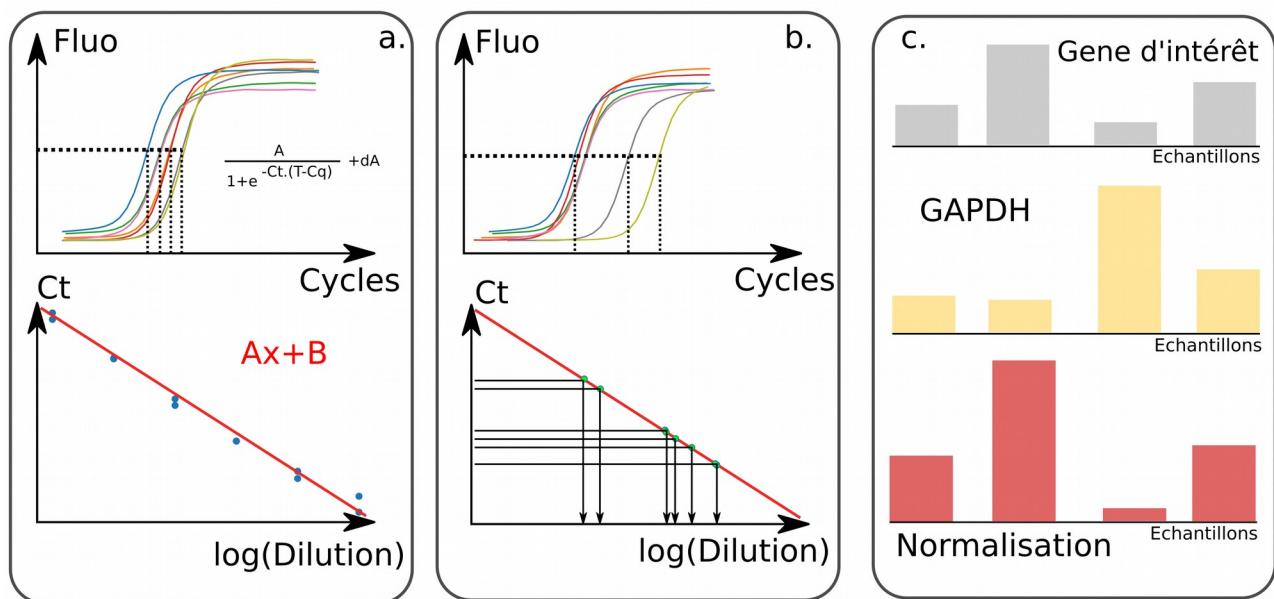


Figure 25: Résumé de la quantification des données de qPCR. a. : Gamme d'étalonnage avec sa droite représenté en bas. b. : Report des « C_t » sur la droite d'étalonnage. c. : Normalisation des échantillons des quantités relatives par rapport à GAPDH. Les étapes de vérification ne sont pas représentées ici.

Algorithme d'analyse des données du LightCycler 480 (sans les étapes de vérification) :

1. Import du fichier contenant les courbes d'amplification avec « `pandas.read_csv` ».
2. Fit des courbes d'amplification pour tous les échantillons par une sigmoïde avec « `scipy.optimize.curve_fit` ».

3. Calculs de la droite d'étalonnage avec « `sklearn.linear_model.LinearRegression` ».
4. Report des « `ct` » de chaque échantillon sur la droite d'étalonnage.
5. Normalisation des échantillons par rapport à un gène standard (GAPDH).

Les données obtenues par la RT-qPCR, nous permettent de suivre l'évolution de l'expression d'un grand ensemble de gènes par expérience. Pour représenter ces données, nous avons utilisé la méthode de classification hiérarchique de Ward et l'analyse de composante principale (PCA).

Pour la méthode de Ward, nous avons utilisé le module python « `scipy.cluster.hierarchy` », cette méthode est un algorithme qui va chercher à obtenir un minimum local de l'inertie pour chaque classe statistique partitionnée. À la fin de l'algorithme, chaque sous-ensemble statistique partage des caractéristiques communes (Ward, 1963) et se représente sous forme de heatmap.

L'analyse en composante principale (PCA) est un outil statistique incontournable si l'on veut représenter la cinétique d'expression d'un grand ensemble de gène sur un graphique à 2-3 dimensions. Pour la PCA, nous avons utilisé le module python « `sklearn.decomposition.PCA` », son algorithme va calculer la matrice de covariance de l'ensemble des points, puis chaque point va être projeté sur l'espace propre de cette matrice. Les vecteurs propres avec les valeurs propres les plus élevées caractérisent le mieux la variance du nuage de points et sont dit « principaux ». Enfin, on ne représente que les points des axes principaux pour interpréter les données (Hotelling, 1936; Pearson, 1901).

les méthodes permettant le suivi en temps réel de l'expression de gènes : Les rapporteurs fluorescents

Les deux méthodes présentées précédemment permettent de mesurer l'expression de gènes de manière flexible. Par contre, elles nécessitent soit la lyse des cellules, soit la fixation des échantillons, ce qui limite les possibilités de mesure en fonction du temps et interdit le suivi en cellule unique de l'expression d'un gène.

Pour notre étude, nous voulions suivre l'expression de Nodal, l'activité de la voie TGF- β et un gène lié à la différenciation en temps réel. Pour cela nous avons utilisé des lignées modifiées

génétiquement pour exprimer des protéines fluorescentes (FP) rapportant l'activité d'un gène. On parle alors de rapporteur fluorescent (Arun et al., 2005; Phillips, 2001).

Nous n'avons pas nous même dérivé les lignées, car elles ont été fournies en grande partie par notre collaborateur Jérôme Collignon ou une équipe tierce. On a utilisé les lignées ASE-YFP, ASE-CFP, Nodal-YFP (*Nodal*^{condHBE-YFP}), HBE-, ASE- et BRA-GFP (T-GFP).

Les lignées ASE-YFP et ASE-CFP ont été établies par l'équipe de Jerome Collignon (Granier et al., 2011) en modifiant le plasmide ASE-LacZ (Norris and Robertson, 1999). Les ASE-FP sont des lignées transgéniques, elles rapportent l'activité de l'élément de régulation et de la voie de signalisation TGF-β lors de la gastrulation. Lorsque nous avons récupéré cette lignée, le signal YFP était très hétérogène, après passage clonal, nous avons pu récupérer des clones qui répondaient de manière homogène alors que d'autres ne répondaient pas, l'hétérogénéité est donc sûrement due à une perte ou une extinction du transgène.

Les lignées Nodal-YFP (*Nodal*^{condHBE-YFP}) et HBE- ont été établies par l'équipe de Jerome Collignon (Papanayotou et al., 2014) par recombinaison homologue. La lignée Nodal-YFP, aussi nommée HBE+, rapporte l'activité de Nodal à l'un des locus. La lignée HBE- rapporte l'activité de Nodal où l'élément de régulation HBE a été excisé par l'action de la recombinase CRE. L'élément HBE est présent sur l'allèle sans rapporteur fluorescent, HBE- est (+/-) (Papanayotou et al., 2014).

La lignée ASE- a été établie par Mathieu Vieira (Jerome Collignon) à l'aide d'un plasmide CRISPR contenant l'ARN guide et une Cas9-2A-OFP (Life Technologies A2117) et à partir des Nodal-YFP. La Cas9 est une enzyme capable de cliver les deux brins d'ADN. Sa fixation est guidée par un ARN guide (gRNA) qui se fixe par homologie de séquence sur une séquence ADN. Le choix des gRNA a été établi à l'aide de l'outil CRISPR MIT (<http://crispr.mit.edu/> du Laboratoire du Pr Zhang (Hsu et al., 2014). Les cibles sélectionnées dans son étude ont été choisies avec un score d'off-target potentiel supérieur à 80/100 afin de minimiser le risque d'effets indésirables. Les gRNA utilisée pour ASE-/ sont 5'ACGATTCTAACTACAGAT et 3'CGGCGGCGGGTCAGAC. Le génotypage par PCR a été réalisé dans son étude (Vieira, 2018).

La lignée BRA-GFP (ou T-GFP) a été établie de l'équipe d'Hiroshi Sasaki (Imuta et al., 2013), par recombinaison homologue. Elle rapporte l'activité du gène Brachyury à la T-box. La cassette ACN contenant la néomycine décrite dans l'article a été enlevée au laboratoire par transfection de recombinase CRE pour que l'expression du rapporteur BRA-GFP soit opérationnelle.

Marquage des noyaux

L'expression des rapporteurs fluorescents est mesurée par l'analyse d'image, mais pour pouvoir segmenter les cellules, on a besoin de marquer les noyaux. Le marquage nucléaire des lignées précédemment cité s'est réalisé à partir de la méthode « PiggyBac Transposon System » (Cadiñanos and Bradley, 2007; Grabundzija et al., 2010).

La méthode des « PiggyBac » permet transposer une séquence d'ADN plusieurs fois dans le chromosome des cellules. Durant la transposition, la transposase reconnaît une séquence de répétition terminale (TIR) et va y déplacer le contenu du vecteur dans le génome. Les séquences TIR sont fréquentes dans le génome, le signal fluorescent de marquage est amplifié suivant les cellules [Figure 26].

La construction des plasmides a été établies par Carine Vias au laboratoire par les techniques standard de restriction/ligation et transformation/amplification en biologie moléculaire. Les extractions d'ADN ont été réalisées conformément au kit Nucleospin DNA (Macherey Nagel 740955). Le plasmide utilisé durant notre étude est l'ePB-93-Z (epB-Zeo-CAG-TagRFP-hH2B) et la transposase ePB210PA-1 décrite dans le manuel PiggyBacTM Transposon Vector System (SBI Cat. #Pbxxx-1).

Le plasmide ePB-93-Z est coupé par la transposase et la séquence Zeo-CAG-TagRFP-hH2B est inséré dans le génome des cellules à la suite de la transfection. La cellule exprime de manière constitutive un gène de sélection taggé avec une H2B-RFP. H2B (ou Histone H2B) est une protéine qui participe à la condensation/décondensation de la chromatine durant la mitose et la méiose (Wu et al., 2016), associé avec une RFP, elle permet de visualiser le noyau de la cellule. De la même manière pour la protéine NLS (*nuclear localization signal*) qui cible les protéines du noyau cellulaire.

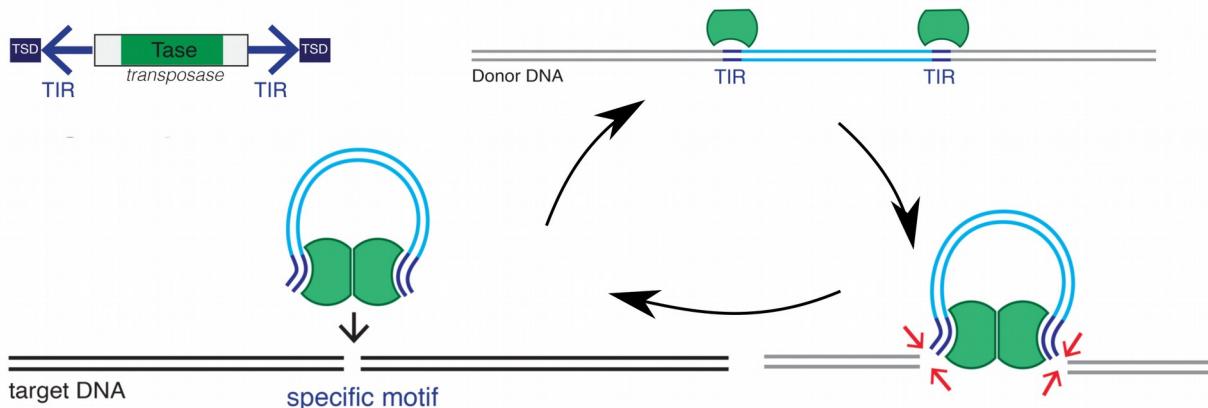


Figure 26: **Méthodes d'insertion par transposa-se.** Le principe de l'ePiggyBac-Bag est d'avoir deux plasmides, l'un avec le transposon et l'autre avec la transposase qui va répéter en boucle l'insertion de la séquence d'ADN suivant des motifs d'ADN cible. Abréviation : séquence de répétition terminale (TIR) et (image adaptée de Wikipédia)

La transfection est un processus qui permet de transférer des gènes dans une cellule eucaryote. Nous avons utilisé la Lipofectamine 3000 (Invitrogen L3000015) en suivant les instructions du fabricant. La Lipofectamine contient des sous-unités lipidiques qui peuvent former des liposomes dans un environnement aqueux, ce qui piége les plasmides. Les liposomes contenant de l'ADN sont chargés positivement à leur surface et peuvent fusionner avec la membrane plasmique chargée négativement, ce qui largue l'ADN dans le cytoplasme (Dalby, 2004).

Protocole de transfection :

1. Mesure de la quantité d'ADN plasmique et mélange avec la Lipofectamine. Deux alicots : 500 ng d'ADN + 1 µl de P3000, 1,5 µL de LF3000.
2. Mélange du milieu de transfection avec les cellules cultivées en boîte de pétri pendant 24 h à 10^5 cellules par puits d'une plaque 24 puits. Le Taux de transfection est de 30-50 % selon les plasmides.
3. **48 h après transfection, passage des cellules dans une plaque 6 puits pour que la sélection soit plus efficace. Ajout de la sélection par antibiotique.**
4. Au passage suivant, ensemencement des cellules dans une plaque 6 puits entre 100 et 500 cellules par puits.
5. Repiquage des colonies individuelles au bout d'une semaine. Les colonies sont visibles à l'œil nu pour qu'on puisse les récupérer à la P10.

L'étape 3 n'est pas indiquée dans le protocole d'invitrogen, les cellules souches embryonnaires forment des colonies en 2i, lorsqu'on sélectionne les cellules avec un antibiotique, si toutes les cellules ne sont pas positives dans une colonie, les cellules mortes vont provoquer le décollement des colonies et diminuer le taux d'efficacité de sélection.

3. La puce microfluidique pour la culture cellulaire

Puce microfluidique avec valve intégrée

Nous voulons stimuler nos cellules avec différents profils temporels de concentration en Activine. Faire des changements simples comme des « marches » de concentration peut être facilement fait à la main. En revanche des signaux plus complexes comme des impulsions à haute fréquence ou des rampes de signal deviennent vite impossibles à réaliser à la main, d'autant plus que la durée de l'expérience est longue (Ex : Changer la concentration toutes les 4 h pendant 4 jours). Pour ce genre de stimulation nous avons fait appel à l'automatisation rendue possible par la microfluidique.

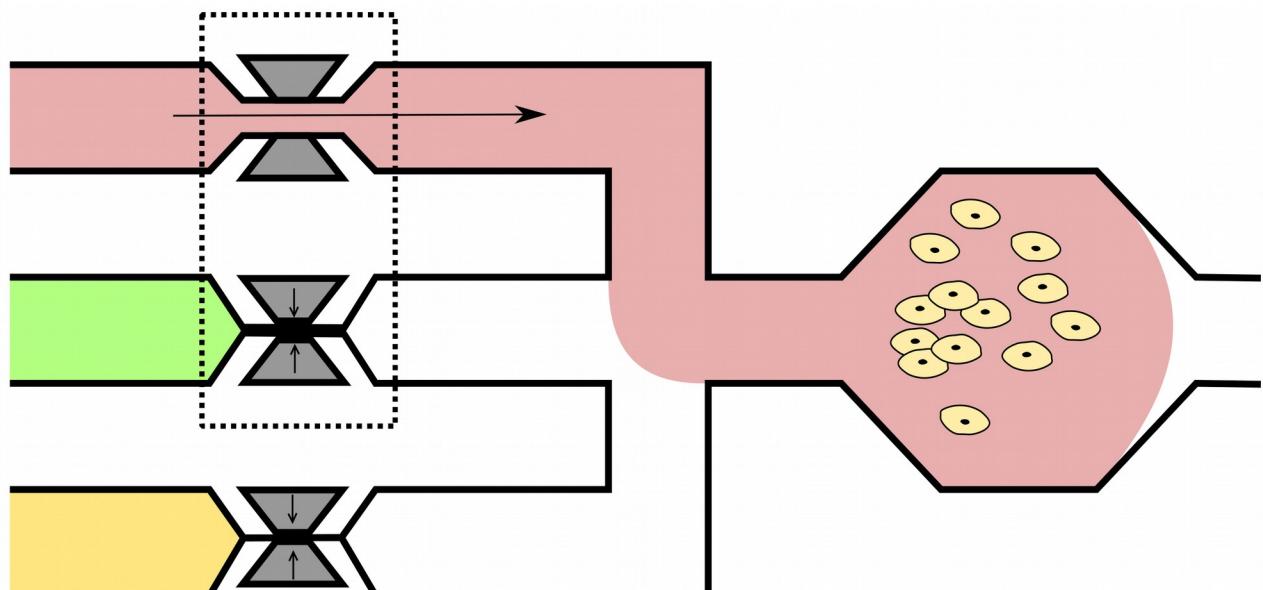


Figure 27: Analogie d'un système de valve dans une puce microfluidique. En rouge, vert et bleu 3 milieux possible. Les cellules sont dans la chambre de culture.

Pour répondre à ce besoin, on s'est orienté vers un système microfluidique automatisé. La microfluidique est une technologie qui a émergé dans les années 1980 avec la création des « LabOnChip » (Whitesides, 2006). L'idée était d'exploiter les propriétés des fluides à l'échelle micrométrique, là où les écoulements sont laminaires, pour miniaturiser des fonctions d'un laboratoire. On peut citer par exemple les chromatographes HPLC (*high pressure liquid chromatography*), qui fait partie des meilleures techniques pour séparer des substances dans un mélange.

Aujourd'hui, on est capable d'utiliser la microfluidique pour cultiver des cellules sans que cela impacte la survie des cellules, mais dans notre cas, on a besoin en plus de changer les milieux de culture au cours du temps [Figure 27]. Pour changer de milieu de culture au cours du temps, on a plusieurs possibilités, soit on utilise un système hydraulique « macro » avec des valves qui vont ouvrir/fermer l'arrivée d'un milieu nutritif dans une chambre de culture, soit on intègre nos valves dans la puce microfluidique. Un système « macro » aura en général des volumes morts importants ce qui limite la rapidité avec laquelle les milieux peuvent être changés et est difficile à paralléliser, nous avons donc utilisé la microfluidique avec valves intégrées.

Module élémentaire de la microfluidique automatisée : La valve microfluidique

Ainsi, nous avons choisi d'utiliser une puce microfluidique intégrant des valves de contrôle, les puces sont en PDMS (poly(diméthylsiloxane)—[O-Si(CH₃)₂]_n—), un polymère biocompatible, transparent (Peterson et al., 2005) et composée d'un mélange élastomère de silicone/réticulant. Le PDMS ne nous pose pas de problème pour la culture cellulaire et l'observation de l'expression de protéines fluorescentes sous microscope. Le système de valve microfluidique s'apparente à un système de valve « macro », l'idée est de pincer le canal comme on pourrait le faire avec un tuyau d'arrosage lorsqu'on veut bloquer le jet d'eau, pour notre système de valve microfluidique, c'est le même principe, une couche de PDMS fine et déformable va « pincer » le canal de flux lorsque celui-ci est sous pression et bloquer ainsi le passage du courant. Pour que la valve soit opérationnelle, le canal de flux est arrondi au croisement avec le canal de contrôle (Unger, 2000) [Figure 28].

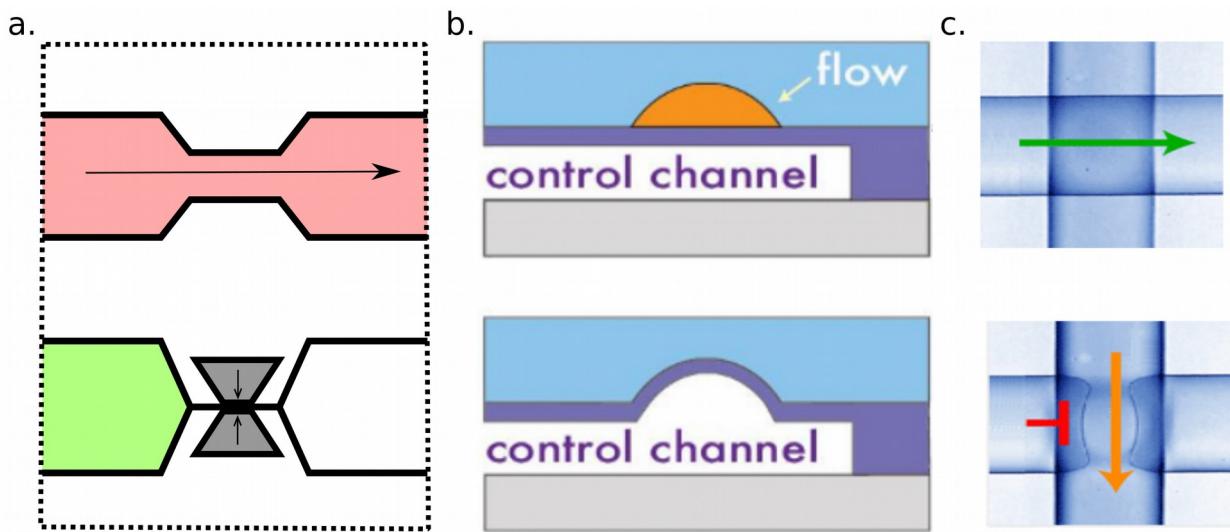


Figure 28: **Schématisation du principe de fonctionnement des valves dans la puce microfluidique.** a. : Principe d'une valve, ouvert en haut, fermé en bas. b. : Vue de profil de la valve (Brower et al., 2017). c. : Image de la valve vue au microscope (Gómez-Sjöberg et al., 2007).

Pour réaliser cette puce avec des valves, on a besoin de superposer 2 couches de PDMS puis placer l'ensemble sur une lamelle de verre [Figure 31]. La difficulté est qu'il est nécessaire d'aligner deux masques à l'échelle du dixième de millimètre pour que les valves soient positionnées au bon endroit de la puce. On peut résumer la réalisation de la puce en 3 étapes :

1. Moulage en PDMS des parties « Flux » et « Contrôle » sur les wafers en silicium et également du PDMS sur la partie « lamelle », le tout suivi d'une cuisson d'environ 1 h.
2. Positionnement de la couche rigide « Flux » sur la couche souple « Contrôle », nécessite un alignement au microscope, puis cuisson de l'assemblage.
3. Assemblage de la bi-couche sur la lamelle de verre, suivi d'une cuisson de 24 h minimum.

Pour l'assemblage du PDMS sur une lamelle de verre, il existe plusieurs techniques, où l'on distingue, d'une part, la méthode de bonding direct « Plasma Oxygen Bonding » (Beh et al., 2012) qui génère des groupes Si-OH silanol sur le verre de la lamelle et permet la liaison Si-O-Si avec le PDMS et, d'autre part, celle que nous utilisons, la méthode directe « Thermal bonding » (Tsao and DeVoe, 2009) où une fine couche de PDMS est au préalable cuite sur la lamelle de verre pour permettre leur liaison. La couche de PDMS sur lamelle n'est pas complètement cuite de façon à ce que l'assemblage entre les interfaces réticule.

Fonction permise par les valves microfluidiques

Le système de valve permet de réaliser plusieurs fonctionnalités en les arrangeant dans la puce microfluidique. Les deux fonctions que l'on a expérimentées sont la pompe péristaltique et le multiplexeur.

La pompe péristaltique est la première fonction du système de valve qui a été proposée et décrite par le laboratoire de Quake (Unger, 2000). Elle est initialement employée dans le cas de la culture cellulaire pour que le cisaillement au niveau des cellules ne soit pas trop fort et détache les cellules ou pour ne renouveler qu'une partie d'une chambre de culture (Gómez-Sjöberg et al., 2007). Pour le cas de la culture de cellules souches embryonnaires de souris, nous avons constaté qu'il n'est pas nécessaire d'utiliser cette fonction, les cellules sont assez adhérentes pour supporter une pression de 1 bar pendant 10 secondes sans qu'aucune cellule ne se détache. Pour la culture des cellules sur le long terme, nous avons même observé que le changement de milieu sans la pompe, par « chasse » était bénéfique, car il permet de rincer et évacuer les débris cellulaires.

Le multiplexeur :

Contrairement à la pompe péristaltique, le multiplexeur est essentiel à la réalisation d'une expérience microfluidique. Il est utilisé pour les valves des chambres de culture et permet de faire passer plusieurs informations à travers un seul support de commande de valve [Figure 29].

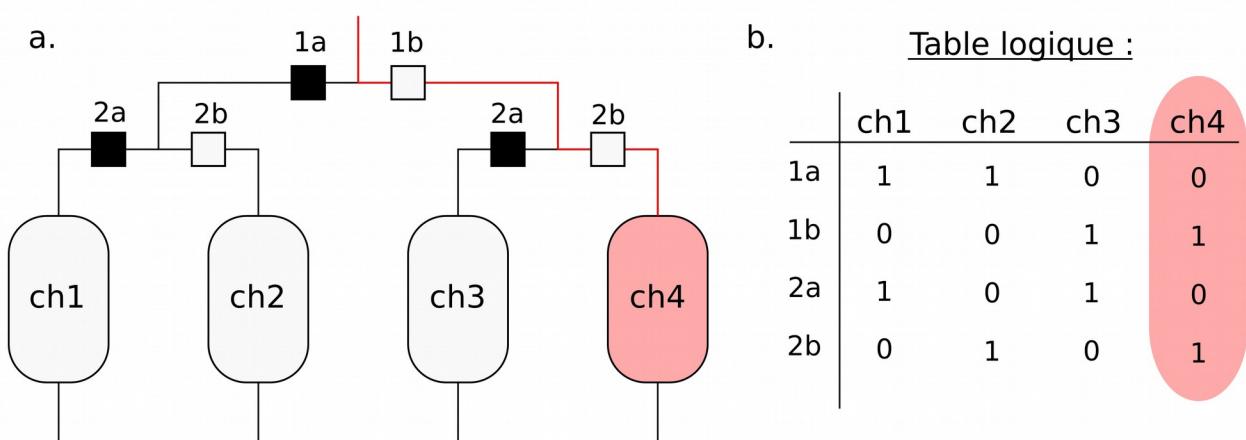


Figure 29: Schématisation du multiplexeur microfluidique. a. : Multiplexeurs avec les valves représentées en carré noir et blanc et les chambre de cultures par des rectangles à bords arrondi, ch : pour chambres, noir pour fermé et blanc pour ouvert. b. : Table logique de la commande des valves. La pression étant constante à l'arrivée des valves, lorsque la commande est à 1, on coupe la pression, ce qui désactive la valve. Chaque chambre a une adresse unique.

Le multiplexeur permet de réduire le nombre de valves pour alimenter une chambre de culture de $2^N - N$ valves, avec N, l'entier naturel telle que $N = (\log_2(n))_{+1}$ et n, le nombre de valve. Par exemple, pour 32 chambres à contrôler, on aurait besoin de 32 valves sans multiplexeurs et seulement 5 avec multiplexeurs soit 27 valves gagnées.

Organisation de la puce microfluidique

La puce est composée de trois parties, les entrées de milieu, le mélangeur et le multiplexeur avec les chambres de culture. Dans la puce, seules les chambres de culture doivent contenir de la Fibronectine, le reste doit être traité avec du Pluronic, pour cela, on a besoin d'un canal « bypass » entre chaque chambre de culture qui permettent ce traitement. Le canal « bypass » est aussi utile lorsque la puce est en fonctionnement : à chaque changement de milieu, on a besoin de traiter le multiplexeur avec un milieu DMEM à faible glucose + 15 % FBS, de façon à saturer la surface du PDMS en FBS pour qu'il n'y ait pas d'interférence entre un milieu activateur et milieu neutre et un milieu à faible glucose pour limiter la cristallisation du milieu en sortie de puce [Figure 30].

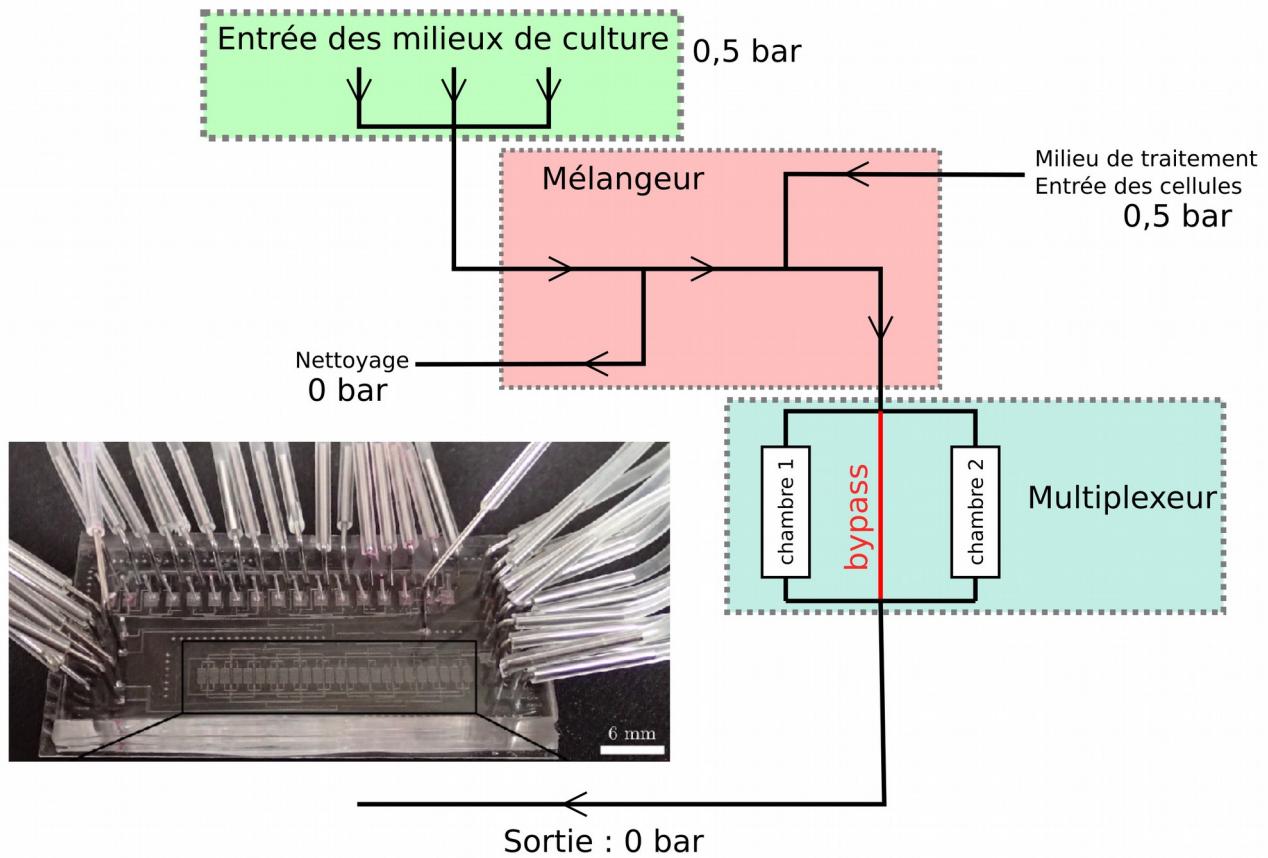


Figure 30: Schématisation de l'organisation de la puce microfluidique. Photographie de la puce utilisée pour nos expériences.

La puce initialement conçue avec 96 chambres de cultures (Gómez-Sjöberg et al., 2007) a été simplifiée à 24 chambres de façon à réduire ses dimensions. Le fait qu'elle soit plus petite permet de la monter sur lamelle à faible épaisseur et donc utiliser des objectifs à forte ouverture numérique.

Fabrications détaillées de la puce microfluidique à valve

Le PDMS, un polymère pour la fabrication de puce microfluidique

Ce protocole n'est pas standardisé et nécessite d'être adapté suivant les conditions environnementales du laboratoire. Si les conditions de température, de pression, de particules de poussière et d'humidité ne sont pas contrôlées dans l'environnement de travail, les durées décrites dans ce protocole peuvent être différentes.

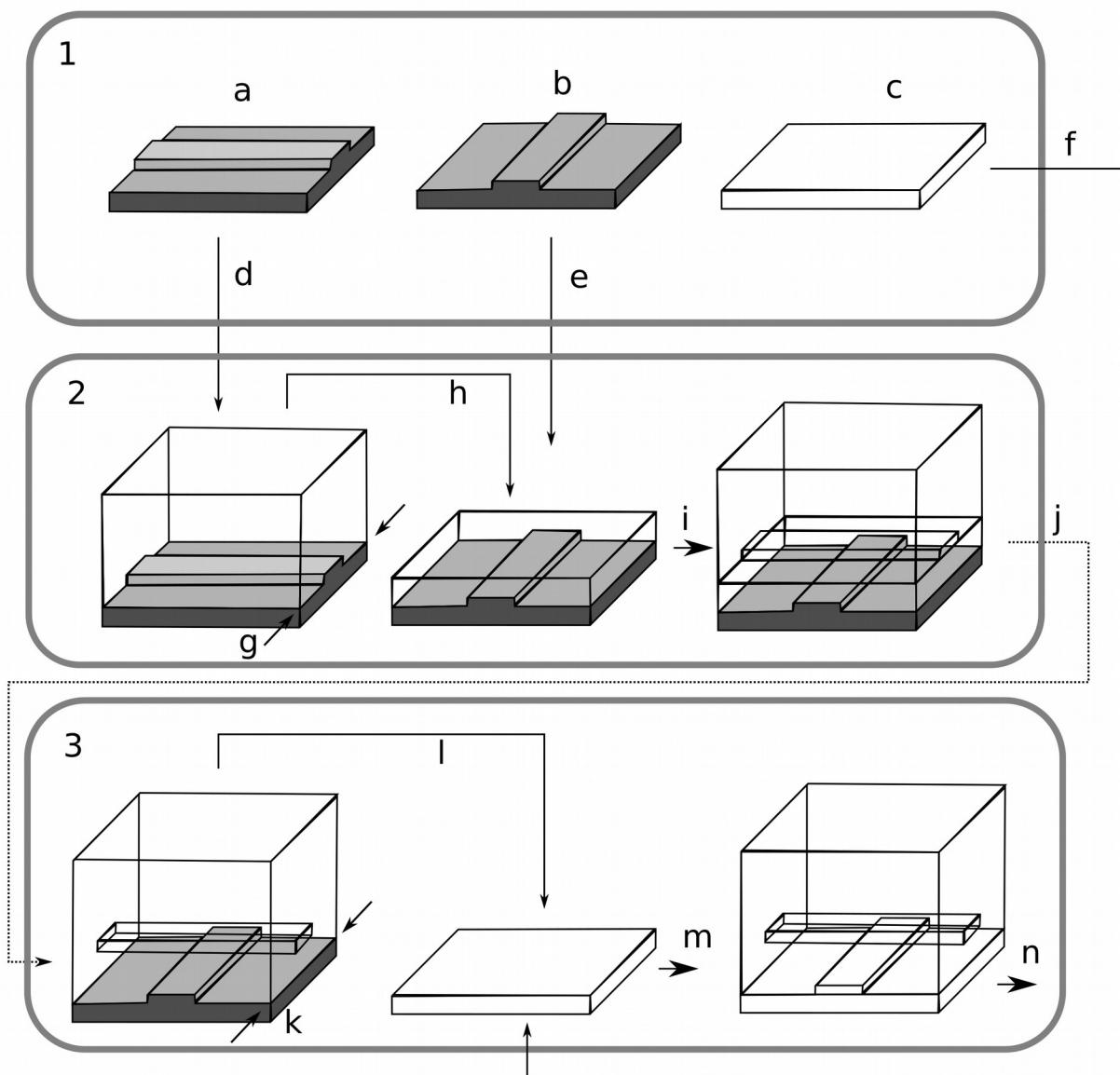


Figure 31: Schéma des différentes étapes du protocole de réalisation de la puce microfluidique. 1,2,3 : Les grandes étapes du protocole. Pour « a » à « n » voir la suite.

Il est nécessaire d'expérimenter plusieurs fois les conditions de temps de cuisson, de proportion de PDMS et de temps d'étalement pour que la puce soit conformément réalisée. Les temps de cuisson doivent être précis, la température de la pièce peut ajouter de la cuisson et dans ce cas, il faut modifier les temps dans le four. Par exemple, du passage de la période hivernale à la période estivale, les temps de cuisson doivent être réduits dans le four. Les puces ne peuvent être opérationnelles que s'il n'y a pas de poussière entre chaque couche de PDMS, les poussières rendent les valves inopérationnelles et perturbent l'observation de la fluorescence.

Nous allons aborder le protocole détaillé pour la fabrication de la puce microfluidique. Ce protocole est volontairement très détaillé et inclut des conseils à chaque étape pour souligner les éléments importants, le but étant de permettre la fabrication de la puce à un novice. Par conséquent le protocole est un peu long, vous pouvez passer à la page 86 si vous le souhaitez.

Protocole de fabrication de la puce :

Durée Totale : 5 à 7 h.

Matériel nécessaire :

- Silicone élastomère + réticulant (PDMS).
- Cloche à vide + pompe aspirante.
- Enduction centrifuge (Spin-coater)
- Loupe binoculaire.

