

Différences d'incorporation des CSE dans un blastocyste hôte chez la souris ou le singe : quelles hypothèses ?

Si ces résultats confirment la différence entre les systèmes du singe Rhésus (et probablement de l'homme) et de souris, l'histoire ne dit pas pourquoi les CSE de Rhésus ne contribuent pas au développement embryonnaire : incompétence des CSE, non-permissivité de l'embryon hôte ou autre facteur de restriction sans aucun rapport avec le potentiel des cellules et qui, s'il était identifié, pourrait être contourné. Les auteurs formulent au moins deux hypothèses :

Les blastocystes hôtes, comme les CSE injectées, sont peut-être au-delà de la fenêtre de permissivité propice à l'établissement du chimérisme. La compétence des CSE de primates (et d'homme) reflète en effet l'état de maturation de la masse interne dont elles sont issues. Or, l'analyse fine des masses internes des blastocystes hôtes a révélé qu'à ce stade, une organisation en deux feuilletts distincts, épiblaste et endoderme primitif, est déjà décelable. Cette ségrégation en 2 feuilletts s'oppose peut-être à l'incorporation de CSE immatures étrangères. Rappelons que chez la souris, cette ségrégation

apparaît au jour 4,5, mais que la greffe de CSE est faite au jour 3,5 ; plus tard, elle est inefficace.

D'autre part, les auteurs démontrent, en suivant grâce à un traceur les CSE injectées dans les embryons 4-cellules, qu'elles se différencient très rapidement et certainement avant d'avoir pu s'intégrer sous une forme encore immature pluripotente dans les embryons 4-cellules.

Il faut cependant remarquer que les CSE de singes Rhésus ont tous les autres attributs de la pluripotente : formation de tératomes, production de cellules différenciées fonctionnelles de multiples tissus *in vitro* (comme nous l'avons décrit à propos des travaux de M. Pucéat et P. Ménasché [7]), signature moléculaire. Est-ce que des CSE dérivées non pas de la masse interne, mais de blastomères (embryons 4-8 cellules) d'embryons de singes pourraient, elles, contribuer *in vivo* à des chimères ? Cela vaut peut-être d'être testé. Pourrait-on aussi, par un artifice de culture, induire un état plus « naïf » dans ces CSE qui élargirait leur potentiel *in vivo*, comme cela a été décrit pour les ÉpiSC de la souris que l'on peut convertir en CSE naïves [8] ?

Comme dans beaucoup de domaines, la souris - modèle d'étude « extra-ordinaire » - ne reflète que très mal la réalité de l'embryologie et de la physiologie humaines ou des primates non humains. Important, à l'heure des discussions éthiques et de la thérapie cellulaire. ♦

ES cells and postnatal chimeric Rhesus monkeys

CONFLITS D'INTÉRÊTS

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Coulombel L. Pluripotente : une définition à géométrie variable. *Med Sci (Paris)* 2009 ; 25 : 798-801.
2. Cohen-Tannoudji M, Guénet JL. Une nouvelle ère pour la génétique du rat. *Med Sci (Paris)* 2011 ; 27 : 387-90.
3. Coulombel L. Reprogrammation nucléaire d'une cellule différenciée : on efface tout et on recommence. *Med Sci (Paris)* 2007 ; 23 : 667-70.
4. Brons IG, Smithers LE, Trotter MW, et al. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* 2007 ; 448 : 191-5.
5. Tachibana M, Sparman M, Ramsey C, et al. Generation of chimeric Rhesus monkeys. *Cell* 2012 ; 148 : 1-11.
6. Häfner S, Coulombel L. Naissance de Mito and Tracker : prélude à la correction des mutations de l'ADN mitochondrial chez l'homme ? *Med Sci (Paris)* 2009 ; 25 : 802-3.
7. Coulombel L. Coup de cœur pour un progéniteur multipotent mésodermique dérivé de cellules souches embryonnaires humaines. *Med Sci (Paris)* 2010 ; 26 : 439-41.
8. Nichols J, Smith A. Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell* 2009 ; 4 : 487-92.

