

La transdifférenciation: signalisation et implications en physiopathologie

Séverine Létuvé

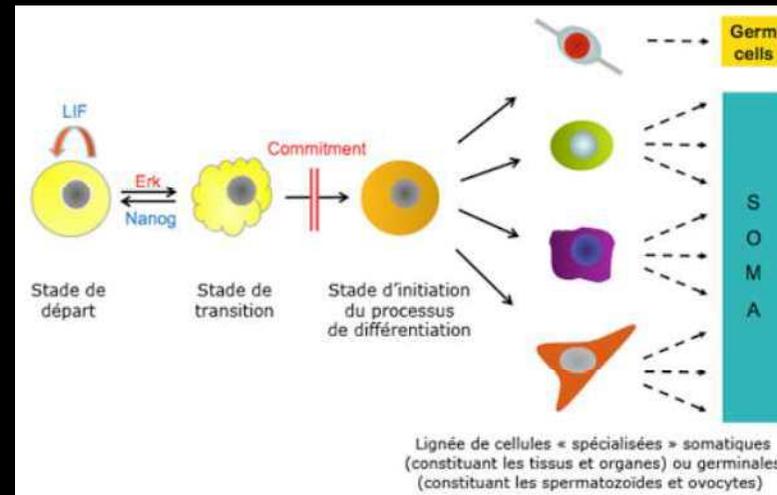
15 novembre 2012

M1 Santé/ UE7 'Biologie moléculaire'

La transdifférenciation, d'après les travaux sur les cellules souches

Dogme

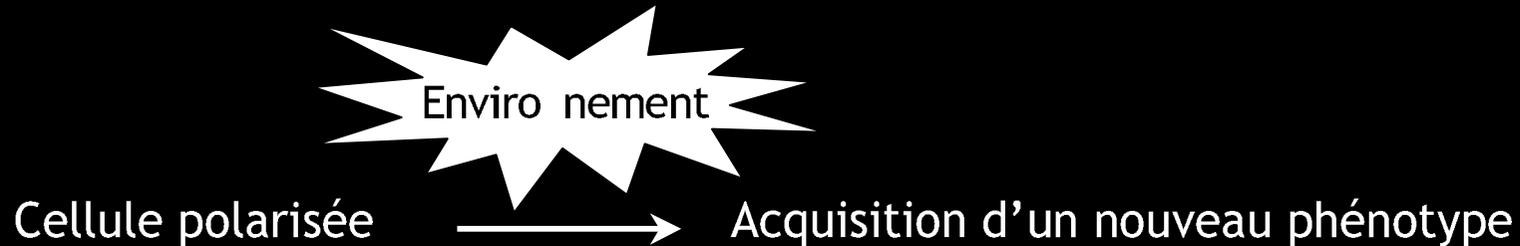
Les capacités de différenciation des cellules sont de plus en plus 'restreintes' à leur lignée au cours de leur développement



⇒ 'Transdifférenciation'

Une cellule complètement différenciée peut se convertir en une cellule d'une lignée distincte!

La transdifférenciation: définition



Transdifférenciation = conversion d'une cellule différenciée en un autre type cellulaire

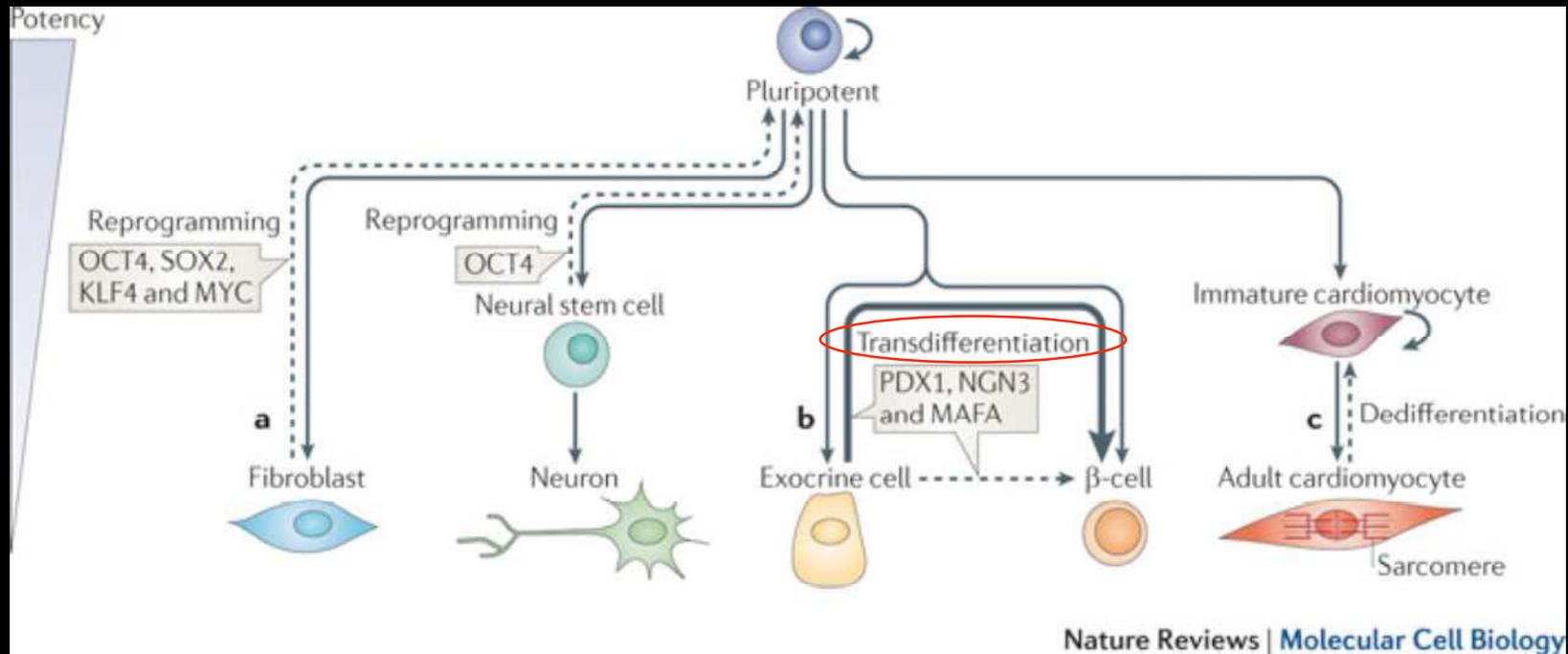
⇒ Plasticité cellulaire impliquant une modification

- de morphologie
- de fonction

⇒ Phénomène

- Direct
- impliquant une dédifférenciation
- nécessitant le passage par un intermédiaire (cellule souche)