Procédure[Figure 31] :

a) **Préparation et mise en place du mélange de PDMS pour le moule de « flux ».**

PDMS : 15:2 g, Mélange homogène, Dégazage sous cloche à vide : 15 minutes en récipients, 1 h dans le moule en résine d 'époxy.

Conseil : Il est nécessaire que le mélange du PDMS soit homogène, pour cela, mélanger le PDMS dans un récipient conique avec une spatule, des bulles peuvent se former. Le premier dégazage permet d'enlever les « grosses » bulles. Protéger les récipients/moule avec un couvercle de boite de Pétri pour limiter la poussière. Vérifier que les bulles ne dépassent pas le couvercle lors du dégazage, pour ne pas perdre de PDMS (la hauteur du PDMS dans le moule doit être au minimum de 0,5 cm), « casser » le vide si nécessaire (enlever le vide). La surface où pose le moule doit être horizontale. Les outils et récipients doivent être le plus propre possible.

b) **Préparation et mise en place du mélange de PDMS pour le moule de « contrôle ».**

PDMS : 20:1 g, Mélange homogène, Dégazage sous cloche à vide : 15 minutes sur le moule en silicium. Enduction centrifuge : 15 secondes à 500 rpm, 45 secondes à 2000-2400 rpm (relatif à la hauteur des motifs). La vitesse de rotation est un paramètre important et dépend de la hauteur des motifs du moule. Il faut une couche de PDMS qui dépasse de quelques microns les motifs. Plus : La valve ne marche pas car trop

difficile à déformer. Moins : la surface du PDMS ne sera pas plane et donc la jonction des deux couches ne sera pas étanche [Figure 32].



Figure 32: Configuration où la hauteur du PDMS n'est pas optimale. a. : Cas où la hauteur est trop grande et n'est pas déformable. b. : Cas où la hauteur est inférieure à la taille du motif et ne permet pas une liaison correcte avec la couche supérieure de flux.

Conseil : Pour le mélange, les conseils sont les mêmes que précédemment. Le moule de « contrôle » est un wafer de silicium très fragile, à la fin de ce protocole, on le recouvre de PDMS pour éviter la poussière. Pour enlever le PDMS de protection, ne pas flétrir le wafer. La quantité de PDMS déposé ne doit pas déborder du wafer. Lors de l'étape de centrifugation, la première partie à 500 rpm permet d'étaler le PDMS sur toute la surface, la seconde dépend de la hauteur des motifs sur le wafer de silicium. Il faut que le PDMS recouvrent au moins de 2 µm les motifs. Pour des motifs à 22 µm, centrifuger entre 2200 et 2400 rpm pendant 45 secondes pour que la hauteur du PDMS soit de 24-25 µm (Mata et al., 2005).

c) Préparation et mise en place du mélange de PDMS pour la lamelle de verre.

PDMS : 20:1 g, Mélange homogène, dégazage du récipient pendant 15 minutes.
Enduction centrifuge : 15 secondes à 500 rpm, 45 secondes à 2400 rpm.

Conseil : Pour le mélange, les conseils sont les mêmes que précédemment. Étaler manuellement le PDMS sur la lamelle et laisser une goutte au centre pour que la centrifugation soit homogène. Par précaution, le nombre de lamelle à préparer doit être 50 % supérieurs au nombre de puce.

d) Cuissons de la partie « Flux ».

Protection de la surface du dessus par un couvercle. Incubateur 65 °C : Entre 60 et 75 minutes (dépend de la saison/ température initiale de la pièce). Surface horizontale.

Conseil : Ne pas superposer les moules les uns sur les autres pour que la température soit la même. Les moules doivent être placés dans une zone de l'incubateur où la température est stable. La durée d'incubation doit être adaptée suivant la saison (+10 minutes en hivers), vérifier la rigidité au doigt vers 60 minutes, si le PDMS est encore trop mou, laisser encore 10-15 minutes.

e) **Étalement et Cuissons de la partie « Contrôle ».**

Dans une boite de pétri. Étalement : 1 h sur surface horizontal. Incubateur 65 °C : 50 à 60 minutes.

Conseil : L'étalement permet à la surface du PDMS d'être homogène. Ne pas laisser les échantillons dans une pièce chaude en été. Comme précédemment, ne pas superposer les moules les uns sur les autres. Il faut faire très attention à ce que le PDMS ne soit pas trop cuit, vérifier au toucher, « à la main » (hors motif) l'état du PDMS. Si le PDMS est collant et visqueux, remettre à incuber et vérifier toutes les 5 minutes.

f) **Étalement et Cuissons de la lamelle de verre.**

Dans une boite de pétri avec des portoirs de lamelle. Étalement : 1 h sur surface horizontale. Incubateur 65 °C : 50 à 60 minutes.

Conseil : Mêmes conditions que l'étape précédente. Il est nécessaire de fabriquer un portoir de lamelle « home-made » pour qu'elle ne colle pas avec la boite de Pétri et que l'on puisse les récupérer.

g) **Détachement du PDMS du moule de « flux » et perforation du PDMS.**

Enlever le couvercle protégeant le moule, découper les contours du moule avec un scalpel, découper les puces avec un cutter et perforez la puce avec un « PDMS puncher » ou une aiguille limée. Pour des connecteurs d'aiguilles 19G (diamètre 1,1 mm), la taille de l'aiguille « punch » doit être 20G (diamètre 1 mm) et enfin nettoyer les surfaces avec du ruban adhésif.

Conseil : Faire attention à ce que le PDMS ne se déchire pas lors du détachement. La perforation du PDMS se fait sur une surface rigide. L'angle des trous doit être vertical, un léger angle est toléré. Limer le puncheur pour chaque utilisation avec une seringue plus grande et plus petite pour plus d'efficacité.

h) **Alignement et liaison de la partie « Flux » avec la partie « Contrôle ».**

Positionner grossièrement la partie « flux » sur la partie « contrôle » avec une loupe. Sous microscope, aligner précisément les croix de la partie contrôle avec celle de la partie

flux. Évacuer les espacements d'air en appuyant délicatement sur la surface du PDMS avec un outil arrondi.

Conseil : Le positionnement grossier permet de limiter la poussière et de trop manipuler le PDMS. Guider la couche de flux en la bloquant d'un côté avec une main et ajuster la position avec l'autre main. Cette étape est difficile, un système « guide » peut être conçu pour l'alignement.

i) **Vérification de la bonne liaison entre les deux parties.**

Vérifier sous microscope 2-3 minutes après avoir lié les parties « flux » et « contrôle », si rien n'a bougé avant la cuisson. (Vérifier principalement que vous n'avez pas déformé le PDMS)

Conseil : Après l'alignement se forme parfois des espacements d'air, si c'est le cas, fixer la partie flux avec le couvercle de la boite de Pétri en appliquant une légère pression. (Cette étape anodine permet de sauver la puce.)

j) **Cuisson de l'assemblage « Flux » + « Contrôle ».**

Incubateur 65 °C : 60 à 90 minutes (min/max).

Conseil : Cette étape n'a pas besoin d'être précise en temps, mais ne doit pas dépasser 90 minutes (surtout en été) pour que le PDMS ne soit pas trop rigide.

k) **Détachement du « PDMS assemblé » du moule de « Contrôle » et perforation du PDMS.**

Enlever le couvercle protégeant le moule, découper délicatement les contours de la puce avec un scalpel (attention au wafer), détacher très délicatement l'assemblage en commençant par la partie où il y aura le moins de connecteur, perforer les entrées de la partie « contrôle » de la puce avec un « PDMS puncher » ou une seringue limée. Pour des connecteurs d'aiguilles 19G (diamètre 1,1 mm), la taille de l'aiguille « punch » doit être 20G (diamètre 1 mm) et enfin nettoyer les surfaces avec du ruban adhésif.

Conseil : Ne pas aller trop vite avec le ruban adhésif au risque de décoller la partie contrôle de la partie flux. Le ruban adhésif permet aussi de dé-collapsé certaine valve.

l) **Liaison de la partie « Flux+Contrôle » avec la lamelle.**

Placer la face du dessus du bloc de PDMS sur une surface propre, placer le coter de la lamelle en PDMS sur le bloc de PDMS, faire cela très lentement. Évacuer l'air entre les couches, en passant délicatement sur la lamelle de verre avec un scalpel.

Conseil: Étape « one-chance », ne pas faire plusieurs puces en même temps pour gagner du temps. L'utilisation d'un scalpel est un exemple, vous pouvez utiliser un autre moyen pour enlever l'air.

m) Vérification de la bonne liaison entre les deux parties.

Vérifier au microscope 2-3 minutes après l'assemblage si rien ne s'est décollé ou si les valves ou collapsé ou non. À cette étape, si les valves sont collapses, il y a peu de chance que la puce marche à la suite.

Conseil: Si la puce fait réapparaître de l'air entre le canal de contrôle et la lamelle, appliquer une pression constante entre le dessus de la puce et un support (boite de Petri ...). Chance pour que la puce soit fonctionnelle dans ce cas : 25 %.

n) Cuisson des puces.

Incubateur 65 °C : 24 h minimum, 48 h conseillé. Globalement 3 puces sur 4 seront fonctionnelles.

Conseil: Utiliser une puce incubée pendant 24 h uniquement est fortement déconseillé, même si la puce semblera opérationnelle après sa mise en place au microscope, elle risquera de fuir durant l'expérience (haut risque de dégradation matérielle).

La fabrication d'une puce demande beaucoup de pratique, pour ma part, il a fallu 6 mois pour maîtriser cette technique en expérimentant les bons paramètres de cuisson et l'alignement de la puce au dix-micromètre près à la main. Mais même avec de l'habitude, à chaque saison, on doit se réhabituer au protocole de l'année précédente.

La photolithographie pour la micro-fabrication de moule en silicium

La fabrication des moules en silicium a été mise en place dans la salle blanche du laboratoire MPQ (Matériaux et Phénomènes Quantiques – <https://www.mpq.univ-paris-diderot.fr/?-salle-blanche->) conformément aux règles de sécurité (Pascal Filloux). Cette partie abordera la micro-fabrication d'un moule en silicium.

Pour avoir des moules de silicium, on a deux possibilités, soit on les commande par un autre laboratoire qui nous les fera pour nous, soit on les fait nous même si on dispose d'une salle blanche. Les techniques pour faire des moules reposent sur des méthodes de photolithographie

et font partie des méthodes standards pour réaliser des moules en silicium. Le principe est d'irradier aux UV une partie de la résine photosensible par un masque contenant des motifs et de développer le moule avec un solvant [Figure 33].

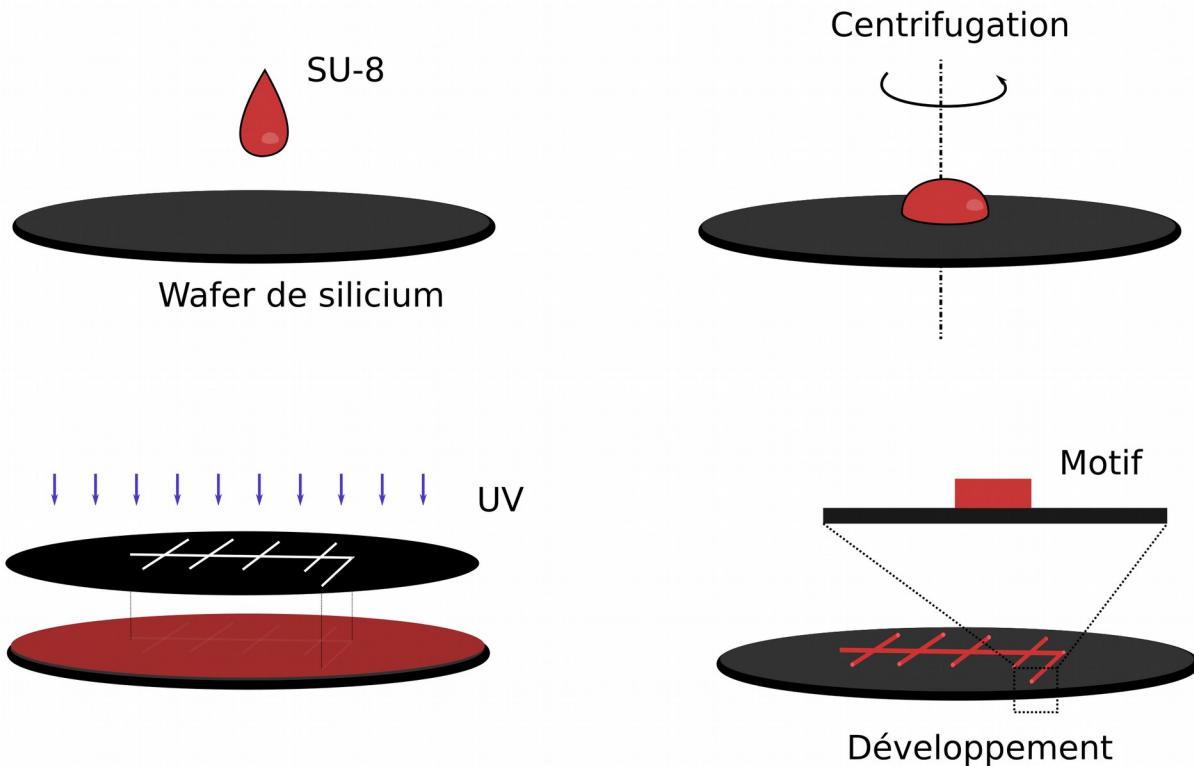


Figure 33: **Principe de réalisation d'un moule en silicium.** Avec une résine négative type SU-8. Les étapes de cuissons et de pré-couche sont volontairement absentes dans le schéma.

La réalisation des moules pour la puce microfluidique suit deux protocoles différents : le moule de contrôle avec la résine négative « SU-8 » et le moule flux avec un passage avec une résine positive « SPR-220-7 » puis la résine négative SU-8. Je n'ai pas utilisé le protocole de fabrication du moule de flux, le premier passage à la SPR-220-7 permet aux valves d'être arrondies et a besoin d'être dans de bonne condition d'humidité. La « SU-8 » est une résine négative, c'est-à-dire qu'elle réticule lorsqu'elle est exposée au UV (Campo and Greiner, 2007) et qui est très utilisée pour sa biocompatibilité (Nemani et al., 2013). Le protocole de micro-fabrication des moules pour les puces à valves micro-fluidiques est accessible en vidéo sur le site de Jove (Brower et al., 2017).

Protocole de fabrication du moule de contrôle :

1. Nettoyage de la surface de silicium avec une soufflette et déshydratation de la surface par une cuisson à 100 °C pendant 5 minutes
2. **Sous couche :** 1^{ère} étape d'étalement avec de la SU-8 2 000.5 (3000rpm, 40sec, 400rpm/sec), suivi d'une cuisson 65 °C : 2 min/95 °C : 5 min, d'un passage aux UV (8 mW/cm²) sans masque et d'une cuisson 65 °C : 2 min/95 °C : 5 min.
3. Motif : 2^{ème} étape d'étalement avec de la SU8-2025 (3000rpm, 80sec, 130rpm/sec), suivi d'une cuisson 65 °C : 2 min/95 °C : 5 min, d'un passage aux UV (8 mW/cm²) avec masque (alignement nécessaire) et d'une cuisson 65 °C : 2 min/95 °C : 5 min.
4. Développement de la résine dans un bain d'agitation de SU8-Developer. (Mesure du profil après cette étape)
5. Silanisation du moule en silicium dans un dessiccateur (le vide doit être évacué dans une hotte chimique).

L'étape 2 a été modifiée par rapport au protocole standard en remplaçant la SU8-2005 par de la SU8-2000.5. Cette couche est mise en place pour que la couche de 25 µm (SU8-2025) soit adhérente, mais la SU8-2000.5 présente moins d'irrégularité et est plus facile à manipuler que la SU8-2005, ce qui nous a motivé à changer cette étape.

Les masques sont conçus à partir d'un logiciel de dessin vectoriels ([inkscape](https://inkscape.org/) <https://inkscape.org/>) et ont été commandé à la société spécialisée « Selba » [Figure 34].

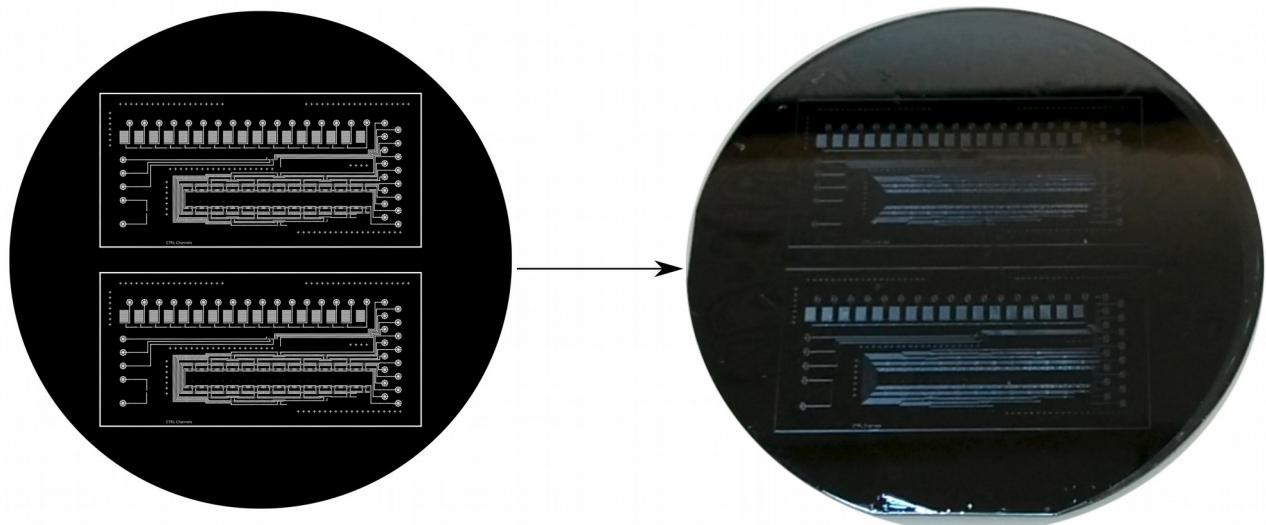


Figure 34: Masque des canaux de contrôle et wafer après micro-fabrication.

Les moules en résine d'époxy pour l'utilisation long-terme

La fabrication du moule de flux est complexe et nécessite plusieurs heures de réalisation. Les moules en silicium étant fragile, il est avantageux d'avoir un moule pour la partie flux qui soit robuste. Pour cela, on a réalisé un contre-moule de la partie Flux en PDMS avec de la résine Epoxy SOLOPLAST (Leroy Merlin : Type R123 + Durcisseur R614) sous hotte chimique [Figure 35]. On obtient un moule robuste au bout de 48 h dont les dimensions de motifs sont réduites par rapport au moule de Silicium (98,2 %). On a donc besoin d'adapter la taille des motifs du moule de contrôle pour que la puce soit fonctionnelle.

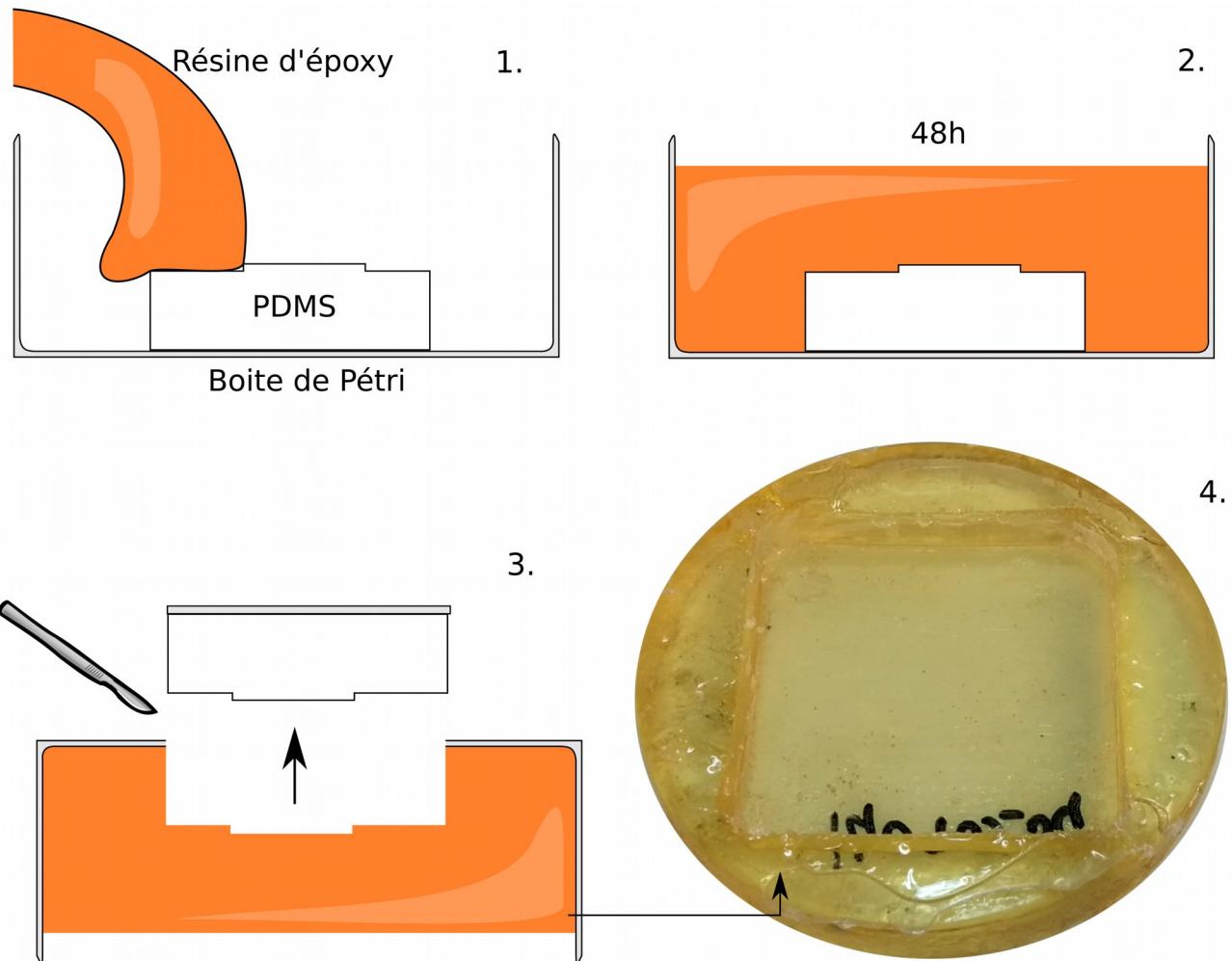


Figure 35: Schématisation des étapes pour la réalisation d'un contre moule en résine d'époxy et résultat final. Les étapes sont décrites dans l'ordre de 1 à 4 au protocole.

Protocole de fabrication de moule robuste (sous hotte chimique) :

1. Démouler le PDMS du wafer de flux après cuissons (Motifs 98,2% par rapport à l'originale).
2. Étaler du PDMS 10:1 sur une boite de pétri, Centrifugation de 30 secondes à 500 rpm.
3. Placer la partie flux en PDMS au centre de la boite de Pétri et incuber 30 minutes à 65 °C.
4. Préparation du mélange « durcisseur :résine d'époxy » (1:3 selon les modèles, dans notre cas : R123/R614) et dégazage dans un tube 50 ml par centrifugation (1500 rpm maximum : déformation du tube)
5. On verse la résine dégazée dans la boite de pétri où l'on a fixé le PDMS. Astuce : verser délicatement sur les motifs en premier pour éviter la formation de bulles d'air.
6. On laisse la résine agir pendant 48 h sous hotte : la résine liquide est très irritante et très odorante.
7. Lorsque le mélange a durci, découper avec une meuleuse la surface de la boite de Pétri qui entoure le PDMS et protéger la surface avec un couvercle.

Les moules de flux en résine d'époxy ont été réalisés avant ma thèse et n'ont pas eu besoin d'être refait à la suite, contrairement au moule en silicium qui l'ont été 4 fois.

Préparation et automatisation de la puce microfluidique

Lorsqu'on dispose d'une puce de culture, il est possible de réaliser nos expériences de stimulation temporelle de morphogènes sur des cellules souches. Pour cela, on a besoin de deux choses : mettre nos cellules dans la puce et automatiser les stimulations sur microscope.

Mise en place des cellules dans la puce microfluidique

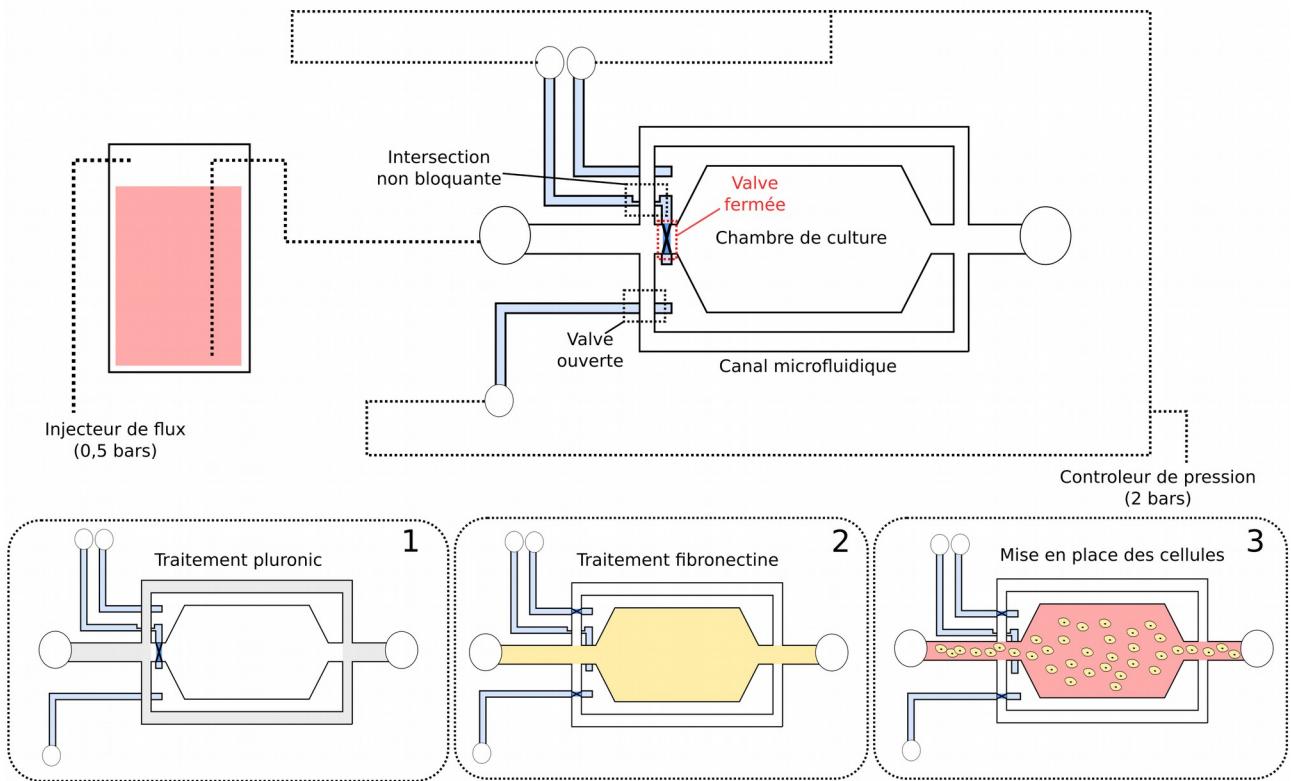


Figure 36: Schématisation simplifiée des protocoles de préparation de la puce. En haut, représentation simplifiée du système de pressurisation des valves et d'injection de milieu dans la puce. En bas, les protocoles de préparation de la puce, en gris le pluronic, en jaune la fibronectine et en rouge le milieu de culture avec des cellules (en jaune)

Le système microfluidique est utilisé comme indiqué dans la littérature (Gómez-Sjöberg et al., 2007; Sorre et al., 2014), mais avec cette fois des cellules souches embryonnaire de souris, ce qui nous a obligé d'adapter le protocole d'automatisation.

Pour ce qui est de la mise en place des cellules dans la puce, le protocole quant à lui n'a pas changé et consiste à connecter chaque contrôleur de pression hydraulique à l'entrée des valves microfluidique, traiter la surface de la puce et placer les cellules dans les chambres de culture dans des conditions stériles. Les cellules sont mises dans la puce en 2i le temps qu'elles adhèrent à la surface et avant de lancer l'expérience. Le contrôleur de pression est un système automatisé « fait maison » de valve pneumatique connecté à des tubes d'eau pressurisé et le traitement de surface se fait premièrement avec du Pluronic, un copolymère aux propriétés hydrophobes (Schmolka, 1973) et ensuite de la Fibronectine, une glycoprotéine présente dans la matrice extracellulaire permettant l'adhésion des cellules (Pankov and Yamada, 2002) [Figure 36].

Pour mettre les cellules dans les chambres de culture et bien traiter les surfaces, on doit comprendre comment sont organisées les différentes parties de la puce [Figure 30].

Protocole de préparation :

1. Enlever la pression au niveau des contrôleurs hydrauliques.
2. Connecter le contrôleur de pression à la puce. La puce ne doit pas subir de flexion.
3. Remettre la pression et vérification du bon fonctionnement des valves (fuite, collapse).
4. Traitement de la puce avec le Pluronic (1 %) sauf au niveau des chambres. 5 minutes.
5. Rinçage du Pluronic avec du DPBS. 5 minutes.
6. Traitement des chambres de cultures avec de la Fibronectine (20 ng/ml, F1141-1MG SigmaAldrich).
7. Rinçage de la puce avec du DMEM faible glucose⁶ + 10 % FBS.
8. Mise en place des cellules dans les chambres de culture en milieu 2i. Adhésion : 1 h minimum (Vérification au microscope de l'étalement cellulaire)
9. Rinçage de la puce avec du DMEM faible glucose + 10 % FBS.
10. Connexion de la partie flux : Milieu de culture en entrée et réservoir en sortie.
11. Mise en place complète de la puce sous microscope à environnement contrôlé (37 °C + 5 % CO2)
12. Lancement de l'expérience.
13. Si les chambres de culture ont été traitées avec du Pluronic ou si l'on veut réutiliser la puce : Nettoyage complet avec de l'éthanol 70 % et ensuite de la Javel 30 % pendant 10 minutes maximum. On peut revenir à l'étape 4 ensuite. Nombre max : 3

Composition des systèmes de pression en amont de la puce

On peut distinguer deux parties dans la puce, la pression au niveau des valves par les contrôleurs de pression hydraulique et la pressurisation des milieux de culture par des réservoirs reliés à l'arrivée d'air et un mélangeur de CO2.

Le système de valve microfluidique est constitué d'une arrivée d'air à 2 bar relié à des valves pneumatiques, à la sortie de ces valves, on a des tubes en PTE rempli d'eau distillée, ce qui permet de passer d'un système pneumatique à un système hydraulique. En sortie de chacun

⁶ Le DMEM faible glucose permet de limiter la cristallisation du sucre au niveau des sorties de la puce.

des tubes, un tuyau en TYGON qui se connecte à la puce avec des connecteurs en aluminium (Diamètre 1 mm pour des trous fait à partir d'une aiguille G20).

L'alimentation en pression des tubes de milieu est de 0,5 bar. Les tubes sont pressurisés en continu à 5 % de CO₂ par un système de pompe/mélangeur et sont fabriqués à partir de tube de congélation 5 ml, de tuyau en Teflon-PTFE et de résine d'époxy. La résine d'époxy permet d'éviter les fuites, mais la salle de microscopie dispose d'un capteur CO₂ le cas échéant.

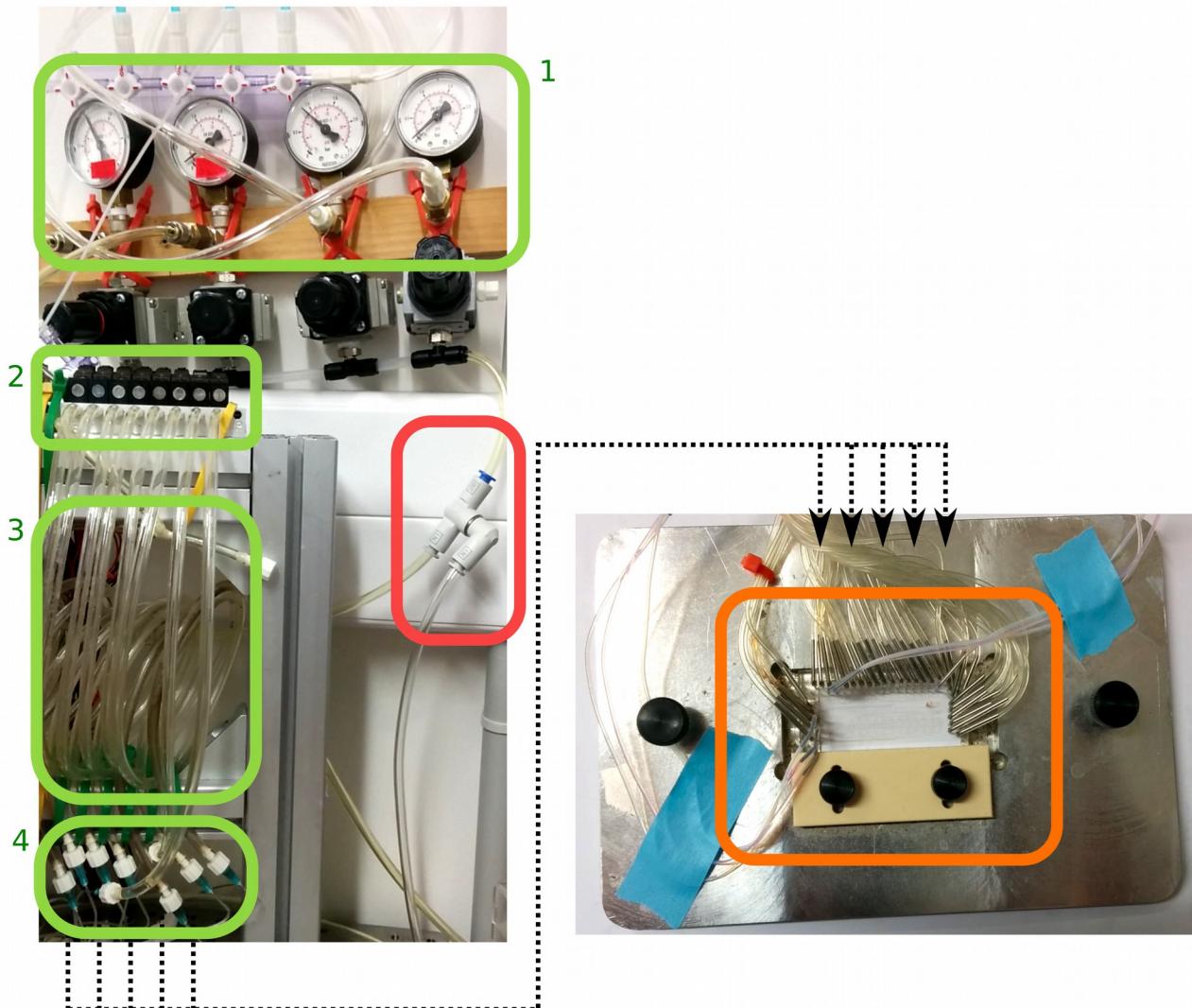


Figure 37: **Vue d'ensemble du système de contrôle de la puce microfluidique.** En code couleurs, les niveaux de risque d'une petite fuite dans notre système, en vert les fuites sans danger, mais qui avorte l'expérience, en orange, les fuites qui engendrent un risque élevé pour le microscope et en rouge, les fuites qui engendrent des fuites dangereuses pour les usagers (ici, ce connecteur est relié à la pompe mélangeant le CO₂)

Pour chacune des expériences, on doit vérifier que le système n'a pas de fuite [Figure 37]. Les fuites aux niveaux des circuits hydropneumatique sont rares si l'on ne dépasse pas les 2,5 bars

(représenté en vert) et sont audibles dès leurs apparitions. Les fuites au niveau du mélangeur d'Air/CO₂ sont dangereuses pour les usagers (alimentation de la pompe représenté en rouge) et peuvent apparaître s'il y a une coupure d'alimentation d'Air, ce qui va faire entrer la pompe en surrégime, le bruit caractéristique de la pompe est audible. Les fuites au niveau de la puce microfluidique peuvent apparaître si la puce est défectueuse ou si la pression des valves est supérieure à 2,5 bars, cette fuite n'est pas audible si la puce est sous le microscope, et peut engendrer des dégâts matériels. Pour éviter les dégâts matériels, les appareillages sont protégés avec des bâches en plastique dans la mesure où il n'affecte pas leur bon fonctionnement (Exemple : caméra).

Automatisation du contrôle des valves

Le circuit électronique des valves est contrôlé par un microcontrôleur industriel (USBIO24 R), la programmation de cette carte avait été programmée avant mon arrivée au laboratoire. La carte utilise une interface FTDI, ce qui permet de passer d'un port série à un port USB pour la communication entre le microcontrôleur et l'ordinateur.

Cette carte est commandée, soit en MATLAB par un code développé par le laboratoire Quake, soit en Python par un code adapté par moi-même à partir du code MATLAB. Le protocole FTDI est importé à partir de sa bibliothèque logicielle (« .DLL » sous Windows, « .SO » sous Linux) dédié (<https://www.ftdichip.com/Drivers/D2XX.htm>) à partir du module python « `ctypes` ». La communication avec le microcontrôleur se fait à partir de ce module et permet d'activer/désactiver les variables de la carte préprogrammée.

