



**HAL**  
open science

## Cinquante nuances de pluripotence

Marielle Afanassieff, Irène Aksoy, Nathalie Beaujean, Pierre-Yves Bourillot,  
Pierre Savatier

► **To cite this version:**

Marielle Afanassieff, Irène Aksoy, Nathalie Beaujean, Pierre-Yves Bourillot, Pierre Savatier. Cinquante nuances de pluripotence. Médecine/Sciences, 2018, 34 (11), pp.944-953. 10.1051/medsci/2018240 . hal-02322475

**HAL Id: hal-02322475**

**<https://hal.science/hal-02322475>**

Submitted on 26 May 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## MXdecine/Sciences [msc180159] - DXcision concernant v...

Sujet : Fwd: MXdecine/Sciences [msc180159] - DXcision concernant votre soumission  
 De : Savatier Pierre < pierre.savatier@inserm.fr >  
 Date : 17/07/2018 11:00  
 Pour : 'Marielle AFANASSIEFF' < Marielle.Afanassieff@inserm.fr >, BOURILLOT Pierre-Yves < pierre-yves.bourillot@inserm.fr >, AKSOY Irène < Irene.Aksoy@inserm.fr >, Nathalie Beaujean < nathalie.beaujean@inserm.fr >

----- Forwarded Message -----  
 Subject:MXdecine/Sciences [msc180159] - DXcision concernant votre soumission  
 Date:Tue, 17 Jul 2018 10:08:35 +0200 (CEST)  
 From:[thierry.jouault@inserm.fr](mailto:thierry.jouault@inserm.fr)  
 To:[pierre.savatier@inserm.fr](mailto:pierre.savatier@inserm.fr)

A l'attention de Mr Pierre SAVATIER

Cher Auteur,

La rédaction de Médecine/Sciences a le plaisir de vous annoncer que votre manuscrit msc180159 "Cinquante nuances de pluripotence" est accepté pour publication dans l'un des prochains numéros de Médecine/Sciences. Vous serez contacté lors du processus d'édition afin de vérifier les corrections et changements éventuels apportés au manuscrit.

En vous remerciant de votre précieuse collaboration à Médecine/Sciences.

Bien cordialement,

Thierry Jouault, PhD  
 CR Inserm  
 Rédacteur en chef adjoint  
[thierry.jouault@inserm.fr](mailto:thierry.jouault@inserm.fr)

Jean-Luc Teillaud  
 Rédacteur en chef

2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19

## Cinquante nuances de pluripotence

**Marielle Afanassieff, Irène Aksoy, Nathalie Beaujean, Pierre-Yves Bourillot,  
Pierre Savatier\***

<sup>1</sup>Univ Lyon, Université Lyon 1, Inserm, Stem Cell and Brain Research Institute U1208, INRA  
USC 1361, 69500 Bron, France

\*Corresponding author: Pierre Savatier, Institut Cellule Souche et Cerveau, INSERM U1208,  
18 Avenue du Doyen Lépine, F-69675 Bron Cedex, France; Tel: +33(0)472913442; Fax:  
+33(0)472913461; [pierre.savatier@inserm.fr](mailto:pierre.savatier@inserm.fr)

## 20 **Résumé**

Depuis la dérivation des premières lignées de cellules souches embryonnaires pluripotentes chez la souris au début des années 80, une pléthore de lignées a été obtenue chez diverses espèces de mammifères dont les rongeurs, les lagomorphes et les primates. Ces lignées se distinguent par leurs caractéristiques moléculaires et fonctionnelles et correspondent aux différents états de pluripotence observés dans l'embryon entre les stades "blastocyste" et "gastrula". Ces lignées se répartissent le long d'un gradient, ou continuum de pluripotence, dont les deux extrémités sont symbolisées par les états appelés "naïf" et "amorcé". Les cellules souches pluripotentes humaines sont dans un état de pluripotence amorcé (c.à.d. au bas du gradient), une position qui est sans doute la cause de leur instabilité naturelle. Les recherches récentes visent à obtenir des cellules souches pluripotentes humaines à l'état naïf (c.à.d. en haut du gradient). L'importance de ces recherches dans la perspective d'applications médicales est discutée.

21

22 Mots-clés : Cellules souches, pluripotence, embryon

23

24

25

26 **Abstract**

Since the derivation of the first pluripotent embryonic stem cell lines in mice in the early 1980s, a plethora of lines has been obtained from various mammalian species including rodents, lagomorphs and primates. These lines are distinguished by their molecular and functional characteristics and correspond to the different pluripotency states observed in the developing embryo between the "blastocyst" and "gastrula" stages. These cell lines are positioned along a gradient, or continuum of pluripotency, the ends of which are epitomized by the naïve and primed states, respectively. Conventional human pluripotent stem cells self-renew in the primed state of pluripotency (ie, at the bottom of the gradient), a position that is undoubtedly the cause of their natural instability. Recent studies aim to generate naive human pluripotent stem cells (at the top of the gradient). The importance of this research in the perspective of medical applications will be discussed.

27

28 **Keywords:** Stem cells, pluripotency, embryo

29

## 30 **Introduction**

31 La pluripotence est définie par la capacité d'une cellule à se différencier en tous les  
32 types cellulaires constituant un organisme adulte. Dans l'embryon au stade du blastocyste, les  
33 cellules pluripotentes constituent l'épiblaste qui est à l'origine de tous les organes du futur  
34 individu ainsi que des tissus hématopoïétiques du sac vitellin et des tissus vasculaires de  
35 l'interface materno-fœtale [1]. Les autres constituants du blastocyste, l'endoderme primitif et  
36 le trophoblaste, sont à l'origine des annexes extra-embryonnaires. Dans le blastocyste de  
37 souris, l'épiblaste nouvellement formé n'est constitué que de 10 à 15 cellules pluripotentes.  
38 Pendant les trois jours suivant, période marquée par l'implantation de l'embryon dans la paroi  
39 utérine, les cellules pluripotentes se multiplient activement et s'organisent progressivement en  
40 une structure d'aspect épithélial. On compte 600-700 cellules pluripotentes dans l'épiblaste au  
41 début de la gastrulation, c'est à dire au début de la formation des premiers grands lignages  
42 embryonnaires, l'ectoderme, le mésoderme, et l'endoderme. On en compte jusqu'à environ 10  
43 000 lorsqu'il a atteint sa pleine expansion trois jours après l'implantation. Au-delà, toutes les  
44 cellules pluripotentes se sont engagées vers l'une de ces trois destinées embryonnaires et leur  
45 stock est alors irrémédiablement épuisé. La pluripotence est donc un état transitoire du  
46 développement embryonnaire.