Transdifferentiation vs. Dédifférenciation & Reprogrammation



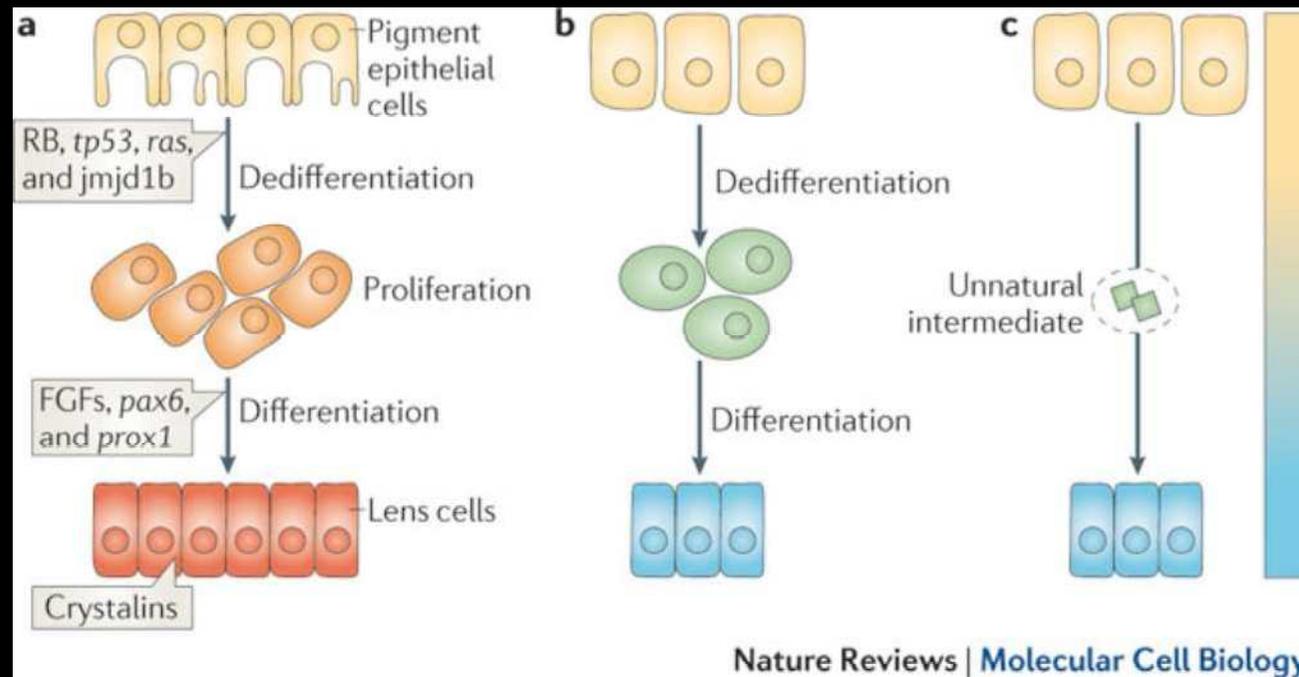
Dédifférenciation:

Réversion d'une cellule différenciée de façon terminale vers un état moins différencié (mais de la même lignée)

Reprogrammation:

Réversion d'une cellule différenciée en cellule pluripotente (capable de se différencier en n'importe quelle cellule de l'organisme)

Transdifférenciation naturelle et artificielle



a et b: Transdifférenciation naturelle

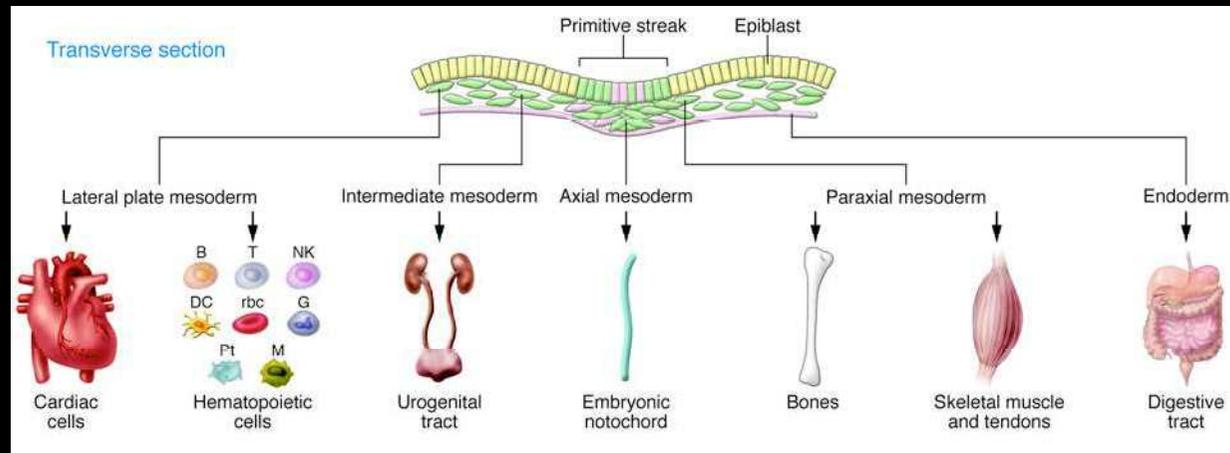
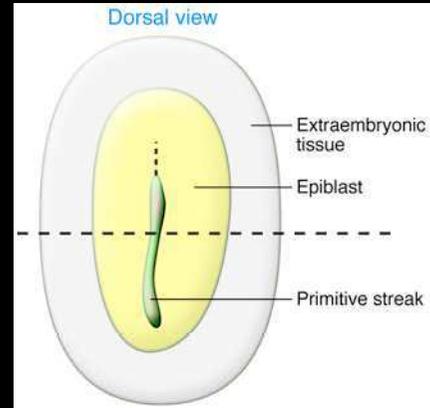
a: Dédifférenciation d'une cellule épithéliale pigmentaire (perte du pigment, modification de la morphologie cellulaire) préalable à l'engagement dans une nouvelle lignée et à sa différenciation en cellule de la cornée

b: Dédifférenciation vers un état de cellule-précurseur comme pré-requi à l'engagement dans une nouvelle lignée et à la différenciation cellulaire

c: Transdifférenciation artificielle

La transdifférenciation directe en un nouveau type cellulaire peut être observée expérimentalement, via la génération d'un intermédiaire 'forcé' dans lequel les 2 programmes génétiques sont actifs