Chaque variable nous donne l'information d'états des valves et le code a été développé de façon à ce que l'on fonctionnalise des groupes de variables. Ces fonctions sont contenues dans une classe pour faciliter l'utilisation des valves. On distingue les fonctions suivantes :

- set_valv_by_name : Fonction attribuant une valeur (0 ou 1) à une valve à partir d'un nom compréhensible. Elle contient la correspondance entre la valeur des bits des valves et les noms prédéfinis.
- purge_step : Fonction faisant appel à « `set_valv_by_name` », elle attribue la valeur des valves adaptée pour qu'un milieu nettoie la puce sans passer par les chambres de cultures.
- feed_chamber : Fonction faisant appel à « `set_valv_by_name` », elle attribue la valeur des valves adaptée pour qu'un milieu alimente une chambre de culture spécifique.

- apply_schedule : Fonction faisant appel aux fonctions précédentes pour suivre le protocole expérimental qu'on lui a donné en entrée.

4. La microscopie de fluorescence pour la détection des rapporteurs fluorescents et la culture cellulaire

Pour l'observation en temps réel de l'expression d'un rapporteur fluorescent, on a besoin d'un microscope à fluorescence, d'un système de culture et d'une caméra pour l'acquisition des profils d'expression. Pour cela, nous disposons d'un microscope IX81 (Olympus) et d'une caméra Zyla (Andor) contrôlée par ordinateur et d'un système d'incubation à humidité et CO₂ autonome (Life imaging services), supplémenté d'une platine XY (Marzhauser) et d'une lampe à fluorescence (X-Cite) pour choisir plusieurs positions d'acquisition et exciter les protéines fluorescentes. Le principe de fonctionnement de la microscopie de fluorescence est décrit sur le site de Nikon MicroscopyU (Spring and Davidson, 2008).

Depuis un peu plus d'un siècle, la microscopie à fluorescence a permis des découvertes majeures en biologie cellulaire et les développements récents ont permis d'améliorer les techniques de visualisation et de quantification d'imagerie (Renz, 2013). Dans cette partie, nous verrons comment contrôler un microscope à fluorescence pour l'automatisation des expériences.

Contrôle de la microscopie pour les expériences microfluidiques

Dans le cas des expériences qui n'ont pas nécessité l'usage de la puce microfluidique, le contrôle de la microscopie et l'acquisition des images s'est réalisé sous μ-manager (<https://micro-manager.org/>). Pour les expériences microfluidiques, le contrôle a été réalisé par un code en python adapté par moi-même à un code MATLAB (Sorre et al., 2014).

La programmation des composants de microscopie nécessite de comprendre leurs fonctionnements interne et la manière dont les composants communiquent avec un ordinateur. La communication entre l'ordinateur et les différents composants de microscopie se fait par un port série (DE-9) hormis pour la caméra qui se fait par une communication USB3.

La voie de communication par les ports séries suivent la norme RS-232 (Evans et al.) et sont désignée par le nom « COM » sur le système d'exploitation Windows (TTY sous Linux). Son protocole utilise des UART (émetteur-récepteur asynchrone universel) qui découpent le flux en trames pour chaque caractère à envoyer (Pour le caractère K : (01001011), avec en rouge, le bit start, en noir, les bits de données et en bleu, le bit stop). La suite de caractère en ASCII va former des mots qui correspondent aux commandes pouvant changer l'état des composantes matérielles.

Les commandes RS-232 ont été trouvées en sniffant les ports de communication lors de l'utilisation de µ-manager par le logiciel jpnevulator sous Ubuntu (<https://jpnevulator.snarl.nl/>), mais leurs documentations détaillées sont disponibles pour chacun des composants. Les commandes créées par les fabricants ont été pensées de façon à ce qu'elles soient compréhensibles par les utilisateurs (Pour la commande de la lampe à 100 % : (01 LAMP 100 8), en rouge, les caractères starts, en noir la commande et en bleu le caractère stop).

La communication avec les composantes séries se fait à partir du module python « serial ». Les commandes sont contenues dans une classe pour faciliter la communication avec les composants matériels et leurs utilisations.

Pour la caméra Zyla, nous avons utilisé le kit de développement fourni par Andor (SDK : atcore.dll) et importé par µ-manager. Micro-manager est contrôlé en python par le module « MMCore.py » conformément aux instructions proposées par Eugene Dvoretsky (https://micro-manager.org/wiki/Using_the_Micro-Manager_python_library).

Le code python est réparti en 5 classes de façons à être importé et utilisé pour la réalisation d'expériences [Figure 38]. On a les classes : « Serial » pour les communications série, « MM_Andor » pour la communication avec la caméra via µ-manager, « Ctypes » pour la communication avec le microcontrôleur de valve (voir partie précédente), « Hardware » qui contient la fonctionnalisation des commandes de microscopie (changer de position, ouvrir l'obturateur, changer de filtre, définir l'intensité de la lampe, prendre une image...) et enfin « valv » qui contient la fonctionnalisation de la commande de valve (voir page 94).

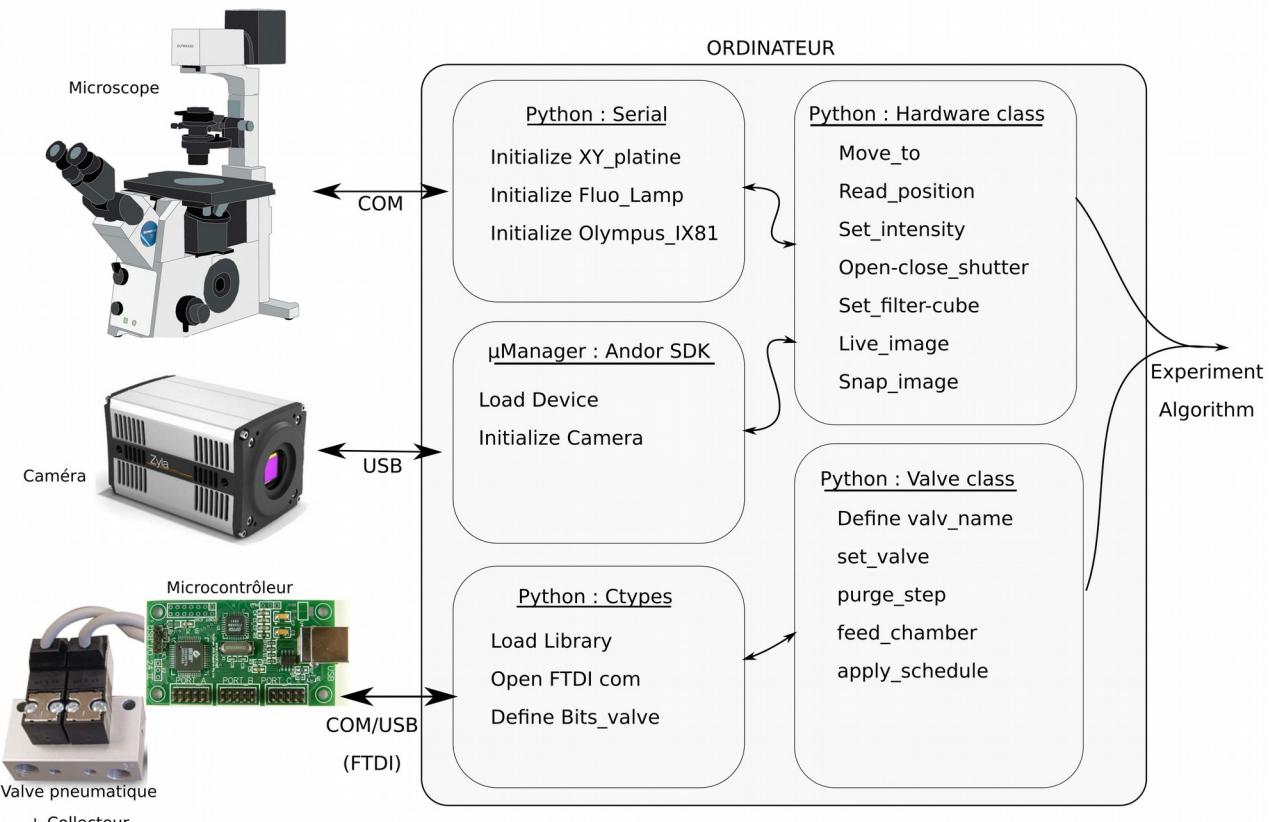


Figure 38: **Représentation des différents modules en python pour contrôler une expérience.** A gauche, l'ensemble des composants, à droite, les modules en python importés par l'algorithme.

Le code python de commande matériel ne dispose pas encore d'interface graphique opérationnelle, une ébauche à tout de même été entamée à partir de la bibliothèque logicielle Qt (<https://doc.qt.io/qtforpython/>).

Automatisation d'une expérience microfluidique

À partir des différentes classes contrôlant les différents composants de microscopie, nous avons réalisé un algorithme qui fait l'acquisition des images sur les différentes positions de la puce microfluidique et qui automatise la culture cellulaire. Le code a été réalisé en python suivant la même logique que précédemment.

Pour augmenter la durée de vie de la roue à filtre, nous avons choisi un algorithme qui va limiter son utilisation. Pour cela, l'algorithme va définir un filtre, pour répéter l'opération de changement de position et de prise d'image, lorsque toutes les positions sont faites, on change de filtre et on recommence l'opération. Le code est organisé sous forme procédurale de façon à ce qu'il soit facile à déboguer. À la fin de la procédure, on obtient une série

d'images et un fichier historique relatif à l'enregistrement séquentiel des événements (acquisition de l'image, changement de milieu) [Figure 39].

Procédure algorithmique d'une expérience :

1. Initialisation des paramètres de temps d'expériences, de la liste des positions, de la liste des filtres à utiliser et des paramètres d'illumination et d'exposition pour les images.
2. Tant que la durée d'expériences « N » n'est pas atteinte, faire :
3. Allumer la lampe fluorescence Xcite.
4. Pour chaque filtre « C », faire :
5. Pour chaque position « P », faire :
6. Acquisition de l'image.
7. Retourner à l'étape 5 jusqu'à la dernière position.
8. Retourner à l'étape 4 jusqu'aux derniers filtres.
9. Éteindre la lampe fluorescence.
10. Appliquer l'algorithme d'automatisation de la puce.
11. Pause de l'algorithme, retourner à l'étape 2.

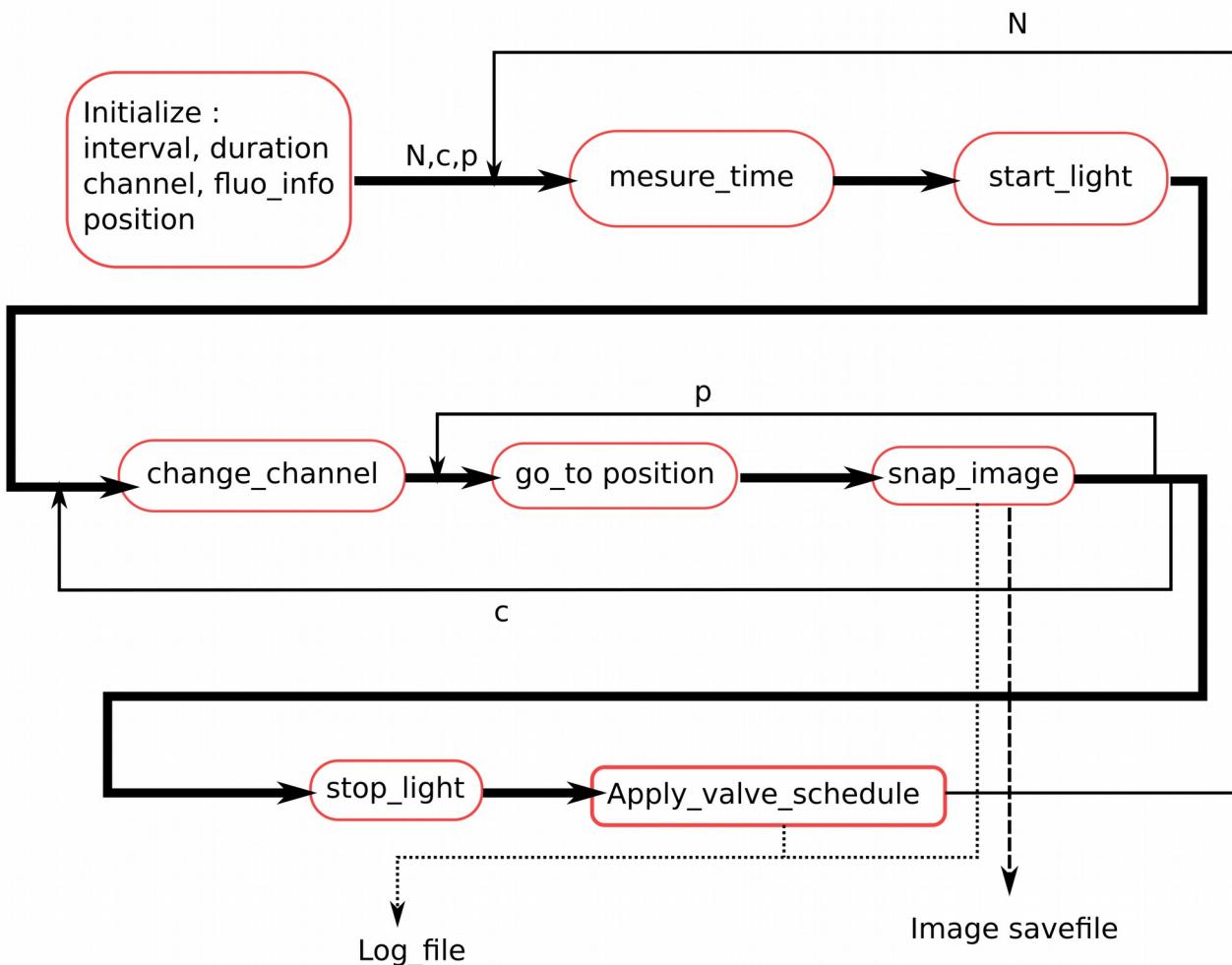


Figure 39: Algorigramme simplifié du protocole expérimental. En encadré rouge, les fonctions des différents modules, les flèches indiquent le sens de la procédure et les indices N,c,p, les étapes de répétition.

Le code python de l'automatisation de l'expérience ne dispose pas encore d'interface graphiques opérationnel, mais comme pour le code de commande, une ébauche à tout de même été entamée à partir de la bibliothèque logicielle Qt (<https://doc.qt.io/qtforpython/>).

5. Analyse d'image pour quantifier l'expression des rapporteurs fluorescents

Les données d'acquisition de la fluorescence des cellules au microscope nous donnent des images à analyser. Pour cela, on a besoin d'utiliser des techniques d'analyse d'image ainsi que des outils d'analyse pour interpréter les données de fluorescence.

Pour visualiser les images, nous avons utilisé le logiciel ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) pouvant aussi être utilisé pour le traitement et l'analyse d'image (Schneider et al., 2012). Pour le traitement d'image nous avons utilisé des bibliothèques python « skimage » et « opencv » où l'on s'est fortement inspiré des documentations disponibles sur internet (<https://scipy-lectures.org/packages/scikit-image/index.html> et https://opencv-python-tutorial.readthedocs.io/en/latest/py_tutorials/py_imgproc/py_watershed/py_watershed.html). Le choix de python a été adopté pour sa simplicité d'écriture et sa rapidité de traitement.

Les premiers traitements d'images ont été réalisés dans les années 1920 pour compresser les données d'envoi d'information, c'est ainsi que la première image numérique est apparue (Gonzalez et al., 2009). Mais, c'est dans les années 1960-1970 que le traitement d'image est en plein essor avec les premiers ordinateurs (Rosenfeld, 1973) et où leurs applications furent utilisées dans plusieurs domaines de recherche (médical, spatial...). Les méthodes que l'on emploie aujourd'hui sont l'héritage de toutes ces années de recherche. Dans cette partie, nous aborderons les méthodes de segmentation d'image, le suivi des cellules (tracking) et l'analyse des données de segmentation et de tracking.

La segmentation pour la détection des cellules sur une image

L'acquisition des images en fluorescence nous donne deux types d'information, la fluorescence des noyaux et l'expression d'un rapporteur fluorescence localisé au noyau. Pour récupérer l'information de l'expression d'un rapporteur fluorescent pour chaque cellule, nous avons besoin de segmenter les cellules les unes des autres.

La segmentation d'image peut être réalisée de deux façons, soit avec un logiciel de visualisation (exemple : ImageJ), soit à partir d'algorithme de calcul. Dans notre cas, nous avons utilisé des algorithmes de segmentation adapté en python par la communauté de Stéfan van der Walt (scikit-image) et Intel Corporation (OpenCv). Les modules « skimage » et « opencv » interprète les images en tableau « numpy » et le module « numpy » permet de manipuler des matrices ou des tableaux multidimensionnels sous la structure de donnée ndarray (<https://www.numpy.org/> : Fonction utilisée : <https://docs.scipy.org/doc/numpy/user/quickstart.html>).

Les outils mathématiques utilisés pour la segmentation sont les filtres gaussiens, la binarisation à seuil OTSU, les transformées de distance euclidienne et la morphologie mathématique par ligne de partage des eaux. Les informations de segmentations (position, intensité, surface...)

sont extraites par le module « skimage.measure.regionprop ». Les séquences d'images sont vectorisées pour faciliter l'utilisation d'opencv [Figure 40].

La binarisation est un processus qui va produire une image en deux classes de pixel, dans notre cas « cellule/fond », nous avons utilisé la méthode OTSU (Otsu) qui se base sur l'histogramme de l'image. Le processus de transformation en distance va calculer la distance par rapport au point d'obstacle le plus proche, dans notre cas la frontière entre les deux classes de pixel, les valeurs de distance les plus grandes sont au centre de la cellule. Pour que la transformée en distance soit efficace, il est nécessaire que les bords de binarisation soit lissés, dans notre cas, on utilise un filtre gaussien avant la binarisation. L'algorithme de ligne de partage des eaux va calculer les frontières entre les objets dans un motif à plusieurs maximums locaux.

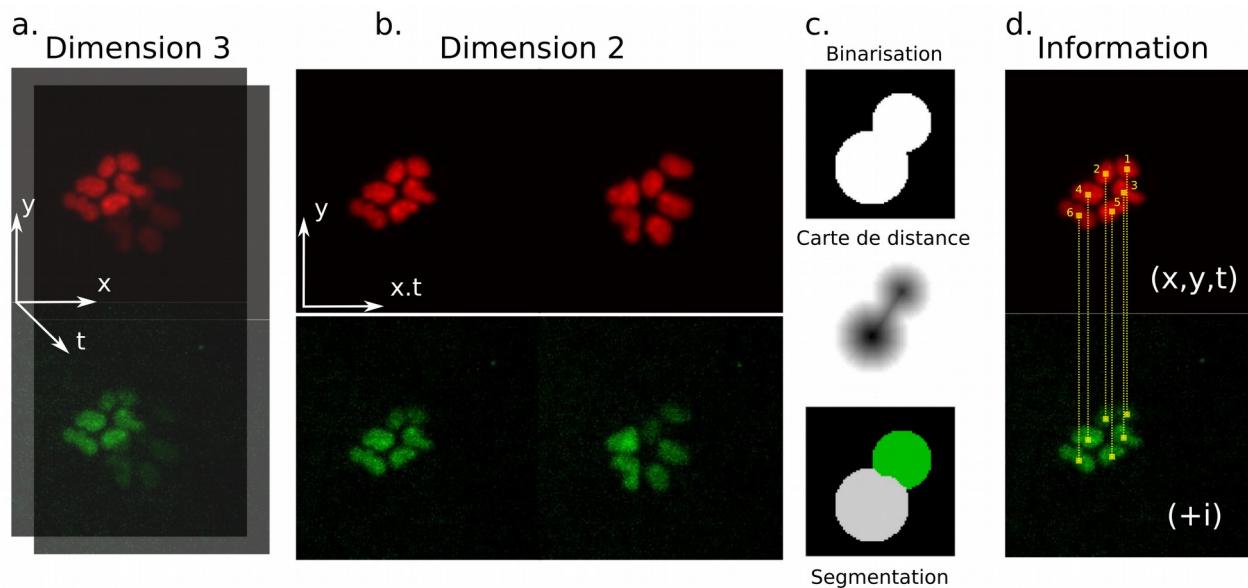


Figure 40: **Schématisation des étapes de l'algorithme de traitement d'image.** a. : Images bruts. b. : Vectorisation des images où l'on a appliqué un filtre gaussien. c. : Segmentation des images (images tirées de scipy). d. : Résultat de la segmentation.

Squelette de l'algorithme :

1. Importation sous forme de tableau numpy des images avec « skimage.io.imread » ou « skimage.io.ImageCollection » .
2. Vectorisation du tableau (3D vers 2D) numpy avec « numpy.reshape ».
3. Lissage des images par un filtre gaussien avec « scipy.ndimage.gaussian_filter ».
4. Binarisation, transformée de distance et segmentation avec « opencv ».

5. Récupération des données de segmentation du noyau des cellules (x, y, t, i) avec « skimage.measure.regionprop ».

Les informations de segmentation sont enregistrées dans un fichier texte « .csv » par le module python « pandas » (https://pandas.pydata.org/pandas-docs/stable/getting_started/10min.html) sous forme de données tabulaires séparées par des virgules. Pandas est un module python pour la manipulation de donnée statistique qui génère des structures *Dataframe*.

Le tracking par lignée pour suivre des populations

Pour savoir comment les cellules répondent à une stimulation Activin/Nodal, il est nécessaire d'avoir l'historique de réponse des cellules, en cas de répartition non homogène des populations. Nous avons utilisé une méthode de suivi cellulaire pour avoir la dynamique de réponse par groupe de cellule fille à partir des données de la segmentation.

La question du tracking de cellule pose plusieurs difficultés à cause des imperfections de la segmentation et je n'ai pas eu de solution pour le tracking de cellule unique. Pour quantifier l'historique de réponse, j'ai proposé une méthode qui va suivre un groupe de filles, ce qui permet de ne pas prendre en compte les divisions cellulaires et augmente la probabilité de correspondance. Cette méthode suppose que les filles ont des variations d'expression faibles entre elles sinon l'approche n'est pas valide.

Pour suivre les cellules entre les images, on calcule la distance euclidienne de chaque cellule entre deux images, les cellules de l'image suivante qui ont la distance la plus petite avec les images précédentes, récupéreront leurs indices. Les erreurs de segmentation (cellules qui disparaissent/apparaissent) sont détectées par le calcul du nombre de cellules par image et corrigé par la mise en mémoire tampon des cellules de l'image précédente [Figure 41].

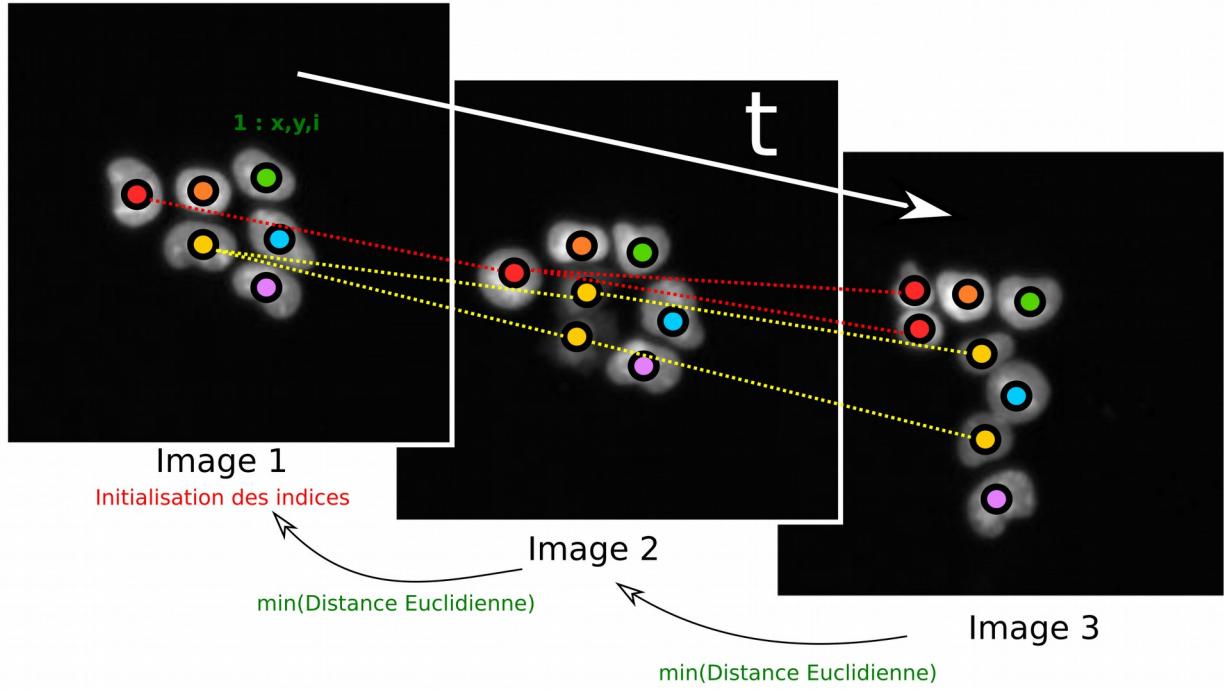


Figure 41: **Représentation simplifiée des étapes de tracking.** Ici, les images ne sont pas réellement à la suite, elles ont été choisies pour mettre en avant le tracking par lignée (lineage clustering) lors de division cellulaire. Les étapes de vérification ne sont pas représentées ici.

Principe de l'algorithme de « lineage tracking » :

1. Récupération des segmentations des noyaux des cellules par images.
2. Attribution pour les cellules de la première image des indices cellulaires.
3. Calcule des distances euclidiennes entre deux images par le module « `scipy.spatial.distance.cdist` ».
4. Calcule des distances minimales et vérification annexes (différence du nombre de cellules...⁷)
5. Attribution des indices pour les cellules de l'image suivante.
6. Retourner à l'étape 3 jusqu'à la dernière image.

Cette approche nous permet d'obtenir l'ordre de grandeur de la réponse cellulaire par groupe de cellules filles au cours de ses divisions cellulaires et d'en déterminer sa variabilité. Les informations de tracking sont ajoutées aux données de segmentation dans un nouveau fichier texte « `.csv` » par le module python « `pandas` ».

⁷ Testé : calcul des trajectoires cellulaires, fluorescence des noyaux...

Analyse des données du traitement d'image

La visualisation des images sur ImageJ nous permet d'avoir une idée du comportement des cellules à une stimulation et d'anticiper les résultats de la segmentation et du tracking. Nous avons observé que les cellules changeaient de phénotype lors du processus de différenciation et qui parfois, laisse apparaître deux types cellulaires avec des réponses différentes.

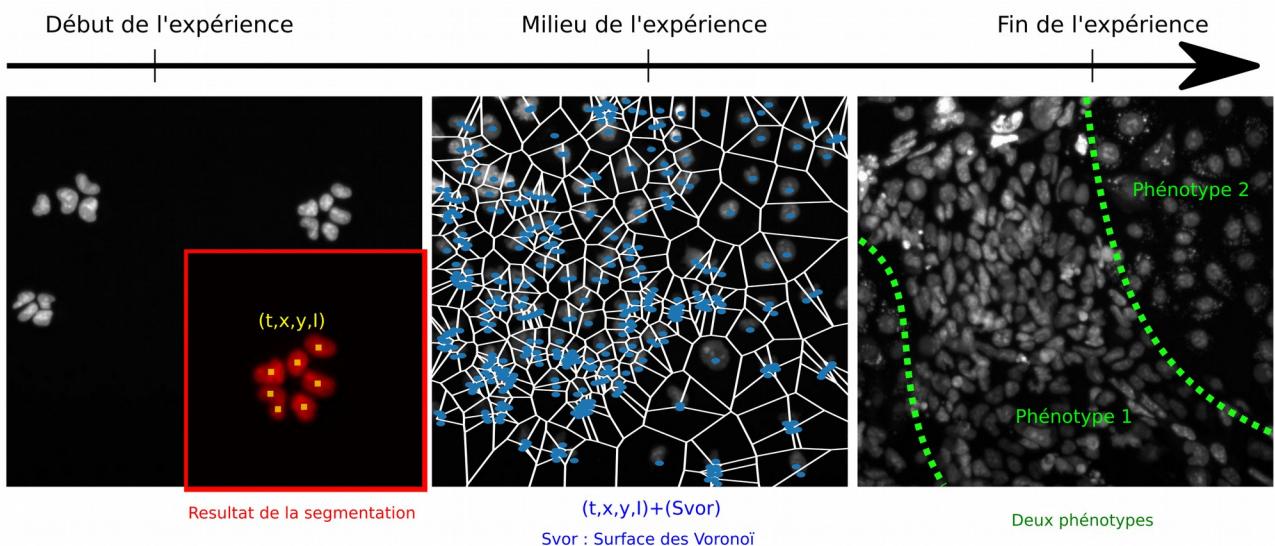


Figure 42: **Evolution de la configuration cellulaire au cours d'une expérience.** A gauche, les cellules en début d'expérience, le résultat de la segmentation d'une partie de l'image est encadré en rouge. Au milieu, les cellules au milieu d'une expérience et l'astuce mise en place pour déterminer les phénotypes. A droite, la représentation des deux phénotypes à la fin d'une expérience.

Pour distinguer les phénotypes cellulaires, nous avons calculé la surface des diagrammes de Voronoi à partir des centroïdes de la segmentation [Figure 42]. L'hypothèse est que les cellules du phénotype mésenchymale sont plus étalées que les cellules du phénotype épithéliale, donc la surface qu'occupent les cellules est différente suivant les phénotypes. L'utilisation des diagrammes de Voronoi est discutable, l'analyse discriminante à apprentissage supervisé, la PIV (Particle image velocimetry) ou encore l'analyse de fourrier locale aurait pu être utilisé pour distinguer les phénotypes (Guirao et al., 2015; Melling, 1997; Russell and Norvig, 1995).

Les diagrammes de Voronoi correspondent à des découpages du plan d'une image en cellules à partir de point. Pour générer des Voronoi on a utilisé le module « `scipy.spatial.Voronoi` » et pour mesurer la surface de chaque cellule de Voronoi, le module « `scipy.spatial.ConvexHull` ».

Nous avons analysé les données de segmentation et de tracking en python à partir des modules « numpy », « pandas » et « scipy » (<https://www.scipy.org/>). Les courbes sont visualisées en python à partir du module « matplotlib » (<https://matplotlib.org/>). Les fonctions spécifiques au module sont explicitées dans le prochain chapitre. Les courbes de réponses à profil adaptatif et les fonctions d'activation sont ‘fitté’ avec « `scipy.optimize.curve_fit` » à partir de la modélisation proposée pour la voie de signalisation TGF-β (Sorre et al., 2014). La solution de ce modèle est le suivant :

$$y = I \cdot t \cdot e^{-c \cdot t/2} \rightarrow y = \frac{4 \cdot I}{T \cdot c^2} (1 - (1 + c \cdot t/2) e^{-c \cdot t/2})$$

Avec t , la variable temporelle, I , l'intensité maximale de réponse, c , le temps de décroissance et T , le délai de réponse.

Références

- Arun, K.H.S., Kaul, C.L., and Ramarao, P. (2005). Green fluorescent proteins in receptor research: An emerging tool for drug discovery. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* *51*, 1–23.
- Baltimore, D. (1970). Viral RNA-dependent DNA Polymerase: RNA-dependent DNA Polymerase in Virions of RNA Tumour Viruses. *Nature* *226*, 1209.
- Bedzhov, I., Graham, S.J.L., Leung, C.Y., and Zernicka-Goetz, M. (2014). Developmental plasticity, cell fate specification and morphogenesis in the early mouse embryo. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* *369*, 20130538–20130538.
- Beh, C.W., Zhou, W., and Wang, T.-H. (2012). PDMS-Glass bonding using grafted polymeric adhesive - Alternative process flow for compatibility with patterned biological molecules. *Lab Chip* *12*, 4120–4127.
- Brower, K., White, A.K., and Fordyce, P.M. (2017). Multi-step Variable Height Photolithography for Valved Multilayer Microfluidic Devices. *Journal of Visualized Experiments*.
- Cadiñanos, J., and Bradley, A. (2007). Generation of an inducible and optimized piggyBac transposon system†. *Nucleic Acids Res* *35*, e87.
- Campo, A. del, and Greiner, C. (2007). SU-8: a photoresist for high-aspect-ratio and 3D submicron lithography. *Journal of Micromechanics and Microengineering* *17*, R81–R95.
- Coons, A.H. (1949). LOCALIZATION OF ANTIGEN IN TISSUE CELLS: II. IMPROVEMENTS IN A METHOD FOR THE DETECTION OF ANTIGEN BY MEANS OF FLUORESCENT ANTIBODY. *Journal of Experimental Medicine* *91*, 1–13.
- Dalby, B. (2004). Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods* *33*, 95–103.
- Evans, M.J., and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* *292*, 154–156.
- Evans, J.M., O'Neill, J.T., Little, J.L., Albus, J.S., Barbera, A.J., Fife, D.W., Fong, E.N., Gilsinn, D.E., Holberton, F.E., Lucas, B.G., et al. Standards for computer aided manufacturing (National Bureau of Standards).
- Giachino, C., Orlando, L., and Turinotto, V. (2013). Maintenance of Genomic Stability in Mouse Embryonic Stem Cells: Relevance in Aging and Disease. *Int J Mol Sci* *14*, 2617–2636.

- Gómez-Sjöberg, R., Leyrat, A.A., Pirone, D.M., Chen, C.S., and Quake, S.R. (2007). Versatile, Fully Automated, Microfluidic Cell Culture System. *Analytical Chemistry* *79*, 8557–8563.
- Gonzalez, R.C., Woods, R.E., and Masters, B.R. (2009). Digital Image Processing, Third Edition. *Journal of Biomedical Optics* *14*, 029901.
- Grabundzija, I., Irgang, M., Mátés, L., Belay, E., Matrai, J., Gogol-Döring, A., Kawakami, K., Chen, W., Ruiz, P., Chuah, M.K.L., et al. (2010). Comparative Analysis of Transposable Element Vector Systems in Human Cells. *Mol Ther* *18*, 1200–1209.
- Granier, C., Gurchenkov, V., Perea-Gomez, A., Camus, A., Ott, S., Papanayotou, C., Iranzo, J., Moreau, A., Reid, J., Koentges, G., et al. (2011). Nodal cis-regulatory elements reveal epiblast and primitive endoderm heterogeneity in the peri-implantation mouse embryo. *Developmental Biology* *349*, 350–362.
- Guirao, B., Rigaud, S.U., Bosveld, F., Bailes, A., López-Gay, J., Ishihara, S., Sugimura, K., Graner, F., and Bellaïche, Y. (2015). Unified quantitative characterization of epithelial tissue development. *ELife* *4*.
- Guo, G., Yang, J., Nichols, J., Hall, J.S., Eyres, I., Mansfield, W., and Smith, A. (2009). Klf4 reverts developmentally programmed restriction of ground state pluripotency. *Development* *136*, 1063–1069.
- Hayashi, K., and Saitou, M. (2013). Generation of eggs from mouse embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Nature Protocols* *8*, 1513–1524.
- Hayashi, K., Ohta, H., Kurimoto, K., Aramaki, S., and Saitou, M. (2011). Reconstitution of the Mouse Germ Cell Specification Pathway in Culture by Pluripotent Stem Cells. *Cell* *146*, 519–532.
- Hotelling, H. (1936). Relations Between Two Sets of Variates. *Biometrika* *28*, 321–377.
- Hsu, P.D., Lander, E.S., and Zhang, F. (2014). Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell* *157*, 1262–1278.
- Iglesias, A.A., and Losada, M. (1988). Purification and kinetic and structural properties of spinach leaf NADP-dependent nonphosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* *260*, 830–840.
- Imuta, Y., Kiyonari, H., Jang, C.-W., Behringer, R.R., and Sasaki, H. (2013). Generation of knock-in mice that express nuclear enhanced green fluorescent protein and tamoxifen-inducible Cre recombinase in the notochord from *Foxa2* and *T* loci: Mouse Lines Expressing EGFP and Inducible CRE. *Genesis* *51*, 210–218.
- Keller, G. (2005). Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. *Genes & Development* *19*, 1129–1155.
- Mata, A., Fleischman, A.J., and Roy, S. (2005). Characterization of Polydimethylsiloxane (PDMS) Properties for Biomedical Micro/Nanosystems. *Biomed Microdevices* *7*, 281–293.
- Melling, A. (1997). Tracer particles and seeding for particle image velocimetry. *Meas. Sci. Technol.* *8*, 1406–1416.
- Moliner, A., Enfors, P., Ibáñez, C.F., and Andäng, M. (2008). Mouse embryonic stem cell-derived spheres with distinct neurogenic potentials. *Stem Cells Dev.* *17*, 233–243.
- Morange, M. (2000). A History of Molecular Biology (Harvard University Press).
- Mullis, K.B., Erlich, H.A., Arnheim, N., Horn, G.T., Saiki, R.K., and Scharf, S.J. (1989). Process for amplifying, detecting, and/or cloning nucleic acid sequences.
- Nemani, K.V., Moodie, K.L., Brennick, J.B., Su, A., and Gimi, B. (2013). In vitro and in vivo evaluation of SU-8 biocompatibility. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* *33*.
- Norris, D.P., and Robertson, E.J. (1999). Asymmetric and node-specific Nodal expression patterns are controlled by two distinct cis-acting regulatory elements. *Genes Dev* *13*, 1575–1588.
- Ohinata, Y., Ohta, H., Shigeta, M., Yamanaka, K., Wakayama, T., and Saitou, M. (2009). A Signaling Principle for the Specification of the Germ Cell Lineage in Mice. *Cell* *137*, 571–584.
- Otsu, N. A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms. *5*.
- Pankov, R., and Yamada, K.M. (2002). Fibronectin at a glance. *Journal of Cell Science* *115*, 3861–3863.
- Papanayotou, C., Benhaddou, A., Camus, A., Perea-Gomez, A., Jouneau, A., Mezger, V., Langa, F., Ott, S., Sabéran-Djoneidi, D., and Collignon, J. (2014). A Novel Nodal Enhancer Dependent on Pluripotency Factors and Smad2/3 Signaling Conditions a Regulatory Switch During Epiblast Maturation. *PLoS Biology* *12*, e1001890.
- Pearson, K. (1901). LIII. On lines and planes of closest fit to systems of points in space.
- Peterson, S.L., McDonald, A., Gourley, P.L., and Sasaki, D.Y. (2005). Poly(dimethylsiloxane) thin films as biocompatible coatings for microfluidic devices: Cell culture and flow studies with glial cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* *72A*, 10–18.
- Phillips, G.J. (2001). Green fluorescent protein--a bright idea for the study of bacterial protein localization. *FEMS Microbiol. Lett.* *204*, 9–18.
- Renz, M. (2013). Fluorescence microscopy-A historical and technical perspective: Fluorescence Microscopy. *Cytometry Part A* *83*, 767–779.

