



Université Claude Bernard



DIPLÔME NATIONAL DE DOCTORAT

(Arrêté du 25 mai 2016)

Date de la soutenance : **22 octobre 2021**

Nom de famille et prénom de l'auteur : **Monsieur MASFARAUD Etienne**

Titre de la thèse : « *Rôle de la signalisation Nétrine dans la régulation de la pluripotence du primate humain et non-humain.* »

Résumé



La pluripotence se définit comme la capacité d'une cellule à s'auto-renouveler et à se différencier dans les trois lignages primaires que sont le mésoderme, l'ectoderme et l'endoderme, eux-mêmes à l'origine de tous les types cellulaires d'un organisme adulte. Chez la souris, deux types de pluripotence ont été définis : la pluripotence naïve, trouvant son origine *in vivo* dans l'épiblaste pré-implantatoire et représentée *in vitro* par les cellules souches embryonnaires ou cellules ES, et la pluripotence amorcée, issue de l'épiblaste post-implantatoire et représentée par les cellules EpiSCs (Epiblast-derived Stem Cells). Ces deux types de pluripotence, bien que partageant les caractéristiques centrales précédemment citées, divergent sur les signaux moléculaires et les réseaux transcriptionnels qui les régissent. De plus, les cellules ES (naïves) sont capables de coloniser un embryon hôte au stade pré-implantatoire, donnant lieu à une chimère, capacité non possédée par leurs homologues amorcées. Chez l'homme, et plus généralement chez les primates, la pluripotence naïve, à l'inverse de l'amorcée, n'a pas pu être capturée *in vitro* de sorte à présenter toutes les caractéristiques moléculaires et fonctionnelles démontrées chez la souris. En dépit de protocoles mis au point pour reprogrammer les cellules humaines amorcées vers un état « pseudo-naïf », cette problématique reste non résolue, et suggère que la pluripotence chez le primate est régie par d'autres voies moléculaires encore non identifiées. Chez la souris, il a été récemment découvert qu'une molécule de la superfamille des laminines, Nétrine-1, est un régulateur de la pluripotence. Lorsque Netrin-1 est surexprimée dans des cellules souches embryonnaires (ES) de souris, elle occasionne un renforcement des caractéristiques naïves via la fixation de ses récepteurs Neo1 et Unc5b, et peut ponctuellement se substituer aux inhibiteurs pharmacologiques habituellement utilisés pour la culture des cellules ES.

Dans le présent projet, nous nous sommes intéressés à Nétrine-1, et plus généralement à la famille des Nétrines et leurs récepteurs, afin de déterminer si ces molécules sont des régulateurs de la pluripotence chez le primate. Nous avons découvert que, au contraire du macaque et de la souris, NTN1 est absente de l'épiblaste pré-implantatoire humain et n'est pas associée à la pluripotence. En surexprimant *NTN1* via un système inductible à la doxycycline dans des PSCs de macaque amorcées, nous avons montré un renforcement de l'expression des gènes associés à la pluripotence. En opérant la même expérience avec des cellules humaines, nous avons au contraire démontré une perte des caractéristiques pluripotentes, dans l'état amorcé comme dans l'état pseudo-naïf.

Par une expérience de séquençage ARN en cellule unique (Single-cell RNA seq), nous avons démontré que la surexpression de *NTN1* dans des PSCs humaines pseudo-naïves n'occasionne pas seulement une perte de la pluripotence, mais un engagement dans des lignages mésodermiques tardifs, le muscle strié et les ostéoblastes, partiellement grâce à l'activation du récepteur NEO1. Nous avons par ailleurs découvert que l'expression de l'antagoniste de NETRIN-1, DRAXIN, permet une conservation des caractéristiques pseudo-naïves, en accord avec son pattern d'expression dans l'embryon pré-implantatoire humain, où il est trouvé enrichi dans l'épiblaste naïf et corrélé à l'expression de gènes de pluripotence.

Bien que nous n'ayons démontré aucun effet de l'expression du second récepteur aux Nétrines, UNC5B, dans nos PSCs humaines, nous avons découvert que ce dernier est spécifiquement enrichi, au même titre que *DRAXIN*, dans l'épiblaste naïf humain, en dépit de l'absence de son ligand putatif. Collectivement, nos travaux démontrent que NTN1 n'est pas un régulateur de la pluripotence chez l'homme, *in vivo* comme *in vitro*, mais induit au contraire la différenciation. L'antagoniste DRAXIN et le récepteur UNC5B, en revanche, constituent de nouveaux candidats potentiels dans la régulation de la pluripotence chez le primate et offrent des perspectives de recherche prometteuses.

Stem Cell and Brain Research Institute (SBRI), Inserm 1208; 18 Avenue du Doyen Jean Lépine, Bron.

Mots-clés : Pluripotence, Cellules souches, Primates, Humain, Embryologie, Embryogénèse