NOUVELLE

Pluripotente des cellules souches

Quand l'épissage alternatif s'en mêle

Mathieu Gabut

University of Toronto, Terrence Donnelly centre for cellular and biomolecular research, 160 College street, room 1030, Toronto M5S 3E1, Ontario, Canada.
mathieu.gabut@utoronto.ca

Le contrôle de la pluripotente des cellules souches

Les cellules souches embryonnaires (CSE) sont issues du blastocyste et sont capables de s'autorenouveler théoriquement indéfiniment sous forme indifférenciée. En outre, les CSE sont pluripotentes, ce qui signifie qu'elles peuvent se différencier en n'importe quel type

cellulaire composant les tissus embryonnaires et que, en interaction étroite avec le placenta, elles ont la capacité de former un organisme viable et fertile. Les CSE possèdent un programme d'expression génique unique favorisant à la fois leur autorenouvellement et le maintien de leur pluripotente. Ce programme est minutieusement contrôlé à différentes

étapes de l'expression des gènes et conserve le génome dans une configuration dynamique qui favorise une activation rapide des gènes impliqués dans la différenciation en réponse à des signaux développementaux. La régulation de ce programme intervient tout d'abord au niveau de la chromatine, par le biais de la méthylation de l'ADN, du remodelage



des nucléosomes et de modifications post-traductionnelles des histones. De nombreuses études ont également établi qu'un nombre limité de facteurs, dont Oct4/POU5F1 (*POU class 5 homeobox*), Sox2 (*SRY [sex determining region Y]-box 2*) et Nanog, constitue un réseau de régulateurs de la transcription qui joue un rôle clé dans le maintien des propriétés des cellules souches ou dans leur réacquisition dans le modèle des cellules pluripotentes induites ou iPSC (*induced pluripotent stem cells*) [1]. En effet, ces facteurs de transcription possèdent une double fonction dans les CSE indifférenciées : d'une part, ils stimulent leur propre expression par le biais de boucles autorégulatrices et celle de gènes nécessaires au maintien de la pluripotence et, d'autre part, ils répriment la transcription de gènes impliqués dans les programmes de différenciation cellulaire [2]. Ce réseau contrôle également l'expression de nombreux microARN qui contribuent au maintien des CSE, et répriment, avec l'aide de protéines du complexe Polycomb,

l'expression de microARN normalement exprimés au cours de la différenciation [2]. Au cours des cinq dernières années, un mécanisme supplémentaire de régulation du destin des CSE a été mis en évidence, l'épissage alternatif, dont l'importance reste encore à définir.

L'épissage alternatif : un mécanisme clé de l'expression des gènes

L'épissage alternatif est une étape cruciale de la maturation des ARNm chez les eucaryotes. Elle permet l'inclusion différentielle de séquences exoniques dans les ARNm matures et favorise ainsi la synthèse de plusieurs isoformes d'ARNm à partir d'un gène unique. L'épissage alternatif est régulé au cours du développement et permet d'accroître la diversité du transcriptome et du protéome exprimés dans chaque type cellulaire [3]. Chez l'homme, des analyses de séquençage ARN à haut débit (*RNA-seq*) ont montré que l'épissage alternatif concerne plus de 95 % des gènes multi-exons, et que les gènes dont l'expression est régulée au niveau transcriptionnel sont essen-

tiellement différents des gènes régulés par cette voie [4, 5]. L'épissage alternatif constitue donc un mécanisme de régulation de l'expression des gènes à part entière, au même titre que la régulation de la transcription, par exemple. Les technologies des puces à ADN, et plus récemment du *RNA-seq*, ont permis l'identification de nombreuses isoformes d'ARNm dont l'épissage alternatif est régulé de façon différente entre les CSE et des populations de cellules différenciées qui dérivent de ces cellules souches. Cependant, à l'exception de quelques événements d'épissage alternatif qui affectent l'activité de facteurs de transcription importants pour le maintien de la pluripotence, tels que Oct4, Tcf3 (*transcription factor 3*), Sall4 (*Sal[Drosophila]-like 4*) et Nanog [6, 7], la fonction de la quasi-totalité de ces isoformes reste inconnue à ce jour.

L'épissage des ARNm du gène *FOXP1* : un interrupteur de la pluripotence

Afin de déterminer la contribution de l'épissage alternatif dans la régulation des CSE humaines, nous avons utilisé des puces à ADN qui permettent de détecter simultanément plus de 5 000 événements d'épissage. Cette approche a identifié plus de 240 exons dont l'épissage est différenciellement régulé entre les CSE pluripotentes et leurs dérivés au cours de leur différenciation en endoderme, mésoderme, et ectoderme [8].