- Rosenfeld, A. (1973). Progress in Picture Processing: 1969–71. *ACM Computing Surveys* *5*, 81–108.
- Russell, S.J., and Norvig, P. (1995). Artificial intelligence: a modern approach (Englewood Cliffs, N.J: Prentice Hall).
- Salleh, N., and Giribabu, N. (2014). Leukemia Inhibitory Factor: Roles in Embryo Implantation and in Nonhormonal Contraception. *ScientificWorldJournal* *2014*.
- Schmolka, I. (1973). Polyoxyethylene-Polyoxypropylene Aqueous Gels.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* *9*, 671–675.
- Sorre, B., Warmflash, A., Brivanlou, A.H., and Siggia, E.D. (2014). Encoding of Temporal Signals by the TGF- β Pathway and Implications for Embryonic Patterning. *Developmental Cell* *30*, 334–342.
- Spring and Davidson (2008). Introduction to Fluorescence Microscopy.
- Tamm, C., Pijuan Galitó, S., and Annerén, C. (2013). A Comparative Study of Protocols for Mouse Embryonic Stem Cell Culturing. *PLoS ONE* *8*, e81156.
- Tesar, P.J., Chenoweth, J.G., Brook, F.A., Davies, T.J., Evans, E.P., Mack, D.L., Gardner, R.L., and McKay, R.D.G. (2007). New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* *448*, 196–199.
- Tropepe, V., Hitoshi, S., Sirard, C., Mak, T.W., Rossant, J., and Kooy, D. van der (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.
- Tsao, C.-W., and DeVoe, D.L. (2009). Bonding of thermoplastic polymer microfluidics. *Microfluid Nanofluid* *6*, 1–16.
- Unger, M.A. (2000). Monolithic Microfabricated Valves and Pumps by Multilayer Soft Lithography. *Science* *288*, 113–116.
- Vieira, P.M. (2018). Régulation de l'expression du gène Nodal lors de la différenciation des cellules souches embryonnaires. *128*.
- Ward, J.H. (1963). Hierarchical Grouping to Optimize an Objective Function. *Journal of the American Statistical Association* *58*, 236.
- Whitesides, G.M. (2006). The origins and the future of microfluidics. *Nature* *442*, 368–373.
- Williams, R.L., Hilton, D.J., Pease, S., Willson, T.A., Stewart, C.L., Gearing, D.P., Wagner, E.F., Metcalf, D., Nicola, N.A., and Gough, N.M. (1988). Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* *336*, 684–687.
- Wolpert, L. (2002). Principles of development (Oxford: Oxford University Press).
- Wu, J., Mu, S., Guo, M., Chen, T., Zhang, Z., Li, Z., Li, Y., and Kang, X. (2016). Histone H2B gene cloning, with implication for its function during nuclear shaping in the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Gene* *575*, 276–284.
- Ying, Q.-L., Wray, J., Nichols, J., Batlle-Morera, L., Doble, B., Woodgett, J., Cohen, P., and Smith, A. (2008). The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* *453*, 519–523.

III. Résultat

Ici, nous allons nous intéresser plus particulièrement à l'influence du profil temporel de stimulation du morphogène Nodal. *Nodal* est un gène essentiel du développement des embryons au stade précoce, où il a notamment été montré que son expression est nécessaire à la gastrulation de l'embryon de souris, car un embryon *Nodal*-/- ne fait pas de ligne primitive (Conlon, 1994). Aujourd'hui, on sait que Nodal joue un rôle central pour la maturation de l'épiblaste, la formation de la ligne primitive et l'établissement de l'axe droite-gauche, que son expression est très dynamique et qu'il est contrôlé par 5 enhancers pour garantir son expression spatio-temporelle [Chapitre 1, partie 3].

Nodal appartient à la famille des facteurs de la voie de signalisation TGF- β , dont il en est régulé positivement et qu'il active la voie lorsqu'il est exprimé sous forme de morphogène. La voie de signalisation TGF- β étant autant sensible au *niveau* de stimulation qu'à sa *vitesse* [Chapitre 1, Partie 2], prendre en compte la dynamique d'intégration de la voie de signalisation est important si l'on veut comprendre la régulation de Nodal et l'organisation spatiale de l'embryon aux stades précoces.

1. Caractérisation de l'expression de Nodal et de l'activité de la voie TGF- β au cours de la maturation des mESC vers les mEpiLC

Nous nous sommes intéressés au rôle que joue le profil temporel de stimulation de la voie TGF- β dans la régulation de l'expression de Nodal qui a été décrit comme une cible de cette voie. Comme il n'est pas possible de contrôler précisément le profil temporel de stimulation de la voie TGF- β *in vivo*, nous avons choisi une approche *in vitro* qui récapitule une des étapes de différenciation des cellules dans l'embryon qui est la maturation de l'épiblaste [Chapitre 1, Partie 4].

Evolution de l'expression de Nodal au cours de la transition mESC vers mEpiLC

Nous avons dans un premier temps caractérisé l'expression de Nodal en temps réel au cours de la transition « ESC→EpiLC » suivant le protocole d'Hayashi. Ce protocole émule *in vitro* la maturation de l'épiblaste. La maturation de l'épiblaste est déclenchée par le remplacement du milieu de maintenance à l'état pluripotent naïf (N2B27+2i) par un milieu N2B27+Activin+KSR+FGF [Chapitre 2, Partie 1].

L'expression de Nodal est mesurée à partir d'une lignée rapportrice *Nodal* ^{condHBE-YFP} au microscope confocal et par RT-qPCR. *Nodal* ^{condHBE-YFP} a été développée par le laboratoire de notre collaborateur Jérôme Collignon (Papanayotou et al., 2014). La lignée est présentée plus en détail au chapitre 2, partie 2 et nous y avons ajouté un marqueur de noyaux H2B-RFP qui permet de segmenter les cellules individuelles grâce à des algorithmes d'analyse d'image [Chapitre 2, Partie 5]. Les amorces pour la qPCR sont décrites au chapitre 2, partie 2. Pour mesurer l'effet de l'activine au cours de la maturation, nous avons ajouté la mesure de deux contrôles, l'un avec un milieu neutre sans Activine et bFGF et l'autre avec un délai de stimulation en milieu Activine+bFGF de 48 h, précédé d'une culture en milieu neutre. La quantité de cellules par puits est adaptée du protocole d'Hayashi pour reproduire les mêmes conditions expérimentales (10^4 cellules par puits de 0.5cm^2) (Hayashi et al., 2011).

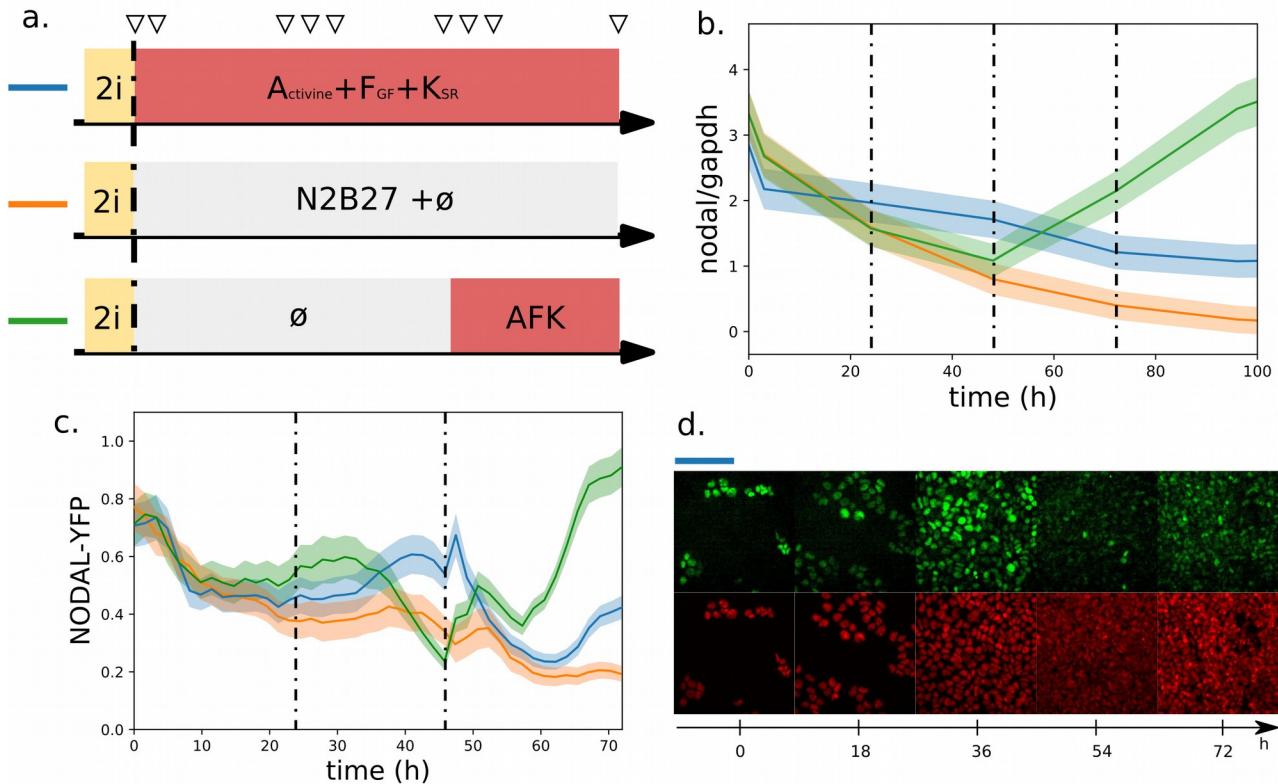


Figure 43: Le profil d'expression de Nodal *condHBE-YFP* au cours de la transition ESC vers EpiLC et influence de la présence d'Activine sur ce profil. a. : Protocole de stimulation en Activine, en jaune, le milieu de maintien à l'état de pluripotence naïf N2B27+2i+LIF, en rouge, le milieu décrit dans le protocole d'Hayashi (Hayashi et al., 2011), en gris, le milieu neutre N2B27+KSR, la barre verticale pointillée indique le passage cellulaire et les flèches indiquent les points de mesure de la RT-qPCR. b. : Profil d'expression de Nodal mesurée par RT-qPCR suivant les 3 conditions expérimentales (a), les barres d'erreur correspondent à l'erreur type pour 2 répliques techniques de 2 répliques physiques. c. Profil d'expression moyen du rapporteur fluorescent de Nodal suivant les 3 conditions expérimentales (a), les barres d'erreurs correspondent à l'écart-type de la population cellulaire. ($n_i = 200$; $n_f = 2000$) d. : Image du rapporteur fluorescent Nodal *condHBE-YFP* au cours de plusieurs étapes de la maturation de l'épiblaste, en vert Nodal *condHBE-YFP* et en rouge, le marqueur de noyau H2B-RFP. (b,c) : Les barres verticales pointillées indiquent les renouvellements de milieu. Le « zéro » de l'expérience sous con-focal correspond à 30 minutes après l'arrêt de la pluripotence, relatif à la thermalisation des éléments de microscopie.

Ces expériences nous montrent que l'expression de Nodal semble indépendante de la présence d'Activine au début de la différenciation de $t=0$ à $t=24$ h [Figure 43: b,c : courbe bleue], puis elle devient dépendante de l'Activine à partir du deuxième jour, car sans Activine dans le milieu, l'expression du rapporteur *Nodal* *condHBE-YFP* continue de chuter alors qu'elle se maintient en présence d'Activine. De plus, l'ajout d'Activine à $t=48$ h réactive l'expression de Nodal. Il est intéressant de noter, et nous y reviendrons, que l'ajout de l'Activine à 48h active plus fortement le profil d'expression de *Nodal* *condHBE-YFP* dans le troisième jour qu'une stimulation en Activine à $t = 0$ [Figure 43: b,c : courbe orange]. Les mesures d'expression de Nodal par RT-qPCR, donne des résultats similaires avec celles obtenues avec le rapporteur fluorescent *Nodal* *condHBE-YFP*.

Les images de fluorescence nous montrent qu'à partir de 36-40h, les cellules semblent occuper toute la surface de mesure et qu'à partir de 54-60h, les cellules semblent très compactes et qu'à ce moment le signal en fluorescence est éteint pour la plupart des cellules [Figure 43: d]. Les hétérogénéités d'ensemencement dans le puits nous ont permis d'observer que cette extinction apparaît d'autant plus tôt que la densité cellulaire locale est forte. Pour vérifier si la densité cellulaire a un effet sur le profil d'expression de *Nodal*^{condHBE-YFP}, nous avons reproduit le protocole de stimulation en Activine, mais avec une densité initiale plus faible. Nous avons choisi une densité initiale 10 fois inférieure à l'expérience précédente, de façon à ce que les cellules n'arrivent à confluence qu'à partir de la fin de l'expérience.

Dans ces conditions, le profil de *Nodal*^{condHBE-YFP} est constant en présence d'Activine contrairement à l'expérience à plus forte densité [Figure 43: d]. L'influence de la présence d'Activine dans le milieu est la même que précédemment, l'expression de *Nodal*^{condHBE-YFP} chute en absence d'Activine et elle est ré-activée par l'ajout d'Activine à t=48h [Figure 44: c]. La principale différence entre les expériences à forte et faible densité est observée dans la distribution des niveaux d'expression de *Nodal*^{condHBE-YFP}. On observe sur les courbes que l'écart-type est plus grand à faible densité et les images de la fluorescence de *Nodal*^{condHBE-YFP} montrent clairement l'existence de deux populations à faible densité. Cette observation est confirmée par le tracé de l'histogramme des valeurs de fluorescence [Figure 44, d]. Nous avons quantifié la distribution de *Nodal*^{condHBE-YFP} à t=48h en échelle "log" suivant les deux densités cellulaires initiales, et on observe que pour le cas à faible densité, on a deux pics de réponse ($\mu_1 = 5,2$; $\mu_2 = 5,8$), alors qu'à forte densité, on a un seul pic de réponse ($\mu_1 = \mu_2 = 5,5$) mais le signal est plus faible [Figure 44, d].

Il a déjà été montré avec des C2C12, qu'une faible densité cellulaire pouvait augmenter la variabilité de réponse de la voie de signalisation TGF- β (Sorre et al., 2014). Dans notre cas, nous observons aussi que la densité cellulaire a une forte influence sur le profil de réponse et notamment à faibles densités cellulaires, où l'on observe en plus deux populations différentes se former. Dans la suite, nous avons, sauf mention contraire, travaillé à densité cellulaire élevée pour avoir une réponse homogène, ce qui simplifie les analyses.

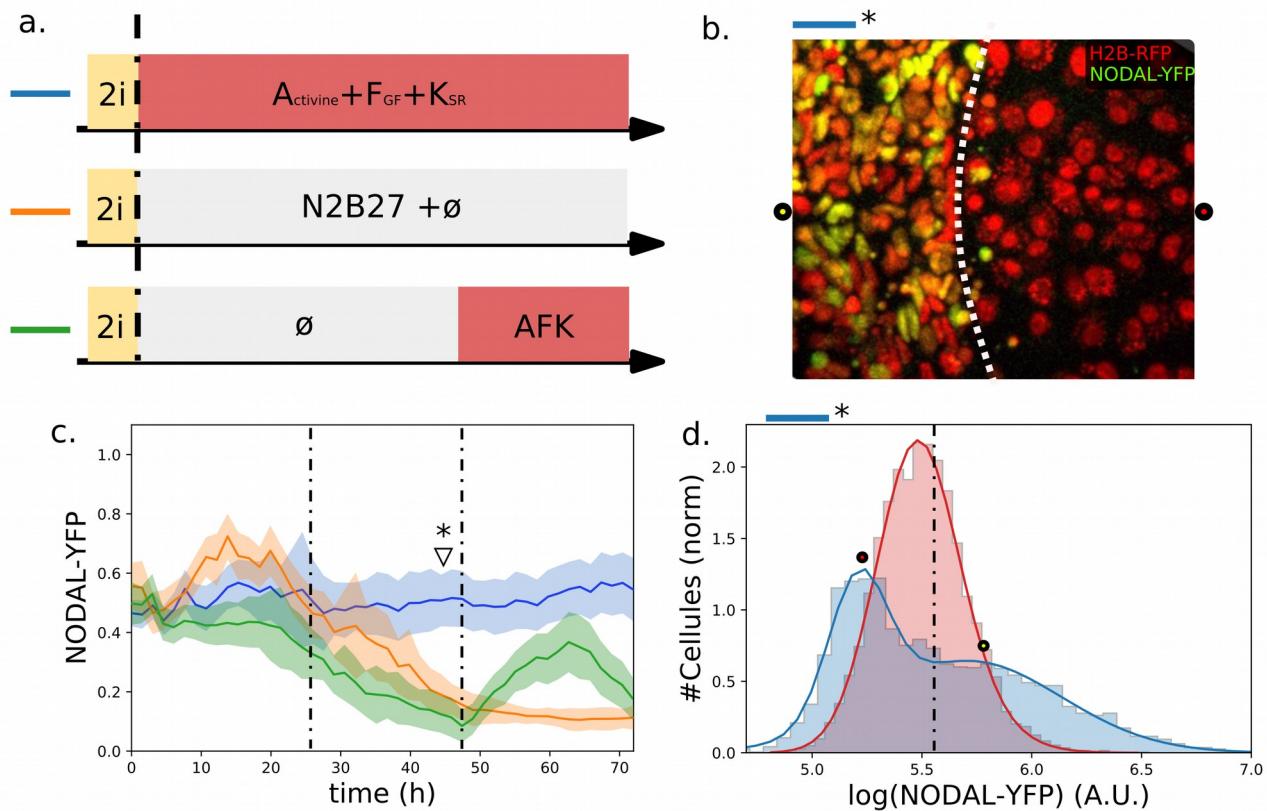


Figure 44: Le profil d'expression de Nodal condHBE-YFP au cours de la transition ESC vers EpiLC à faible densité. a. : Protocole de stimulation en Activine, en jaune, le milieu de maintien à l'état de pluripotence naïf (N2B27+2i+LIF), en rouge, le milieu décrit dans le protocole d'Hayashi (Hayashi et al., 2011), en gris, le milieu neutre N2B27+KSR, la barre verticale pointillée indique le passage cellulaire. b. : Image montrant deux phénotypes différents à réponse différente. c. : Profil d'expression moyen du rapporteur fluorescent de Nodal suivant les 3 conditions expérimentales (a), les barres d'erreurs correspondent à l'écart-type de la population cellulaire ($n_i = 30$; $n_f = 1000$). d. : (b,c) : Distribution du log de la fluorescence de Nodal-YFP à $t=48h$ pour une stimulation en Activine à $t=0$, en rouge, le cas à forte densité initiale [Figure 43, c] et en bleu, le cas à faible densité initiale (c : flèche), les distributions sont ajustées par une gaussienne bimodale ($\text{gauss}(x,\mu_1,\sigma_1,A_1)+\text{gauss}(x,\mu_2,\sigma_2,A_2)$ avec $\text{gauss}(x,\mu,\sigma,A) = A \cdot \exp(-(x-\mu)^2/2/\sigma^2)$). Le « zéro » de l'expérience sous con-focal correspond à 30 minutes après l'arrêt de la pluripotence, temps relatif à la thermalisation des éléments de microscopie pour démarrer l'acquisition.

Contributions respectives des enhancers HBE et ASE à l'expression de Nodal en fonction du temps

Le profil temporel d'expression de Nodal que nous avons observé n'est pas celui d'une cible simple de la voie TGF-β. Ce profil complexe est cependant compatible avec ce qui est connu de l'activité des différents éléments de régulation qui contrôlent l'expression du gène Nodal au cours du développement. En effet, au niveau moléculaire, l'expression du gène Nodal est régulée par plusieurs éléments de régulation (ou enhancers). On peut mentionner deux éléments impliqués dans la régulation de l'expression de Nodal lors du développement des embryons aux stades précoces : "HBE" et "ASE". L'enhançer "ASE" dispose de séquence cible

aux Smad2-3 et l'enhancer HBE, dispose de séquence cible de facteurs de pluripotence [Chapitre 1, Partie 3].

Dans l'embryon, il a été montré récemment que l'expression de Nodal est régulée par HBE au stade épiblaste pré-implantatoire (E3.5-E4.5) puis devient régulée par ASE en post-implantatoire (E5.5). De même, en culture, Nodal est exprimé dans les mESCs et les EpiLCs lorsque HBE est présent, si HBE est absent des mESCs, Nodal ne s'exprime plus. Lorsque HBE est ôté dans les EpiLCs déjà différencierées Nodal reste exprimé. Cependant, si HBE n'est pas présent en mESCs et si ces cellules sont ensuite différencierées, l'expression de Nodal est nulle (Papanayotou et al., 2014). Ensuite, plus les cellules se spécialisent et plus Nodal est régulé par les autres éléments de régulation dont "ASE". ASE est principalement impliqué dans la régulation de Nodal lors de la gastrulation et l'asymétrisation de l'embryon [Chapitre 1, Partie 3]. On peut aussi mentionner l'élément de régulation PEE, qui participe à l'expression de Nodal lors de la formation de la ligne primitive sous l'influence de la voie Wnt/bcat (Norris et al., 2002) cet élément n'a fait pas partie de mon étude qui a été restreinte au rôle de la voie TGF- β [Chapitre 1, Partie 3].

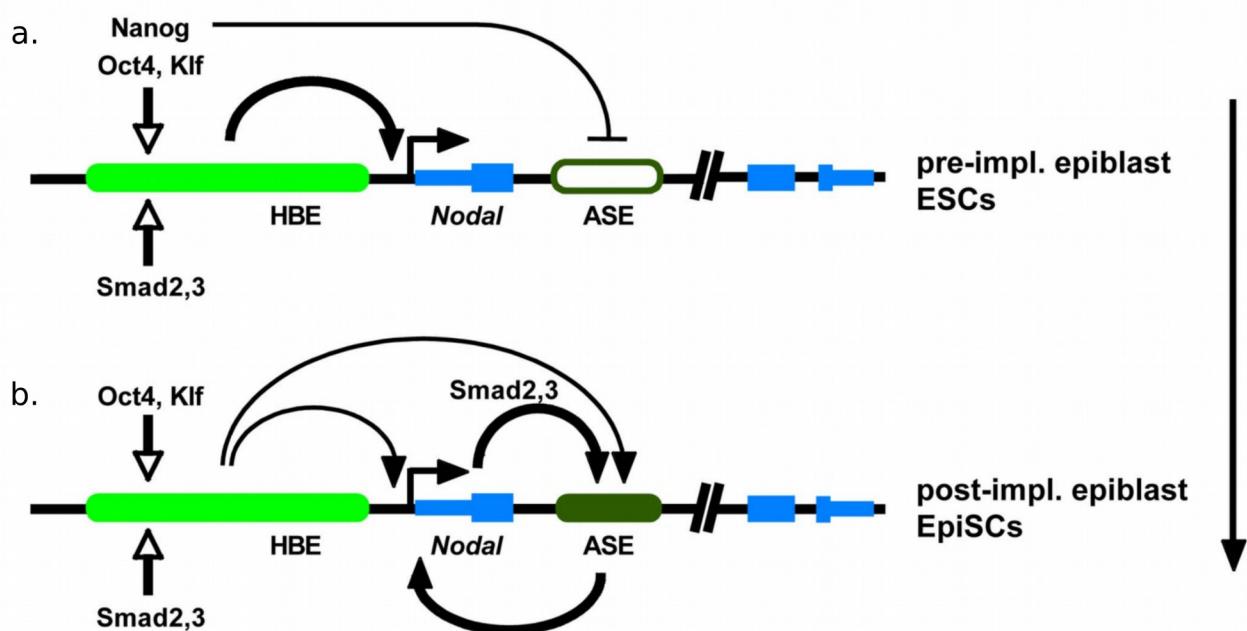


Figure 45: **Modèle de transfert de l'enhancer HBE à ASE pendant la maturation des épiblastes.** a. : Dans l'épiblaste préimplantatoire tardif et dans les cellules ES, des facteurs de pluripotence (principalement Oct4) et la signalisation Nodal / Activine activent HBE, qui régule positivement Nodal. Cependant, Nanog lié sur HBE réprime l'ASE afin que les niveaux d'expression de Nodal restent faibles. b. : Dans l'épiblaste post-implantation et dans les EpiSC, des modifications de la combinaison des facteurs liés à l'HBE permettent à l'ASE de remplacer HBE en tant que principal activateur de l'expression Nodal. Ensuite, la boucle de régulation positive entre Nodal et l'ASE est établie, ce qui entraîne une augmentation niveaux d'expression. (Papanayotou et al., 2014)

Pour vérifier que le profil temporel de Nodal que nous avons observé lors de la maturation est bien compatible avec un changement de régulation contrôlée par HBE vers une expression contrôlée par ASE, nous avons étudié le profil d'expression de lignées rapportrice pour lesquelles ces enhancers ont été supprimés, soit par la méthode Crispr/Cas9 (ASE^{-/-}) soit par la recombinasse CRE (HBE^{-/+}). Nous avons aussi utilisé une lignée transgénique ASE-YFP qui rapporte l'activité de l'élément ASE hors de son contexte. Ces lignées sont présentées en détail au chapitre 1, partie 3 et chapitre 2, partie 2. Cette expérience s'est limitée au cas de la stimulation en Activine directement après l'arrêt de la pluripotence naïve et avec les densités cellulaires initiales fortes et faibles.

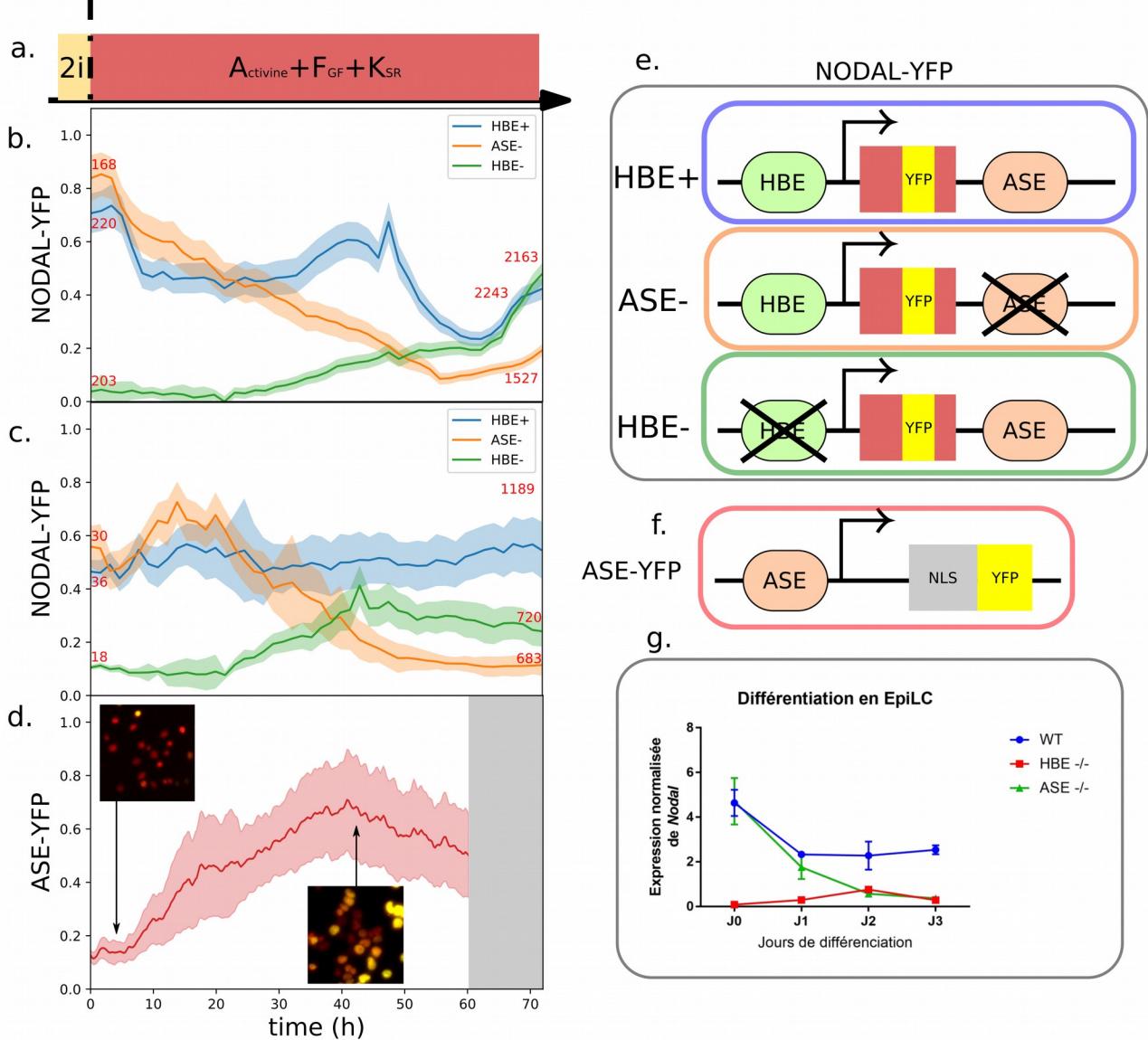


Figure 46: Contribution des éléments de régulation HBE et ASE sur le profil de Nodal. a. : Protocole de stimulation en Activine, en rouge, le milieu décrit par Hayashi (N2B27+Activine+bFGF+KSR), la barre verticale pointillée indique le passage cellulaire. b. : Profil de Nodal à forte densité cellulaire initiale suivant les 3 lignées HBE+, ASE- et HBE- (e). c. : Profil de Nodal à faible densité cellulaire initiale suivant les 3 lignées HBE+, ASE- et HBE- (e). d. : Profil du rapporteur transgénique ASE-YFP à forte densité cellulaire initiale (e), et les images d'acquisition, en rouge, le marqueur de noyau H2B-RFP. e. : Les trois lignées fluorescentes HBE+, ASE- et HBE-, la YFP a été inséré dans l'exon 1 du locus Nodal. f. : Le rapporteur transgénique ASE-YFP. g. : Profils de transcription de Nodal suivant les délétions HBE-/- et ASE-/- (Vieira, 2018). Les barres d'erreurs correspondent à l'écart-type de la population cellulaire pour (b-d) et à l'erreur type pour 2 répliques techniques de 2 répliques physiques pour (g). Le « zéro » de l'expérience sous microscope correspond à 30 minutes après l'arrêt de la pluripotence, temps relatif à la thermalisation des éléments de microscope pour démarrer l'acquisition.

Les courbes de cette expérience nous montrent pour la lignée Nodal-yfp "HBE-", un signal éteint lorsque les cellules sont pluripotentes mais se rallume lorsque les cellules se différencient [Figure 46 : b-c]. A l'inverse pour ASE-, un signal allumé lorsque les cellules sont pluripotentes puis s'éteint progressivement à la mesure où les cellules se différencient. La lignée ASE-YFP

montre une activation progressive du signal rapporteur à partir du deuxième jour de différentiation, mais pas d'expression en sortie du milieu 2i [Figure 46 : d].

Le profil temporel d'expression de notre rapporteur Nodal-yfp est donc cohérent avec le modèle de transition d'une expression de Nodal contrôlée par l'élément HBE à l'état pluripotent naïf vers une expression régulée par l'élément ASE en EpiLC présenté Figure 45 et [Chapitre1, Partie 3] et cela quelque soit la densité initiale de cellules. Nos observations avec des lignées rapportrice sont de plus cohérentes avec les observations de Mathieu Vieira, de l'équipe Collignon qui a mesuré par RT-PCR l'expression endogène de Nodal au cours de la transition mESC vers mEpiLC pour des cellules WT et mutantes HBE(-/-) et ASE(-/-).

Le signal du transgène ASE-YFP est aussi compatible avec le changement de régulation de l'expression de Nodal de l'élément HBE vers l'élément ASE au cours du deuxième jour de différentiation. Cependant, le profil d'ASE-YFP nous a posé question : l'élément ASE a été décrit comme un élément de réponse à la voie TGF- β (Granier et al., 2011; Norris et al., 2002). Et à la réflexion, il peut donc sembler surprenant qu'il mette autant de temps à s'activer. Des expériences avec un autre élément de régulation rapporteur synthétique de la voie TGF- β « CAGA12 » en cellules C2C12 (Sorre et al., 2014) montrent en effet une activation instantanée du rapporteur après la stimulation. Pour expliquer ce retard à l'activation, nous avons imaginé deux explications possibles : soit il pourrait s'agir d'un mécanisme épigénétique, soit la voie de signalisation TGF- β n'est pas active.

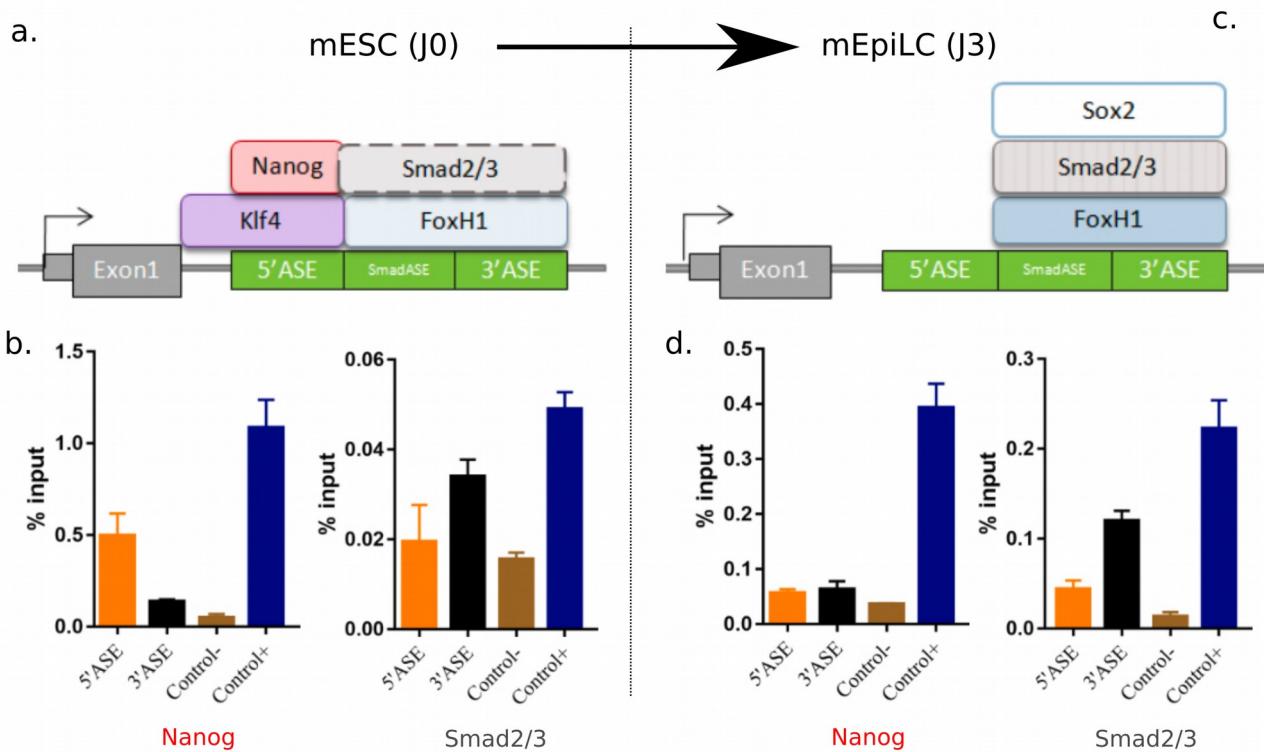


Figure 47: Evolution du paysage épigénétique sur ASE lors de la maturation des cellules vers les EpiLC. a.-b. : Schéma représentant les facteurs de transcription identifié sur ASE à l'aide des expériences de ChIP-qPCR. b.c. : Données de ChIP-qPCR, montrant l'évolution des niveaux des facteurs de transcription Nanog (pluripotence) et Smad2/3 (TGF-β) sur ASE. (Vieira, 2018)

Mathieu Vieira a travaillé en partie durant sa thèse dans l'équipe Collignon sur la première hypothèse. Il a montré par analyse ChIP-qPCR que la modification des histones au sein du locus Nodal affectait le recrutement des Smads sur l'élément ASE, via l'association de facteurs de pluripotence (Nanog et Klf4). Le niveau smad2/3 est inférieur lors de l'état mESC par rapport à l'état mEpiLC (0,02 % sur 5'ASE et 0,03 % sur 3'ASE de l'input en mESC puis 0,05 % sur 5'ASE et 0,12 % sur 3'ASE de l'input en EpiLC) [Figure 47 : b,d]. Pour Nanog c'est l'inverse, où l'on a le niveau Nanog qui est supérieur lors de l'état mESC par rapport à l'état mEpiLC (0,5 % sur 5'ASE et 0,15 % sur 3'ASE de l'input en mESC puis 0,05 % sur 5'ASE et 3'ASE de l'input en EpiLC) [Figure 47 : b,d]. Cette observation pourrait expliquer le profil de Nodal lors de la différenciation des mESC, car Nanog décroît fortement dans les 15 premières heures de la transition mESC vers mEpiLC (Hayashi et al., 2011).