47 Depuis les travaux précurseurs de Martin Evans au Royaume-Uni [2] et de Gail Martin  
48 aux Etats-Unis en 1981 [3], il est possible de capturer cet état de pluripotence transitoire sous  
49 la forme de lignées cellulaires, les cellules souches embryonnaires pluripotentes ou cellules  
50 ES. Contrairement aux cellules pluripotentes de l'épiblaste dont elles sont issues, les cellules  
51 ES se caractérisent par leur auto-renouvellement illimité, grâce à des conditions de culture  
52 appropriées qui bloquent l'engagement dans la différenciation. Au cours des trois décennies  
53 écoulées, divers protocoles ont été élaborés dans le but d'accroître la stabilité de la

54 pluripotence *in vitro* et de préserver l'intégrité génétique des cellules ainsi capturées [4]. Les  
55 lignées de cellules souches pluripotentes ainsi fabriquées ont permis des avancées  
56 considérables dans notre compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires qui sous-  
57 tendent la pluripotence chez la souris, et plus récemment chez l'Homme. Elles ont aussi  
58 conduit à une vision plus complexe de la pluripotence. Celle-ci n'apparaît plus comme un état  
59 unique et homogène de l'épiblaste pendant toute la durée de son expansion, mais plutôt  
60 comme la succession, et parfois la coexistence, d'états discrets amenant graduellement les  
61 cellules pluripotentes aux abords de la différenciation. Dans cette revue, nous ferons le point  
62 des connaissances sur les différents états de pluripotence *in vitro* ainsi que sur leurs corrélats  
63 moléculaires et développementaux. Nous discuterons des différences entre mammifères et de  
64 l'impact de ces nouvelles connaissances dans la mise en œuvre de la thérapie cellulaire.

65

## 66 **La pluripotence naïve: une *tabula rasa***

67 La dérivation de lignées de cellules ES à partir de l'embryon pré-implantatoire de  
68 souris au stade blastocyste requiert le LIF (*leukemia inhibitory factor*), une cytokine de la  
69 famille de l'IL6 et du sérum, ce dernier pouvant être remplacé par le BMP4 (*bone*  
70 *morphogenetic protein 4*) [5] (**Fig. 1**). Le LIF active plusieurs facteurs, dont la kinase JAK2  
71 (*Janus kinase*), le facteur de transcription STAT3 [6], la PI3K (*phosphatidylinositol 3 kinase*)  
72 [7], et les kinases de la famille Src, Hck et Yes [8]. Le BMP4 active la transcription des gènes  
73 de la famille *Id*, via les facteurs de transcription de type Smad [5]. Ensemble, ils stimulent  
74 l'activité d'un réseau de gènes caractéristiques de l'épiblaste du blastocyste. Ce réseau  
75 comprend les facteurs de transcription centraux de la pluripotence, Oct4, Sox2 et Nanog, et  
76 plusieurs facteurs ancillaires, Klf2, Klf4, Tfcp2l1, Tbx3, Esrrb, Gbx2, et Sall4, formant un  
77 réseau élargi [9, 10]. Ce réseau de pluripotence peut être stabilisé, et son activité renforcée, en  
78 bloquant l'activité des kinases ERK1/2 (*extracellular regulated kinases 1/2*) responsables de

79 l'engagement spontané dans la différenciation et en stimulant l'activité de la signalisation  
80 WNT grâce à l'inhibition de la kinase GSK3 (*glycogen synthase kinase 3*). Dans ce but, on  
81 utilise des inhibiteurs pharmacologiques et un milieu de culture synthétique [11]. Cette  
82 condition de culture, chimiquement définie, est appelée "2i/LIF". Les cellules ES cultivées  
83 dans cette condition sont capables de s'auto-renouveler de manière illimitée en l'absence  
84 d'activité des protéines ERK, de sérum, et de BMP4. Le génome est globalement hypo-  
85 méthylé, la chromatine est dans une configuration permissive, et les cellules des lignées  
86 dérivées d'embryons femelles possèdent deux chromosomes X actifs, autant de  
87 caractéristiques des cellules pluripotentes du blastocyste. L'ensemble de ces caractéristiques  
88 définit l'état naïf, ou état fondamental de pluripotence. Sur le plan fonctionnel, l'état naïf se  
89 caractérise par la capacité de chaque cellule ES de souris, une fois réintroduite dans un  
90 blastocyste hôte, à s'incorporer dans l'épiblaste et à participer ainsi à la formation de tous les  
91 tissus constituant l'organisme adulte y compris la lignée germinale [12, 13]. Les analyses par  
92 RNA-seq ont montré que le transcriptome des cellules ES est très proche de celui de  
93 l'épiblaste du blastocyste entre la fin du 4<sup>ème</sup> et le 5<sup>ème</sup> jour de développement [14]. Ce stade  
94 du développement est d'ailleurs celui à partir duquel des lignées de cellules ES de souris  
95 peuvent être dérivées avec la plus grande efficacité. A partir du 6<sup>ème</sup> jour, cette efficacité  
96 chute brutalement. Les cellules ES de souris en culture peuvent également se différencier en  
97 gamètes mâles et femelles fonctionnelles [15], ce qui est cohérent avec le fait que la  
98 ségrégation de la lignée germinale ne s'opère qu'au 6<sup>ème</sup> jour de développement chez la  
99 souris. Ainsi, la combinaison 2i/LIF permet de capturer *in vitro*, avec une fidélité quasi  
100 parfaite, l'état de pluripotence qui prévaut dans l'épiblaste de l'embryon au début du 5<sup>ème</sup> jour  
101 de son développement.

102 Le rôle de la signalisation du LIF dans la capture de l'état naïf de pluripotence mérite  
103 attention. Les études génétiques ont révélé qu'aucun des composants de la voie de

104 signalisation du LIF (LIFR, gp130 et STAT3) n'était nécessaire au développement de  
105 l'embryon pré-implantatoire. L'activation de la voie LIF/STAT3 se révèle néanmoins  
106 nécessaire à la survie du blastocyste lors de la diapause, un processus physiologique qui, chez  
107 les rongeurs, retarde l'implantation chez la femelle allaitante. Dans cette situation seulement,  
108 la voie LIF/STAT3 maintient les cellules de l'épiblaste à l'état pluripotent [16]. Son  
109 activation serait donc la solution adoptée par la future cellule ES afin d'acquérir l'immortalité.

110

### 111 **La pluripotence amorcée: un état fragile à la lisière de la différenciation**

112 Il est impossible de dériver des lignées de cellules ES à partir de l'épiblaste de  
113 l'embryon de souris au-delà du 5<sup>ème</sup> jour de développement [17]. Néanmoins, les cellules de  
114 l'épiblaste sont encore pluripotentes, et ce jusqu'au début du 9<sup>ème</sup> jour. A partir du 6<sup>ème</sup> jour,  
115 les cellules de l'épiblaste ont simplement perdu la capacité à répondre au LIF. En revanche,  
116 elles ont acquis la capacité à s'auto-renouveler *in vitro* sous l'action du FGF2 et de l'Activin  
117 A. Les lignées de cellules ainsi obtenues sont appelées EpiSC (*Epiblast Stem Cells*) [18, 19].  
118 Les cellules EpiSC sont capables de se différencier *in vitro* en cellules représentatives des  
119 trois feuillets embryonnaires, attestant de la préservation de leur caractère pluripotent.  
120 Contrairement au milieu de culture des cellules ES, celui des EpiSC est enrichi en facteurs  
121 sériques, reflétant la relative complexité des voies de signalisation impliquées dans le contrôle  
122 de leur auto-renouvellement. Le transcriptome des cellules EpiSC est très proche de celui de  
123 l'épiblaste de l'embryon post-implantatoire dont elles sont issues et différent de celui des  
124 cellules ES [18, 19]. Singulièrement, les cellules EpiSC ont un transcriptome similaire à celui  
125 de l'épiblaste de l'embryon au stade de la gastrula tardive (8<sup>ème</sup> jour de développement), et ce  
126 quelque soit le stade embryonnaire (entre le 6<sup>ème</sup> et le 8<sup>ème</sup> jour) utilisé comme source de  
127 l'épiblaste [20] (**Fig. 1**). Les voies de signalisation FGF2 et Activin A ont donc la capacité de  
128 conduire les cellules de l'épiblaste vers un état unique, temporellement restreint, propice à

