

L'Académie Roumaine
L'Institut de Biologie et Pathologie Cellulaire "Nicolae Simionescu"

THESE DE DOCTORAT
Les mécanismes épigénétiques impliqués dans la
différenciation des cellules souches

Directeur de doctorat
Acad. Maya Simionescu

Doctorant
Florin Iordache

Bucarest
2013

Contenu

INTRODUCTION

PARTIE I. ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES

CHAPITRE I.1 Cellules progénitrices endothéliales	6
I.1.1 Définition et les caractéristiques des cellules souches	6
I.1.2 Classification et types de cellules souches	8
I.1.3 Cellules progénitrices endothéliales présentes dans le sang de cordon ombilical.....	18
I.1.4 Applications cliniques des cellules progénitrices endothéliales en pathologie cardiovasculaire.....	22
CHAPITRE I.2 Mécanismes épigénétiques et leur rôle dans la différenciation cellulaire	
I.2.1 Définition et caractéristiques des modifications épigénétiques	31
I.2.2 Classification et types de modifications épigénétiques	32
I.2.2.1 Méthylation ADN.....	32
I.2.2.2 Changements dans histone	34
a. Méthylation	
b. Acétylation	
c. Phosphorylation	
d. Sumoilation	
e. Ubiquitination	
f. Proline isomérisation	
g. ADP-ribosylation	
h. Deimination	
I.2.2.3 microARN.....	47

Chapitre I.3 Mécanismes d'acétylation des histones et de leur rôle dans la différenciation cellulaire.....	57
I.3.1 Définition et caractéristiques de l'acétylation	57
I.3.2 Classification des enzymes impliquées dans l'acétylation:	59
I.3.2.1 histone acétyltransférase (HAT)	60
I.3.2.2 histone déacétylase (HDAC)	65
I.3.3 Les mécanismes d'action de l'acétylation des protéines histones et nonhistonice	72
I.3.4 Le rôle de l'acétylation dans la différenciation des cellules souches	78
PARTIE II CONTRIBUTIONS ORIGINALES	84
II.1 But et Objectif.....	84
II.2 Matériels et méthodes.....	86
II.3 Résultats et discussion.....	106
II.3.1 L'isolement et la caractérisation de cellules progénitrices endothéliales de le sang de cordon ombilical	106
II.3.2 Enquête de niveaux de l'acétylation des histones dans les cellules progénitrices...119	
II.3.3 Effet de l'acétylation des histones sur la différenciation de cellules progénitrices.125	
II.3.4 Analyse d'acétylation de facteurs de transcription impliqués dans la morphogenèse carviovasculaire.....	129
II.3.5 Influence de l'acétylation des histones sur le processus de néovascularisation « in vitro ».....	131
II.4 Conclusions.....	145
Bibliographie.....	148
Diffusion des résultats obtenus dans la thèse	172
Financement de la recherche.....	178

Mots-clés

Acétylation

Histone

Chromatine

Epigénétique

Cellules Souches

Cellules progénitrices endothéliales

Cellules Souches Fœtales

Différenciation

Néovascularisation

Maladies cardiovasculaire

Résumé

Importance de l'étude

La compréhension des mécanismes qui conduisent à la différenciation de cellules souches est l'objet principal de nombreuses études. L'accessibilité de l'ADN à des facteurs de transcription dépend de la structure de la chromatine et de le degré de compactage. Analyses récentes des modifications épigénétiques dans les cellules souches humaines et murines ont fourni de nouvelles données sur les propriétés des cellules souches pluripotentes et de leur capacité de différenciation. Ces mécanismes conduisent à une hiérarchie de la transcription qui est induite par des facteurs de transcription et sont conçus pour contrôler l'expression du gène sans altérer l'ADN. La capacité des cellules souches multipotentes diminue avec le temps en raison de la répression de certains gènes qui ont une "signature" épigénétique. Les gènes actifs dans les cellules souches sont rendues silencieux progressivement avec le passage de leurs ancêtres, et un autre sous-ensemble de gènes spécifiques de tissus sont activés. Cette progression est obtenue par une expression sélective de facteurs de transcription qui reconnaissent et interagissent avec diverses modifications épigénétiques de la chromatine. A la suite de ces événements, la chromatine devient accessible pour la transcription dans certaines régions, ce qui permet la différenciation spatiale et temporelle nécessaire pour les cellules souches de commande. Par exemple, la protéine HP1 (protéine de l'hétérochromatine1) change sa distribution d'une localisation dispersée dans des cellules souches embryonnaires à l'une plus concentrée dans loci distincts lors de la différenciation cellulaire. L'acétylation des histones a été considérée comme un phénomène en corrélation avec une conformation de la chromatine ouverte qui a permis l'expression de différents gènes impliqués dans la différenciation. Actuellement il est observé que dans l'état acétylé, des nombreux gènes sont réprimés et donc la différenciation à une lignée cellulaire spécifique est bloquée, en les maintiennent dans l'état pluripotent. Manipulation de l'activité des histone déacétylase pourrait être un outil utile pour générer des populations de cellules spécifiques dans le but de les utiliser dans la transplantation.