6 Mise en évidence historique d'une transition de phénotype: apparition du sillon primitif au cours de l'embryogenèse



Exemples de transition de phénotype

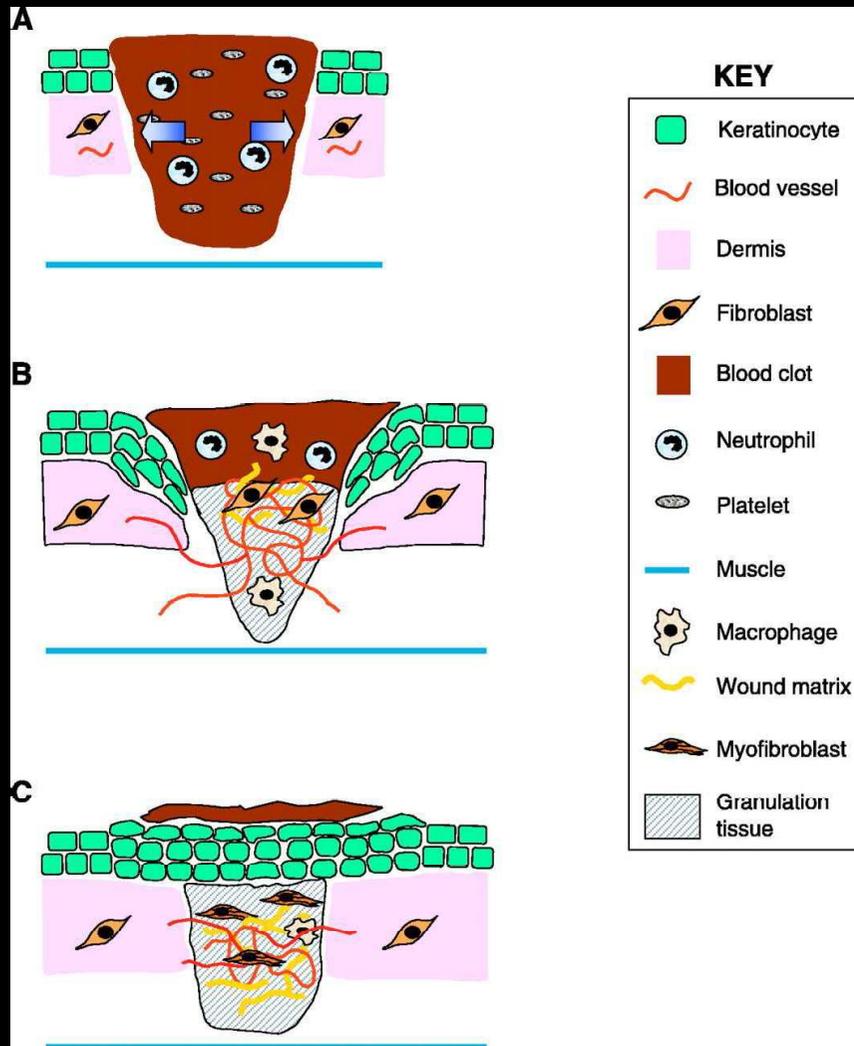
- Transition épithélio-mésenchymateuse (TEM= Epithelial- mesenchymal transition, EMT/ métaplasie):
Génération de cellules capables de migrer à partir de cellules épithéliales
 - différenciation en cellules mésenchymateuses, fibroblastes
 - acquisition de propriétés de cellules souches

- Mésenchymal- epithelial transition (MET): phénomène inverse de la TEM
Ex: formation des somites/embryogenèse

- Endothelial- mesenchymal transition (EndoMT): acquisition d'un phénotype mésenchymateux par les cellules endothéliales

- Conversion de fibroblastes en myofibroblastes au cours de la réparation tissulaire

Transdifférenciation et réparation tissulaire



D'après Werner et al, *Physiol Rev* 2003; 83: 35-87

Les différentes étapes de la réparation tissulaire (plaie cutanée):

A: 12-24 h après l'agression.

La zone mise à nu est comblée par un caillot sanguin, dans lequel sont présents des neutrophiles.

B: jours 3-7 après l'agression.

La majorité des neutrophiles ont été éliminés par apoptose et de nombreux macrophages les ont remplacés. Les cellules endothéliales migrent à travers le caillot, prolifèrent et forment de nouveaux vaisseaux.

Les fibroblastes colonisent le tissu lésé, dans lequel ils prolifèrent et déposent de la matrice extracellulaire.

Ce nouveau tissu est appelé 'tissu de granulation'. Les kératinocytes prolifèrent en bordure de la plaie et migrent vers le derme sous-jacent, en surface de la matrice provisoire.

C: 1 à 2 semaines après l'agression.

La zone lésée est complètement remplie de tissu de granulation. Les fibroblastes se sont convertis en myofibroblastes, conduisant à la contraction de la plaie et au dépôt de collagène. La zone lésée est complètement réépithélialisée.

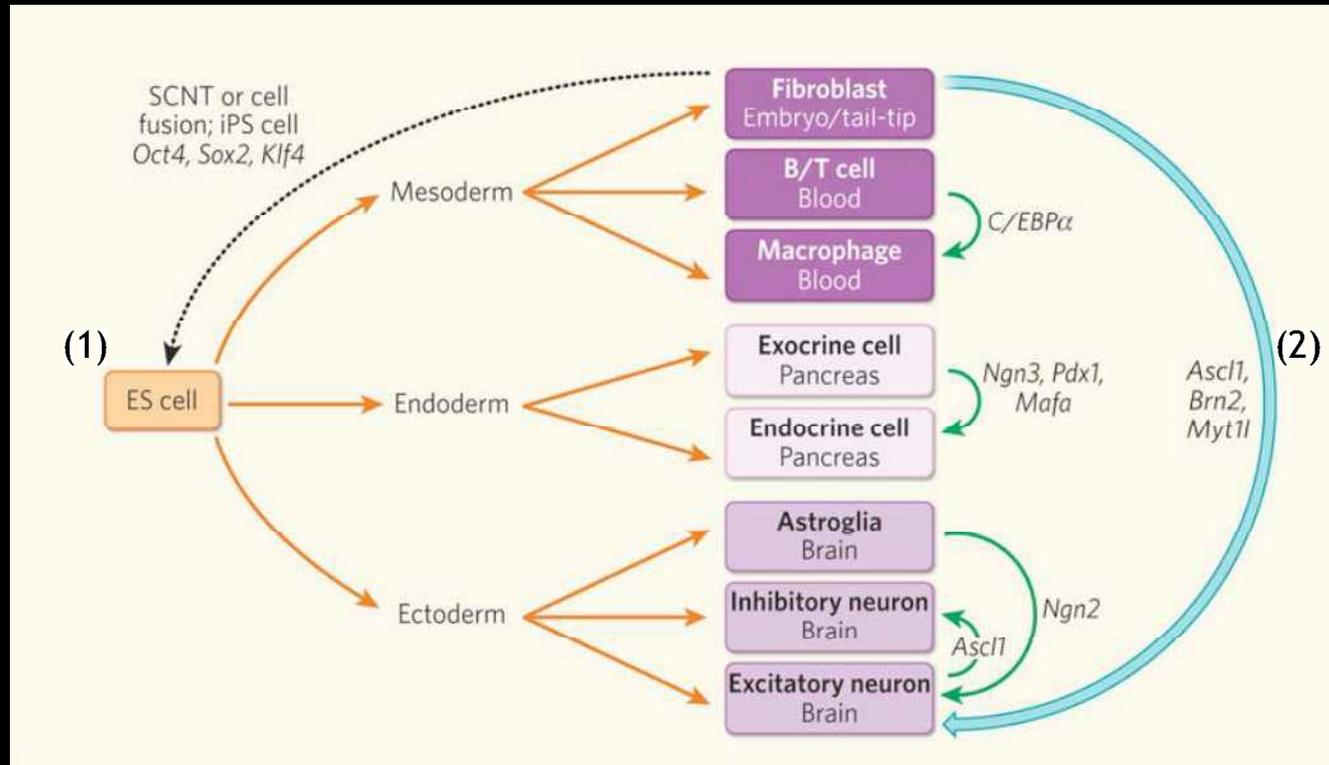
Exemples de transdifférenciation en pathologie humaine

- Cellules endothéliales et fibroblastes \Rightarrow cellules musculaires vasculaires et myofibroblastes (α SMA+):
hypertension pulmonaire artérielle
- Cellules étoilées du foie \Rightarrow myofibroblastes:
fibrose hépatique
- Cellules épithéliales tubulaires rénales \Rightarrow (myo)fibroblastes:
néphropathie chronique d'allogreffe
- Cellules épithéliales alvéolaires \Rightarrow (myo)fibroblastes:
rejet de greffe pulmonaire

Application de la transdifférenciation en thérapie cellulaire (1)