129 leur auto-renouvellement. Une particularité du transcriptome des cellules EpiSC est la  
130 présence d'ARNm caractéristiques des tous premiers stades de la différenciation en  
131 ectoderme (*Fgf5*, *Sox1*), mésoderme (*Brachyury*), et endoderme (*Foxa2*, *Sox17*, *Cereberus*),  
132 qui conduit à l'idée que les cellules EpiSC, bien que fonctionnellement pluripotentes, sont  
133 "pré-instruites" pour la différenciation. La notion de pluripotence amorcée a été proposée  
134 pour rendre compte de l'état des cellules EpiSC, un état plus proche de l'engagement dans la  
135 différenciation que l'état naïf [13]. Les cellules EpiSC expriment les régulateurs canoniques  
136 de la pluripotence, Oct4, Sox2 et Nanog, mais n'expriment pas les facteurs de transcription  
137 ancillaires Klf2, Klf4, Tfcp2l1, Esrrb, Gbx2, et Sall4 [18, 19]. Le réseau de pluripotence des  
138 cellules EpiSC serait donc moins stable. Les états naïf et amorcé de pluripotence diffèrent  
139 également par les facteurs de signalisation qui gouvernent leur état, en tout premier lieu la  
140 stricte dépendance des cellules EpiSC aux kinases ERK [13]. Sur le plan épigénétique, les  
141 cellules EpiSC se distinguent des cellules ES par une relative hyper-méthylation du génome  
142 [21] et par l'inactivation de l'un des chromosomes X dans les lignées dérivées d'embryons  
143 femelles [22]. Ces différences sont cohérentes avec celles décrites entre l'épiblaste précoce de  
144 l'embryon pré-implantatoire et l'épiblaste tardif de l'embryon post-implantatoire.

145 Sur le plan fonctionnel, les cellules EpiSC sont capables de coloniser l'épiblaste  
146 d'embryons post-implantatoires et de participer à la formation des trois feuillets  
147 embryonnaires [20, 23]. On ne sait pas si elles sont capables de former tous les tissus  
148 différenciés de l'organisme adulte car ces expériences ont été réalisées sur des embryons post-  
149 implantatoires cultivés *in vitro* pendant 48 heures, au-delà desquelles ils dégèrent. En  
150 revanche, contrairement aux cellules ES, les cellules EpiSC sont incapables de coloniser  
151 l'épiblaste de l'embryon pré-implantatoire. Enfin, elles ont également perdu la capacité à se  
152 différencier en gamètes, ce qui est cohérent avec la ségrégation de la lignée germinale lors du  
153 6<sup>ème</sup> jour de gestation chez la souris.

154 Une nouvelle classe de lignées EpiSC, appelée rsEpiSC (*region-selective epiblast stem*  
155 *cells*), a été dérivée de l'épiblaste d'embryons au stade gastrula (8<sup>ème</sup> jour de développement)  
156 en utilisant un inhibiteur de la signalisation WNT, la molécule IWR1 [24]. Les cellules  
157 rsEpiSC expriment des marqueurs transcriptomiques caractéristiques de la région postérieure  
158 de l'épiblaste et colonisent préférentiellement cette région dans les expériences de  
159 chimérisme, alors que les cellules EpiSC conventionnelles présentent les caractéristiques  
160 transcriptomiques et fonctionnelles propres à la région antérieure de l'épiblaste [20]. La  
161 dérivation des lignées de cellules EpiSC conduit donc à une restriction spatiale des  
162 caractéristiques des cellules souches pluripotentes.

163 Pour conclure, la combinaison FGF2/Activin A permet de capturer *in vitro*, avec une  
164 fidélité quasi parfaite, l'état de pluripotence qui prévaut dans les dernières cellules  
165 pluripotentes de l'embryon, et plus particulièrement des cellules localisées dans la partie  
166 antérieure ou la partie postérieure de l'épiblaste de la gastrula tardive, à la lisière de la  
167 différenciation.

168

### 169 **Vers une modélisation du continuum de pluripotence**

170 Les états naïfs et amorcés incarnent les deux extrémités d'un continuum de  
171 pluripotence allant de l'épiblaste précoce du blastocyste à l'épiblaste tardif de la gastrula.  
172 Grâce aux cellules ES et EpiSC, il devient possible de modéliser ce continuum *in vitro*. Les  
173 cellules ES peuvent être facilement converties en cellules de type EpiSC en les cultivant dans  
174 un milieu contenant les facteurs de remplacement sérique, le FGF2 et l'Activin A [22]. La  
175 transition s'accompagne de l'acquisition à la dépendance aux voies de signalisation  
176 FGF2/ERK et Activin A/Smad, de la disparition des marqueurs transcriptomiques de  
177 l'épiblaste précoce et de l'acquisition des marqueurs de l'épiblaste tardif [25]. La question de  
178 l'identification d'éventuels états intermédiaires susceptibles de modéliser l'épiblaste entre le

179 5<sup>ème</sup> et le 8<sup>ème</sup> jour de développement est plus difficile. Néanmoins, quelques travaux  
180 apportent des premiers éléments de réponse (**Fig. 2**). Plusieurs méthodes, permettant de tirer  
181 les cellules ES hors de leur état naïf originel, ont été décrites. Par exemple, le traitement des  
182 cellules ES par le FGF2 et l'Activin A, pendant 2 jours en présence d'une faible concentration  
183 de facteurs de remplacement sérique, amorce la différenciation et conduit à la formation de  
184 cellules appelées EpiLC (*Epiblast-Like Cells*) [26]. Les cellules EpiLC ont un transcriptome  
185 similaire à celui de l'épiblaste de l'embryon post-implantatoire avant la gastrulation (6<sup>ème</sup> jour  
186 de développement) mais différent de celui des cellules EpiSC. Comme les cellules ES, et  
187 contrairement aux cellules EpiSC, les cellules EpiLC sont capables de se différencier dans la  
188 lignée germinale. Les cellules EpiLC semblent donc occuper une position intermédiaire entre  
189 état naïf et état amorcé, tant sur le plan transcriptomique que sur le plan fonctionnel. Un autre  
190 protocole utilise le FGF2, l'Activin A, et un inhibiteur chimique de la kinase GSK3 pour  
191 convertir les cellules ES naïves en cellules appelées INTPSC, un état décrit comme  
192 intermédiaire entre état naïf et état amorcé sur la base de l'analyse du transcriptome [27]. Les  
193 cellules INTPSC sont capables de produire des chimères germinales après injection dans un  
194 blastocyste, suggérant une proximité fonctionnelle avec les cellules EpiLC. L'inactivation de  
195 la signalisation WNT semble aider les cellules EpiSC à sortir de l'état amorcé, à acquérir les  
196 caractéristiques transcriptomiques d'un épiblaste plus immature, distinctives de l'embryon  
197 avant le début de la gastrulation, mais néanmoins différentes de celles des cellules ES [28,  
198 29]. Le FGF4 exercerait un effet similaire en permettant aux cellules EpiSC de coloniser le  
199 blastocyste, comme le font les cellules ES, sans néanmoins contribuer à la formation de la  
200 lignée germinale [30]. D'autres types cellulaires ont été créés à partir de cellules ES, comme  
201 les cellules EPL et les cellules IESC, mais leur relevance pour la modélisation du continuum  
202 de pluripotence est moins claire. Enfin, un nouvel état dit "formatif", situé entre l'état naïf et  
203 l'état amorcé, a récemment été proposé [31]. A l'état formatif, les cellules pluripotentes