Découvrir les modèles d'acétylation ("*acetylation signature*") impliqués dans la différenciation des cellules souches de différents types de cellules, ouvrant de nouvelles opportunités à l'interface entre la chimie et la biologie des cellules souches, et peuvent fournir des informations précieuses pour améliorer les applications des cellules souches dans l'ingénierie tissulaire et la médecine régénérative.

Dans ce contexte, l' **objectif de cette thèse** est d'étudier le rôle de l'acétylation des histones dans la différenciation des cellules progénitrices endothéliales par l'analyse de l'expression de marqueurs génétiques différents et des facteurs de transcription qui régulent l'activité de ces gènes. En outre, les études portant sur l'effet de l'acétylation sur le processus de cellules progénitrices endothéliales dans la néovascularisation *in vitro*.

La thèse est divisée en deux grandes parties : Partie I - L'état actuel des connaissances et de la Partie II - Contributions originales.

La première partie présente l'état actuel des connaissances et est organisé en trois sections.

Sous-chapitre I présente des notions sur les caractéristiques et les propriétés des cellules souches. Dans ce chapitre est présenté le modèle cellulaire utilisé, représenté par les cellules progénitrices endothéliales et leurs applications cliniques potentielles.

Sous-chapitre II fait un aperçu des principales modifications épigénétiques. Il décrit les mécanismes d'action de ces changements et les enzymes impliquées dans leur mise en œuvre. Également dans cette section est décrit le rôle des modifications épigénétiques dans la différenciation des cellules souches à diverses lignées cellulaires.

Sous-chapitre III décrit les mécanismes de l'acétylation des histones et leur rôle dans la différenciation des cellules souches. Ce chapitre présente les principales catégories d'histone acétyltransférase et les histones désacétylases, les mécanismes d'action de l'acétylation de l'histone et l'influence de l'acétylation sur la différenciation de cellules progénitrices endothéliales.

Dans la deuxième partie - « **Contributions originales** » sont présentés les résultats d'expériences visant à étudier le rôle de l'acétylation des histones dans la différenciation des cellules progénitrices endothéliales et la capacité de la néovascularisation *in vitro*.

Chapitre II.2 - " Matériels et Méthodes " décrit les principaux matériaux et techniques utilisés dans les expériences, y compris de nombreuses techniques et de la biologie cellulaire et moléculaire: PCR en temps réel, Western blot, cytométrie en flux, la microscopie électronique à

transmission et à balayage, immunocytochimie et immunohistochimie, méthodes colorimétrique et fluorimétriques.

Chapitre II.3 - " Résultats et discussion " présente les principaux résultats originaux obtenus dans les études.

Résultats et discussion

La compréhension des mécanismes qui conduisent à la différenciation de cellules souches est l'objet principal de nombreuses études. Analyses récentes des modifications épigénétiques dans les cellules souches humaines et murines ont fourni de nouvelles données sur les propriétés des cellules souches pluripotentes et de leur capacité de différenciation. Ces mécanismes conduisent à une hiérarchie de la transcription qui est induite par des facteurs de transcription qui sont destinés à contrôler l'expression de gènes sans modifier la structure de l'ADN. L'acétylation des histones est considérée comme un phénomène en corrélation avec une conformation de la chromatine ouverte, permettant l'expression de différents gènes impliqués dans la différenciation. Actuellement c'est observé que dans l'état acétylé, de nombreux gènes sont réprimés et donc la différenciation à une lignée cellulaire spécifique est bloqué, avec le maintien de l'état pluripotent.

Dans cet étude, nous avons montré que le sang de cordon ombilical contient une riche population de cellules progénitrices endothéliales avec un profil de l'immunophénotype caractéristique: CD31, CD34, CD133, CD144, CD146, VEGFR2. L'analyse moléculaire des cellules obtenues à partir de sang de cordon ombilical a montré que dans ces cellules sont exprimés a la fois les gènes impliqués dans la morphogenèse cardiovasculaire, des gènes pour des facteurs de transcription GATA2, GATA3, GATA4, et les gènes caractéristiques des cellules endothéliales: CD31, VE -cadhérine, VEGFR1, VEGFR2, vWF, CXCR4, Tie-2. Nous avons également montré que les cellules progénitrices endothéliales ont une grande capacité de prolifération et de migration en comparaison avec d'autres cellules souches fœtales. Ces cellules peuvent prendre LDL acétylé, et la lectine *Ulex europaeus*, réseau vasculaire peut être formé, qui montrent leur potentiel dans l'angiogenèse et dans la réparation vasculaire. Cela a été confirmé en utilisant des sections ventriculaires embryonnaires murines viable ou soumis à une ischémie, sur lesquelles on a montré que les cellules progénitrices endothéliales ont la capacité d'intégrer et de

former des réseaux vasculaires. Nos résultats indiquent que les cellules progénitrices endothéliales formant les structures vasculaires seulement sections viables ventriculaires embryonnaires murins, tandis que le ischemique seulement intégrer ces cellules, ce qui démontre une communication directe avec l'autre.