- Conversion des cellules α du pancréas (glucagon +) en cellules β (insuline +): régénération tissulaire en réponse à la disparition massive des cellules β (modèle de diabète type I)
- Plasticité des cellules souches mésenchymateuses: différenciation en cellules d'autres lignages (cellules β , neurones, cellules musculaires cardiaques...)
- Reprogrammation des fibroblastes en neurones matures

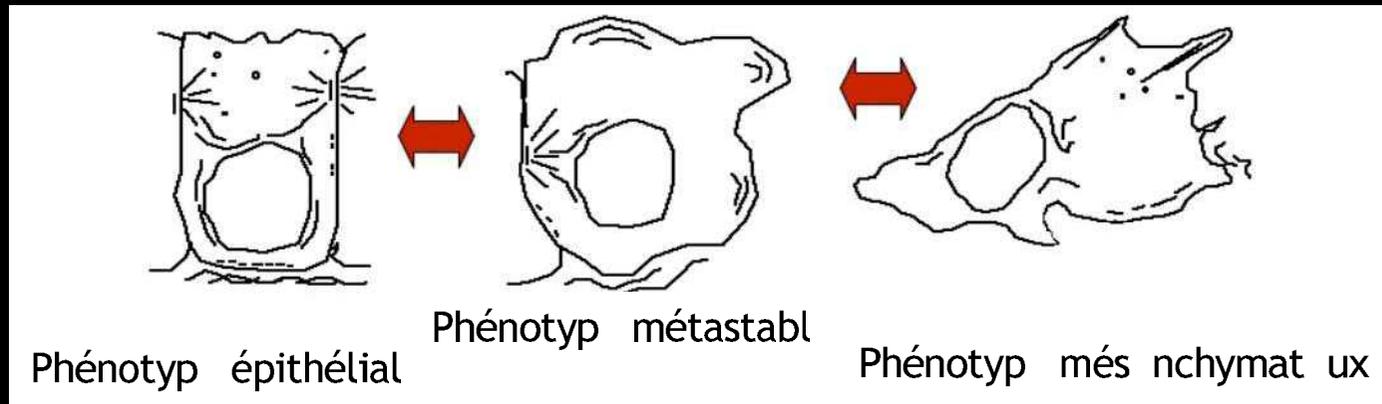
Application de la transdifférenciation en thérapie cellulaire (2)



①] Dédifférenciation (état *ES cell*) par *somatic-cell nuclear transfer* (SCNT), fusion cellulaire/ ou production d' *induced pluripotent stem* (iPS) par l'expression de l'expression de gènes, tels Oct4, suivie de redifférenciation en un type cellulaire adulte d'un autre lignage (mésoderme, endoderme, ectoderme)

②] Induction de facteurs de transcription spécifiques codés par les gènes *Ascl1*, *Brn2* et *Myt1l* (Vierbuchen et al. 2011) permettant l'induction directe d'une conversion de fibroblastes en neurones

12 Cas particulier de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)



Polarité apico-basale
Phénotype statique

Jonctions
adhérentes + serrées

E-cadhérine
Cytokératines

Absence de polarité
Extensions membranaires

Réorganisation du
cytosquelette

Cytokératines
Vimentine

β -caténine nucléaire

Polarité 'avant-arrière'
Phénotype migratoire

Absence de jonctions
intercellulaires

Production de matrice
extracellulaire
et médiateurs fibrogéniques

La TEM: Implication en physiologie humaine/ physiopathologie

- Initialement décrite dans le cadre de l'embryogenèse

TEM de type I

- Mise en évidence dans les phénomènes de réparation tissulaire et les pathologies à composante fibrotique (rejet de greffe, fibrose rénale, fibrose pulmonaire idiopathique...)

TEM de type II

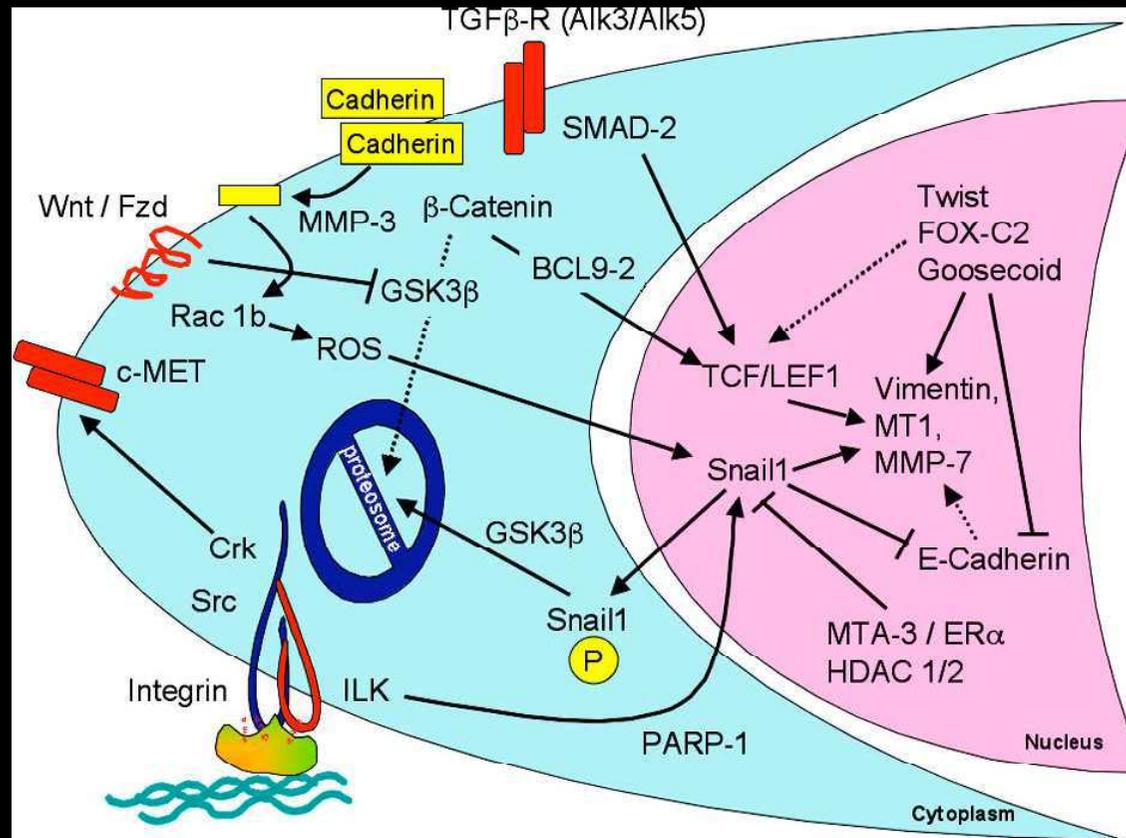
- Impliquée dans la dissémination des cellules épithéliales tumorales (métastases)