204 n'expriment plus les gènes du noyau de la pluripotence naïve (*Klf2*, *Klf4*, *Tfcp2l1*, *Tbx3*,  
205 *Esrrb*, *Gbx2*, et *Sall4*) et n'expriment pas encore les gènes de l'ectoderme (*Fgf5*, *Sox1*), du  
206 mésoderme (*Brachyury*) et de l'endoderme (*Foxa2*, *Cereberus*, *Sox17*). Elles expriment  
207 d'autres régulateurs présomptifs de la pluripotence tels que *Oct6* (*Pou3f1*), *Otx2* et *Lef1*, dont  
208 l'expression est également observée dans l'épiblaste au 6<sup>ème</sup> jour de développement, c'est à  
209 dire au moment de la ségrégation de la lignée germinale. L'état formatif représenterait un état  
210 intermédiaire au sein du continuum de pluripotence pendant lequel les cellules ne constituent  
211 plus une *tabula rasa* (cellules ES), mais ne sont pas encore des cellules pré-instruites à se  
212 différencier en l'un des trois feuilletts embryonnaires (cellules EpiSC). Cette phase  
213 intermédiaire permettrait de déclencher le reformatage du transcriptome, de l'épigénome, et  
214 des réseaux de signalisation, conférant ainsi aux cellules pluripotentes la compétence pour  
215 répondre aux signaux de différenciation lors de la gastrulation [32].

216 Ces travaux mettent en lumière divers états intermédiaires de pluripotence dans les  
217 cultures cellulaires. Tous ne sont cependant pas des états stables. Les cellules EpiLC, par  
218 exemple, n'existent que de manière transitoire sur le chemin menant les cellule ES vers la  
219 différenciation germinale [26]. L'état formatif est lui aussi observé de manière transitoire 16h  
220 après la sortie des cellules ES de l'état naïf. On ne connaît pas encore les voies de  
221 signalisation dont l'activation permettrait de stabiliser ces états fugaces. Une autre difficulté  
222 est la coexistence de différents états au sein d'une population cellulaire *a priori* homogène, un  
223 phénomène observé aussi bien dans les populations de cellules ES que de cellules EpiSC [33].  
224 Par ailleurs, aucun de ces protocoles n'est encore capable de simuler l'intégralité de  
225 l'évolution de la pluripotence partant de *la tabula rasa* (cellules ES) jusqu'à la lisière de la  
226 différenciation (cellules EpiSC).

227

228

## 229 **Les cellules "ES" et le continuum de pluripotence chez l'Homme**

230 Les premières tentatives visant à créer des lignées des cellules ES naïves à partir de  
231 blastocystes humains en utilisant les protocoles développés chez la souris ont échoué,  
232 suggérant que le LIF est incapable d'enclencher le processus d'immortalisation des cellules de  
233 l'épiblaste et que l'inhibition de ERK n'est pas suffisante pour bloquer leur différenciation.  
234 Néanmoins, des lignées de cellules souches pluripotentes humaines ont été obtenues en  
235 utilisant le FGF2 (ou la combinaison FGF2/Activin A) et des facteurs de remplacement  
236 sérique [34, 35]. Les lignées ainsi obtenues sont souvent appelées "ES" mais elles ne  
237 présentent en réalité aucune des caractéristiques cardinales de la pluripotence naïve telle que  
238 définies chez la souris. Outre l'absence de réponse à la signalisation LIF/STAT3 [36], elles  
239 requièrent l'activité des kinases ERK pour se diviser, elles n'expriment aucun des facteurs de  
240 pluripotence ancillaires décrits chez la souris [37, 38], la respiration mitochondriale est  
241 réduite [39], le génome est hyper-méthylé [37], la chromatine est enrichie en marques  
242 répressives des histones [40], et elles ne possèdent qu'un seul chromosome X actif dans les  
243 lignées dérivées d'embryons humains XX [37]. La comparaison de leur transcriptome à celui  
244 de l'épiblaste de singe macaque cynomolgus, entre le 6<sup>ème</sup> (blastocyste) et le 17<sup>ème</sup> jour de  
245 développement (gastrula), montre que les cellules "ES" humaines ont un profil d'expression  
246 génique plus proche de celui de l'épiblaste tardif de la gastrula que de l'épiblaste précoce du  
247 blastocyste [41]. Enfin, lorsqu'elles sont injectées dans des embryons de souris au 8<sup>ème</sup> jour de  
248 développement pour former des chimères dites "inter-espèces", elles colonisent l'épiblaste  
249 tardif de l'embryon [42] comme le font les cellules EpiSC de souris [23]. En revanche,  
250 lorsqu'elles sont injectées dans des blastocystes de souris, elles sont alors incapables de  
251 coloniser l'épiblaste précoce comme le feraient les cellules ES naïves [43]. Ainsi, selon tous  
252 les critères communément utilisés pour positionner les cellules le long du continuum de  
253 pluripotence, les cellules "ES" humaines s'auto-renouvellent dans un état de pluripotence

254 proche, voire identique à celui de l'état amorcé décrit pour les cellules EpiSC de souris (**Fig.**  
255 **3**). L'usage des guillemets pour décrire ces cellules "ES" s'impose afin de les distinguer des  
256 véritables cellules ES à l'état naïf.

257 La raison pour laquelle les cellules "ES" humaines ne s'auto-renouvellent pas à l'état  
258 naïf est une question fondamentale. Selon l'hypothèse la plus couramment proposée,  
259 l'absence de diapause aurait conduit au démantèlement de la voie de signalisation du LIF chez  
260 les primates. Ainsi, lorsqu'elles sont mises en culture, les cellules de l'épiblaste précoce  
261 humain continuent de progresser spontanément le long du continuum de pluripotence jusqu'à  
262 atteindre un état "amorcé" où elles se stabilise sous l'action du FGF2 et de l'Activin A. Cette  
263 dérive spontanée des cellules de l'épiblaste "naïf" vers l'état "amorcé" s'observe d'ailleurs  
264 aussi chez la souris lorsque l'épiblaste précoce du blastocyste est cultivé en l'absence de LIF  
265 et en présence de FGF2 et d'Activin A. On obtient alors des cellules EpiSC, même si  
266 l'épiblaste originel était de nature intrinsèquement naïve.

267 La situation que nous venons de décrire chez l'Homme n'a rien d'exceptionnelle. Au  
268 contraire, les cellules "ES" dérivées de blastocystes chez d'autres primates (macaque,  
269 marmouset, babouin), mais aussi chez le lapin, le vison, le chien et le bovin, présentent les  
270 caractéristiques cardinales de l'état amorcé [4, 41]. La souris fait donc figure d'exception  
271 soulignant la nécessité d'étudier le continuum de pluripotence dans les embryons de primates,  
272 humains et non-humains.