Un événement d'épissage a retenu notre attention, car il implique un exon non annoté dans le gène *FOXP1* codant pour un facteur de transcription de la famille *Forkhead*. Nous avons démontré que cet exon 18b est spécifiquement inclus dans les CSE humaines (*FOXP1-ES*) et progressivement remplacé au cours de la différenciation cellulaire par l'exon 18 qui, lui, est détecté dans la quasi-totalité des tissus adultes (*Figure 1*). De

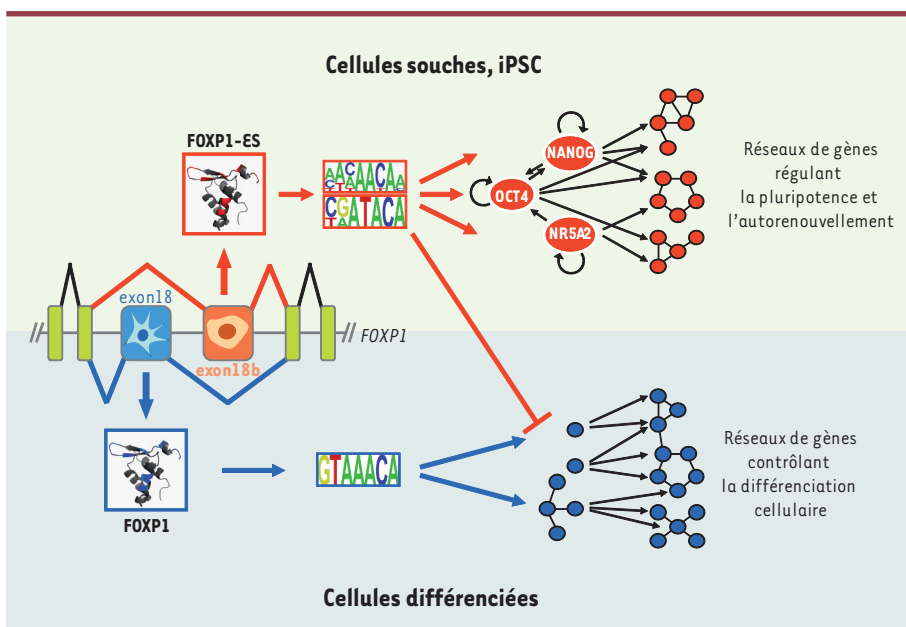


Figure 1. Modèle de la régulation de l'épissage et de la fonction des isoformes *FOXP1-ES* et *FOXP1* dans les cellules souches pluripotentes ou différenciées, respectivement. Les exons 16 à 20 du gène *FOXP1* sont représentés. La spécificité de liaison à l'ADN de *FOXP1* et *FOXP1-ES* est indiquée sous forme de séquences consensus dont la taille des lettres représente la fréquence observée des différents nucléotides à chaque position dans les motifs ADN.

façon remarquable, le profil d'épissage alternatif de l'exon 18b est conservé au cours de l'évolution, en particulier dans les CSE murines, mais également dans le gène ancestral *FoxP* chez les invertébrés [9], ce qui suggère qu'il joue un rôle important au cours du développement. En effet, les exons 18 et 18b codent pour une partie du domaine de liaison à l'ADN des isoformes FOXP1 et FOXP1-ES, respectivement, et modifient la spécificité d'interaction à l'ADN de ces deux isoformes. Une analyse, réalisée grâce à des puces ADN de type PBM (*protein binding microarray*) représentant toutes les combinaisons possibles de séquences de huit nucléotides, a confirmé que la protéine FOXP1 reconnaît un motif GTAAACA, alors que FOXP1-ES s'associe préférentiellement à des motifs CGATACA et des motifs riches en A/C (Figure 1), ce qui suggère que ces deux isoformes contrôlent des programmes génétiques distincts. L'utilisation de siARN (*small interfering*) dirigés spécifiquement contre les exons 18 et 18b, couplée à une analyse par *RNA-seq*, a révélé que chaque isoforme de FOXP1 régule des réseaux de gènes différents dans les CSE humaines. En particulier, FOXP1-ES réprime l'expression de nombreux gènes impliqués dans la différenciation cellulaire et stimule l'expression de OCT4, NANOG et NR5A2 (*nuclear receptor subfamily 5, group A, member 2*), trois facteurs de transcription clés pour les propriétés de pluripotence. Enfin, nous avons démontré que l'isoforme *Foxp1-ES*, mais pas *Foxp1*, est requise pour le maintien de la pluripotence et de l'autorenouvellement des CSE murines, ainsi que pour la reprogrammation de fibroblastes embryonnaires murins en cellules iPSC. L'ensemble de ces données démontre qu'un événement d'épissage alternatif dans le gène *FOXP1* se positionne en amont du réseau de facteurs de transcription qui contrôle les programmes génétiques spécifiques des CSE, et se comporte

comme un interrupteur qui régule le maintien des propriétés des cellules souches ou leur différenciation.