TEM de type III

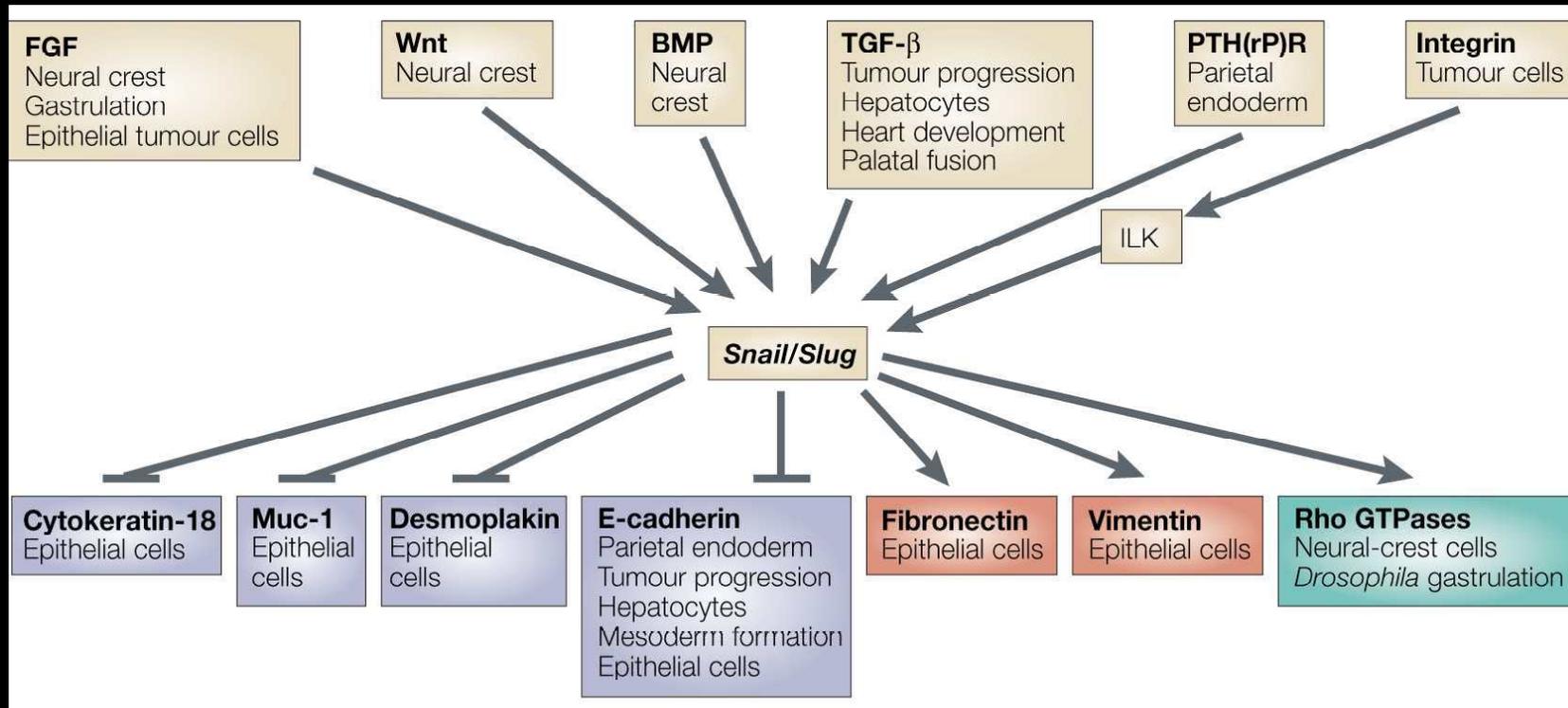
Stimuli inducteurs de TEM

- Facteurs solubles (facteurs embryogéniques, médiateurs inflammatoires: TGF- β , PDGF, EGF, FGF-2, IGF-BP5)
- Réarrangements matriciels (ex: matrice fibrillaire vs. Laminine)
- Agression épithéliale (ex: protéases, lésion)

Signalisation intracellulaire de la TEM



Rôle clé de Snail au cours de la TEM



Marqueurs épithéliaux

Marqueurs
mésenchymateux

Remaniements
du cytosquelette

Les marqueurs de TEM (1)

Les plus fréquemment utilisés, liés à une:

▫ Altération de l'expression de protéines membranaires:

- Adhérence cellule-cellule
switch E-cadhérine/ N-cadhérine

- Adhérence à la matrice

$\alpha 5$ intégrine, discoidin domain receptor tyrosine kinase 2 (= kinase spécifique au récepteur du collagène)

- Forme de la cellule

cytosquelette: switch cytokératine/ vimentine

▫ Modification de la fonction cellulaire:

- Migration

protéines du cytosquelette: FSP-1 \pm α -SMA, métallo-protéases
matricielles

- Synthèse de protéines matricielles

fibronectine, collagène I

- Résistance à l'anoikis

+ Néo-expression de facteurs de transcription et translocation nucléaire de la β -caténine

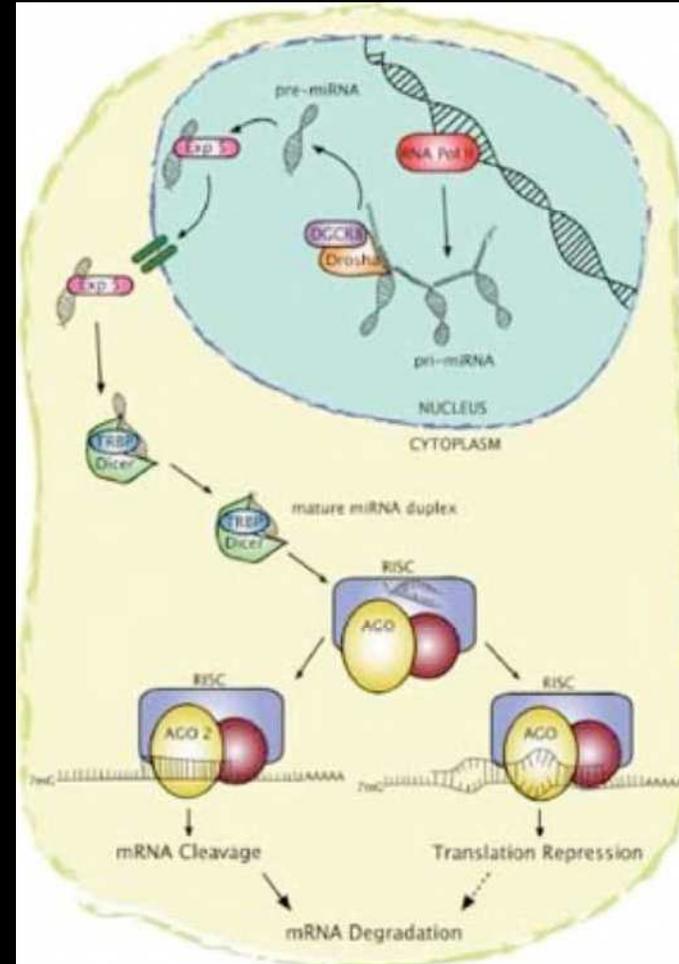
Les marqueurs de TEM (2)

Marqueurs induits		Marqueurs réprimés	
Nom	Type de TEM	Nom	Type de TEM
Cell-surface proteins			
N-cadherin	1, 2	E-cadherin	1, 2, 3
OB-cadherin	3	ZO-1	1, 2, 3
$\alpha 5\beta 1$ integrin	1, 3		
$\alpha V\beta 6$ integrin	1, 3		
Syndecan-1	1, 3		
Cytoskeletal markers			
FSP1	1, 2, 3	Cytokeratin	1, 2, 3
α -SMA	2, 3		
Vimentin	1, 2		
β -Catenin	1, 2, 3		
ECM proteins			
$\alpha 1(I)$ collagen	1, 3	$\alpha 1(IV)$ collagen	1, 2, 3
$\alpha 1(III)$ collagen	1, 3	Laminin 1	1, 2, 3
Fibronectin	1, 2		
Laminin 5	1, 2		
Transcription factors			
Snail1 (Snail)	1, 2, 3		
Snail2 (Slug)	1, 2, 3		
ZEB1	1, 2, 3		
CBF-A/KAP-1 complex	2, 3		
Twist	1, 2, 3		
LEF-1	1, 2, 3		
Ets-1	1, 2, 3		
FOXC2	1, 2		
Goosecoid	1, 2		
MicroRNAs			
miR10b	2	Mir-200 family	2
miR-21	2, 3		

ZEB1, zinc finger E-box binding homeobox 1.