273

### 274 **Comment obtenir des cellules ES humaines naïve ?**

275 En 2016, l'équipe de Austin Smith à Cambridge (UK) a réussi à obtenir des lignées de  
276 cellules ES humaines dans un état proche de l'état naïf en utilisant un milieu de culture  
277 similaire à celui utilisé pour la culture des cellules ES de souris, dans lequel ont été rajoutés  
278 des inhibiteurs de la protéine kinase C (Gö6983) et de la kinase ROCK (Y-27632), ainsi que

279 de la Vitamine C (milieu t2iLGöY). Les lignées de cellules ainsi obtenues ont été appelées  
280 HNES (*Human Naïve Embryonic Stem*). Elles expriment les facteurs de transcription  
281 accessoires spécifiques de la pluripotence naïve telle que définie chez la souris. Elles  
282 présentent un profil global d'expression génique et un niveau de méthylation du génome  
283 différents de celui des cellules "ES" dérivées en FGF2 + Activin A, compatibles avec des  
284 caractéristiques de pluripotence naïve [44]. Les cellules HNES ne sont pas pour autant de  
285 véritables cellules ES naïves car elles sont incapables de coloniser l'embryon animal pour  
286 former des chimères, une marque des véritables cellules ES naïves chez le souris. D'ailleurs,  
287 les analyses à l'échelle unicellulaire ont révélé que le transcriptome des cellules HNES est  
288 sensiblement différent de celui des cellules de l'épiblaste précoce dont elles sont issues,  
289 laissant penser que le système de culture t2iLGöY est capable de bloquer la dérive des  
290 cellules en direction de la pluripotence amorcée, mais ne réussit pas à véritablement capturer  
291 l'état de pluripotence qui préexiste les cellules de l'épiblaste du blastocyste humain (**Fig. 3**).

292 Une étude systématique des facteurs de croissance, cytokines et molécules capables de  
293 promouvoir l'immortalisation des cellules de l'épiblaste précoce et la dérivation de véritables  
294 lignées de cellules ES humaines naïves est nécessaire. La difficulté d'accès aux embryons  
295 humains rend cependant cette approche difficile. Une autre approche consiste à reprogrammer  
296 les cellules "ES" humaines conventionnelles en cellules exprimant les caractéristiques  
297 épigénétiques et fonctionnelles de cellules ES naïves. Plusieurs protocoles ont été ainsi  
298 élaborés visant à repousser les cellules "ES" de primates, humain et non-humain, vers le haut  
299 du continuum de pluripotence, en utilisant des facteurs de transcription associés à la  
300 pluripotence naïve chez la souris (OCT4, KLF2, KLF4, NANOG et STAT3), des facteurs de  
301 croissance (LIF, Activin A, FGF2), ainsi que des inhibiteurs de kinases (ROCK, BRAF,  
302 p38/MAPK, GSK3, MEK1/2, SRC, PKA, PKC, RAF et JNK), d'histones déacétylases  
303 (HDAC1/2) ou de voies de signalisation (BMP et HIPPO). Les cellules ainsi obtenues

304 présentent des caractéristiques de l'état naïf de pluripotence, tel qu'il est défini chez la souris,  
305 avec une reconfiguration du transcriptome et de l'épigénome les rapprochant de l'épiblaste  
306 précoce du blastocyste [38, 41, 45]. On observe également la perte de la dépendance à la  
307 signalisation FGF2/ERK, l'acquisition de la dépendance à la signalisation LIF/JAK/STAT3,  
308 la stimulation de la respiration mitochondriale, et la réactivation du second chromosome X.  
309 Notons cependant qu'aucune des lignées de cellules ES humaines ainsi reprogrammées ne  
310 présente toutes les caractéristiques de l'état naïf de pluripotence tel qu'il est défini chez la  
311 souris [46-49]. Par ailleurs, aucune de ces cellules ne semble capable de former des chimères  
312 après injection dans un embryon animal, une prérogative des véritables cellules ES naïves. La  
313 véritable cellule ES humaine naïve semble donc ne pas encore exister.

314

## 315 **Conclusions**

316       Quelle est la signification de cette pléthore de lignées ? Il est possible que les cellules  
317 de ces lignées se positionnent à différents niveaux le long du continuum de pluripotence, mais  
318 qu'aucune n'ait encore atteint l'état naïf tel qu'il est défini chez la souris. Il est également  
319 possible que certaines de ces lignées représentent des artéfacts sans correspondance avec un  
320 quelconque stade de développement de l'épiblaste humain. Singulièrement, toutes ces lignées  
321 ont en commun la réactivation de la signalisation LIF/JAK/STAT3 et la perte de la  
322 dépendance à la voie MEK/ERK, qui sont les premiers critères moléculaires de l'état naïf  
323 chez la souris, alors qu'il n'existe aucune preuve tangible de l'implication de ces voies dans le  
324 développement du blastocyste humain. Il semble donc vraisemblable que les mécanismes  
325 moléculaires qui contrôlent l'émergence et la multiplication des cellules pluripotentes dans le  
326 blastocyste humain soient partiellement différents de ceux décrits chez les rongeurs. Un long  
327 ARN non codant, HPAT5, ainsi qu'un facteur de transcription, TFAP2C, spécifiques de l'état  
328 naïf de la pluripotence humaine ont déjà été identifiés. La capture de l'état naïf dans les

329 cellules souches pluripotentes humaines requiert maintenant l'identification des voies de  
330 signalisations qui régulent cet état dans l'embryon de primates [50]. Les études récentes du  
331 transcriptome de l'embryon humain ouvrent la voie à cette connaissance [51].

332 La dichotomie entre cellules ES naïves et cellules "ES" amorcées s'applique-t-elle  
333 aussi aux cellules souches pluripotentes induites (iPS) ? Toutes les études montrent que les  
334 cellules iPS obtenues chez les rongeurs s'auto-renouvellent à l'état naïf alors que les cellules  
335 iPS obtenues chez les primates s'auto-renouvellent à l'état amorcé. Parmi tous les protocoles  
336 développés afin de reprogrammer les cellules "ES" humaines vers l'état naïf, certains ont été  
337 appliqués avec succès aux cellules iPS. Il est donc vraisemblable que les résultats des futures  
338 recherches sur les cellules ES naïves humaines pourront être appliqués à l'obtention de  
339 cellules iPS naïves.

340 Pourquoi est-il important d'obtenir des cellules ES et iPS naïves chez l'Homme ? Les  
341 cellules souches pluripotentes à l'état amorcé sont beaucoup plus instables que les cellules  
342 naïves tant sur le plan de l'intégrité génétique que celui de l'auto-renouvellement.  
343 Contrairement à la culture des cellules ES de souris, celle des cellules "ES" et iPS humaines  
344 requière des milieux de culture sophistiqués et un contrôle qualité régulier pour s'assurer de  
345 l'absence de dérives génétiques dans les populations cellulaires. Des conditions de culture  
346 non optimales sont d'ailleurs souvent à l'origine de l'accumulation de cellules possédant des  
347 réarrangements chromosomiques car les altérations ainsi produites leur confèrent un avantage  
348 de croissance. Elles subissent alors une sélection positive Darwinienne [52], posant un risque  
349 pour les applications en thérapie cellulaire [53]. Des différences dans les capacités de  
350 différenciation ont également décrites entre des lignées de cellules "ES" et entre des lignées  
351 de cellules iPS, différences qui pourraient s'expliquer par une plus grande hétérogénéité  
352 épigénétique. Toutes ces "faiblesses" tiennent sans doute au fait que les cellules pluripotentes  
353 amorcées sont plus proches de l'engagement dans la différenciation. Contrairement aux

354 cellules naïves dont la fonction première, dans l'embryon, est uniquement l'amplification  
355 rapide du stock de cellules pluripotentes avant l'implantation, les cellules amorcées sont dans  
356 une situation d'équilibre précaire car elles doivent choisir entre auto-renouvellement et  
357 différenciation lors de la gastrulation. C'est d'ailleurs la raison d'être du continuum de  
358 pluripotence: permettre aux cellules pluripotentes de basculer graduellement de la phase de  
359 multiplication rapide à la phase de préparation à une différenciation imminente lors de la  
360 gastrulation. Il est vraisemblable que l'instabilité décrite pour les cellules "ES" humaines soit  
361 consubstantielle de l'état amorcé. L'obtention de cellules ES et iPS humaines naïves  
362 permettra de s'affranchir de cette instabilité et facilitera la manipulation des cellules souches  
363 pluripotentes à finalité thérapeutique.