Les résultats ont montré que l'acétylation des histones peut inhiber la différenciation des cellules progénitrices endothéliales. Les inhibiteurs de désacétylation (VPA, TSA, BuA) gardent la chromatine acétylée dans un état correspondant à un décondensent de forme.

Le niveau des désacétylases des histones a été diminué de manière significative en présence de ces inhibiteurs et le niveau de l'histone H3 acétylée a été augmenté et ces changements ont été en corrélation avec l'expression de marqueurs de différenciation impliqués dans des cellules progénitrices endothéliales. Les données de la biologie moléculaire et de l'immunophénotypage des inhibiteurs de HDAC ont montré que l'abaissement de l'expression du vWF, VEGFR2, eNOS, CD117, CD133, CD144, CXCR4 et Tie-2, alors que l'expression de CD34 et de CD45 reste inchangée montrant que les désacétylases des histones sont impliquées dans la différenciation des cellules endothéliale. Expression VE-cadhérine a été inhibée de manière significative à la fois au niveau de l'ARNm et des protéines. Le mécanisme sous-jacent de l'expression de la VE-cadhérine changement peut s'expliquer par ses facteurs de transcription de type incapacité de HoxC6 pour interagir avec les histones acétylées dans le but d'activer le promoteur de la VE-cadhérine. L'expression des gènes de CXCR4, Tie-2 et VEGFR2 significativement diminué après le traitement avec TSA, le mécanisme mis en jeu est contrôlé par des facteurs de transcription Hox dont l'expression est modulée en présence de ces inhibiteurs. Nos résultats ont montré que, dans l'état acétylé expression de l'HoxD9 dans les cellules progénitrices endothéliales est augmentée à la fois au niveau dugène et de la protéine.

Le processus de néovascularisation est un processus complexe impliquant une série d'étapes interconnectées conduisant à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins quand les lésions vasculaires se produisent dans les organes adultes. A la différence de l'angiogenèse, qui est la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de certains néovascularisation préexistant, celui ci a lieu par l'intermédiaire des cellules progénitrices endothéliales. Ils sont mobilisées à migrer, proliférer et se différencier au niveau du site cible, sous l'action de cytokines et le micro-environnement. Nos résultats ont montré que l'acétylation inhibe la néovascularisation *in vitro*, agissant dans les processus de prolifération, l'adhésion, la migration et la différenciation

des cellules progénitrices endothéliales. Des cellules progénitrices endothéliales ont montré une diminution significative du niveau d'activité de la télomérase en comparaison avec le témoin, ce qui indique une diminution de la prolifération cellulaire. La motilité cellulaire évaluée en utilisant le " *wound healing-assay* " et par la mesure de l'impédance de la cellule, a montré que les inhibiteurs de HDAC diminuent la motilité cellulaire après 24 heures suivant la stimulation.

En revanche, la chimiotaxie des cellules progénitrices endothéliales ont augmenté après le traitement par les inhibiteurs de HDAC, ce qui peut s'expliquer par le maintien du phénotype de ces cellules progénitrices circulantes. En présence de 3 mM VPA on a montré une stimulation significative de la chimiotaxie des cellules progénitrices endothéliales par l'angiopoïétine, VEGF et SDF. Après la prolifération, la mobilisation, la migration des cellules endothéliales et l'adhésion au site cible, la dernière étape consiste à organiser leur réseau vasculaire. Nous avons poursuivi ce stage en termes d'acétylation. En poussant sur Matrigel en présence d'inhibiteurs de HDAC de cellules progénitrices endothéliales on a montré qu'ils ne peuvent pas former des réseaux vasculaires. Pour confirmer ces résultats, nous avons utilisé une autre matrice à base de collagène. Les résultats indiquent que les cellules progénitrices endothéliales isolées à partir de sang de cordon ombilical ont été capables de survivre et de se conformer à la matrice de collagène. De plus, ces cellules émettent des prolongements interagissent les uns avec les autres et avec la matrice, en formant la structure du réseau. En état acétylé, les cellules progénitrices endothéliales perdent cette capacité, ce qui démontre que l'acétylation inhibe la néovascularisation des cellules endothéliales *in vitro*.

Manipulation de l'activité de l'histone déacétylase pourrait être un outil utile pour générer des populations spécifiques de cellules pour la transplantation. Découvrir les modèles d'acétylation ("*acetylation signature*") impliqués dans la différenciation des cellules souches de différents types ouvre de nouvelles opportunités à l'interface entre la chimie et la biologie des cellules souches, et peuvent fournir des informations précieuses pour améliorer les applications des cellules souches dans l'ingénierie tissulaire et la médecine régénérative.

Nombre de figures dans la première partie -32

Nombre de figures dans le text original (Partie II) – 40

Notes bibliographiques – 251

Articles publiés dans des revues internationales ISI – 4

Articles publiés dans des revues nationales CNCSIS B + 1

Communication orale: 2

Les résumés des communications présentées lors de réunions scientifiques internationales - 11

Les résumés des communications présentées lors de la conférence nationale - 25

Participation à des projets de recherche - 2 national, 1 international.