Nouveaux marqueurs de phénotype: les miRNAs

- Petits ARN (19-22 nts) simple-brins non-codants
- Répriment l'expression de gènes de façon post-transcriptionnelle:
fixation par complémentarité totale ou partielle avec séquence 3'UTR des ARNm cibles



Modulation de l'expression des miRNAs

- Expression tissu-spécifique

Ex: miR-122/ foie; miR-1/ muscle squelettique;
miR-133/ muscle cardiaque; miR-375/ îlots de Langerhans

- Régulation temporelle

Ex: gastrulation/ développement (miR-124a)

- Modulation par l'environnement tissulaire chez l'adulte

Ex: miR-21/ inflammation allergique des voies aériennes (IL-13 Tg);
miR-155/ fibrogenèse pulmonaire

Exemples de fonctions des miRNAs

- Régulation de la différenciation

 - Ex: famille miR-200/ phénotype épithélial;
miR-145/ conversion fibroblastes-cellules musculaires lisses

- Régulation de la prolifération

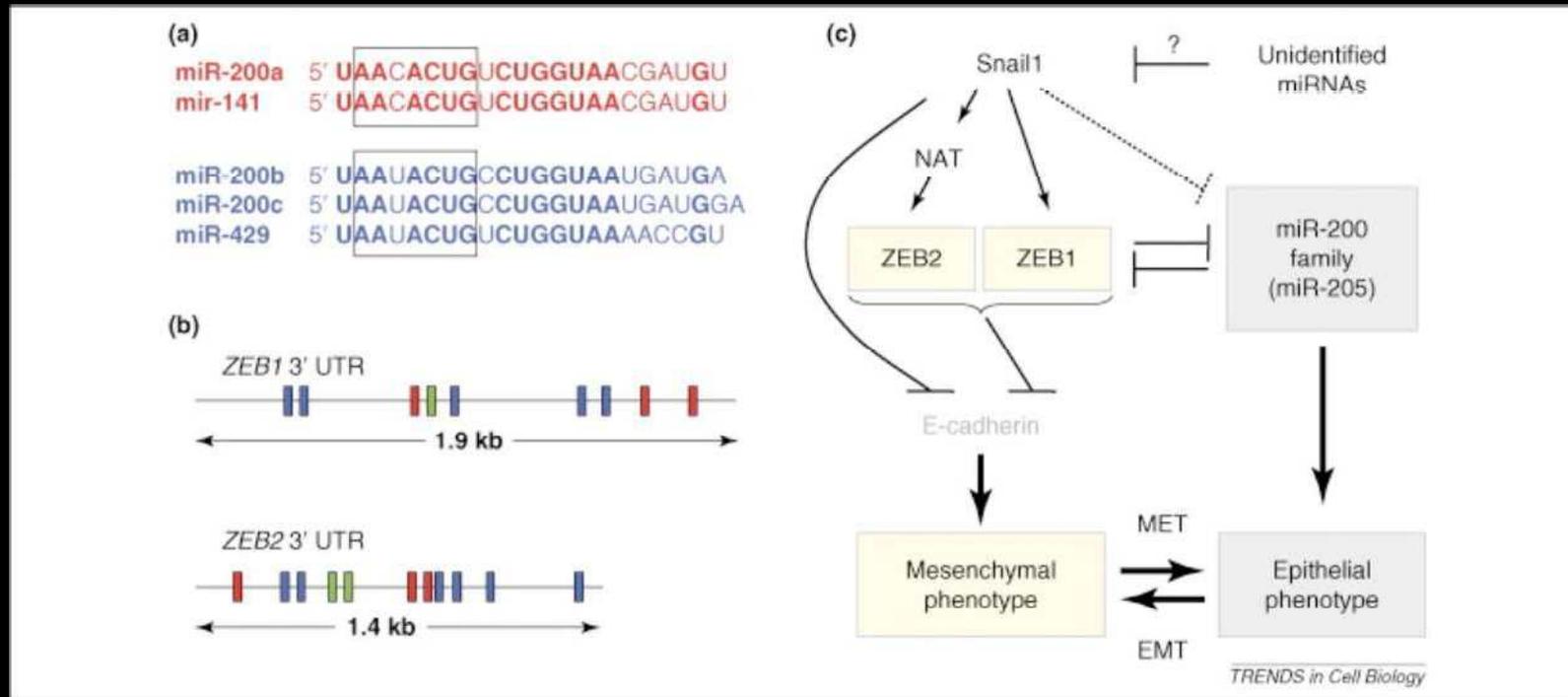
 - Ex: miR-203/ différenciation des kératinocytes: cellules basales
(proliférantes) vers supra-basales (différenciées)

La machinerie des miRNAs et la transdifférenciation

- Induction de conversion de phénotype sans retour à un état pluripotent (régulation épigénétique: inactivation par hyperméthylation de l'ADN)
- Expression réduite de Dicer associée avec un état moins différencié des cellules (↓ maturation des miRNAs)

Autres acteurs de la TEM: les ZEBs

Facteurs de transcription de la famille ZEB : répression de l'E-Cadhérine et des miRNAs