Cependant, le rapporteur ASE-YFP est un transgène et est donc inséré dans le génome a priori hors du locus Nodal. De plus, l'élément rapporteur qui a été utilisé pour fabriquer ce transgène ne contient que la partie 3' de l'élément ASE alors que Mathieu Viera a montré que Nanog se liait plutôt sur la partie 5' qui est donc absente du transgène. Il nous a donc semblé peu probable qu'une régulation épigénétique soit à l'origine du profil temporel observé.

Pour cela, nous avons donc voulu vérifier une deuxième possibilité : le transgène ASE-YFP rapporte fidèlement l'activité de la voie TGF- β qui n'est juste pas active ou sensible durant le premier jour du protocole de différenciation.

2. Caractérisation de l'activité et la sensibilité de la voie TGF- β à différents moments de la transition mESC vers EpiLC

Nos expériences avec les rapporteurs Nodal-YFP, ASE- et surtout les résultats avec le transgène ASE-YFP, un rapporteur synthétique, nous amènent à émettre l'hypothèse que les cellules ne répondent pas de la même manière à une stimulation de la voie de signalisation TGF- β au cours du protocole de différenciation d'Hayashi.

Pour le vérifier, nous avons caractérisé l'activité et la sensibilité de la voie de signalisation TGF- β à deux niveaux. Premièrement en amont, au niveau de l'activité des récepteurs, en mesurant par immunofluorescence la localisation des smads2-3 dans le noyau ou le signal nucléaire d'un anticorps spécifique de la forme phosphorylée de Smad2, puis en aval au niveau transcriptionnel en mesurant l'évolution de l'expression de l'ARN de gènes connus pour être des cibles de la voie de signalisation.

Nous avons mesuré l'évolution de l'activité de la voie TGF- β avec ces deux méthodes complémentaires pour des stimulations avec de l'Activine à différents moments après l'arrêt de pluripotence. Ces méthodes sont décrites au chapitre 2, partie 2.

Mesure de la réponse des cellules par immunofluorescence contre Smad2/3 et p-Smad2

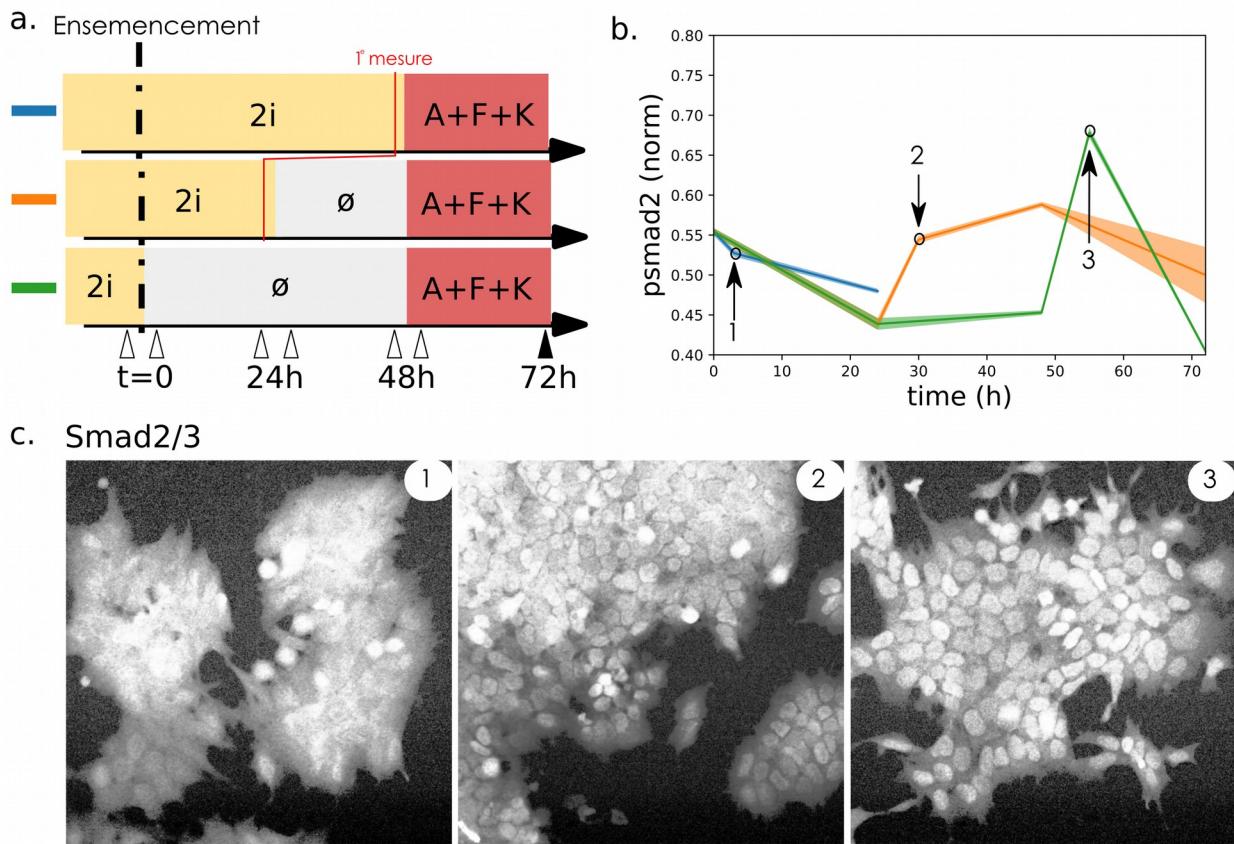


Figure 48: Profils des smads après l'arrêt de la pluripotence. a. : le protocole de culture inversé et les points temporels d'analyses. Les flèches indiquent les changements de milieu, où la flèche noir correspond aussi au temps de fixation. La barre verticale pointillée indique le passage cellulaire. b. : Profils des pSmad2 suivant les 3 protocoles (a). c. : Images d'acquisition au con-focal des cibles Smad2/3 réalisée simultanément avec les cibles pSmad2 aux trois points temporels des courbes de (b). Les barres d'erreurs en (b) correspondent à l'écart-type de la population cellulaire ($n=300$).

Nous avons mesuré à cellule unique le niveau de fluorescence des marqueurs immunofluorescents pSmad2 où les noyaux sont segmentés à partir du DAPI. Dans le cas de la stimulation à $t=0$, il ne semble pas y avoir d'augmentation de la quantité de pSmad2 après ajout de l'Activine. En revanche le signal mesuré est élevé mais le fait qu'il ne soit pas vraiment nucléaire nous a fait suspecter un problème de bruit de fond du marquage [Figure 48 : b]. On observe un profil adaptatif de la réponse des Smads à partir de 24 h après l'arrêt de la pluripotence, dont le temps d'adaptation est plus court lorsqu'on stimule à 48 h par rapport à 24 h.

Les expériences d'immunofluorescences (IF) ont été réalisées en culture inversée, c'est à dire que les cellules sont ensemencées au même moment et stimulées de façon à avoir des durées de stimulations différentes tout en fixant les cellules au même moment [Figure 48 : a]. Ce protocole est pratique, mais les cellules ne sont pas stimulées à la même densité ce qui peut introduire des artefacts : par exemple, pour la stimulation à $t=0$, les cellules ont passé 3

jours dans le puits de culture en condition 2i+LIF et sont donc sous forme de grosses colonies compactes au moment de la stimulation.

Pour cela, nous avons reproduit cette expérience, à 30 000 cellules par puits, mais uniquement pendant 2 jours de culture et où on les a stimulés à partir de 24 h après ensemencement.

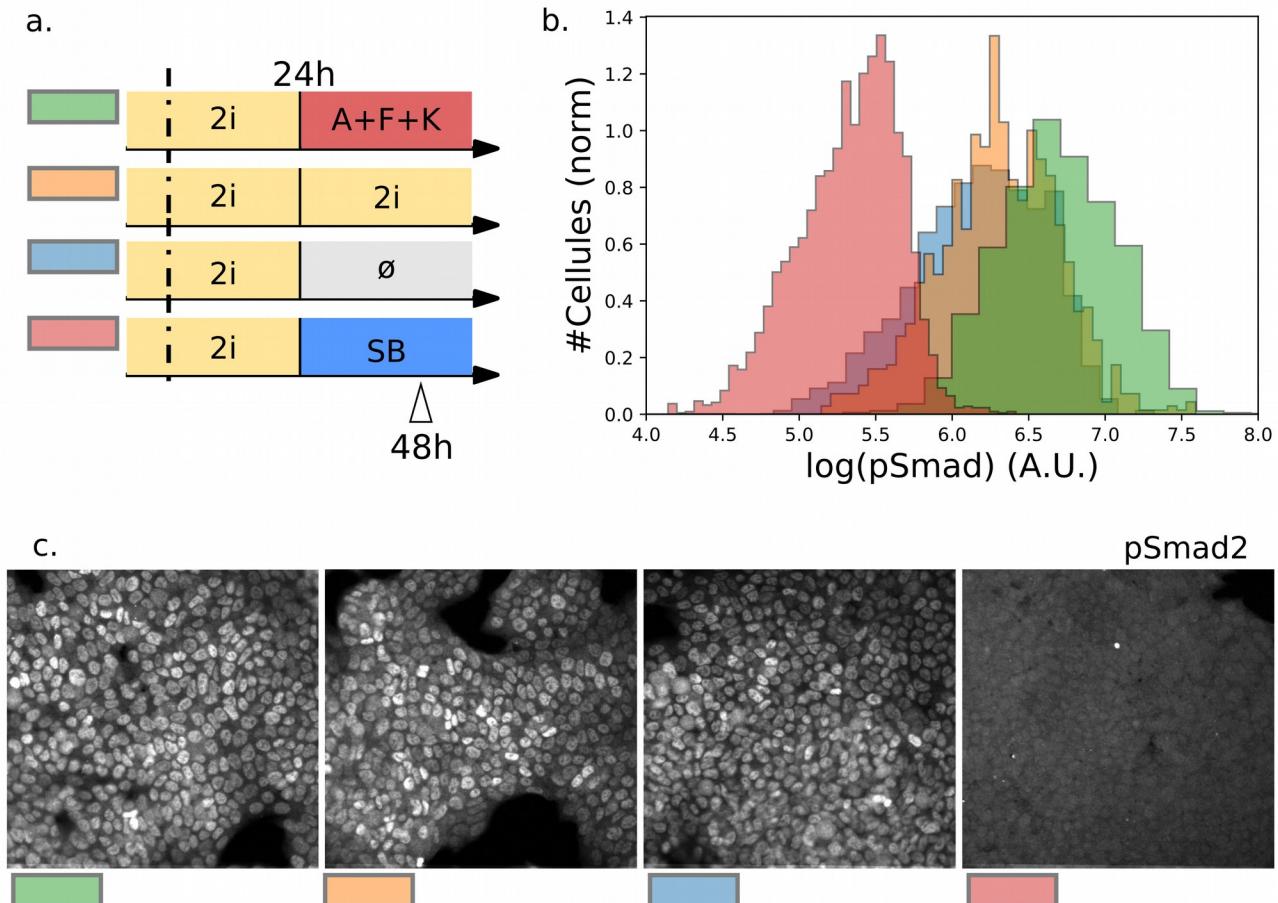


Figure 49: **Distribution des pSmad2 dans le noyau à 24h après l'ensemencement des cellules.** a. : protocole de culture non inversé pour limiter l'effet de la densité cellulaire et les contrôles « non stimulé » et « avec du SB-431542 », un inhibiteur des récepteurs kinase d'Activine. La barre verticale pointillée indique le passage cellulaire. b. : Distribution de la présence des psmad2 en échelle log suivant les protocoles au couleurs correspondantes (a). c. : les images d'acquisition des pSmad2 des protocoles correspondant (d).

Cette fois c'est plus clair, les distributions de réponse nous montrent que la voie est « active » au sortir du milieu de pluripotence « 2i », car les pSmad2 sont élevés et disparaissent en présence de l'inhibiteur des récepteurs kinase d'Activine SB-431542, mais elle ne « répond » pas, car l'ajout d'Activine n'entraîne pas d'augmentation du signal [Figure 49 : a-b].

Mesure de l'activité de la voie de signalisation TGF-β par RT-qPCR

Pour les expériences de RT-qPCR, on a utilisé plusieurs marqueurs décrits comme étant des cibles directes de la voie de signalisation TGF-β, telle que: « LEFTY2 et pITX2 » (Adachi et al., 1999; Hamada et al., 2002) et HAND1 (Scott et al., 2000) qui est corrélé indirectement à l'activité de la voie de signalisation TGF-β (Heemskerk et al., 2018). Pour cette expérience, on a cultivé nos cellules en boîte de petri et on a prélevé les cellules en plusieurs points temporels de stimulation.

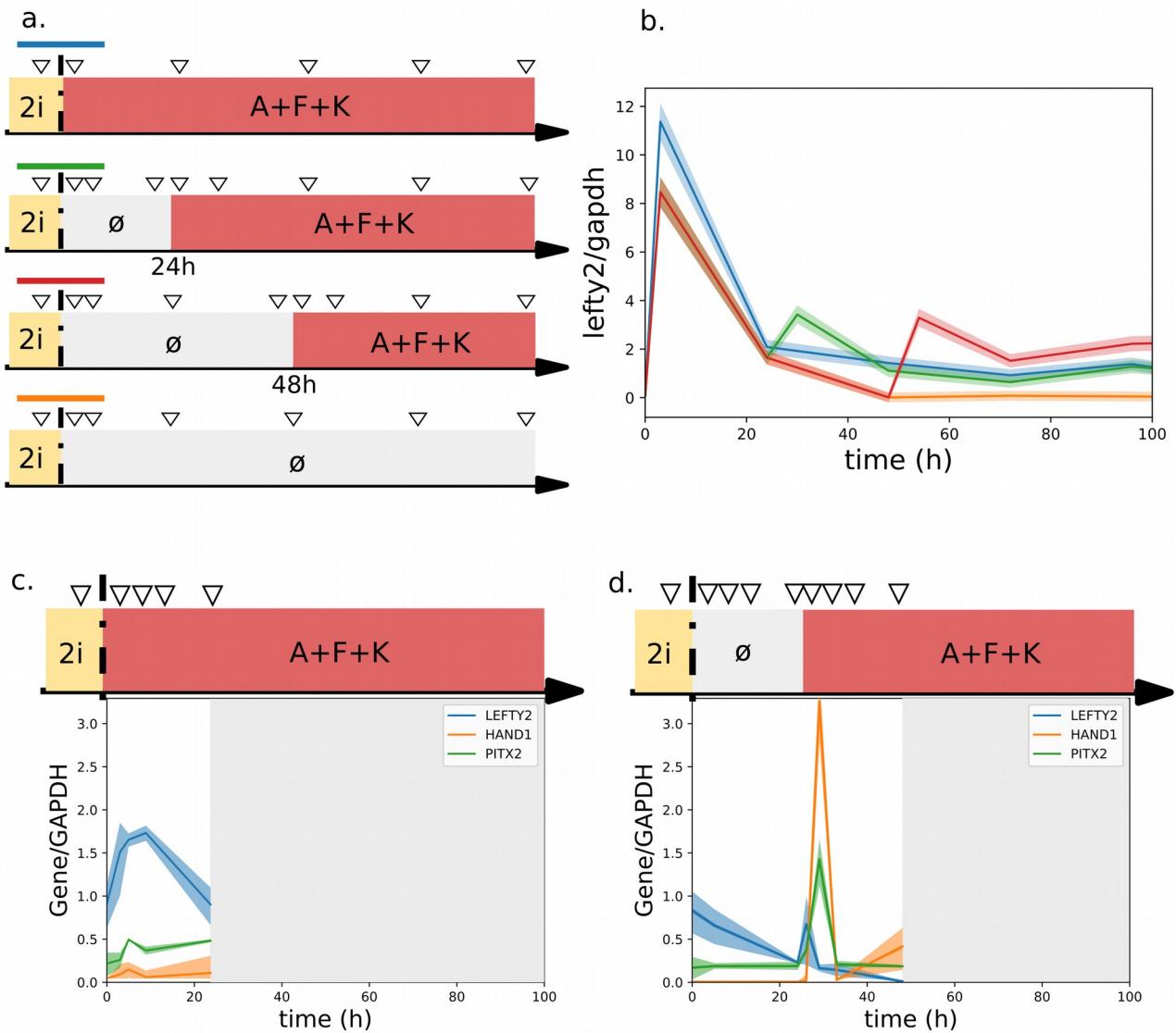


Figure 50 : Profils des marqueurs de la voie de signalisation TGF- β suivant plusieurs temps de stimulation. a. : Protocole de stimulation en Activine, le code couleur est le même que précédemment. La barre verticale pointillée indique le passage cellulaire et les flèches indique les points de mesure de la RT-qPCR (b). b. : Profil temporel de LEFTY2 normalisé par le standard GAPDH suivant les protocoles (a). c. : Profils des 3 gènes cibles de la voie de signalisation TGF- β suivant le protocole d'Hayashi. d. Profils des 3 marqueurs de la voie de signalisation TGF- β pour une stimulation 24h après l'arrêt de la pluripotence. Les barres d'erreurs correspondent à l'erreur types pour 2 réplications techniques de 2 réplicats biologiques/physiques.

L'analyse de ces expériences de RT-qPCR, nous montrent des résultats globalement compatibles avec les IF Smad2 montrées plus haut. À 24h, l'expression des gènes cibles augmente fortement et de manière adaptative [Figure 50: d]. A t=0, nous avons observé une activation modérée des gènes cibles suivant l'ajout d'activine, mais au moins une d'entre elle (*lefty2*) avait un niveau d'activation basale élevé, compatible avec le fait que Smad2 soit déjà fortement phosphorylé en sorti de la condition 2i+LIF [Figure 50: b-c].

Ces deux séries d'expériences (IF+RT-PCR) nous montrent que la voie TGF- β est active ou activable tout au long de la différenciation des mESC vers les mEpiLC, mais que sa sensibilité

évolue fortement. En effet, à t=0, l'amplitude de réponse à une stimulation par de l'activine, mesurée soit par pSmad2 ou en RT-PCR, est faible alors qu'elle est forte à t=24h [Figure 48,Figure 49,Figure 50]. En revanche, le niveau basal (avant l'ajout d'activine dans le milieu) d'activité de la voie est élevé à t=0 (pSmad2 élevé, Lefty2 exprimé) alors qu'il est plus faible à t=24h. À t=0, le niveau élevé d'activité de la voie est cohérent avec le fait que les cellules expriment Nodal [Figure 43,Figure 44].

Comment expliquer alors que le rapporteur ASE-YFP soit inactif à la sortie de pluripotence alors que la voie TGF- β est active ? [Figure 46 : d]

Les expériences menées précédemment avec la lignée C2C12 ont montré que la voie TGF- β pouvait fonctionner de manière adaptative [Chapitre 1, Partie 2], c'est-à-dire que la réponse des cellules à une stimulation de la voie TGF- β ne dépend pas seulement de la concentration de ligand dans le milieu à un moment donné, mais aussi de l'état de la cellule au moment de la stimulation. Dans notre cas, cela implique que si la voie de signalisation est déjà activée en 2i, les cellules ont en mémoire l'historique de l'activation de la voie et l'ajout d'Activine ne permet pas aux cellules de ré-activer la voie de signalisation.

Pour vérifier si et comment l'élément ASE est capable d'intégrer la dynamique de la stimulation de la voie TGF- β , nous avons entrepris une caractérisation complète de la réponse d'ASE en fonction du profil temporel de stimulation par de l'Activine que nous allons présenter dans la suite.

3. Caractérisation de l'activité de l'enhancer ASE au cours de la transition mESC vers mEpiLC

Pour faire une caractérisation complète de la façon dont cet élément intègre les profils temporels de stimulation Activine via la lignée trangénique ASE-YFP, nous avons tiré parti de la micro-fluidique pour contrôler l'environnement cellulaire de manière automatisée [Chapitre 2, Partie 3] (Gómez-Sjöberg et al., 2007). Cet outil nous permet de stimuler la voie de signalisation avec une haute résolution temporelle et avec des profils temporels complexes tels que des marches, des pulses ou des rampes de concentration en Activine.

Influence du moment de stimulation en Activine : Les délais

Nous avons commencé par stimuler les cellules par des profils temporels d'Activine en forme de « marche » (ajout d'Activine dans le milieu à un temps donné et de façon instantanée) ces profils sont simples à réaliser puisqu'ils consistent en un simple changement de milieu et peuvent aussi être réalisées « à la main ». Les expériences réalisées « à la main » pourront être utilisées comme référence et nous permettent de nous assurer que la culture microfluidique n'introduit pas d'artefacts [Figure 45, Figure 52]. Précédemment, on a vu que le moment auquel on ajoute de l'Activine lors de la maturation des mESC vers les mEpiLC avait un effet sur la réponse de la voie TGF- β [Figure 48, Figure 49 et Figure 50], nous avons mesuré la réponse du transgène ASE-YFP dans les mêmes conditions et en y ajoutant un délai plus long de 80 h, au-delà de la maturation des cellules vers les EpiLC.

Dans le cas d'une stimulation directe à t=0, on observe un retard au démarage pour l'expression du transgène ASE-YFP [Figure 51: c]. Au-delà de 20 h après l'arrêt de la pluripotence on observe une réponse instantanée après la stimulation [Figure 51: c, d et f]. La réponse est de plus adaptative, c'est-à-dire que le signal augmente rapidement jusqu'à atteindre une valeur maximale et ensuite diminue jusqu'à son extinction. La réponse adaptative de la voie de signalisation TGF- β a déjà été observée dans d'autres systèmes (Warmflash et al., 2012).

La comparaison de la réponse des cellules qui reçoivent de l'Activine à t=0 (protocole de référence) et celles qui n'en reçoivent pas du tout, met en évidence une auto-activation du transgène [Figure 51: c]. Notre hypothèse est que lorsque les cellules sont plus denses, les cellules sécrètent petit à petit Nodal dans l'environnement cellulaire, ce qui active de plus en plus la voie de signalisation. Par contre, il est probable que le mode de communication de signalisation cellulaire se fasse par des messagers chimiques qui se fixent sur la membrane cellulaire, car le rinçage sous puce microfluidique toutes les 15 minutes enlève toute trace de molécule sécrétée dans le milieu.

La superposition des différentes courbes d'ASE-YFP, nous montre qu'à forte densité cellulaire et quelque-soit les délais de stimulation en Activine, le signal s'éteint vers 80 h [Figure 51 : c, d]. Pour vérifier si l'auto-activation des cellules est dû à des facteurs sécrétés et qu'elle pourrait être responsable de l'extinction du signal vers 80 h, nous avons réalisé des expériences de stimulation à faible densité et à des délais de stimulation allant jusqu'à 80 h.

Contrairement à forte densité cellulaire initiale, on n'observe pas d'auto-activation à 40 h, mais le profil de réponse est le même qu'à forte densité [Figure 51 : f]. Pour mesurer le temps d'adaptation, on a ajusté le modèle adaptatif avec décalage temporel par une régression non linéaire [Chapitre 2, Partie 5], ce qui nous donne la durée de la réponse pour passer de la valeur maximale à la valeur minimale. Lorsqu'on trace la durée d'adaptation en fonction du

délai, on observe une stabilisation du temps d'adaptation autour de 35 h, cette courbe a été ajustée empiriquement à partir d'une courbe sigmoïdale.

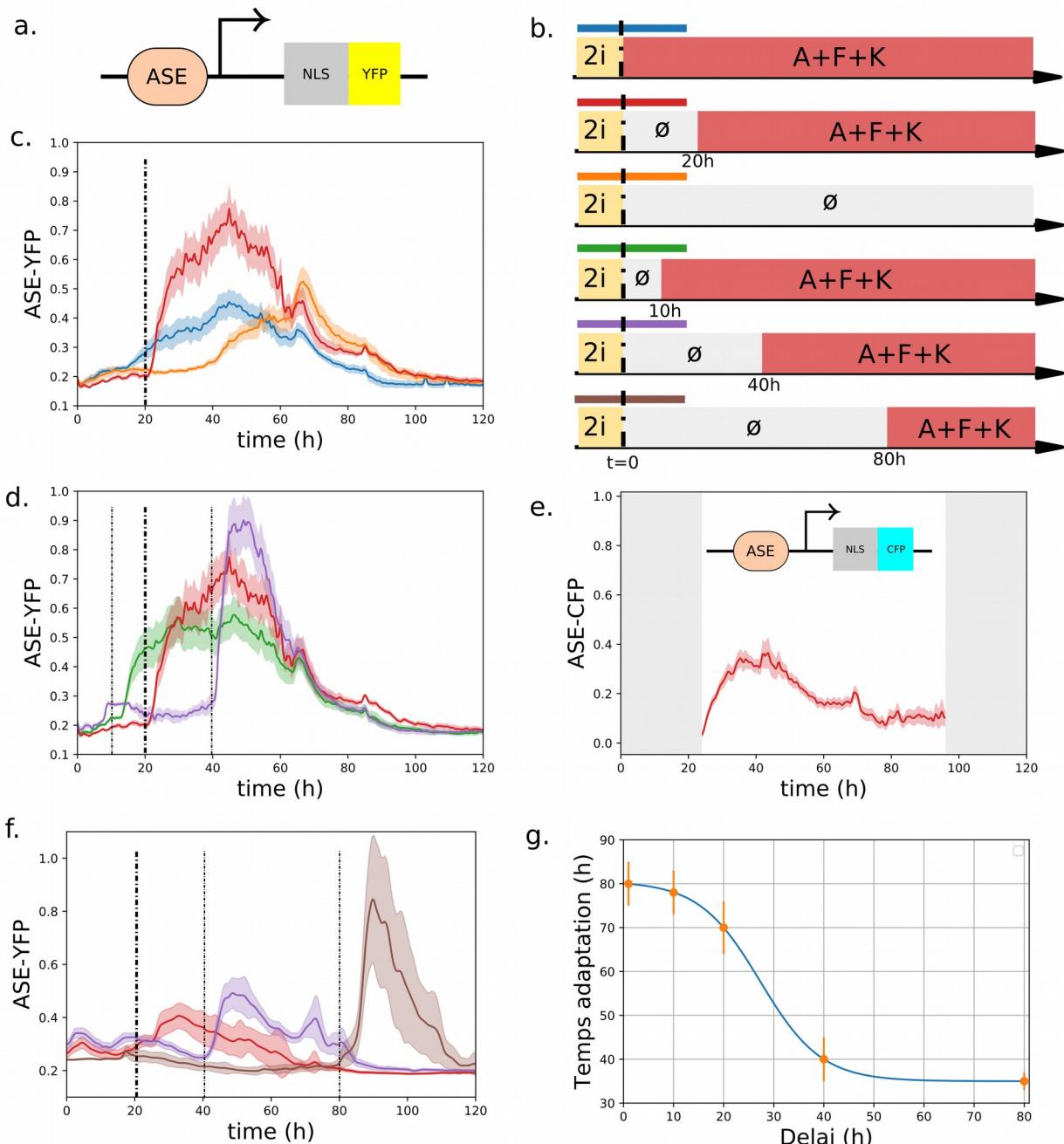


Figure 51: Profils temporels d'ASE-YFP suivant plusieurs délais de stimulation en Activine. a. : Construction du rapporteur transgénique ASE-YFP. b. : Conditions expérimentales, les codes couleurs sont relatives aux courbes (c-f). La barre verticale pointillée indique le passage cellulaire. c. : Profil d'ASE-YFP suivant deux stimulations marche à $t=0$ et à $t=20h$ et une absence de stimulation durant toute la durée de l'expérience. d. : Profil d'ASE-YFP suivant 3 stimulations marche à $t=10h$, à $t=20h$ et $t=40h$. e. : Profils d'une autre lignée rapportrice d'ASE (ASE-CFP) suivant une marche à $t=20h$. f. Profil d'ASE-YFP suivant 3 stimulations marche à $t=20h$, à $t=40h$ et $t=80h$ et à densité cellulaire initiale faible. g. : Courbe du temps d'adaptation en fonction du délai, ajustée à partir d'une sigmoïde ($f(x)=1/(1+\exp(-a*x))$) et dont les temps d'adaptations sont calculés à partir du modèle d'adaptation à translation temporelle décrit au chapitre 2, partie 5. Les barres d'erreurs sont calculé à partir de l'écart-type de la population à chaque instant pour (c-f) ($n_i = 100$; $n_f = 2000$) et par la valeurs de corrélation de l'ajustement du modèle pour (g).

Nous avons aussi vérifié si la réponse d'ASE-YFP dépendait du locus d'insertion du transgène. Pour cela, nous disposions d'une autre lignée transgénique où le transgène ASE-CFP est inséré à une autre position dans le génome. Pour cela, nous avons mesuré le profil de réponse d'ASE-CFP à forte densité cellulaire et à un délai de 20 h après l'arrêt de la pluripotence et nous observons un profil adaptatif avec une extinction vers 80 h [Figure 51 : e]. Cette dernière observation est cohérente avec ce qu'on observe avec ASE-YFP et va dans le sens qu'ASE-YFP n'est pas influencé par sa position dans le génome.

Ces expériences mettent en évidence que la réponse des cellules à une stimulation Activine est dépendante du moment auquel elle a lieu. La valeur maximale du signal ASE-YFP est d'autant plus forte et d'autant plus rapide à mesure qu'on s'éloigne de l'état de pluripotence. La réponse est de plus adaptative et l'échelle de temps d'adaptation est de plus en plus courte au cours de la différenciation.

Dose réponse du transgène ASE-YFP

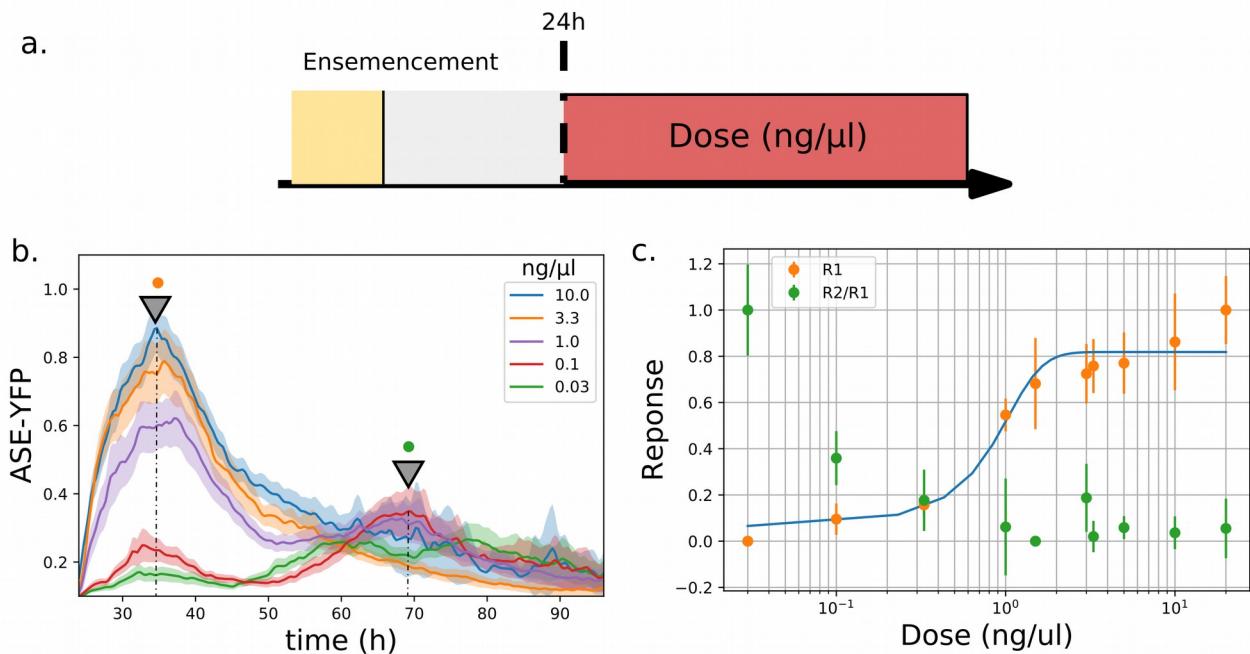


Figure 52: Balance de réponse entre la dose d'activine et l'auto-activation à forte densité. a. : Protocole expérimentale. (Ensemencement à 10^4 cellules par puits de 0.5cm^2). La barre verticale pointillée indique l'acquisition au microscope. b. : Profil d'ASE-YFP à une concentration d'Activine donnée relativement aux dilutions de concentration d'Activine. c. : Les points de courbes doses/réponse en orange, en vert la courbe de ratio entre les deux pics observés et en bleu, l'ajustement des points dose/réponse par une fonction de Hill du premiers ordres ($I = a^*(L/(K+L))+b$: avec x , la concentration de Ligand, k , le point d'inflexion et a et b , les constantes d'amplification et de translation). Les barres d'erreurs correspondent à l'écart-type de la population cellulaire ($n_i = 100$; $n_f = 1000$).

Maintenant que l'on sait que la réponse du transgène ASE-YFP est adaptative et dépendante du temps, nous avons voulu savoir comment la réponse du transgène dépendait de la concentration d'Activine reçue. Pour cela, nous avons mesuré la relation dose-réponse à t=20 h, car comme on a vu précédemment, les cellules commencent à répondre rapidement à la stimulation sans s'auto-activer, ce qui aurait pu compliquer l'analyse. Cette expérience a été réalisée « à la main » au confocal pour garantir un meilleur rapport signal/bruit lorsqu'on est à faible concentration.

Ces mesures nous montrent qu'à forte dose d'Activine, le signal ASE-YFP atteint son maximum au bout d'une douzaine d'heures [Figure 52: c]. Le signal maximum atteint décroît au fur et à mesure que la dose d'Activine diminue. La courbe dose-réponse peut être ajustée par une fonction de Hill d'ordre 1, ce qui est compatible avec une réponse linéaire du transgène avec saturation à partir d'une certaine concentration [Figure 52: d]. Ce comportement est analogue à ce qui a été observé en C2C12 avec le rapporteur synthétique CAGA12 (Sorre et al., 2014).

Un pic de réponse secondaire est aussi observé, mais seulement pour les faibles doses de stimulation. À la plus faible dose sondée ici (0.03ng/ml) on obtient un signal ASE :YFP similaire au signal d'auto-activation obtenu à 0 ng/ml [Figure 51 : c]. Ce pic disparaît pour les concentrations égales ou supérieures à 1 ng/ml. Le ratio entre les deux pics de réponse diminue avec la quantité d'Activine. Cette expérience met donc en évidence un effet mémoire : le niveau d'expression du transgène ASE-YFP à t=72 h dépend de la réponse de la cellule à t=24 h.

Réponse fréquentielle du transgène ASE-YFP

Nous avons ensuite caractérisé la réponse des cellules à des « trains de pulses », le but ici n'est pas de reproduire un profil temporel se produisant dans l'embryon, mais ce genre de stimulation est en général très instructif sur la façon dont les cellules intègrent des signaux dynamiques. Par exemple, dans le cas où la réponse des cellules est adaptative, il a été montré qu'une stimulation pulsée pouvait permettre de contourner les retro-actions négatives limitant la réponse des cellules [Chapitre 1, Partie 2]. Faire varier la fréquence de stimulation permet de savoir quelle est la bande passante de la voie de signalisation et nous permettra aussi de mieux caractériser l'effet mémoire décrit au paragraphe précédent. Pour générer ce genre de signaux, la puce microfluidique est nécessaire si l'on veut alterner efficacement les milieux de culture pendant de longue durée.