364         Seules les cellules ES et iPS naïves possèdent la capacité de coloniser l'embryon et  
365 former des chimères. Cette compétence est à la base de la technologie des souris knockout.  
366 Chez l'obtention de cellules ES et iPS naïves est une condition préalable à la mise en œuvre  
367 d'une nouvelle technologie visant à produire des organes humains chez l'animal [54, 55].  
368 Cette technologie, qui en est encore à ses balbutiements, repose sur l'injection de cellules ES  
369 ou iPS humaines dans l'embryon d'un animal (porc, mouton) dans lequel un ou plusieurs  
370 gènes "maîtres" de la formation des organes ont été invalidés. Les cellules humaines ainsi  
371 injectées pourraient alors compléter la fonction manquante et créer un organe entièrement  
372 humain chez l'animal devenu adulte. Sa mise en œuvre exigera de disposer de cellules  
373 humaines, ES ou iPS, à l'état naïf de pluripotence afin de coloniser efficacement l'embryon  
374 animal.

375  
376  
377

378 **Références bibliographiques**

379

380 1. Gardner RL, Rossant J. Investigation of the fate of 4-5 day post-coitum mouse inner cell  
381 mass cells by blastocyst injection. *J Embryol Exp Morphol* 1979; 52 : 141-52.

382 2. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse  
383 embryos. *Nature* 1981; 292 : 154-6.

384 3. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in  
385 medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78 :  
386 7634-8.

387 4. Savatier P, Osteil P, Tam PP. Pluripotency of embryo-derived stem cells from rodents,  
388 lagomorphs, and primates: Slippery slope, terrace and cliff. *Stem Cell Res* 2017; 19 : 104-12.

389 5. Ying QL, Nichols J, Chambers I, Smith A. BMP induction of Id proteins suppresses  
390 differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3.  
391 *Cell* 2003; 115 : 281-92.

392 6. Niwa H, Burdon T, Chambers I, Smith A. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells  
393 is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev* 1998; 12 : 2048-60.

394 7. Paling NR, Wheadon H, Bone HK, Welham MJ. Regulation of embryonic stem cell self-  
395 renewal by phosphoinositide 3-kinase-dependent signalling. *J Biol Chem* 2004; 279 : 48063-  
396 70.

397 8. Tamm C, Bower N, Anneren C. Regulation of mouse embryonic stem cell self-renewal by  
398 a Yes-YAP-TEAD2 signaling pathway downstream of LIF. *J Cell Sci* 2011; 124 : 1136-44.

399 9. Martello G, Smith A. The nature of embryonic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2014; 30  
400 : 647-75.

- 401 10. Dunn SJ, Martello G, Yordanov B, *et al.* Defining an essential transcription factor  
402 program for naive pluripotency. *Science* 2014; 344 : 1156-60.
- 403 11. Ying QL, Wray J, Nichols J, *et al.* The ground state of embryonic stem cell self-renewal.  
404 *Nature* 2008; 453 : 519-23.
- 405 12. Beddington RS, Robertson EJ. An assessment of the developmental potential of  
406 embryonic stem cells in the midgestation mouse embryo. *Development* 1989; 105 : 733-7.
- 407 13. Nichols J, Smith A. Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell* 2009; 4 : 487-92.
- 408 14. Boroviak T, Loos R, Bertone P, *et al.* The ability of inner-cell-mass cells to self-renew as  
409 embryonic stem cells is acquired following epiblast specification. *Nat Cell Biol* 2014; 16 :  
410 516-28.
- 411 15. Saitou M, Miyauchi H. Gametogenesis from Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* 2016;  
412 18 : 721-35.
- 413 16. Nichols J, Chambers I, Taga T, Smith A. Physiological rationale for responsiveness of  
414 mouse embryonic stem cells to gp130 cytokines. *Development* 2001; 128 : 2333-9.
- 415 17. Brook FA, Gardner RL. The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the  
416 mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94 : 5709-12.
- 417 18. Brons IG, Smithers LE, Trotter MW, *et al.* Derivation of pluripotent epiblast stem cells  
418 from mammalian embryos. *Nature* 2007; 448 : 191-5.
- 419 19. Tesar PJ, Chenoweth JG, Brook FA, *et al.* New cell lines from mouse epiblast share  
420 defining features with human embryonic stem cells. *Nature* 2007; 448 : 196-9.
- 421 20. Kojima Y, Kaufman-Francis K, Studdert JB, *et al.* The Transcriptional and Functional  
422 Properties of Mouse Epiblast Stem Cells Resemble the Anterior Primitive Streak. *Cell Stem*  
423 *Cell* 2013; 14 : 107-20.

- 424 21. Ficuz G, Hore TA, Santos F, *et al.* FGF Signaling Inhibition in ESCs Drives Rapid  
425 Genome-wide Demethylation to the Epigenetic Ground State of Pluripotency. *Cell Stem Cell*  
426 2013; 13 : 351-9.
- 427 22. Guo G, Yang J, Nichols J, *et al.* Klf4 reverts developmentally programmed restriction of  
428 ground state pluripotency. *Development* 2009; 136 : 1063-9.
- 429 23. Huang Y, Osorno R, Tsakiridis A, Wilson V. In Vivo differentiation potential of epiblast  
430 stem cells revealed by chimeric embryo formation. *Cell reports* 2012; 2 : 1571-8.
- 431 24. Wu J, Okamura D, Li M, *et al.* An alternative pluripotent state confers interspecies  
432 chimaeric competency. *Nature* 2015; 521 : 316-21.
- 433 25. Osteil P, Studdert J, Wilkie E, *et al.* Generation of genome-edited mouse epiblast stem  
434 cells via a detour through ES cell-chimeras. *Differentiation* 2016; 91 : 119-25.
- 435 26. Hayashi K, Ohta H, Kurimoto K, *et al.* Reconstitution of the Mouse Germ Cell  
436 Specification Pathway in Culture by Pluripotent Stem Cells. *Cell* 2011; 146 : 519-32.
- 437 27. Tsukiyama T, Ohinata Y. A modified EpiSC culture condition containing a GSK3  
438 inhibitor can support germline-competent pluripotency in mice. *PLoS ONE* 2014; 9 : e95329.
- 439 28. Kim H, Wu J, Ye S, *et al.* Modulation of beta-catenin function maintains mouse epiblast  
440 stem cell and human embryonic stem cell self-renewal. *Nat Commun* 2013; 4 : 2403.
- 441 29. Kurek D, Neagu A, Tastemel M, *et al.* Endogenous WNT signals mediate BMP-induced  
442 and spontaneous differentiation of epiblast stem cells and human embryonic stem cells. *Stem*  
443 *cell reports* 2015; 4 : 114-28.
- 444 30. Joo JY, Choi HW, Kim MJ, *et al.* Establishment of a primed pluripotent epiblast stem cell  
445 in FGF4-based conditions. *Scientific reports* 2014; 4 : 7477.