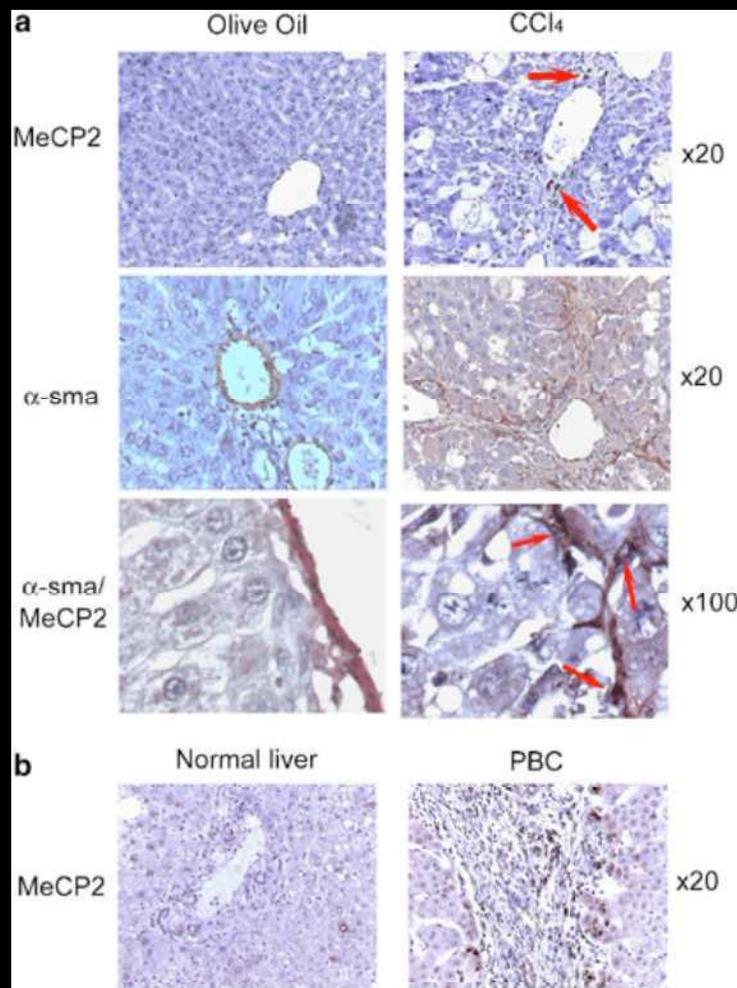


- a: Ségrégation des membres de la famille miR-200 en fonction de leur séquence 'seed'
 b: Sites de fixation des miR-200s au niveau des régions 3' UTR des ARNm des ZEBs
 c: Boucle de rétro-régulation négative impliquant les miR-200s et les ZEBs au cours de la TEM

NAT: Natural Antisense Transcript

Régulation épigénétique, transdifférenciation et fibrose

MeCP2 (recrutée par CpG méthylés) impliquée dans la conversion des fibroblastes en myofibroblastes dans la fibrogenèse hépatique



Expression de MeCP2 dans le foie contrôlé (huile) ou fibrotique (CCl₄) chez le rat:

- (a) MeCP2 n'est pas détecté dans le foie sain (panel de gauche) et est exprimé au niveau de lésions de fibrose (coloration brune désignée par des flèches, panel de droite).

- Expression de alpha-SMA (en brun) exclusivement par les cellules musculaires bordant les vaisseaux dans le foie sain (à gauche), et localisé au niveau des myofibroblastes en association avec les lésions de fibrose (droite).
grossissement X 100: double marquage MeCP2 (noir) and alpha-SMA (brun) (flèches rouges)

- (b) Immunomarquage de MeCP2 au niveau du foie humain sain ou atteint de cirrhose biliaire (PBC)

Mise en évidence de la transdifférenciation

But: mettre en évidence l'apparition d'un nouveau phénotype différencié

- bien caractériser le phénotype initial (type de cellule, mais également type de tissu! Exemple: cellule épithéliale bronchique vs. alvéolaire)
- définir si mise en évidence précoce? (facteurs de transcription, nouveau phénotype transitoire)
- ou détection plus tardive (maladie chronique: nouveau phénotype stable)

Outils de mise en évidence de la transdifférenciation

- Etude morphologique: microscopie classique
- Caractérisation et distribution cellulaire des marqueurs de phénotype + facteurs de transcription (Immunocytochimie ± fluorescence et microscopie confocale)
- Quantification de l'expression à l'échelle protéique (Western Blot) et transcriptionnelle (PCR, puces à ADN)

! Attention !

- choix du modèle cellulaire déterminant pour les marqueurs à étudier (origine tissulaire) et la 'facilité' de mise en évidence de la TEM (cellules immortalisées > cellules primaires)
- choix du mode de préparation des échantillons: ex. analyse des miRNAs/ ne pas éliminer les petits ARNs...
- et du mode de culture (effet de la matrice sur le phénotype des cellules/ culture en interface air-liquide pour différenciation épithéliale...)

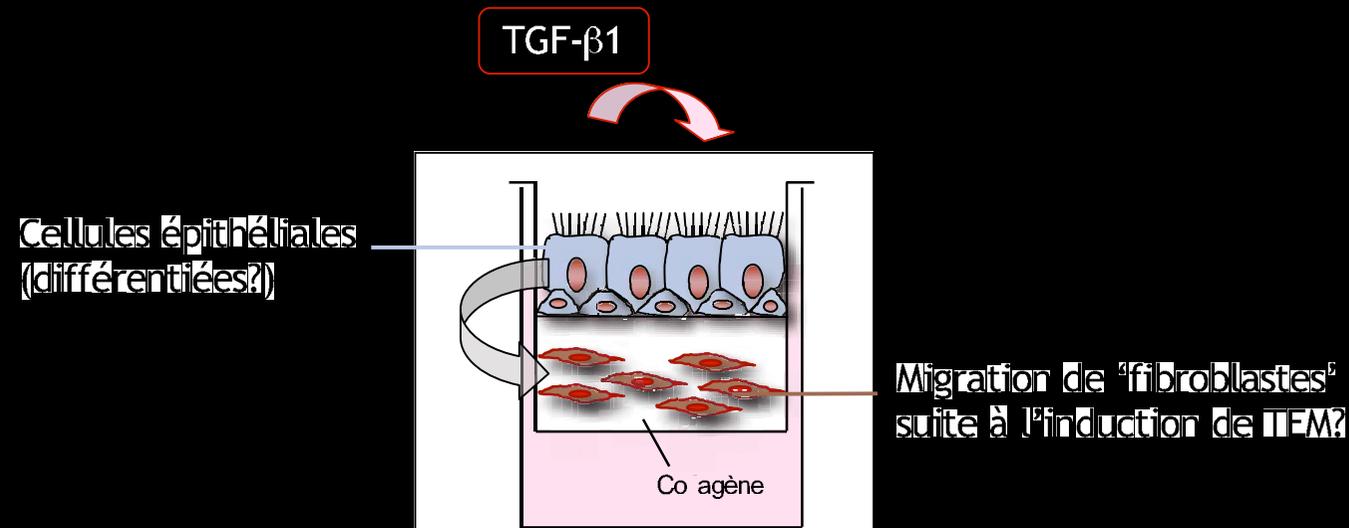
Exemple: Mise en évidence *in vitro* de la TEM

- Morphologie 'allongée' (spindle-shape) avec perte de polarité et réorganisation des fibres de stress
- Disparition des marqueurs épithéliaux (E-cadhérine, cytokératine, ZO-1)
- Néo-expression de marqueurs mésenchymateux (N-cadhérine, FSP-1)
- Induction de Snail/ Slug/ Twist
- Translocation de la β -caténine

- Augmentation de l'expression de collagène/ vimentine/ HSP-47
- Augmentation de la capacité migratoire
- Augmentation de l'expression de MMPs
- Résistance à l'apoptose/ anoïkis

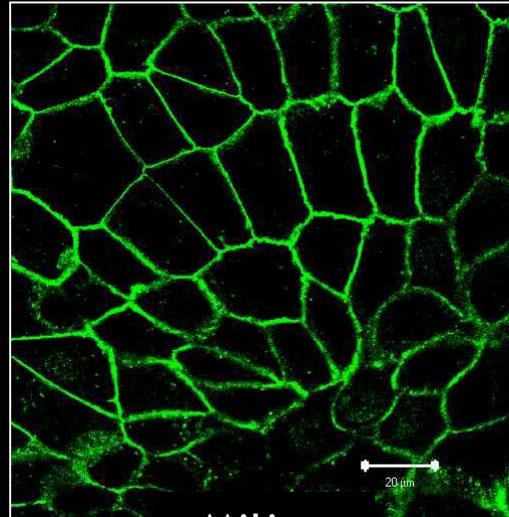
Mise en évidence *in vitro* de la TEM: chambre de Boyden