Nous avons commencé les stimulations avec 20 ng/ml d'Activine vers 20 h après l'arrêt des conditions pluripotence pour avoir une réponse immédiate des cellules. Les expériences ont été réalisées dans notre puce micro fluidique à densité initiale intermédiaire (100 cellules maximums par chambres) pour pouvoir les suivre pendant une centaine d'heures et éviter l'auto-activation. La durée des impulsions était fixée à 2 h après avoir déterminé dans une autre expérience qu'il fallait au moins 1 h de stimulation en Activine pour avoir une réponse des cellules.

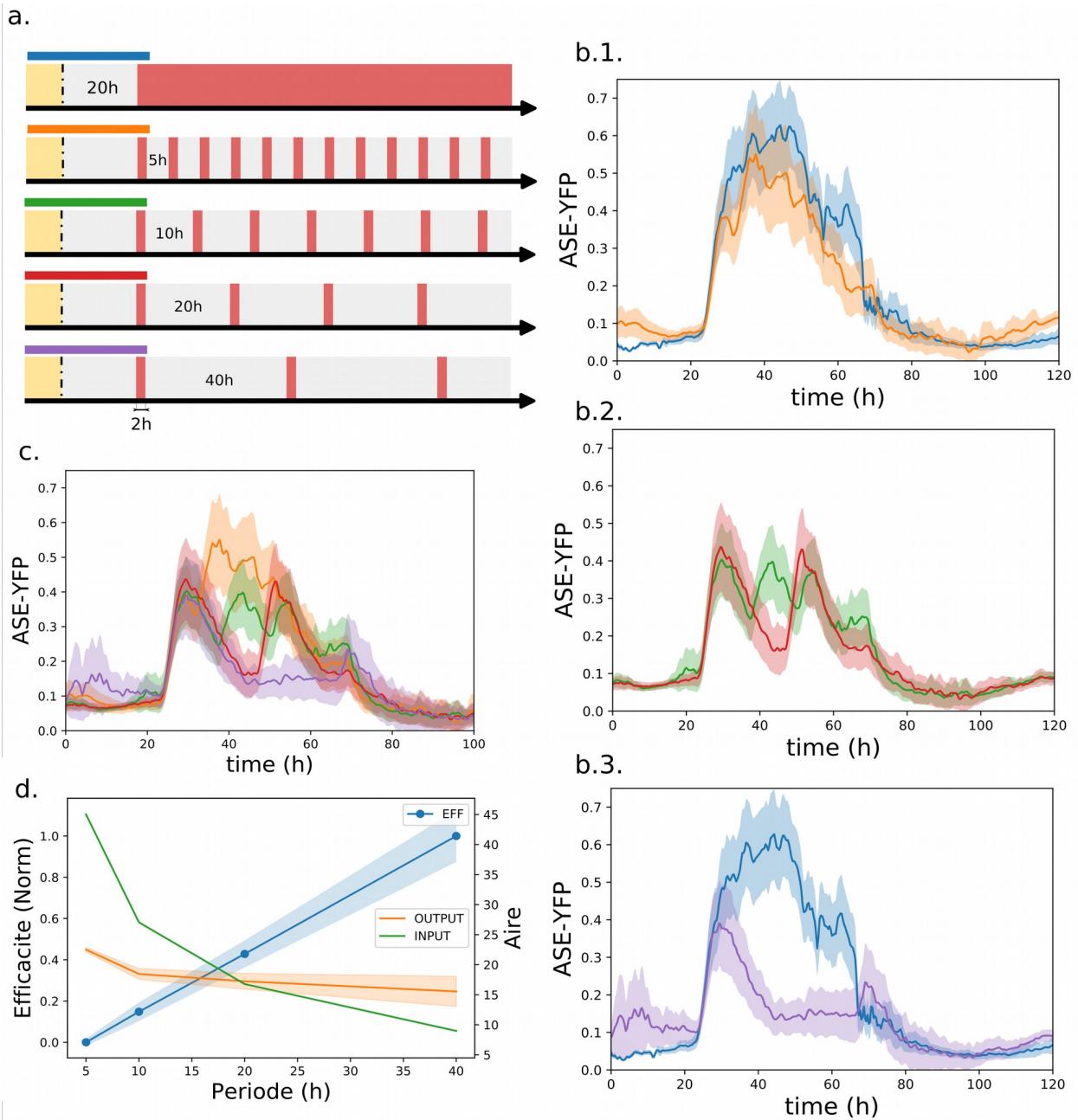


Figure 53: Étude de l'effet des trains de pulse à des périodes différentes sur la réponse du transgène ASE-YFP. a. : Protocole expérimentale, les codes couleurs sont les mêmes que précédemment. La barre verticale pointillée indique le passage cellulaire. b. : Profils de réponse suivant les différentes périodes de stimulation comparée à une stimulation marche à 20h. c. : Superposition des courbes de stimulation à des fréquences différentes. d. : Efficacité de la réponse suivant la période. Les Aires de réponse sont calculés à partir de la méthodes Simpson (python : `scipy.integrate`). L'efficacité de réponse est calculée à partir des Aires de réponses, puis est normalisé par rapport au valeurs min/max des Aires. L'efficacité d'une marche à 24h est inférieure de 2,6 fois un train de pulse de période « 5h » à 20h (non représenté). Les barres d'erreurs correspondent à l'écart-type de la population cellulaire pour (b-c) et à l'incertitude du calcul de l'Aire par rapport à l'écart-type pour (d).

On observe à partir de ces expériences que la réponse des cellules dépend de la fréquence de stimulation, mais contrairement à ce qui a été observé précédemment avec le rapporteur CAGA12 dans les cellules C2C12 [Chapitre 1, Partie 2], le signal ne se stabilise pas et toutes les courbes de réponses ont la même enveloppe [Figure 53 : b, c]. Quelle que soit la fréquence de stimulation, le signal ASE-YFP est éteint à $t \sim 80$ h et les cellules ne répondent plus aux stimulations. Même dans le cas extrême où la seconde stimulation a lieu 40 h après la première, les cellules ne répondent pas, alors qu'une première stimulation à 80 h induit une réponse forte [Figure 51 : f].

Pour estimer l'efficacité de réponse en fonction de la fréquence de stimulation, nous avons calculé l'intégrale de réponse à une fréquence donnée par rapport à l'intégrale du profil de stimulation d'Activine. On obtient le rapport sorti/entrée correspondant à l'efficacité de réponse, qu'on a ensuite normalisé arbitrairement par les valeurs extrema obtenus. On peut remarquer que l'intégrale de sortie à haute fréquence est plus élevée qu'à basse fréquence et voir quasiment aussi élevée qu'en stimulation continue, mais comme la quantité d'Activine est beaucoup plus élevée, le rapport des deux, qu'on peut appeler « l'efficacité » est plus faible, ce qui suggère que le rapporteur ASE-YFP fonctionne comme un filtre passe-bas. Cependant le fait que toutes les courbes de réponses aient l'air de suivre la même enveloppe suggère que ce comportement pourrait être une signature de l'effet mémoire ou d'un effet épigénétique plutôt qu'une réelle dépendance en fréquence.

Réponse impulsionnelle

Une autre façon de caractériser la réponse fréquentielle d'un système est de calculer la transformée de Fourier de la réponse impulsionnelle. Cette approche, très utilisée en électronique ou en acoustique, est valide pour les systèmes linéaires et invariants. Nous avons vu [Figure 52: c, d] que le système est linéaire et on peut faire l'approximation qu'il est invariant sur les échelles de temps courte d'une réponse impulsionnelle. Ce n'est évidemment pas le cas sur des durées plus longues.

Pour réaliser cette expérience, on a cultivé les cellules à faible densité dans la puce microfluidique (20-50 cellules par chambres) à $t = \{20, 40 \text{ et } 80 \text{ h}\}$. On a choisi de stimuler les cellules à faible densité pour limiter l'effet d'auto-activation avant 80 h. La durée des impulsions est de 2 h correspondant à la durée minimale pour que les cellules répondent suffisamment. La mesure de la réponse impulsionnelle est réalisée pour des fenêtres temporelles de 60 h pour chacune des impulsions.

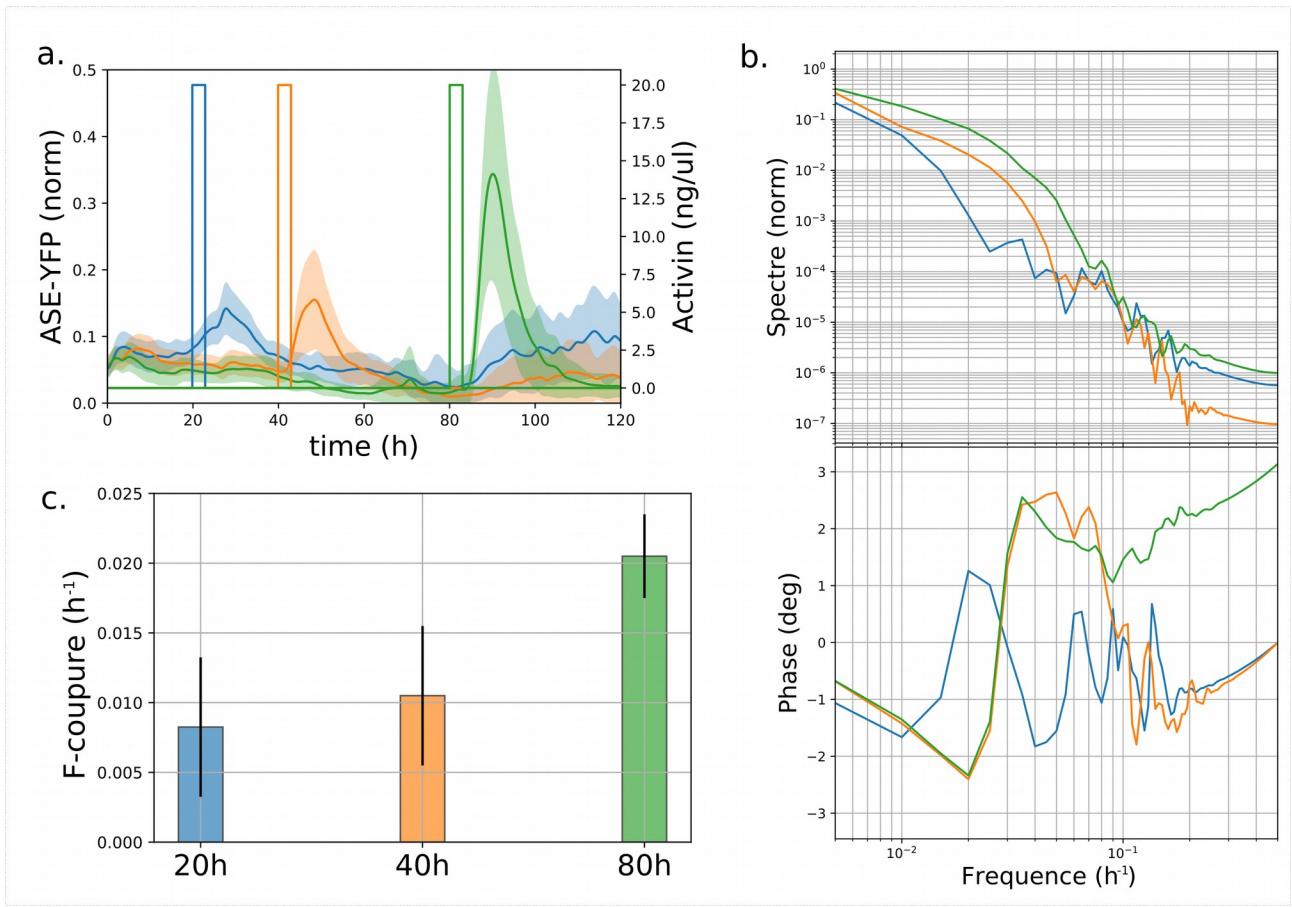


Figure 54: La voie de signalisation se comporte comme un filtre passe bas quel que soit le moment de la stimulation. a. : Les profils de réponse des cellules suivant les 3 réponses impulsionales correspondantes. b. : Réponse fréquentielle pour chacune des courbes normalisées par le continu ($f=0$) en échelle loglog et phase de la réponse fréquentielle. Les gains non normalisés sont (123 ; 81 ; 173) pour des délais (20h, 40h et 80h) c. : Fréquence de coupure pour les différentes impulsions. Les fréquences de coupure sont calculées à partir d'un ajustement des courbes du spectre par la fonction de transfert d'un filtre passe bas d'ordre 1 ($H(p) = 1/(1+(p/fc))$, avec fc , la fréquence de coupure). Les barres d'erreurs correspondent à l'écart-type de la population pour (a) et à la corrélation du fit pour (c).

Cette expérience montre que la réponse fréquentielle à une impulsion a le profil d'un filtre passe bas. Les courbes sont normalisées par rapport au continu de façon à ce qu'a « $f=0$ » les courbes se rejoignent et ne prennent pas en compte l'effet de l'amplitude de réponse. On constate qu'en échelle « loglog », les courbes normalisées ne sont pas superposées [Figure 54: b, haut], ce qui suggère que les cellules n'ont pas le même comportement fréquentiel au cours de la différenciation. La phase nous indique que le comportement fréquentiel n'est pas celui d'un simple filtre passe bas d'ordre 1.

Pour avoir l'ordre de grandeur de la fréquence de coupure, nous avons ajusté les courbes de réponse fréquentielle normalisées (Gain = 1) par un filtre passe bas d'ordre 1. Cette mesure

nous montre que la fréquence de coupure est de plus en plus grande avec le temps relatif à la perte de pluripotence [Figure 54: c].

Effet mémoire

Pour caractériser plus en détail l'effet mémoire, nous avons mesuré comment la réponse à un pulse dépendait de la réponse au pulse précédent. Pour cela on a besoin suivre précisément les cellules au cours du temps, ce qui est complexe quand les cellules bougent beaucoup et que leurs phénotypes changent au cours du temps. Pour suivre efficacement les cellules au cours du temps, on a dû trouver des astuces : au lieu de suivre une seule cellule indépendamment, on suit un groupe de cellule ayant la même mère, de cette façon, on suit des clusters de lignée cellulaire. Cette astuce permet de conserver un nombre fixe de cluster au cours du temps [Chapitre 2, Partie 5].

Nous avons analysé de cette manière les courbes présentées « Figure 53 » les expériences de stimulation impulsionnelle à plusieurs fréquences et on mesure l'historique de chacun des clusters, ensuite on compare pour chaque cluster l'intensité maximale de réponse entre deux impulsions et on trace le nuage de points « premiers pulse » / « seconds pulse ».

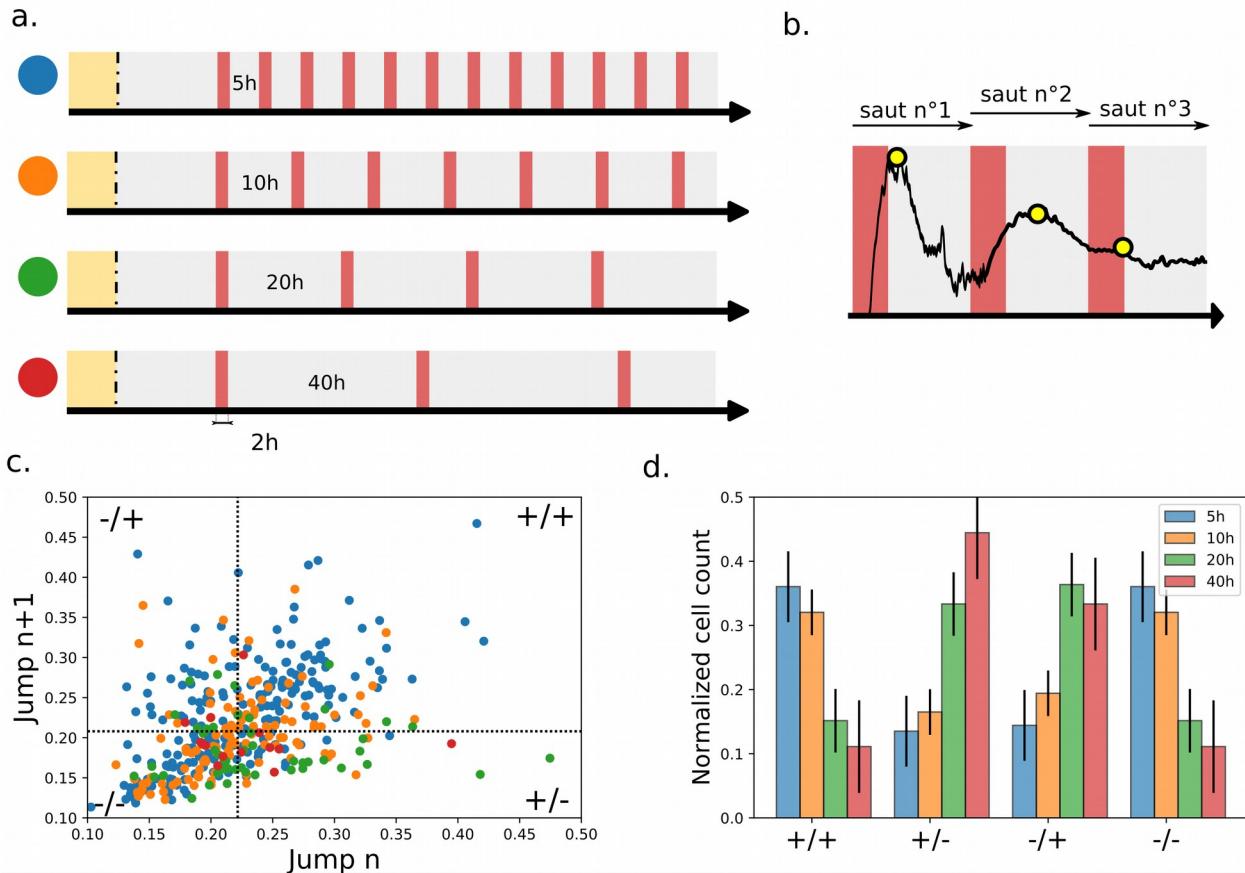


Figure 55: **Les cellules ont la mémoire d'une impulsion à long terme.** a. : les protocoles de stimulation. b. : la méthode de calcul des maximums entre chaque « saut » de pulse. c. : Les nuages de points 1er réponse/2ème réponse. d. : Distribution des réponses en fonction des quadrants. Les quadrants sont définis par rapport au centre de masse du nuage de points de l'ensembles des expériences. Les barres d'erreurs correspondent en (d), au nombre de cellules contenu dans l'écart type de chaque quadrant.

Lorsqu'on représente le nuage de points sur un graphe, on remarque qu'on peut réduire cette représentation en quatre parties, les cellules qui répondent 2 fois d'affilée (+/+), les cellules qui ne répondent pas aux deux stimulations (-/-), les cellules qui répondent aux premiers pulse mais pas au second (+/-) et l'inverse (-/+). [Figure 55 : c]. Le comptage du nombre de cellules qu'il y a par quadrant, montre une symétrie de réponse différentes suivant les hautes et basse fréquence, à plus hautes fréquences, les cellules qui ont répondu aux premières impulsions, répondent aux seconds, alors que lorsqu'on est à plus basse fréquence, c'est l'inverse qui se produit, si la cellule a répondu aux premières impulsions, il est plus probable qu'aux secondes impulsions, la cellule ne réponde pas [Figure 55 : d]. Les cellules ont donc la mémoire d'une brève impulsion même après 40 h de non stimulation. Par contre, seules les stimulations à basse fréquence ont le temps de se relaxer complètement, ce qui n'est pas le cas à hautes fréquences, ainsi, il est probable que les cellules (+/+) en hautes fréquences soit en réalité (+/-).

Pour conclure cette partie, l'analyse fréquentielle nous a permis de caractériser la fonction de filtrage « passe-bas » du transgène ASE-YFP à une stimulation d'Activine au cours de la différenciation et la mémoire à long terme des cellules lors de la différenciation, même pour une stimulation brève. Ces données nous suggèrent que la voie de signalisation TGF- β pourrait mémoriser dans ce cas une brève impulsion sur le long terme et affecter le destin des cellules.

4. L'effet des signaux sur la différenciation cellulaire

Que ce soit le niveau de l'expression de Nodal, d'autres cibles de la voie TGF- β ou du transgène ASE-YFP, les expériences décrites dans les sections précédentes montrent que les mESC n'interprètent pas une stimulation TGF- β de la même façon au cours de leur différenciation. Nous avons voulu savoir si cela avait une influence sur la façon dont les cellules se différenciaient. Est-ce que des délais et autres profils temporels de stimulation influencent la trajectoire de différenciation ? Le profil temporel a-t-il une influence comparable sur la différenciation des cellules ? Est-ce que l'effet mémoire mis en évidence avec le rapporteur ASE-YFP a aussi lieu pour la différenciation des cellules ? L'effet mémoire est-il dû à un changement d'identité cellulaire ?

Au cours du développement, Nodal et la voie TGF- β sont impliqués dans la maturation des cellules souches embryonnaires vers les cellules souches de l'épiblaste, et aussi à la différenciation des cellules de l'épiblaste vers les cellules de la lignée primitive (mes-endoderme) [Chapitre 1, Partie 3]. Aussi, on sait que Nodal a tendance à inhiber la voie de différenciation vers les cellules de l'ectoderme (Dupont et al., 2005).

La première expérience que nous avons réalisée consiste à cultiver des cellules en boîte de pétri et à les stimuler avec quatre types de signaux : une stimulation directe en Activine, différents délais de stimulation, des impulsions et aucune stimulation. Nous avons ensuite mesuré l'expression de trois marqueurs par RT-qPCR: « NANOG », « FGF5 » et « BRACHYURY ».

NANOG est un marqueur de pluripotence naïve qui diminue lorsque les cellules matures vers l'épiblaste. FGF5 est un marqueur de la maturation et de la croissance cellulaire, lorsqu'il commence à être exprimé, il indique que les cellules sont au stade de l'épiblaste et des EpiLC. BRACHYURY est un marqueur de la différenciation vers les cellules de la ligne primitives et de l'identité mes-endoderme.

Les expériences ont été réalisées à densité moyenne (10 000 cellules/ puits de 0.5 cm²) dans la totalité de l'expérience de façon à avoir assez d'ARN pour la RT-qPCR et le milieu a été changé deux fois par jour à partir de 72 h pour limiter les effets de densité sur la réponse.

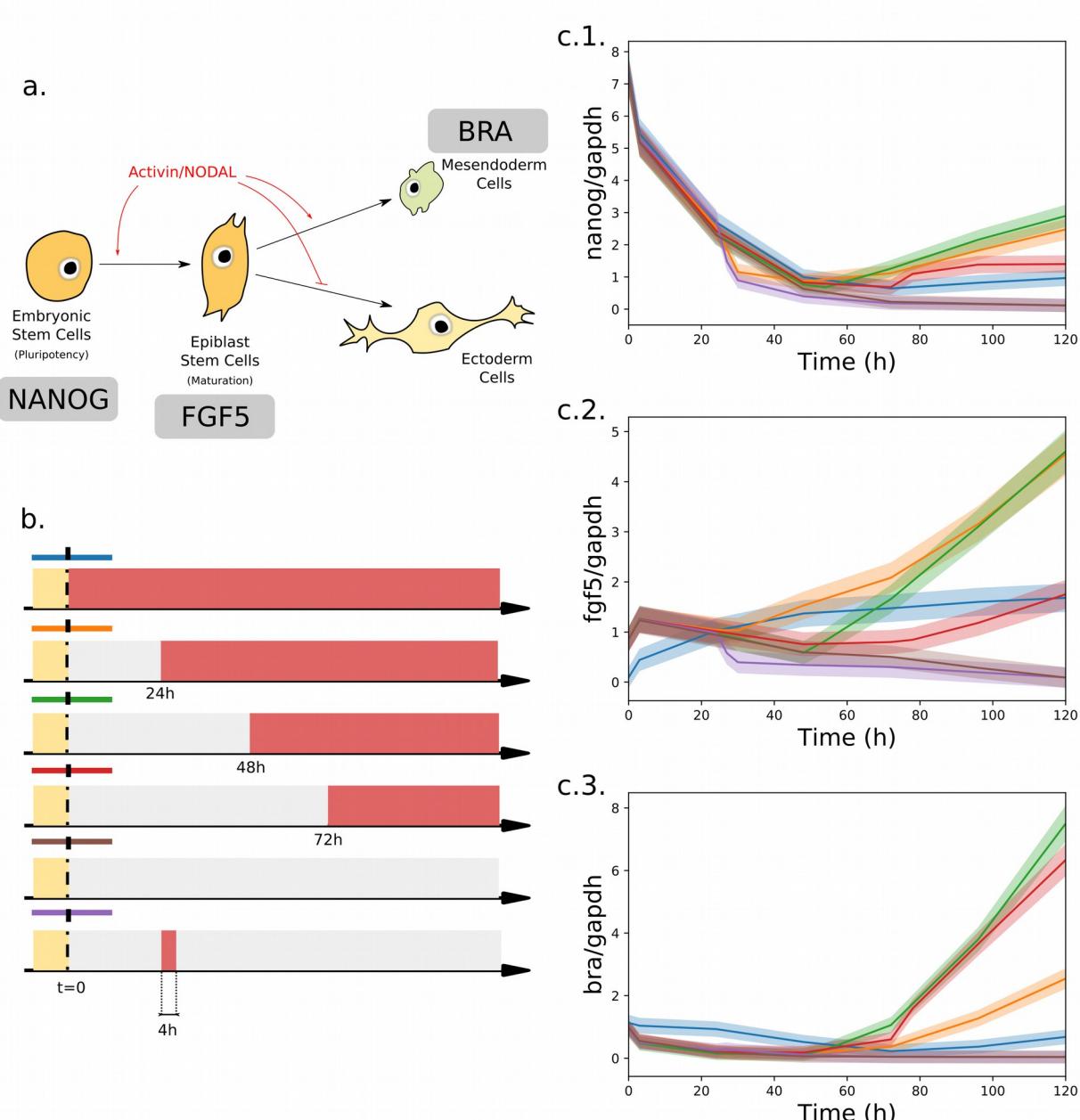


Figure 56: **Trajectoire de différenciation suivant les 3 marqueurs d'identités cellulaires.** a. : Différenciation des cellules souches vers les 3 feuillets embryonnaires. (Murry and Keller, 2008) b. : Protocole de stimulation en Activine. Les points de mesure sont pris toutes les 12 heures, ainsi que 3 heures avant/après le passage d'un milieu à un autre. c. : Profils temporels des marqueurs d'identité cellulaire. Les barres d'erreurs correspondent à l'erreur types pour deux réplicats technique de deux réplicats biologiques.

Les résultats nous montrent que NANOG diminue au cours de la maturation [Figure 14 : c.1], conformément à ce que l'on attend lorsqu'on arrête de maintenir les cellules en culture 2i (Hayashi et al., 2011).

Pour FGF5, le profil est stabilisé lorsqu'on stimule directement les cellules avec de l'Activine, les stimulations plus tardives induisent aussi fgf5, et même de manière plus forte que les stimulations à t=0 dans le cas des stimulations à t=24 h et 48 h [Figure 56 : c.2].

On observe pour BRACHYURY une forte induction pour les stimulations à 48 h et 72 h alors que la stimulation à t=0 donne le même résultat que l'absence de stimulation (pas d'induction de brachyury) [Figure 56 : c.3]. Quel que soit le marqueur, le court pulse de 4 h à 24 h semble trop court pour induire un changement d'identité cellulaire alors qu'il était suffisant pour activer la voie de signalisation [Figure 56 : c]. Il semble donc qu'une stimulation prolongée soit nécessaire pour avoir un effet sur le destin cellulaire.

Cette expérience semble indiquer qu'une stimulation par l'Activine à t=0 induit et stabilise un état EpiLC alors qu'une stimulation plus tardive peut induire du mes-endoderme. Il est cependant toujours délicat de tirer des conclusions sur un si faible nombre de marqueurs, pour cela, nous avons mesuré l'expression d'un plus grand panel de marqueurs pour la même expérience. Nous avons utilisé 21 gènes, dont des marqueurs de différenciation (FOXA2, STELLA, GSC...) et des marqueurs d'activité d'autres voies de signalisations (ID1, Wnt...).

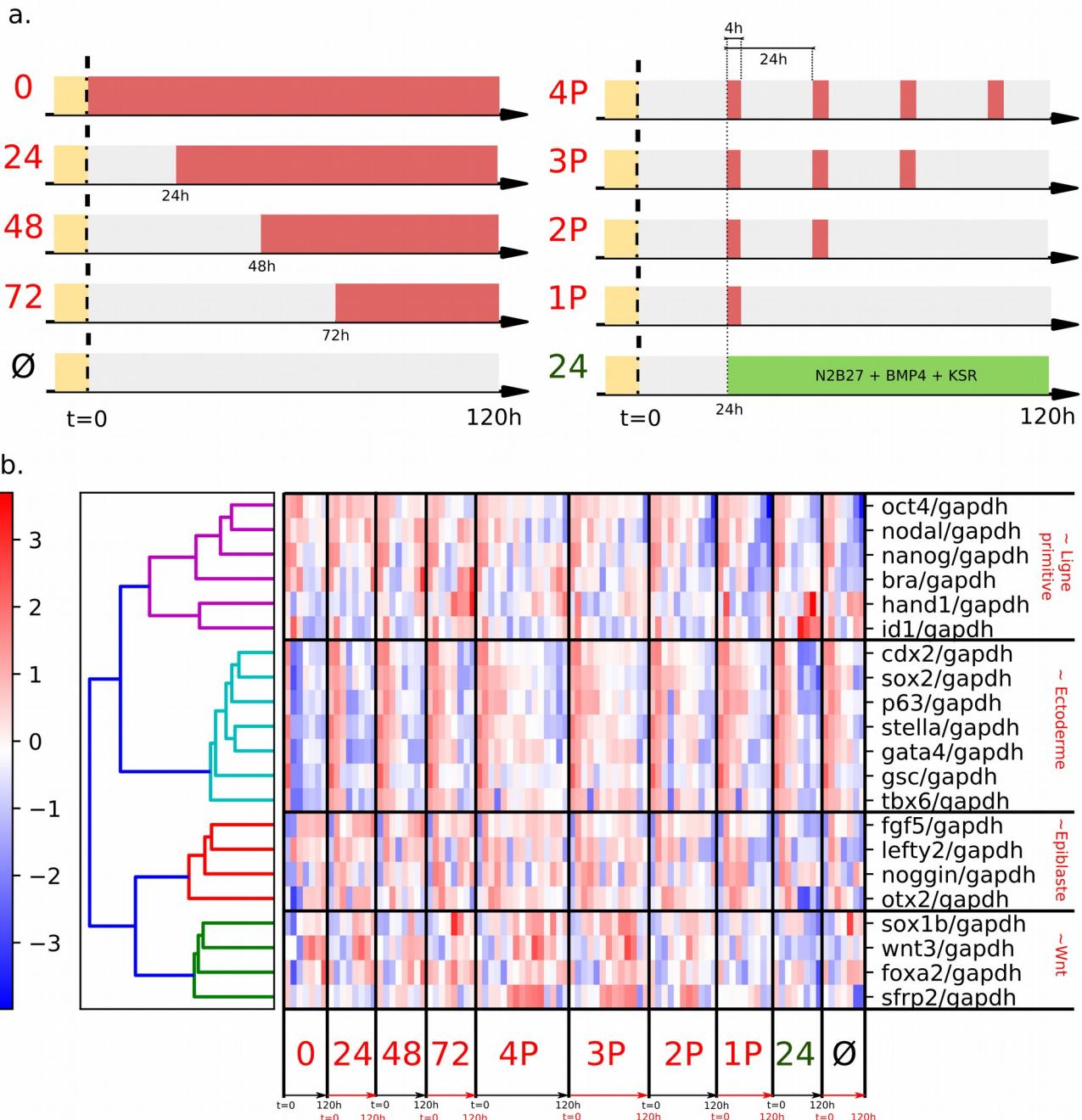


Figure 57: Effet des différentes stimulations sur l'expression des gènes. a. : les protocoles de stimulations, les couleurs sont les mêmes que précédemment, où l'on peut ajouter le milieu vert correspondant au milieu contenant du BMP4. b. : Représentation en carte des chaleurs de l'ensemble des gènes exprimées suivant les échantillons, le niveau de couleurs indique l'expression standardisée des gènes, les dendrogrammes représentent l'arrangement des groupes généré par la méthodes de Ward.

Pour l'interprétation des courbes de 21 gènes, nous avons représenté les données par une carte des chaleurs (heatmap) où l'on a au préalable ordonné les gènes par la méthode classification hiérarchique de Ward [Chapitre 2, Partie 2]. La classification nous permet de déterminer les échantillons et les variables qui ont les mêmes propriétés statistiques. Les

données ont été au préalable mises à l'échelle log puis standardisées de manière à mieux quantifier l'écart d'expression entre les échantillons.

La classification hiérarchique de l'ensemble des gènes nous donne 4 partitions, la première contient des marqueurs de la ligne primitive (*Brachyury* et *Nodal*), les seconds de l'ectoderme, de l'épiblaste et le dernier il y a des marqueurs de la voie Wnt (*Wnt3*,*Sfrp2*). Cette carte nous montre que les marqueurs de l'ectoderme sont plus fortement exprimés lorsque les cellules ont le moins reçu d'Activine [Figure 57 : b], sauf dans le cas des pulses (4P et 3P) où l'on peut voir une augmentation de l'expression des marqueurs de la formation de la ligne primitive qui augmente.

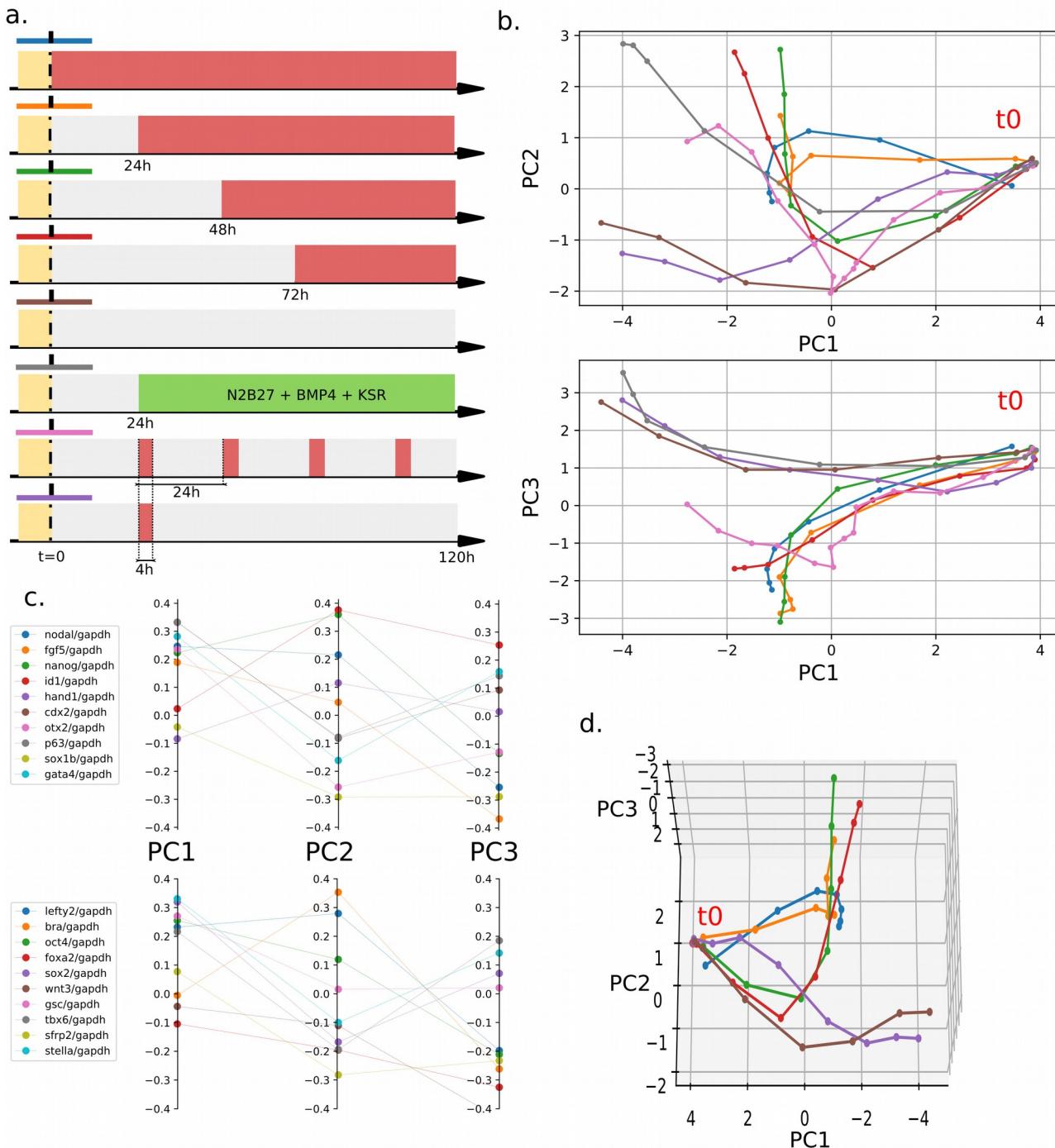


Figure 58: Trajectoire des gènes dans l'espace des composantes principales. a. : Protocoles expérimentale. b. : Trajectoire de l'ensemble des échantillons sur les axes des composantes principale 1, 2 et 3 (PC1, PC2 et PC3). c. : Positionnement des variables dans les différents axes de composante principale, laissant apparaître les variables corrélé/décorrélé entre elle. d. : Projection 3D des échantillons dans l'espace de Karhunen-Loève (PCA).