- 446 31. Kalkan T, Olova N, Roode M, *et al.* Tracking the embryonic stem cell transition from  
447 ground state pluripotency. *Development* 2017; 144 : 1221-34.
- 448 32. Smith A. Formative pluripotency: the executive phase in a developmental continuum.  
449 *Development* 2017; 144 : 365-73.
- 450 33. Han DW, Tapia N, Joo JY, *et al.* Epiblast Stem Cell Subpopulations Represent Mouse  
451 Embryos of Distinct Pregastrulation Stages. *Cell* 2010; 143 : 617-27.
- 452 34. Vallier L, Alexander M, Pedersen RA. Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to  
453 maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *J Cell Sci* 2005; 118 : 4495-509.
- 454 35. Ludwig TE, Levenstein ME, Jones JM, *et al.* Derivation of human embryonic stem cells  
455 in defined conditions. *Nat Biotechnol* 2006; 24 : 185 - 7.
- 456 36. Daheron L, Opitz SL, Zaehres H, *et al.* LIF/STAT3 signaling fails to maintain self-  
457 renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2004; 22 : 770-8.
- 458 37. Takashima Y, Guo G, Loos R, *et al.* Resetting Transcription Factor Control Circuitry  
459 toward Ground-State Pluripotency in Human. *Cell* 2014; 158 : 1254-69.
- 460 38. Chen H, Aksoy I, Gonnot F, *et al.* Reinforcement of STAT3 activity reprogrammes  
461 human embryonic stem cells to naïve-like pluripotency. *Nat Commun* 2015; 6 : 7095-112.
- 462 39. Sperber H, Mathieu J, Wang Y, *et al.* The metabolome regulates the epigenetic landscape  
463 during naive-to-primed human embryonic stem cell transition. *Nat Cell Biol* 2015; 17 : 1523-  
464 35.
- 465 40. Rada-Iglesias A, Bajpai R, Swigut T, *et al.* A unique chromatin signature uncovers early  
466 developmental enhancers in humans. *Nature* 2010; 470 : 279-83.
- 467 41. Nakamura T, Okamoto I, Sasaki K, *et al.* A developmental coordinate of pluripotency  
468 among mice, monkeys and humans. *Nature* 2016; 537 : 57-62.

- 469 42. Mascetti VL, Pedersen RA. Human-Mouse Chimerism Validates Human Stem Cell  
470 Pluripotency. *Cell Stem Cell* 2016; 18 : 67-72.
- 471 43. Masaki H, Kato-Itoh M, Umino A, *et al.* Interspecific in vitro assay for the chimera-  
472 forming ability of human pluripotent stem cells. *Development* 2015; 142 : 3222-30.
- 473 44. Guo G, von Meyenn F, Santos F, *et al.* Naive Pluripotent Stem Cells Derived Directly  
474 from Isolated Cells of the Human Inner Cell Mass. *Stem cell reports* 2016; 6 : 437-46.
- 475 45. Huang K, Maruyama T, Fan G. The naive state of human pluripotent stem cells: a  
476 synthesis of stem cell and preimplantation embryo transcriptome analyses. *Cell Stem Cell*  
477 2014; 15 : 410-5.
- 478 46. Manor YS, Massarwa R, Hanna JH. Establishing the human naive pluripotent state. *Curr*  
479 *Opin Genet Dev* 2015; 34 : 35-45.
- 480 47. Weinberger L, Ayyash M, Novershtern N, Hanna JH. Dynamic stem cell states: naive to  
481 primed pluripotency in rodents and humans. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2016; 17 : 155-69.
- 482 48. Warriar S, Van der Jeught M, Duggal G, *et al.* Direct comparison of distinct naive  
483 pluripotent states in human embryonic stem cells. *Nat Commun* 2017; 8 : 15055.
- 484 49. Collier AJ, Rugg-Gunn PJ. Identifying Human Naive Pluripotent Stem Cells - Evaluating  
485 State-Specific Reporter Lines and Cell-Surface Markers. *Bioessays* 2018 : e1700239.
- 486 50. Boroviak T, Nichols J. Primate embryogenesis predicts the hallmarks of human naive  
487 pluripotency. *Development* 2017; 144 : 175-86.
- 488 51. Petropoulos S, Edsgard D, Reinius B, *et al.* Single-Cell RNA-Seq Reveals Lineage and X  
489 Chromosome Dynamics in Human Preimplantation Embryos. *Cell* 2016; 165 : 1012-26.
- 490 52. Funk WD, Labat I, Sampathkumar J, *et al.* Evaluating the genomic and sequence integrity  
491 of human ES cell lines; comparison to normal genomes. *Stem Cell Res* 2012; 8 : 154-64.

492 53. Na J, Baker D, Zhang J, *et al.* Aneuploidy in pluripotent stem cells and implications for  
493 cancerous transformation. *Protein Cell* 2014; 5 : 569-79.

494 54. Masaki H, Nakauchi H. Interspecies chimeras for human stem cell research. *Development*  
495 2017; 144 : 2544-7.

496 55. Wu J, Greely HT, Jaenisch R, *et al.* Stem cells and interspecies chimaeras. *Nature* 2016;  
497 540 : 51-9.

498

## Légendes

### Figure 1: Etats naif et amorcé de pluripotence chez la souris.

GSK3i, inhibiteur pharmacologique de GSK3; MEKi, inhibiteur pharmacologique de MEK;  
SRK, Src-related kinases (Hck et Yes).

### Figure 2: Le continuum de pluripotence chez la souris.

E3.5 à E7.5 représentent les stades de développement. Les flèches pointillées indiquent la  
dérivation de lignées de cellules souches pluripotentes à partir de l'épiblaste embryonnaire à  
différents stades de son développement. Les triangles bleus indiquent la correspondance entre  
cellules souches pluripotentes et stades embryonnaires. Les flèches pleines indiquent (i) la  
conversion antérograde des cellules ES en cellules EpiSC, EpiLC, INTPSC, EPL, ou IESC, en  
cellules moins immatures, et (ii) la conversion rétrograde des cellules EpiSC en cellules plus  
immatures. FBS, serum de veau foetal; GSK3i, inhibiteur pharmacologique de la kinase  
GSK3; MEDII, milieu conditionné de la lignée HepG2; rsEpiSC, regionTANKi; inhibiteur  
pharmacologique de la tankyrase; WNTi, inhibiteur pharmacologique de la voie de  
signalisation WNT. 2iLIF, GSK3i + MEKi + LIF.