- Détection d'une capacité migratoire accrue

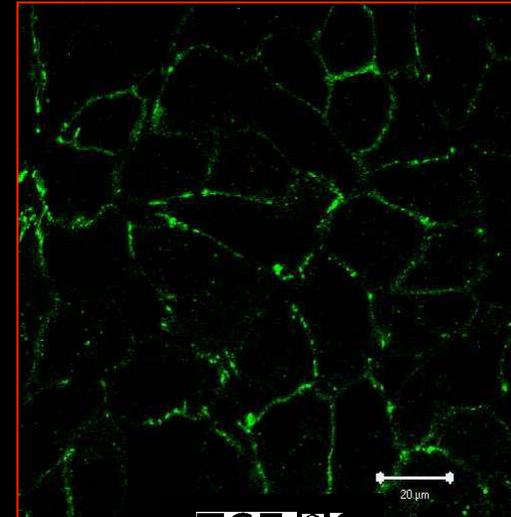


TEM de cellules bronchiques immortalisées (BEAS-2B)...

E-cadhérine

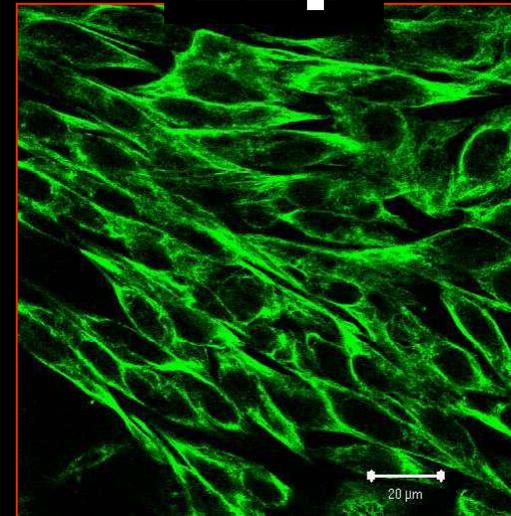
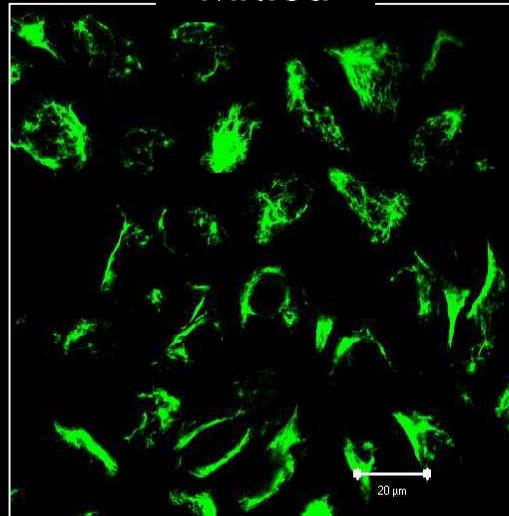


Milieu

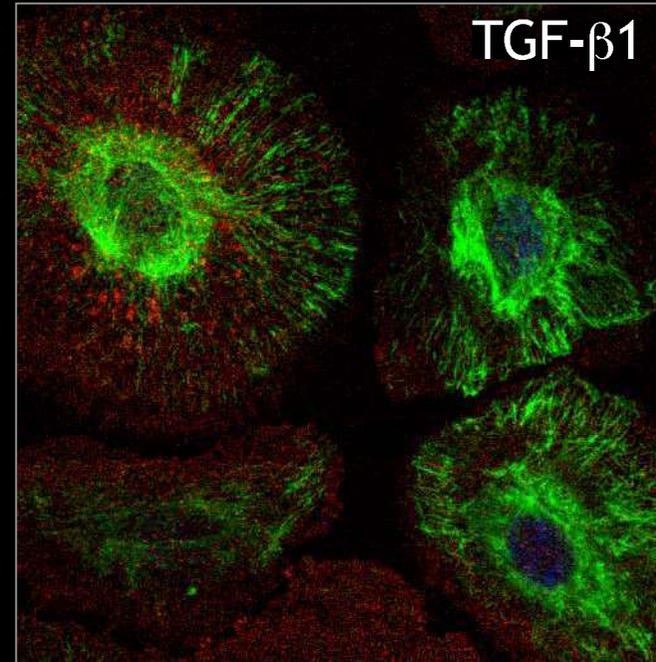
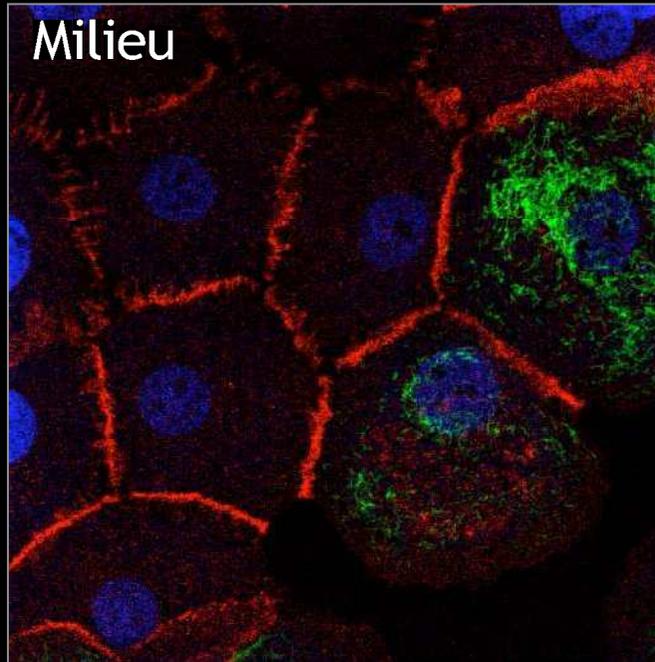


TGF-β1

Vimentine

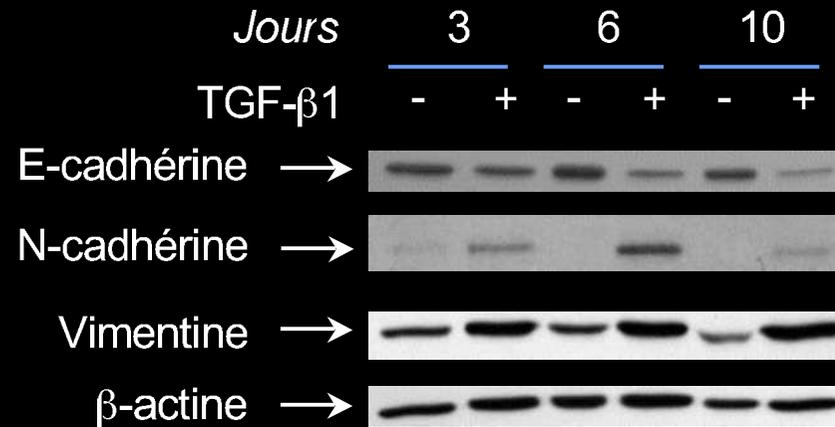


...vs. TEM de cellules bronchiques primaires (NHBE)



E-cadherine /
Vimentine

Expression des marqueurs de TEM au niveau des cellules épithéliales bronchiques humaines: Western-Blot



● Milieu ○ TGF- β 1