Pour comprendre la manière dont évolue la trajectoire cellulaire, nous avons analysé dans l'espace des composantes principale l'ensemble des données de la qPCR. L'analyse en composante principale nous permet de réduire notre analyse à trois dimensions, ce qui nous simplifie l'interprétation des données.

Pour la trajectoire des expériences dans l'espace des composantes principales, on observe 3 trajectoires suivant les composantes PC1-PC2 et 2 trajectoires suivant les composantes PC1-PC3 [Figure 58 : b, d]. La projection des variables suivant les axes des composantes principales nous montre sur l'axe PC1 que l'ensemble des variables sont corrélées entre elles et qu'on ne peut pas distinguer deux groupes de marqueurs spécifiques. Par contre, suivant les axes PC2 et PC3, les décorrélations sont plus claires, les marqueurs de la voie TGF- β (Lefty2) et de la ligne primitive (Nodal,Brachyury) sont corrélés entre eux, mais l'ensemble est décorrélé des voies de signalisation Wnt (Wnt3) et des précurseurs de l'ectoderme (Sox1b, Otx2...) [Figure 58 : c].

À partir de cette conclusion, on peut dire que suivant PC2, les cellules ayant reçu les marches d'Activine à 48 h et 72 h vont vers une direction « mésoderme » en opposition avec l'absence de stimulation et un seul pulse d'Activine qui oriente quant à lui les cellules vers de l'ectoderme [Figure 58 : b]. Par contre, on remarque que suivant l'axe PC2, les cellules stimulées en BMP4 à 24 h après l'arrêt de la pluripotence vont dans le même sens que les marches 48 h et 72 h, mais pas suivant l'axe PC3, où la trajectoire suit les cellules le moins stimulé en Activine [Figure 58 : b]. Une stimulation à t=0, va dans le même sens que des délais de stimulation suivant l'axe PC3, mais l'on remarque que suivant l'axe 2, les cellules semblent changer de direction [Figure 58 : b].

Le fait intéressant ici, est que la série de 4 pulses de 4 h espacés de 24 h semble s'orienter progressivement vers la même trajectoire qu'une stimulation BMP4 à 24 h, et cela aussi bien suivant PC2 et PC3. Cette observation semble montrer que des pulses répétés d'Activine guides les cellules différemment vers une identité cellulaire qu'une stimulation « marche » d'Activine [Figure 58 : b].

Ces résultats nous montrent que les trajectoires cellulaires sont très différentes suivant que l'on applique des délais de stimulation ou une stimulation directe. Par contre, contrairement aux expériences faites sur ASE-YFP, les cellules ne semblent pas avoir la mémoire à long terme d'une impulsion d'Activine à 20 h, mais un train de pulse semble faire changer la trajectoire de différenciation cellulaire dans le même sens qu'une stimulation BMP4 à 24 h.

Marquage de la formation de la lignée primitive en temps réel : BRA-GFP (ou T-GFP)

Nous avons ensuite mesuré la dynamique d'expression de Brachyury, un marqueur de la formation de la ligne primitive à l'aide d'une lignée rapportrice BRA-GFP décrite au chapitre 1 partie 4 et chapitre 2, partie 2 (Imuta et al., 2013). Ici, nous avons stimulé ces lignées avec

plusieurs signaux d'Activine en utilisant la puce de culture microfluidique et mesuré la fluorescence en GFP. Le noyau des cellules a été marqué avec une NLS-mCherry pour suivre les cellules au cours de l'expérience et pouvoir quantifier la réponse cellulaire. Nous avons réalisé nos expériences avec deux densités initiales différentes, une densité élevée (entre 150 et 200 cellules par chambres de cultures) et une faible densité (entre 20 et 50 cellules par chambres de cultures) de façon à quantifier l'effet de la densité sur la différenciation.

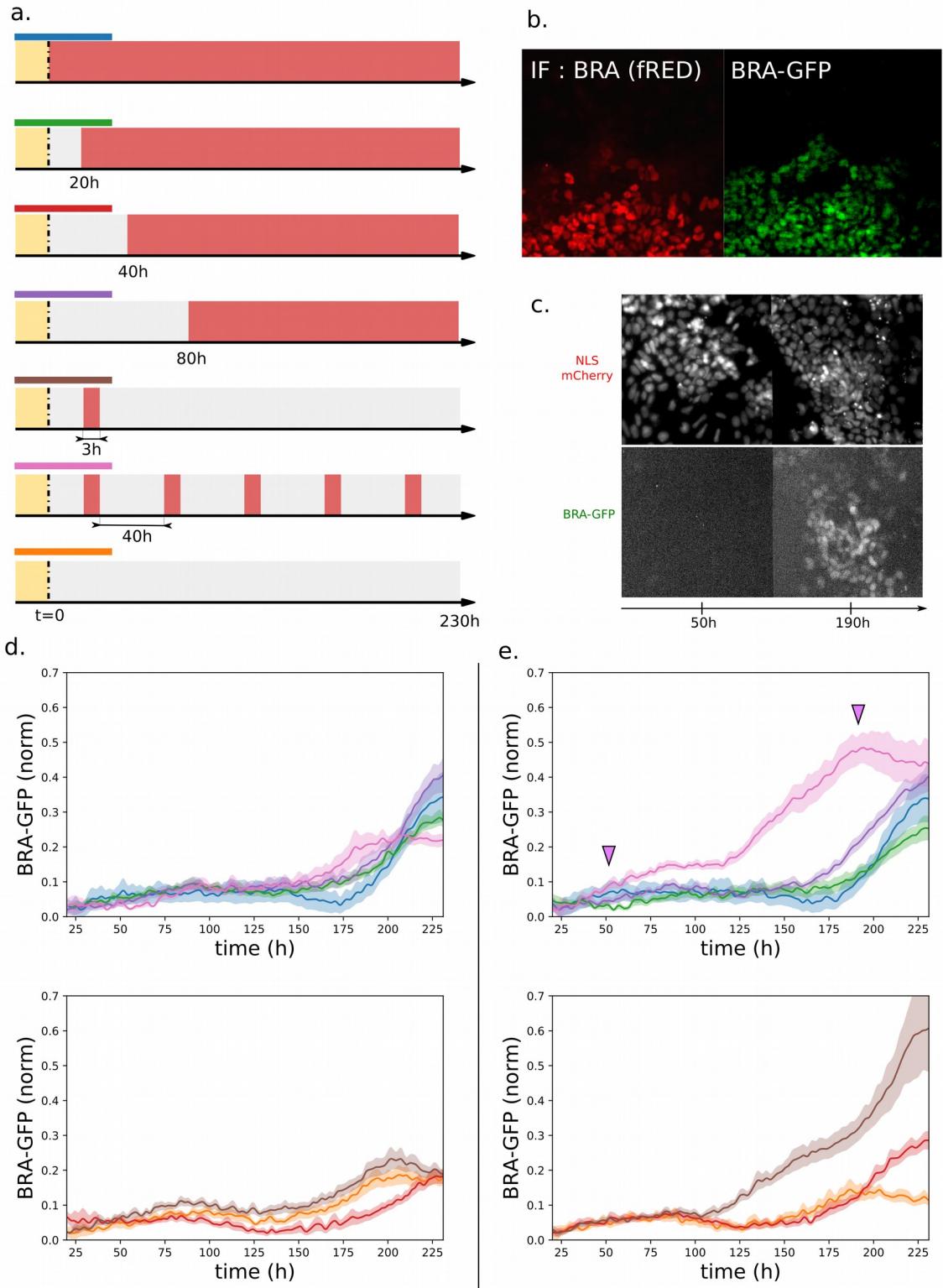


Figure 59: Profils de BRA-GFP suivant plusieurs stimulations en Activine. a.: Protocoles de stimulation en Activine. b.: Contrôle du rapporteur BRA-GFP par un marquage IF de Brachyury. c.: Image acquisition du marqueur de noyau (NLS) et de brachyury (BRA) en fluorescence. d.: Profils de réponse à forte densité initiale. e.: Profils de réponse à faible densités initiale. Les barres d'erreurs correspondent à l'écart-type de la population cellulaire.

Dans cette expérience, on observe que le profil d'expression de BRA-GFP est très différent suivant la densité cellulaire initiale, de plus les temps pour que les cellules commencent à

exprimer Brachyury sont excessivement longs pour la plupart des expériences (200 h) [Figure 59 : d-e]. Ces observations, pour la plupart ne vont pas dans le même sens que pour les RT-qPCR. Par exemple, pour une stimulation à 40 h et 80 h, nous n'observons pas d'expression à 120 h, même à forte densité [Figure 59 : d]. Par contre, des impulsions toutes les 40 h engendrent une réponse précoce de Brachyury ce qui va dans le sens des RT-qPCR [Figure 58 : b] et plus surprenant, une simple impulsion engendre la plus forte expressions de BRA-GFP, mais uniquement à faible densité et à la fin de l'expérience [Figure 59 : e]. Cela est toutefois à nuancer, les expériences ont été réalisées sous microscope à transmission, et pour une protéine GFP, si le milieu contient de la riboflavine, le rapport signal/bruit est proche de 1 pour de faible réponse, ce qui limite la détection, mais pas dans le cas à très forte réponse.

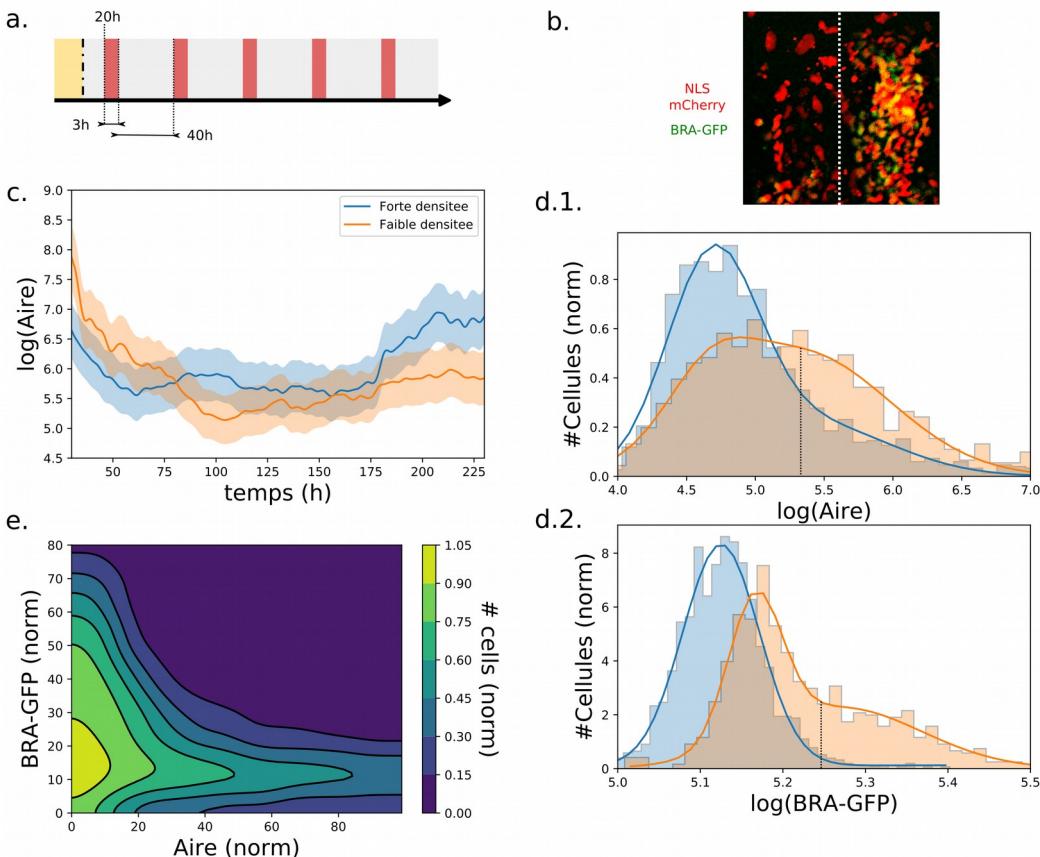


Figure 60: Distribution de la réponse de BRA-GFP, pour le cas de train de pulse toute les 40h. a. : Protocole expérimentales. b. : Image de fluorescence à la fin de l'expérience, où l'on peut observer 2 réponses différentes. c. : Evolution de la surface d'occupation moyenne des cellules à forte et faible densité cellulaire initiale. d. : Distribution de la surface d'occupation (1) et de fluorescence BRA-GFP (2) des cellules à la fin de expériences. e. : Distribution 2D de la réponse en fonction de la surface d'occupation. Les barres d'erreurs correspondent à l'écart-type de la population cellulaire. Les fits des distributions sont des gaussienne bimodale comme précédemment.

Pour comprendre le rôle de la densité, nous avons mesuré la corrélation entre la densité locale de cellule et l'expression de Bra-GFP. Une des hypothèses est que les cellules qui commençant à faible densité ne s'auto-organisent pas spatialement de la même façon que lorsqu'on commence avec une forte densité. Une manière de quantifier cela est de mesurer l'évolution de la surface d'occupation moyenne des cellules sur une surface donnée. Nous avons mesuré la surface d'occupation par la surface des cellules de Voronoï [Chapitre 2, Partie 5]. Aussi, nous avons mesuré l'histogramme de réponse des cellules dans le cas où les cellules répondent fortement. Seules les réponses à des trains de pulses de 40 h seront présentées ici, car elles correspondent à la réponse optimale mesurée.

Ces mesures nous montrent une forte dépendance de la réponse à la densité locale de cellules [Figure 60 : e], et tout comme avec Nodal-YFP, nous observons dans certain cas 2 réponses cellulaires différentes suivant le phénotype des cellules [Figure 44, Figure 60 : b]. La mesure de l'Aire moyenne d'occupation cellulaires à faible et forte densité initiales nous montre que les cellules commençant à faible densité atteignent une plus forte densité cellulaire maximale [Figure 60 : c], ce qui pourrait expliquer que les cellules à faibles densités cellulaires initiales répondent plus fortement.

Nous avons quantifié la distribution de BRA-GFP à t=190h en échelle "log" suivant les deux densités cellulaires initiales, et l'on observe que pour le cas à faible densité, on a deux pics de réponse ($\mu_1 = 5,18$; $\mu_2 = 5,3$), alors qu'à forte densité, on a un seul pic de réponse ($\mu_1 = \mu_2 = 5,1$) mais le signal est plus faible [Figure 60 : d.2]. Enfin nous avons quantifié la distribution 2D de la réponse BRA-GFP cellules sur l'ensemble de l'expériences par rapport à l'Aire d'occupation ; ces mesures montrent que seule les cellules avec l'Aire d'occupation la plus petite répondent [Figure 60 : e].

Ces dernières expériences nous ont permis de mettre en avant le rôle de la densité cellulaire sur l'orientation des cellules vers la ligne primitive et l'expression du rapporteur bra-gfp. Vu le rôle primordial de la densité et le manque de contrôle que nous avons sur ce paramètre localement, il est difficile d'analyser cette expérience. De plus l'activation de bra-gfp vers t=150h semble tardive comparé à d'autres expériences faites dans le laboratoire par Jean-Louis Plouhinec ou encore à partir de publication récente (Morgani et al., 2018).

Nous nous sommes donc tournés vers un autre système de différenciation, où il est possible de contrôler la densité cellulaire. Les systèmes que nous avons choisi ont été développé initialement pour reproduire *in vitro* la formation des trois feuillets embryonnaires de manière ordonnée à partir de cellules souches embryonnaires humaines, et cela en contrôlant la géométrie des colonies de cellules par des patterns en fibronectine (Warmflash et al., 2014).

Par contre, contrairement à l'embryon humain, les signalisations mises en jeu ne sont pas tout à fait les mêmes, par exemple, chez la souris, l'effet de Noggin n'apparaît qu'à partir de E.8 (Etoc et al., 2016), alors qu'il est impliqué chez l'humain lors de la formation de la ligne primitive. Cette approche a permis toutefois de montrer que les profils de Brachyury observés dans un pattern *in vitro* sont cohérents avec des observations *in vivo* (Morgani et al., 2018).

Des expériences menées par Jean-Louis Plouihnec ont montré récemment que des cellules stimulées en BMP4 à partir de 48h après l'arrêt de la pluripotence "naïve", engendraient au bout de 48h, un anneau de Brachyury, ce qui est beaucoup plus précoce que les observations précédentes [Figure 61 : c].

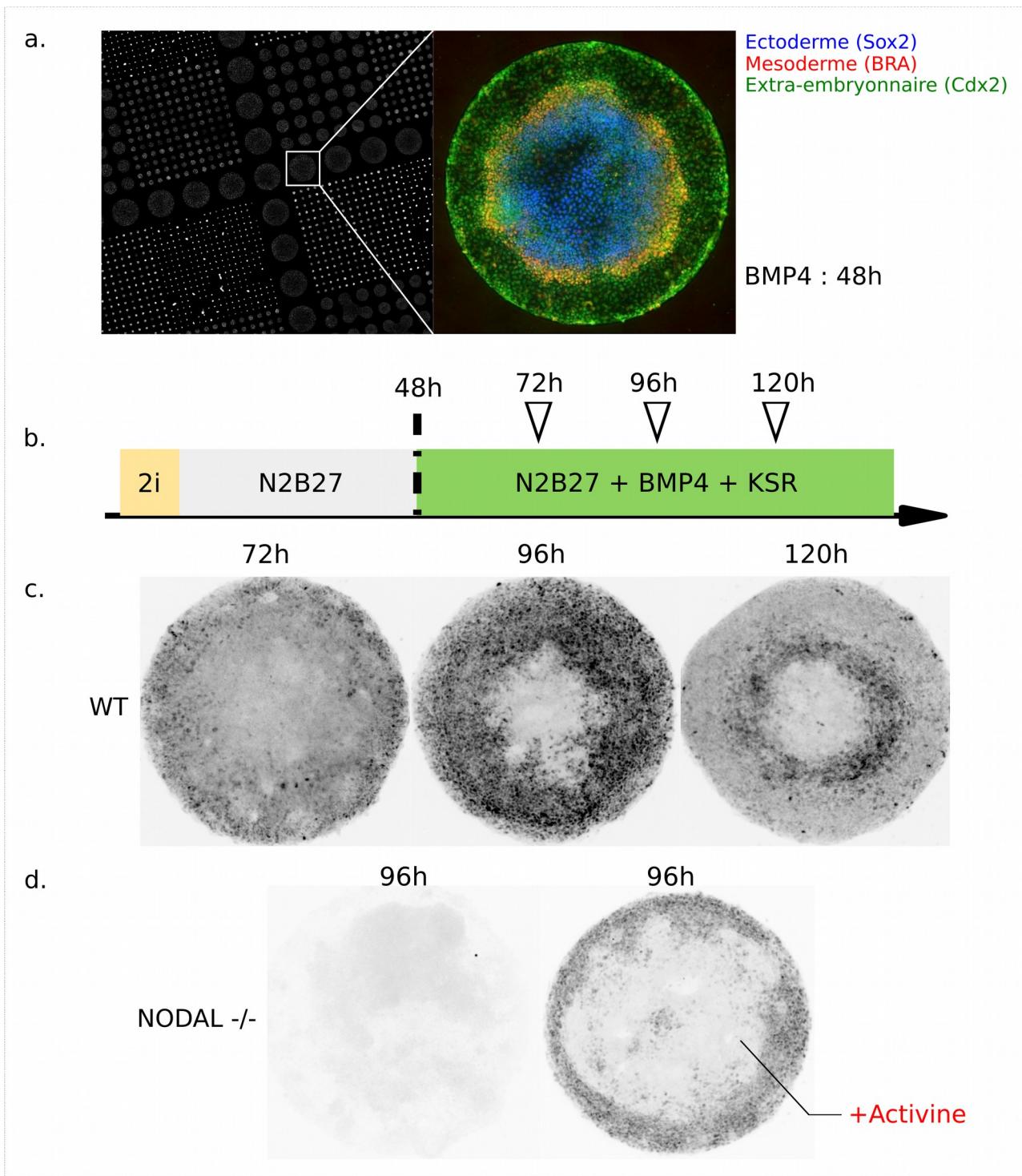


Figure 61: Anneaux de Brachyury après une stimulation de BMP4 48h après l'arrêt de la pluripotence. a. : Système modèle récapitulant la formation des feuillets embryonnaires chez l'humain. b. : Protocole de stimulation en BMP4 chez la souris. c. : Formation de l'anneaux de Brachyury (IF) suivant le protocole (b). d. : Effet de la délétion de Nodal sur la formation du disque de Brachyury et rôle de l'Activine. Jean-Louis Plouhinec

Jean-Louis Plouhinec a montré que Nodal est impliqué dans la formation de l'anneau de Brachyury, car lorsqu'on délète Nodal au deux locus (Nodal $-/-$), la stimulation de BMP4

n'engendre pas d'anneau de Brachyury, mais par contre, l'ajout d'Activine permet de sauver la formation d'anneau de Brachyury partiellement [Figure 61: d].

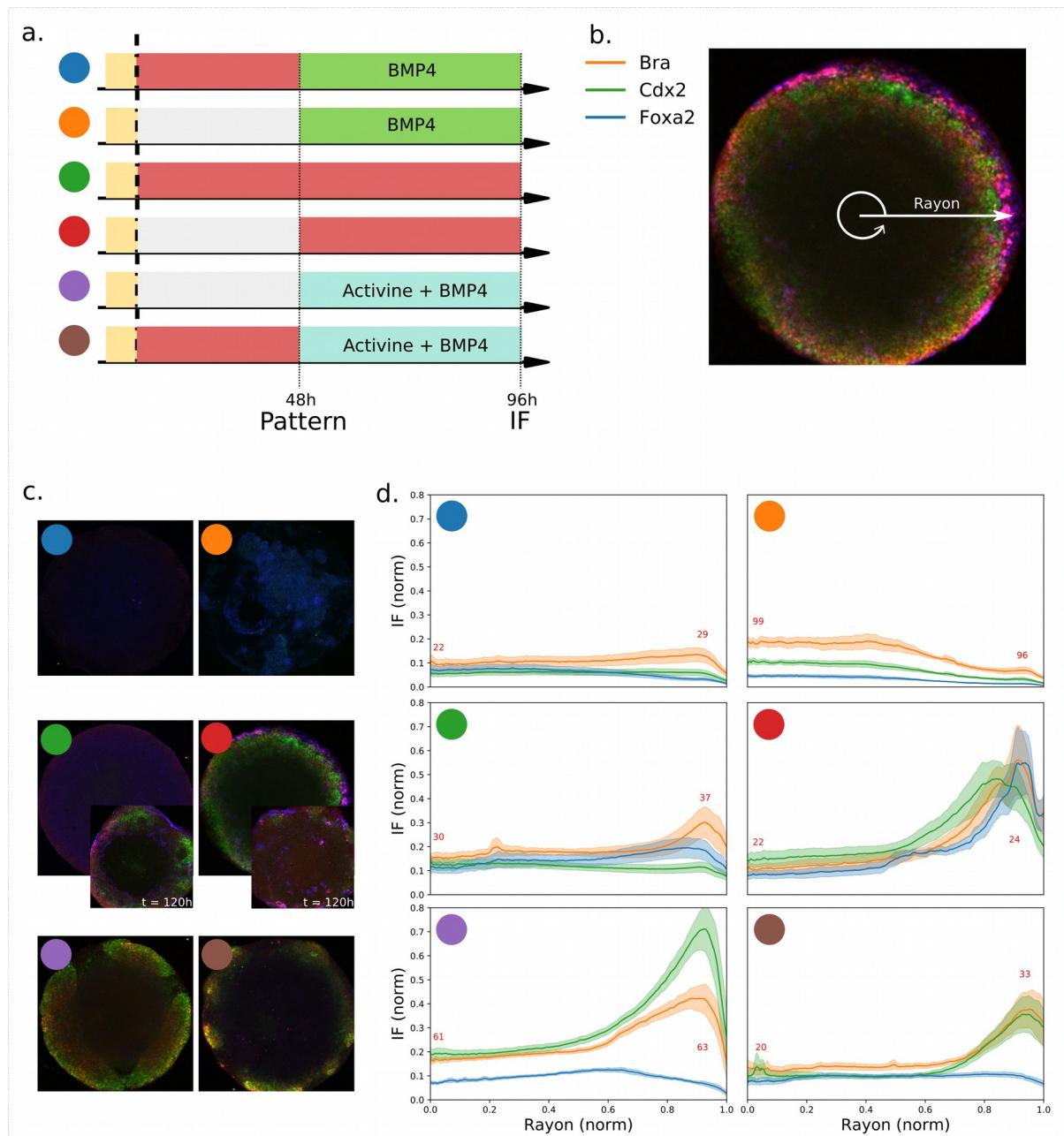


Figure 62: Effet d'une stimulation en Activine sur la formation de l'anneau de Brachyury. a. : Protocole de stimulation pour les immunofluorescences à 96h. b. : Méthode de mesure des marqueurs par projection radiale. c. Images des IF à 96h suivant les protocoles (a), les images à 120h pour les protocoles « vert » et « rouge » ont été ajouté. d. : Profils radial de l'expression des marqueurs de différenciation à 96h suivant les protocoles (a) avec les valeurs en rouge de la densité locale de cellules par le DAPI. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type de la projection radiale.

A partir des observations de RT-qPCR sur Brachyury [Figure 56 : c.3] et du profil de Nodal lorsqu'on applique une délai de stimulation en Activine de 48h [Figure 43, Figure 44 : c], nous avons voulu quantifier si lorsqu'on applique un délai de stimulation en Activine de 48h sur les pattern, on sauve plus efficacement la formation de l'anneau de Brachyury que lorsqu'on stimule en Activine les cellules à t=0. Pour éviter que le Nodal secreté par les cellules ne vienne perturber l'analyse, on a travaillé également avec des Nodal KO.

Pour cela, nous avons réalisé des expériences de stimulation sur "pattern" à géométrie circulaire, où l'on a ensemencé les cellules à 24h, puis on les a stimulées à partir de 48h après l'arrêt pluripotence "naïve", précédé d'une culture en boite de pétri. Ensuite, on a mesuré en immuno-fluorescence en supplément de Brachyury, le profil des marqueurs du mésoderme-axiale/endoderme-primitif (Foxa2), du mésoderme postérieure/Trophectoderme (Cdx2) [Figure 62 : b].

Les résultats des marqueurs d'IF nous montrent que la stimulation de la voie TGF- β est nécessaire à l'apparition de marqueurs de ligne primitive et que l'expression de ces marqueurs est plus importante et plus précoce quand l'activine est donné à t=40h comparée à t=0, mais aussi qu'une stimulation BMP4 à 48h [Figure 62 : c-d, : image IF à 120h]. Nous remarquons conformément à notre observation précédente sur l'effet de la densité cellulaire sur la réponse de BRA-GFP [Figure 60 : e], que le profil spatial de BRACHYURY n'est pas homogènement réparti dans le tissu, mais seules les cellules aux bords expriment le plus BRACHYURY [Figure 62 : d]. Les marqueurs Foxa2 et Cdx2 sont eux aussi répartis de la même façon que BRACHYURY. On remarque que les stimulations à partir de 48h après l'arrêt de la pluripotence en BMP4+Activine ont la réponse la plus forte à t=96h [Figure 62 : d].

Ces expériences nous ont permis de mettre en avant que le profil de BRACHYURY est dépendant de la stimulation temporelle en Activine, mais que celui-ci est d'autant plus dépendant de la densité cellulaire.

Références

- Adachi, H., Saijoh, Y., Mochida, K., Ohishi, S., Hashiguchi, H., Hirao, A., and Hamada, H. (1999). Determination of left/right asymmetric expression of nodal by a left side-specific enhancer with sequence similarity to a lefty-2 enhancer. *Genes Dev.* *13*, 1589–1600.
- Conlon, F.L. (1994). A primary requirement for nodal in the formation and maintenance of the primitive streak in the mouse. *Trends Genet.* *10*, 308–308.
- Dupont, S., Zacchigna, L., Cordenonsi, M., Soligo, S., Adorno, M., Rugge, M., and Piccolo, S. (2005). Germ-Layer Specification and Control of Cell Growth by Ectodermin, a Smad4 Ubiquitin Ligase. *Cell* *121*, 87–99.
- Etoc, F., Metzger, J., Ruzo, A., Kirst, C., Yoney, A., Ozair, M.Z., Brivanlou, A.H., and Siggia, E.D. (2016). A Balance between Secreted Inhibitors and Edge Sensing Controls Gastruloid Self-Organization. *Dev. Cell* *39*, 302–315.

- Gómez-Sjöberg, R., Leyrat, A.A., Pirone, D.M., Chen, C.S., and Quake, S.R. (2007). Versatile, Fully Automated, Microfluidic Cell Culture System. *Anal. Chem.* *79*, 8557–8563.
- Granier, C., Gurchenkov, V., Perea-Gomez, A., Camus, A., Ott, S., Papanayotou, C., Iranzo, J., Moreau, A., Reid, J., Koentges, G., et al. (2011). Nodal cis-regulatory elements reveal epiblast and primitive endoderm heterogeneity in the peri-implantation mouse embryo. *Dev. Biol.* *349*, 350–362.
- Hamada, H., Meno, C., Watanabe, D., and Saijoh, Y. (2002). Establishment of vertebrate left-right asymmetry. *Nat. Rev. Genet.* *3*, 103–113.
- Hayashi, K., Ohta, H., Kurimoto, K., Aramaki, S., and Saitou, M. (2011). Reconstitution of the Mouse Germ Cell Specification Pathway in Culture by Pluripotent Stem Cells. *Cell* *146*, 519–532.
- Heemskerk, I., Burt, K., Miller, M., Chhabra, S., Guerra, M.C., Liu, L., and Warmflash, A. (2018). Rapid changes in morphogen concentration control self-organized patterning in human embryonic stem cells. *28*.
- Imuta, Y., Kiyonari, H., Jang, C.-W., Behringer, R.R., and Sasaki, H. (2013). Generation of knock-in mice that express nuclear enhanced green fluorescent protein and tamoxifen-inducible Cre recombinase in the notochord from *Foxa2* and *T* loci: Mouse Lines Expressing EGFP and Inducible CRE. *Genesis* *51*, 210–218.
- Morgani, S.M., Metzger, J.J., Nichols, J., Siggia, E.D., and Hadjantonakis, A.-K. (2018). Micropattern differentiation of mouse pluripotent stem cells recapitulates embryo regionalized cell fate patterning. *ELife* *7*.
- Murry, C.E., and Keller, G. (2008). Differentiation of Embryonic Stem Cells to Clinically Relevant Populations: Lessons from Embryonic Development. *Cell* *132*, 661–680.
- Norris, D.P., Brennan, J., Bikoff, E.K., and Robertson, E.J. (2002). The Foxh1-dependent autoregulatory enhancer controls the level of Nodal signals in the mouse embryo. *Development* *129*, 3455–3468.
- Papanayotou, C., Benhaddou, A., Camus, A., Perea-Gomez, A., Jouneau, A., Mezger, V., Langa, F., Ott, S., Sabéran-Djoneidi, D., and Collignon, J. (2014). A Novel Nodal Enhancer Dependent on Pluripotency Factors and Smad2/3 Signaling Conditions a Regulatory Switch During Epiblast Maturation. *PLoS Biol.* *12*, e1001890.
- Scott, I.C., Anson-Cartwright, L., Riley, P., Reda, D., and Cross, J.C. (2000). The HAND1 Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor Regulates Trophoblast Differentiation via Multiple Mechanisms. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 530–541.
- Sorre, B., Warmflash, A., Brivanlou, A.H., and Siggia, E.D. (2014). Encoding of Temporal Signals by the TGF- β Pathway and Implications for Embryonic Patterning. *Dev. Cell* *30*, 334–342.
- Vieira, P.M. (2018). Régulation de l'expression du gène Nodal lors de la différenciation des cellules souches embryonnaires. *128*.
- Warmflash, A., Zhang, Q., Sorre, B., Vonica, A., Siggia, E.D., and Brivanlou, A.H. (2012). Dynamics of TGF- signaling reveal adaptive and pulsatile behaviors reflected in the nuclear localization of transcription factor Smad4. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, E1947–E1956.
- Warmflash, A., Sorre, B., Etoc, F., Siggia, E.D., and Brivanlou, A.H. (2014). A method to recapitulate early embryonic spatial patterning in human embryonic stem cells. *Nat. Methods* *11*, 847–854.

IV. Discussion

Une des propriétés principales des morphogènes est de pouvoir induire différents destins cellulaires en fonction de la dose à laquelle les cellules sont soumises. Ainsi, des expériences fondatrices permettant de comprendre le *patterning* ont montré qu'une « dose » de morphogènes suffisait à induire la différentiation des cellules en plusieurs types cellulaires (Green et al., 1992; Gurdon et al., 1999). Ces expériences qui sont à la base de nos questions sur l'auto-organisation des tissus dans un embryon, ont montré clairement qu'une concentration fixe en Activine pouvait induire à forte dose (entre 7.2 et 20 U/ml) de l'ectoderme, à dose intermédiaire (entre 0.9 et 4.3 U/ml) du mésoderme et à faible dose (entre 7.2 et 20 U/ml) des cellules de la corde dorsale [Chapitre 1, Partie 2].

Ce n'est que plus récemment, depuis qu'il est possible de pouvoir suivre en temps réel l'expression de protéine fluorescente (Arun et al., 2005; Phillips, 2001) que l'influence de la dynamique temporelle des morphogènes sur la réponse cellulaire a commencé à être considérée. Encore aujourd'hui cela reste assez complexe à mettre en œuvre *in vivo* sur un embryon de mammifère. Cependant, des études *in vitro* menées sur la lignée myoblastique C2C12 ont montré que pour la voie de signalisation TGF- β , la vitesse de stimulation pouvait être tout aussi importante (Sorre et al., 2014).

Notre objectif premier a été de vérifier si la dérivée temporelle de stimulation observée sur les C2C12 est tout aussi importante dans le développement. Nodal est un ligand qui active la voie de signalisation TGF- β (Zhou et al., 1993), où nous savons aujourd'hui qu'il intervient à plusieurs étapes du développement, que son expression spatio-temporelle est très complexe et qu'il est contrôlé entre autres par la voie de signalisation TGF- β [Chapitre 1, Partie 3].

Pour comprendre quelle influence le profil temporel de stimulation de la voie TGF- β a sur la dynamique d'expression de Nodal, nous avons proposé une approche *in vitro* pour pouvoir stimuler les cellules avec des signaux complexe d'Activine [Chapitre 1, Partie 4]. Nous nous sommes focalisés sur la transition « mESC → mEpiLC », un modèle *in vitro* de la maturation de l'épiblaste qui correspond à un moment où l'expression de Nodal change de régulation. Dans l'épiblaste préimplantatoire elle dépend principalement des facteurs de pluripotence, via l'élément HBE alors que dans l'épiblaste post-implantation, elle est contrôlée par les voies de signalisation β -caténine et TGF- β via les éléments PEE et ASE, respectivement [Chapitre 1, Partie 3].

Ces travaux de thèse ont permis de caractériser le profil temporel des différentes composantes de NODAL à partir de stimulation en Activine, ainsi que l'impact de la réponse sur la différenciation cellulaire. Nous avons aujourd'hui la confirmation que NODAL est régulé par HBE lors de l'état pluripotent naïf, mais qu'au fur et à mesure de la différenciation, NODAL est régulé par ASE et devient une cible de la voie de signalisation TGF- β [Chapitre 3, Partie 1 et 2]. Pourtant, nous ne savons toujours pas précisément la manière dont les cellules intègrent la voie de signalisation TGF- β . La caractérisation du profil de réponse d'ASE-YFP nous laisse penser que la voie de signalisation est adaptative sur des temps longs, mais il reste à caractériser de la même façons la translocation des smad2s.

Durant ces travaux nous avons montré deux propriétés novatrices jusqu'alors jamais observées chez NODAL, en particulier l'effet mémoire de la voie de signalisation TGF- β sur des temps longs [Chapitre 3, Partie 1], mais aussi la distribution inhomogène bimodale d'expression de NODAL suivant la densité locale de cellule.

Cette dernière observation est d'autant plus intéressante lorsqu'on a observé le même phénomène d'effet de densité locale de cellule sur le profil de réponse du rapporteur de la formation de la ligne primitive « BRA-GFP » [Chapitre 3, Partie 4] et montre qu'il est nécessaire *in vitro* de contrôler le plus possible la densité cellulaire.

Enfin, nous avons montré que la temporalité de stimulation en Activine influençait grandement la transcription globale des mESC en cours de différenciation [Chapitre 3, Partie 4] et que par exemple, un train de pulse de 3 h toutes les 24 h pouvait avoir le même effet qu'une stimulation continue en BMP4, un autre morphogène de la voie TGF- β , mais qui est sensé activé des cibles différentes de la voie Activine/NODAL (Galvin et al., 2010).

Dans cette partie nous aborderons les questions en suspens, des expériences qu'on pourrait réaliser prochainement et aussi des idées que l'on avait initialement eues pour ce projet.

Le comportement de HBE- pour les mEpiLCs est différent de celui des mEpiSCs.