L'épissage alternatif : un régulateur clé du transcriptome et du devenir des cellules souches ?

Les études réalisées au cours des trois dernières années grâce au *RNA-seq* ont permis de mettre en évidence que les cellules pluripotentes, et en particulier les CSE, possèdent un transcriptome très diversifié, et expriment de nombreux ARN qui diffèrent des modèles de transcrits ou d'ADNc actuellement établis [10]. Ces résultats impliquent également que la diversité du protéome des CSE et la fonction de la vaste majorité de ces ARN restent encore à définir. En effet, les rares exemples d'événements d'épissage alternatif décrits pour des facteurs de transcription tels que Nanog, Oct4, Tcf3 et *Foxp1* démontrent clairement que des variations subtiles de domaines fonctionnels jouent un rôle déterminant pour reprogrammer la fonction de ces gènes, indépendamment de la régulation de leur transcription. Ces exemples soulignent l'importance d'étudier la diversité du transcriptome des CSE d'un point de vue non seulement descriptif, mais aussi fonctionnel, et suggèrent que les modèles actuellement établis de réseaux de gènes assurant le contrôle des capacités de pluripotence et d'autorenouvellement des CSE vont être profondément remaniés. Ces études suscitent également un intérêt important pour identifier les mécanismes qui définissent la diversité du protéome des CSE et contribuent à maintenir l'identité pluripotente des cellules souches. Enfin, elles soulignent l'importance de caractériser les facteurs qui régulent le transcriptome en réponse à des cascades de signalisation lors de la différenciation cellulaire. ♦

Alternative splicing: a new mechanism controlling stem cell pluripotency

REMERCIEMENTS

Cette étude a été réalisée avec l'appui des instituts de recherche en santé du Canada

(IRSC) et le soutien du Pr Benjamin Blencowe de l'Université de Toronto. Je tiens à remercier les Drs Johann Soret et Éric Lécuyer pour leurs commentaires sur le manuscrit.

CONFLIT D'INTÉRÊTS

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Yamanaka S, Blau HM. Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature* 2010 ; 465 : 704-12.
2. Young RA. Control of the embryonic stem cell state. *Cell* 2011 ; 144 : 940-54.
3. Nilsen TW, Graveley BR. Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature* 2010 ; 463 : 457-63.
4. Pan Q, Shai O, Lee LJ, et al. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat Genet* 2008 ; 40 : 1413-5.
5. Wang ET, Sandberg R, Luo S, et al. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature* 2008 ; 456 : 470-6.
6. Cheong CY, Lufkin T. Alternative splicing in self-renewal of embryonic stem cells. *Stem Cells Int* 2011 ; 2011 : 560261.
7. Das S, Jena S, Levasseur DN. Alternative splicing produces Nanog protein variants with different capacities for self-renewal and pluripotency in embryonic stem cells. *J Biol Chem* 2011 ; 286 : 42690-703.
8. Gabut M, Samavarchi-Tehrani P, Wang X, et al. An alternative splicing switch regulates embryonic stem cell pluripotency and reprogramming. *Cell* 2011 ; 147 : 132-46.
9. Santos ME, Athanasiadis A, Leitao AB, et al. Alternative splicing and gene duplication in the evolution of the FoxP gene subfamily. *Mol Biol Evol* 2011 ; 28 : 237-47.
10. Kolle G, Shepherd JL, Gardiner B, et al. Deep-transcriptome and ribosome sequencing redefines the molecular networks of pluripotency and the extracellular space in human embryonic stem cells. *Genome Res* 2011 ; 21 : 2014-25.



m/s
médecine/sciences

Abonnez-vous
à médecine/sciences

Bulletin d'abonnement
page 438 dans ce numéro de m/s