Nos expériences menées sur les lignées « NODAL-YFP » vont dans le sens de la transition de la régulation de HBE vers ASE lors de la maturation des mESC vers les mEpiLC. En effet, lorsqu'on mesure le profil de NODAL-YFP de la lignée ASE – lors de la maturation, le signal s'éteint à la fin de la transition et pour la lignée HBE-, c'est l'inverse, le signal est éteint au début d'expérience et se rallume lorsque les cellules sont à la fin de la transition [Chapitre 3, Partie 1] [Figure 63 : b].

Pourtant, cette dernière observation ne va pas dans le sens des observations antérieures faites sur des mEpiSCs induites (Papanayotou et al., 2014) où il a été montré que si HBE est absent à partir du stade mESC, alors, lorsque les cellules sont au stade mEpiSC, il n'y a plus d'expression du rapporteur NODAL-YFP [Figure 63 : c].

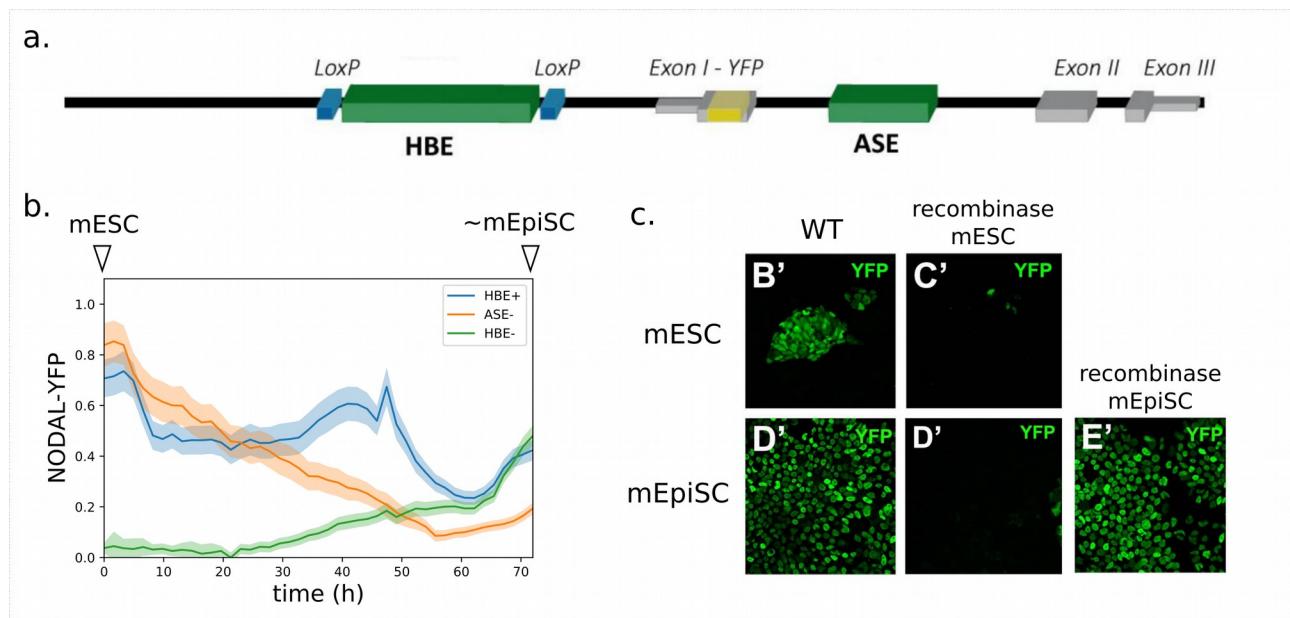


Figure 63: Comparaison des résultats d'HBE- en EpiLC et en EpiSC induites. a. : Lignée rapportrice Nodal-YFP, les sites de recombinaison LoxP sont placés de chaque côté de l'enhancer HBE. b. : Profils de Nodal condHBE-YFP suivant les délétions HBE et ASE. c. : Nodal-YFP suivant les conditions WT et les recombisase en mESC et mEpiSC. (Papanayotou et al., 2014; Vieira, 2018)

Toutefois, les observations réalisées sur les « EpiSC induites » ne sont pas tout à fait les mêmes qu'en EpiLC. Comme on l'a vu au chapitre 1, partie 4, les EpiLCs au troisième jour sont les seules à pouvoir se différencier en cellules germinales et leurs profils transcriptionnels sont plus proches de celui des cellules directement extraites de l'épiblaste au E5.5. Quant aux cellules « EpiSC induites », les mESC sont cultivées pendant 10 jours en « Activine + bFGF » avant de se

stabiliser et une bonne partie des cellules sont rentrées en apoptose, ce qui laisse supposer que seule une sous-population a été maintenue (Guo et al., 2009). Nos expériences réalisées sur les *Nodal*^{condHBE-YFP}, montrent qu'il peut se former deux populations de cellules lors de la maturation des mESC vers les mEpiLC [Chapitre 3, Partie 1], avec une partie dense qui est fortement allumée et une partie plus étalée qui n'exprime pas *Nodal*^{condHBE-YFP}, il est donc possible que la population « étalée » qui n'exprime pas NODAL soit favorisée en EpiSC induites dans le cas où HBE est délété et que nos différences d'observation viennent des différences entre protocole.

Néanmoins, leurs expériences réalisées *in vivo* montrent que des embryons chimériques HBE – expriment faiblement le rapporteur *Nodal*^{ΔHBE-YFP} au stade 6.5 comparée à des embryons chimériques HBE+ au même stade (Papanayotou et al., 2014). Ces observations ne sont pas incompatibles avec nos expériences, dans la mesure où les niveaux sont plus bas, ou que le timing *in vivo* à E6.5 corresponds *in vitro* à 60 h, moment où le signal du rapporteur *Nodal*^{ΔHBE-YFP} est faible [Figure 63 : b].

La signalisation TGF- β est-elle déjà adaptée en sortie du milieu « 2i » ?

Les observations sur les immunofluorescences des pSmad2 et d'ASE-YFP, nous ont montré une dynamique complexe d'intégration de la voie de signalisation TGF- β . En immunofluorescence, nous avons observé que la voie semble active en sortie du 2i [Chapitre 3, Partie 2], ce qui pourrait expliquer que la dynamique d'ASE-YFP soit décalée dans le temps en sortie du 2i. Pour cela, il nous manque encore des expériences à réaliser avec nos lignées *Nodal*^{condHBE-YFP} et ASE-YFP pour vérifier si cette hypothèse est valide ou non. L'une d'entre elles serait de refaire les expériences de stimulations en Activine avec des signaux complexes en ayant au préalable désactivé la voie de signalisation avec du SB-431542 sur les NODAL-YFP et ASE-YFP. Avec cette expérience, si l'hypothèse que la voie TGF- β est activée en sortie de 2i est valide, on aurait pour ces deux lignées des cellules qui répondent plus précocement à une stimulation Activine. Mais une autre expérience qui répondrait mieux à cette problématique, serait de mesurer directement la translocation des pSmad2/3 en temps réel au cours de la maturation de l'épiblaste.

Depuis peu, nous avons à disposition une lignée mESC rapportrice de la translocation des smads2 construite au laboratoire par Carine Vias et avec la méthode Crispr/Cas9. Cette lignée nous permettrait de suivre en temps réel la position des smad2 dans la cellule et de répondre aux questions liées à l'activité de la voie de signalisation TGF- β .

Cette lignée nous permettra d'être plus précis sur les expériences réalisées au chapitre 3, partie 2, et de vérifier si le profil de la translocation des smads2 à bien une forme adaptive, mais aussi de mesurer l'effet de l'inhibiteur SB-431542 en sortie de 2i, pour vérifier si cela permet de relancer l'activité de la voie de signalisation TGF- β plus préocurement que lorsqu'on stimule en Activine sans traitement SB-431542 préalable.

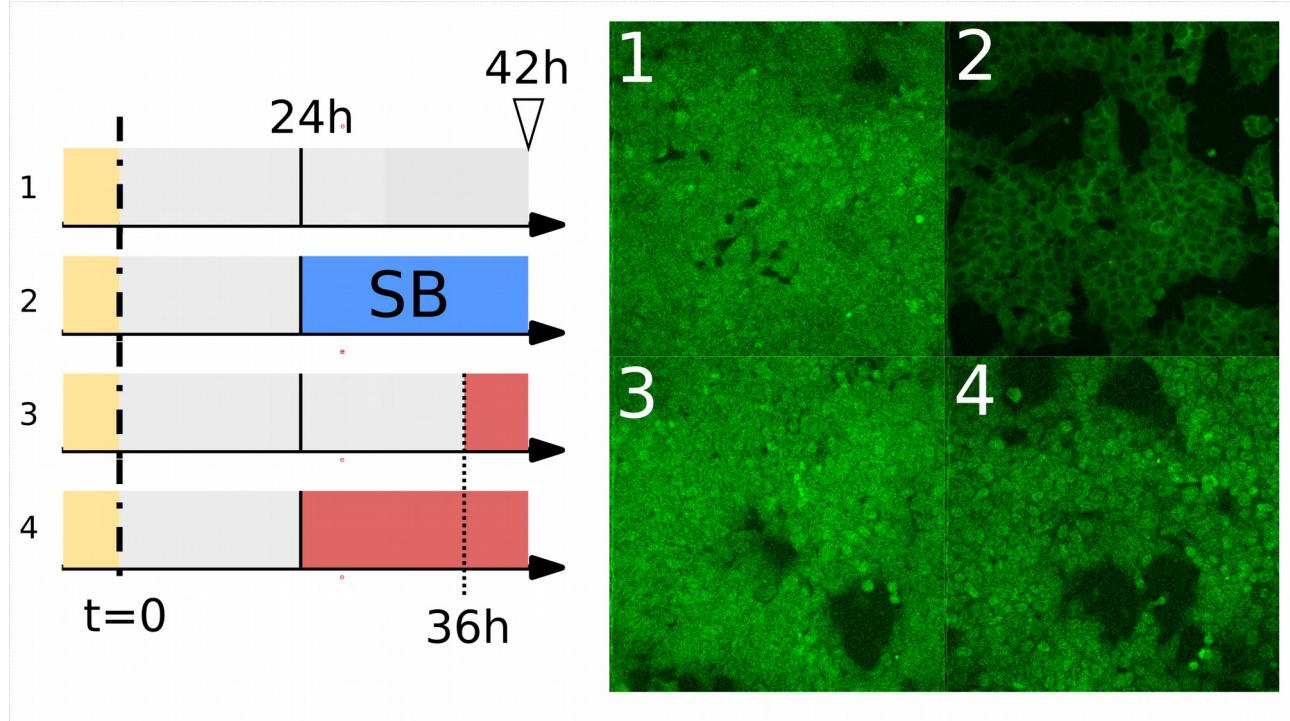


Figure 64: Expérience à temps fixe à 42h sur Smad2-RFP montrant la translocation des smads2. 1 : Stimulation sans Activine pendant 42h. 2 : Traitement SB-431542 pendant 22h précédé de 24h non stimulée. 3 : Stimulation en Activine à partir de 36h. 4 : Stimulation en Activine pendant 22h précédée de 24h non stimulée.

Des expériences ont déjà été élaborées avec la lignée Smad2-RFP et montrent qu'un traitement inhibe la translocation des smad2 dans le noyau [Figure 64 : 2] et qu'une stimulation de 22 h en Activine à partir de 24 h après l'arrêt de la pluripotence entraîne une localisation des smads2 dans le noyau [Figure 64 : 2]. Ces expériences vont dans le sens des observations faites aussi bien avec les pSmad2 en immunofluorescence, où l'on a mesuré une translocation des smad2 supérieurs à $t=48$ h qu'à $t=30$ h pour une stimulation en Activine commençant 24 h après l'arrêt de la pluripotence [Chapitre 3, Partie 2], mais aussi avec ASE-YFP, où pour une stimulation en Activine à $t=20$ h, le signal est maximal aux alentours de 40 h. La lignée Smad2-RFP est donc un bon outil pour étudier la translocation des Smad2 et mieux comprendre les mécanismes d'intégration de la voie TGF- β .

Cette lignée pourra aussi répondre à la question de la mémoire de la voie de signalisation TGF- β . En effet, les expériences de train de pulses sur ASE-YFP nous ont montré que les cellules « gardent » en mémoire un pulse sur de longue durée (40 h observé) [Chapitre 3, Partie 3], avec la lignée Smad2-RFP, nous pourrions vérifier si cet effet mémoire s'observe aussi lors de la translocation des smad2. Aussi, les expériences à « hautes fréquences » de stimulation [Chapitre 3, Partie 3] ne nous ont pas permis de savoir s'il y a une relaxation instantanée des smads2 lorsqu'on passe du milieu activateur au milieu neutre comme il a déjà été montré avec les C2C12 [Chapitre 1, Partie 2] (Sorre et al., 2014), ou si les smad2s reste localisés dans le noyau pour augmenter la transcription.

À chaque moment, les pSmad2 sont à 3 niveaux : Le niveau basal (celui qu'a une cellule lorsqu'on est en milieu neutre), le niveau actif (lorsqu'on ajoute de l'Activine) et le niveau « zéro » (traitement SB-431542). La lignée Smad2-RFP nous permettra de mesurer la quantité absolue de smad2 produit par la cellule et de savoir si c'est la valeur absolue du signal qui est importante pour la réponse transcriptionnelle d'ASE-YFP ou la différence entre les niveaux actif/basal ou actif/zéro. Ainsi cette lignée nous apportera aussi une meilleure compréhension de nos observations sur l'amplitude de réponse d'ASE-YFP.

L'effet mémoire observée sur ASE-YFP est-il cohérent avec le développement d'un embryon de souris ?

Les expériences de trains de pulse en Activine menées sur le rapporteur transgénique ASE-YFP ont montré que quelle que soit la fréquence de stimulation, le signal s'éteint aux alentours de 80 h et forme une enveloppe ayant la forme d'une stimulation marche d'Activine à 20 h et cela même pour des périodes de stimulation de 40 h [Chapitre 3, Partie 3]. Cette observation, nous a laissé penser en premier lieu à une fenêtre temporelle de réponse, comme il a déjà été montré avec un rapporteur de la formation de la ligne primitive Mixl1 (Jackson et al., 2010). Mais les expériences de marche et de pulse d'Activine à des temps plus longs (80 h), nous ont montré que la réponse était la plus forte à ce moment de la différenciation [Chapitre 3, Partie 3] et nous a fait penser qu'un pulse d'Activine pouvait être gardé en mémoire à des temps longs.

Cette observation a amené à deux grandes questions : Est-ce que la cellule a changé d'identité et n'est plus sensible à une stimulation Activine ? Ou est-ce que la voie de signalisation TGF- β des cellules est encore adaptée à 80 h lorsqu'on stimule avec un pulse à 20 h ?

Les expériences où l'on a mesuré l'effet d'un pulse de 4 h sur la transcription cellulaire par RT-qPCR nous ont montré qu'il n'était pas suffisant pour les cellules d'adopter une identité différente du cas où l'on ne stimule pas en Activine et que seule une série de pulses et des marches à temps longs pouvait changer l'identité cellulaire vers de la ligne primitive [Chapitre 3, Partie 3]. Il est donc plus probable que la voie de signalisation soit encore active à des temps longs, ce qui empêcherait au second pulse de ré-activer la voie de signalisation TGF-B. Pour vérifier cette seconde hypothèse, une expérience réalisable serait de refaire l'expérience de pulse à temps long, mais cette fois, entre chaque pulse, on inhibe la voie de signalisation TGF- β par un traitement SB-431542 pendant une durée encore à définir, pour qu'elle soit suffisante pour inhiber la voie, mais pas trop longue pour ne pas perturber le bon fonctionnement des cellules [Figure 65 : a].

Pour autant, l'observation du phénomène de mémoire, n'est pas incohérente avec ce qui pourrait se produire à la suite de la formation de la ligne primitive. Lors de la formation de la ligne primitive de la souris E6.5, il se forme un gradient de morphogène Nodal sur le côté Postérieur dans la direction de l'axe proximal-distal, qui oriente la ligne dans ce sens jusqu'à la formation du nœud [Figure 65 : 1,c,2]. Ainsi les cellules du côté Postérieur ont reçu une plus grande quantité du morphogène Nodal que le côté Antérieur et ne pourront plus répondre ultérieurement à une stimulation NODAL, alors que les cellules du côté Antérieurs pourront participer à une autre étape où Nodal est impliqué [Figure 65 : 3] et les cellules du côté Postérieurs qui n'ont reçu qu'une brève impulsion de NODAL, de ne pas participer à la future étape où Nodal est impliqué. L'effet mémoire, pourrait expliquer des phénomènes séquentiels que l'on peut observer dans l'embryon à ce stade (Beddington and Robertson, 1999).

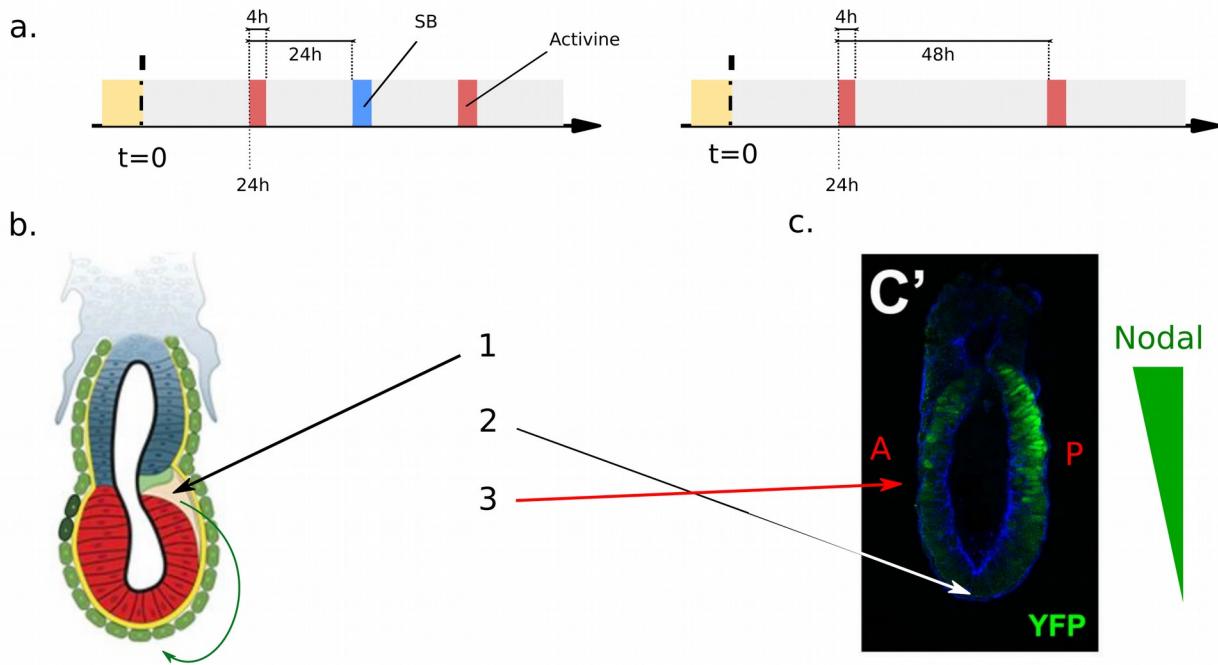


Figure 65: Caractérisation du phénomène de mémoire sur la voie de signalisation et hypothèse dans l'embryon lors de la formation de la ligne primitive (E6.5). a. : Protocole pour vérifier si l'activité de la voie TGF- β est la cause du phénomène de mémoire et à droite, le contrôle b. : schématisation de l'embryon au stade E6.5, la flèche verte indique le sens de formation de la ligne primitive. c. : Image en fluorescence de NODAL dans l'embryon au stade E6.5, Nodal forme un gradient suivant l'axe proximal-distal sur la face postérieure. 1 : Début de la formation de la ligne primitive. 2 : Fin de la formation de la ligne primitive/début du Nœud (stade ultérieur : E7.25. 3 : Face antérieure n'ayant pas reçu de NODAL à des niveaux élevés. (Harrison et al., 2017; Papanayotou et al., 2014)

Comprendre les mécanismes dynamiques de différenciation des cellules sur Pattern à partir de BRA-GFP

Les expériences menées en RT-qPCR ont montré que la dynamique de stimulation en Activine avait un effet important sur la différenciation des cellules, où des marches à temps longs (48 h, 72 h) pouvaient orienter les cellules plus rapidement vers de la ligne primitive (Brachyury) qu'une stimulation continue en Activine, mais aussi qu'une série de pulse toutes les 24 h pouvait avoir le même effet qu'une stimulation marche en BMP4 à 24 h. Nous nous sommes donc intéressés à l'effet de la dynamique de stimulation pour des signaux plus complexes d'Activine via un rapporteur fluorescent de Brachyury : Bra-GFP.

Pourtant, les expériences menées sur puces microfluidiques avec la lignée rapportrice BRA-GFP, ne nous ont pas permis d'observer tout à fait les mêmes comportements du profil de Brachyuri mesuré en RT-qPCR, à cause de la présence de riboflavine dans le milieu qui

diminue le contraste entre la GFP et le fond, et d'un effet important de la densité sur le profil temporel de Brachyuri. La comparaison des expériences sur puces à celles réalisées sur micro-pattern circulaire (Jean-Louis Plouhinec) [Chapitre 3, Partie 4], nous montre des temps d'expression du rapporteur Brachyuri bien trop grand et pas comparable avec ce que l'on pourrait obtenir dans un embryon : à 200 h sur puce après l'arrêt de la pluripotence, pourrait être équivalent à E10 in vivo, soit au moment où Brachyury est nécessaire à la formation du squelette de la souris (Pennimpede et al., 2012), or il est peu probable qu'on soit à cette étape du développement sur puce. Nous envisageons donc pour BRA-GFP de mesurer son activité d'expression uniquement au confocal pour optimiser l'acquisition, mais surtout dans un environnement où la densité cellulaire est contrôlée comme les micro-patterns.

Pour la lignée NODAL-YFP, des expériences ont déjà été réalisées en temps réel sur pattern à géométrie circulaire par Benoit Sorre et Jean-Louis Plouhinec pour étudier l'effet du contrôle de la densité cellulaire sur l'intégrale d'expression de Nodal. Comme on a vu au chapitre 1, partie 3, Nodal interagit avec un Wnt3 et BMP4 lors de la formation de la ligne primitive, et il a été proposé que l'intégrale de production de Nodal pouvait prédire la future identité des cellules en mes-endoderme, mésoderme ou ectoderme [Figure 66 : a] (Ben-Haim et al., 2006).

Pour leurs expériences, ils ont stimulé à partir de 48 h après l'arrêt de la pluripotence les NODAL-YFP séparément avec du Wnt3 et du BMP4 sur patterns et ont mesuré l'évolution temporelle du profil radial d'expression de *Nodal*^{condHBE-YFP} entre 20 et 63 h après la stimulation. Leurs expériences montrent une intégrale de réponse plus faible dans le cas d'une stimulation en BMP4 [Figure 66 : d-e] et plus forte pour une stimulation Wnt3 [Figure 66 : c, e]. Ils ont ensuite mesuré par Immunofluorescence le profil des marqueurs de la position Antérieur (Foxa2) et Postérieur (Cdx2), et ont observé que Foxa2 est plus exprimé avec les stimulations Wnt3, alors qu'avec BMP4, c'est Cdx2 qui est plus exprimé.

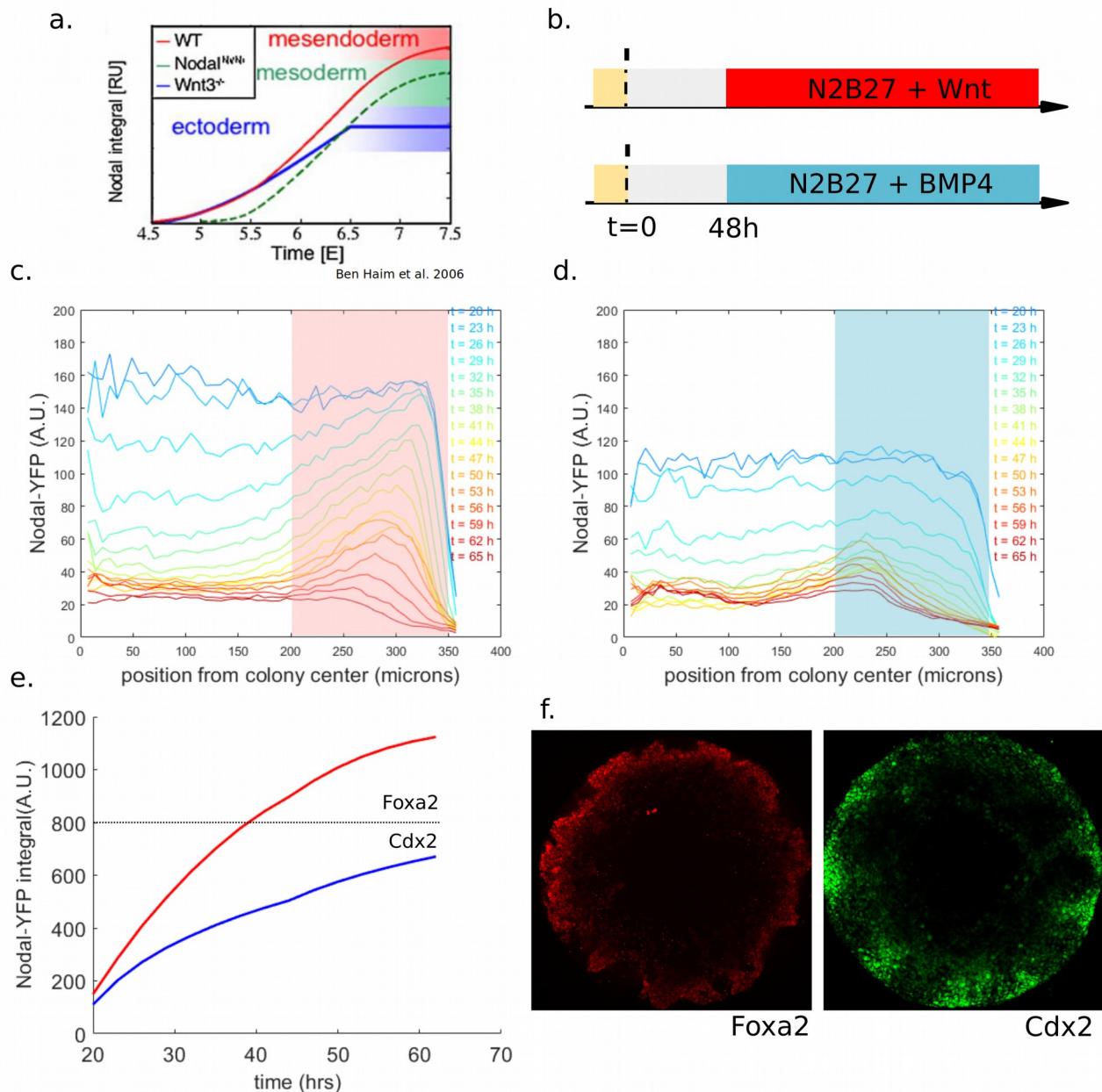


Figure 66: Mesure du profil temporel de Nodal condHBE-YFP sur pattern circulaire et implication sur la différenciation. a. : Modélisation de l'effet de l'intégrale d'expression de Nodal sur la formation des 3 feuillets embryonnaires (Ben-Haim et al., 2006). b. : Protocole expérimental de stimulation pour les expériences réalisées en pattern. c. : Evolution du profil radial au cours du temps pour une stimulation Wnt3. d. : Evolution du profil radial au cours du temps pour une stimulation BMP4. e. : Courbe de l'intégrale de réponse radiale entre 200μm et 350μm des patterns stimulés en Wnt3 (rouge) et BMP4 (bleu). f. : Immunofluorescence des marqueurs Postérieur (Foxa2) et Antérieurs (Cdx2) respectivement suivant les stimulations Wnt3 et BMP4. (Benoit Sorre et Jean-Louis Plouhinec)

Ces observations indiquent que l'approche sur pattern va dans le même sens que les observations faites sur l'étude de la formation de la ligne primitive des souris *in vivo*. Pour compléter cette expérience et répondre à nos questions sur l'expression du rapporteur de la formation de la ligne primitive « BRA-GFP », il serait nécessaire d'étudier son profil radial temporel d'expression sur pattern dans le cas de stimulation en Activine ou avec BMP4 et

Wnt3. Pour générer des signaux plus complexes, comme des pulses ou des rampes, il serait par contre envisageable de développer un système microfluidique précis et automatisé qui contraine les cellules dans un environnement circulaire.

Comment contrôler la différenciation cellulaire des mESC vers la formation des 3 feuillets embryonnaire ?

Un des buts initiaux de ma thèse était de contrôler la différenciation des cellules souches embryonnaire vers les 3 feuillets embryonnaires. Des expériences ont déjà fait leurs preuves pour le contrôle de l'expression de gène aussi bien chez des bactéries comme E.Coli (Lugagne et al., 2017), ou encore des eucaryotes unicellulaire comme la levure S. Cerevisiae (Uhlendorf et al., 2012). Ils ont montré qu'il était possible avec des techniques issues de l'automatisme, comme les régulateurs « tout ou rien », « PID » (Proportionnel Intégrale Dérivée) ou encore la « commande prédictive », qu'on peut contrôler efficacement l'expression d'un gène, dans la mesure où la modélisation de la fonction de transfert est possible et que la segmentation est très efficace. Dans notre cas, on aurait voulu faire de même avec le rapporteur fluorescent NODAL-YFP et BRA-GFP, pour guider les cellules vers un des trois types cellulaires du feuillet embryonnaire.

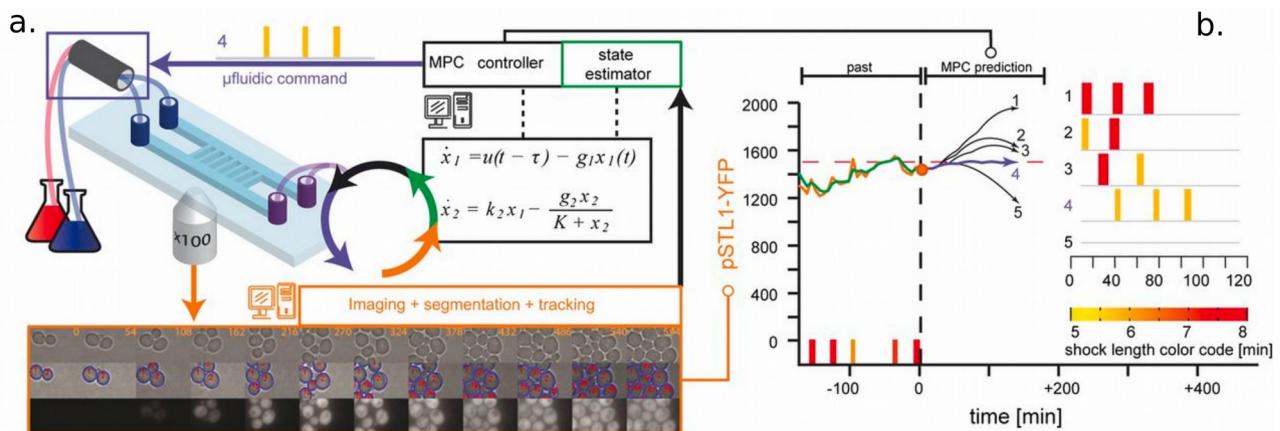


Figure 67: Principe de la plateforme pour le contrôle en temps réel de l'expression des gènes chez la levure. a.: Culture des levures en microfluidique adaptée pour le changement du stress osmotique (input), modélisation du système « levure » par des équations différentielles et mesure en fluorescence d'un marqueur de production de glycérol « pSTL1 » (output). b. : Mesure du profil d'expression de pSTL1 en fluorescence et prédition trouvée par la commande prédictive pour générer le futur stress osmotique. (Uhlendorf et al., 2012)

Durant nos travaux, on a montré que notre système cellulaire est très complexes à caractériser, d'une part car notre système n'est ni linéaire, ni invariant, comme on a pu le voir

avec la mesure de la réponse fréquentielle [Chapitre 3, Partie 3], que des variables d'entrée influençant fortement l'expression des gènes ne sont pas contrôlables avec notre système microfluidique comme la densité cellulaire [Chapitre 3, Partie 1 et 4], mais surtout, les échelles de temps de réponse sont trop longs (de l'ordre d'une journée pour certains cas) pour qu'une commande prédictive soit efficace. Nous n'avons donc pas développé cette direction d'étude durant nos recherches, mais il pourrait être intéressant à l'avenir de trouver des solutions pour le contrôle de la différenciation des cellules souches, car elles ouvrent des perspectives dans le domaine médical comme l'ingénierie tissulaire (Dzobo et al., 2018).

Références

- Arun, K.H.S., Kaul, C.L., and Ramarao, P. (2005). Green fluorescent proteins in receptor research: An emerging tool for drug discovery. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* *51*, 1–23.
- Beddington, R.S.P., and Robertson, E.J. (1999). Axis Development and Early Asymmetry in Mammals. *Cell* *96*, 195–209.
- Ben-Haim, N., Lu, C., Guzman-Ayala, M., Pescatore, L., Mesnard, D., Bischofberger, M., Naef, F., Robertson, E.J., and Constam, D.B. (2006). The Nodal Precursor Acting via Activin Receptors Induces Mesoderm by Maintaining a Source of Its Convertases and BMP4. *Dev. Cell* *11*, 313–323.
- Dzobo, K., Thomford, N.E., Senthebane, D.A., Shipanga, H., Rowe, A., Dandara, C., Pillay, M., and Motaung, K.S.C.M. (2018). Advances in Regenerative Medicine and Tissue Engineering: Innovation and Transformation of Medicine.
- Galvin, K.E., Travis, E.D., Yee, D., Magnuson, T., and Vivian, J.L. (2010). Nodal Signaling Regulates the Bone Morphogenic Protein Pluripotency Pathway in Mouse Embryonic Stem Cells. *J. Biol. Chem.* *285*, 19747–19756.
- Green, J.B.A., New, H.V., and Smith, J.C. (1992). Responses of embryonic *xenopus* cells to activin and FGF are separated by multiple dose thresholds and correspond to distinct axes of the mesoderm. *Cell* *71*, 731–739.
- Guo, G., Yang, J., Nichols, J., Hall, J.S., Eyres, I., Mansfield, W., and Smith, A. (2009). Klf4 reverts developmentally programmed restriction of ground state pluripotency. *Development* *136*, 1063–1069.
- Gurdon, J.B., Standley, H., Dyson, S., Butler, K., Langton, T., Ryan, K., Stennard, F., Shimizu, K., and Zorn, A. (1999). Single cells can sense their position in a morphogen gradient. *Development* *126*, 5309–5317.
- Harrison, S.E., Sozen, B., Christodoulou, N., Kyprianou, C., and Zernicka-Goetz, M. (2017). Assembly of embryonic and extraembryonic stem cells to mimic embryogenesis in vitro. *Science* *356*, eaal1810.
- Jackson, S.A., Schiesser, J., Stanley, E.G., and Elefanty, A.G. (2010). Differentiating Embryonic Stem Cells Pass through 'Temporal Windows' That Mark Responsiveness to Exogenous and Paracrine Mesendoderm Inducing Signals. *PLoS ONE* *5*, e10706.
- Lugagne, J.-B., Sosa Carrillo, S., Kirch, M., Köhler, A., Batt, G., and Hersen, P. (2017). Balancing a genetic toggle switch by real-time feedback control and periodic forcing. *Nat. Commun.* *8*.
- Papanayotou, C., Benhaddou, A., Camus, A., Perea-Gomez, A., Jouneau, A., Mezger, V., Langa, F., Ott, S., Sabéran-Djoneidi, D., and Collignon, J. (2014). A Novel Nodal Enhancer Dependent on Pluripotency Factors and Smad2/3 Signaling Conditions a Regulatory Switch During Epiblast Maturation. *PLoS Biol.* *12*, e1001890.
- Pennimpede, T., Proske, J., König, A., Vidigal, J.A., Morkel, M., Bramsen, J.B., Herrmann, B.G., and Wittler, L. (2012). In vivo knockdown of Brachyury results in skeletal defects and urorectal malformations resembling caudal regression syndrome. *Dev. Biol.* *372*, 55–67.
- Phillips, G.J. (2001). Green fluorescent protein—a bright idea for the study of bacterial protein localization. *FEMS Microbiol. Lett.* *204*, 9–18.
- Sorre, B., Warmflash, A., Brivanlou, A.H., and Siggia, E.D. (2014). Encoding of Temporal Signals by the TGF- β Pathway and Implications for Embryonic Patterning. *Dev. Cell* *30*, 334–342.
- Uhlendorf, J., Miermont, A., Delaveau, T., Charvin, G., Fages, F., Bottani, S., Batt, G., and Hersen, P. (2012). Long-term model predictive control of gene expression at the population and single-cell levels. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 14271–14276.

- Vieira, P.M. (2018). Régulation de l'expression du gène Nodal lors de la différenciation des cellules souches embryonnaires. 128.
- Zhou, X., Sasaki, H., Lowe, L., Hogan, B.L.M., and Kuehn, M.R. (1993). Nodal is a novel TGF- β -like gene expressed in the mouse node during gastrulation. *Nature* 361, 543.