499  
500

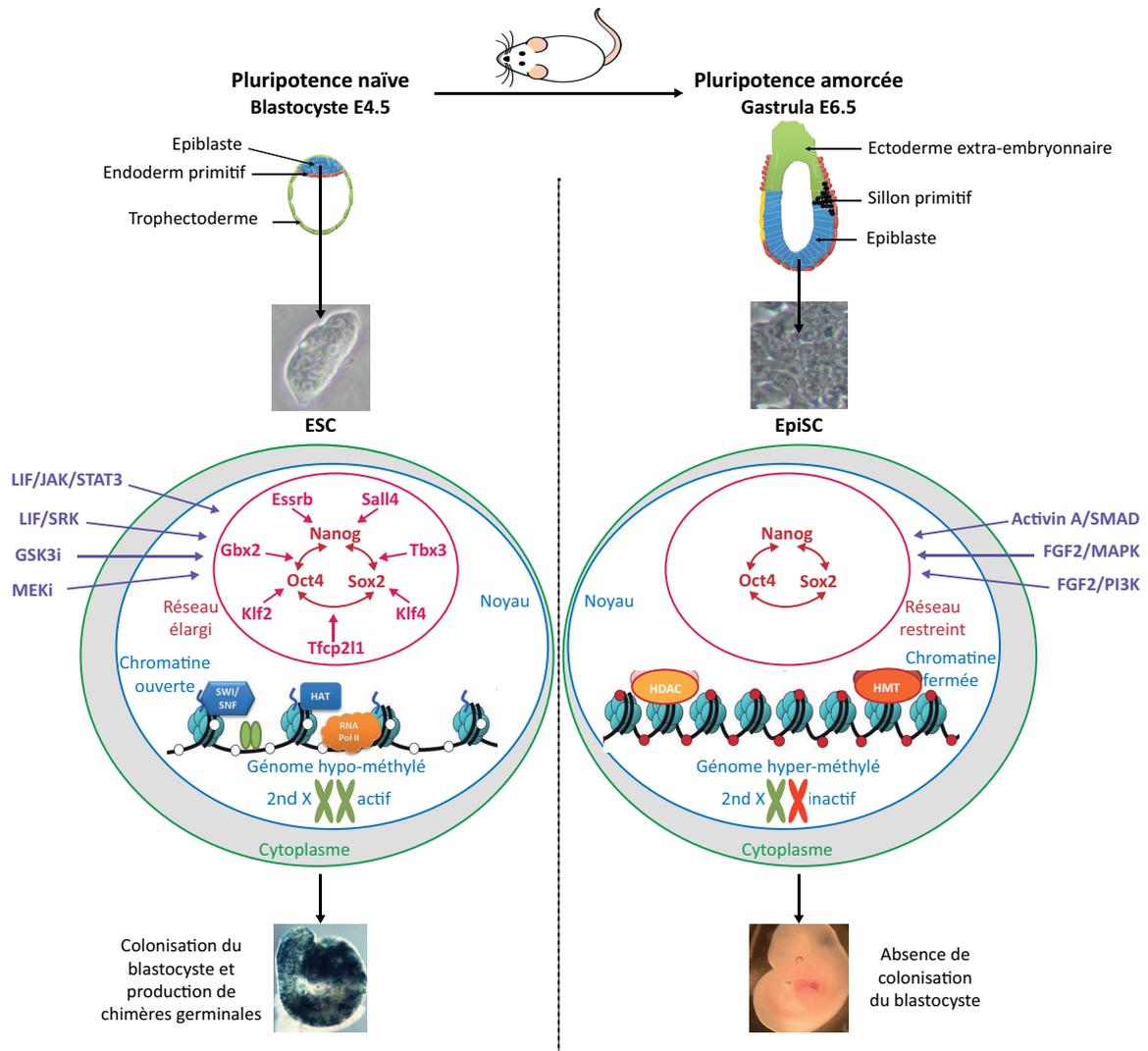
501 **Figure 3: le continuum de pluripotence chez l'Homme**

E5 à E16 représentent les stades de développement. Les flèches pointillées indiquent la dérivation de lignées de cellules souches pluripotentes à partir de l'épiblaste embryonnaire à différents stades de son développement. Les flèches pleines indiquent la conversion rétrograde des cellules "ES" humaines en cellules plus immatures, appelées NHSM (Gafni et al., 2013, *Nature* 504, 282-286), 3i (Chan et al., 2013, *Cell Stem Cell* 13, 663-675), 2iF (Ware et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 4484-4489), NHSM-v (Chen et al., 2015, *Cell Stem Cell* 17, 116-124), 5iLA (Theunissen et al., 2014, *Cell Stem Cell* 15, 471-487), Reset (Takashima et al., 2014, *Cell* 158, 1254-1269) et TL2i (Chen et al., 2015, *Nat Commun* 6, 7095-7112). FCS, serum de veau foetal; 2i: GSK3i + MEKi.

502  
503

Figure 1

504  
505

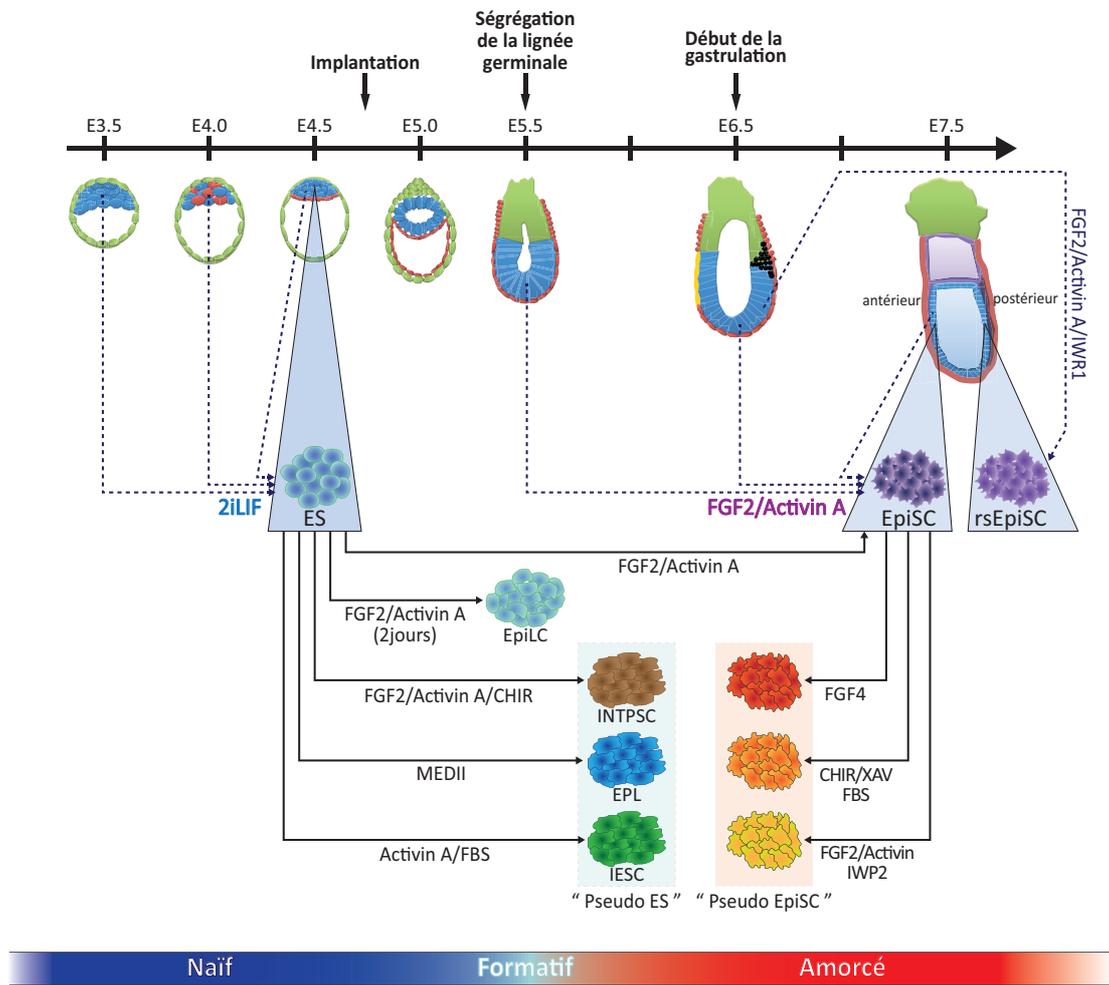


Version postprint

506

Figure 2

507



Version postprint

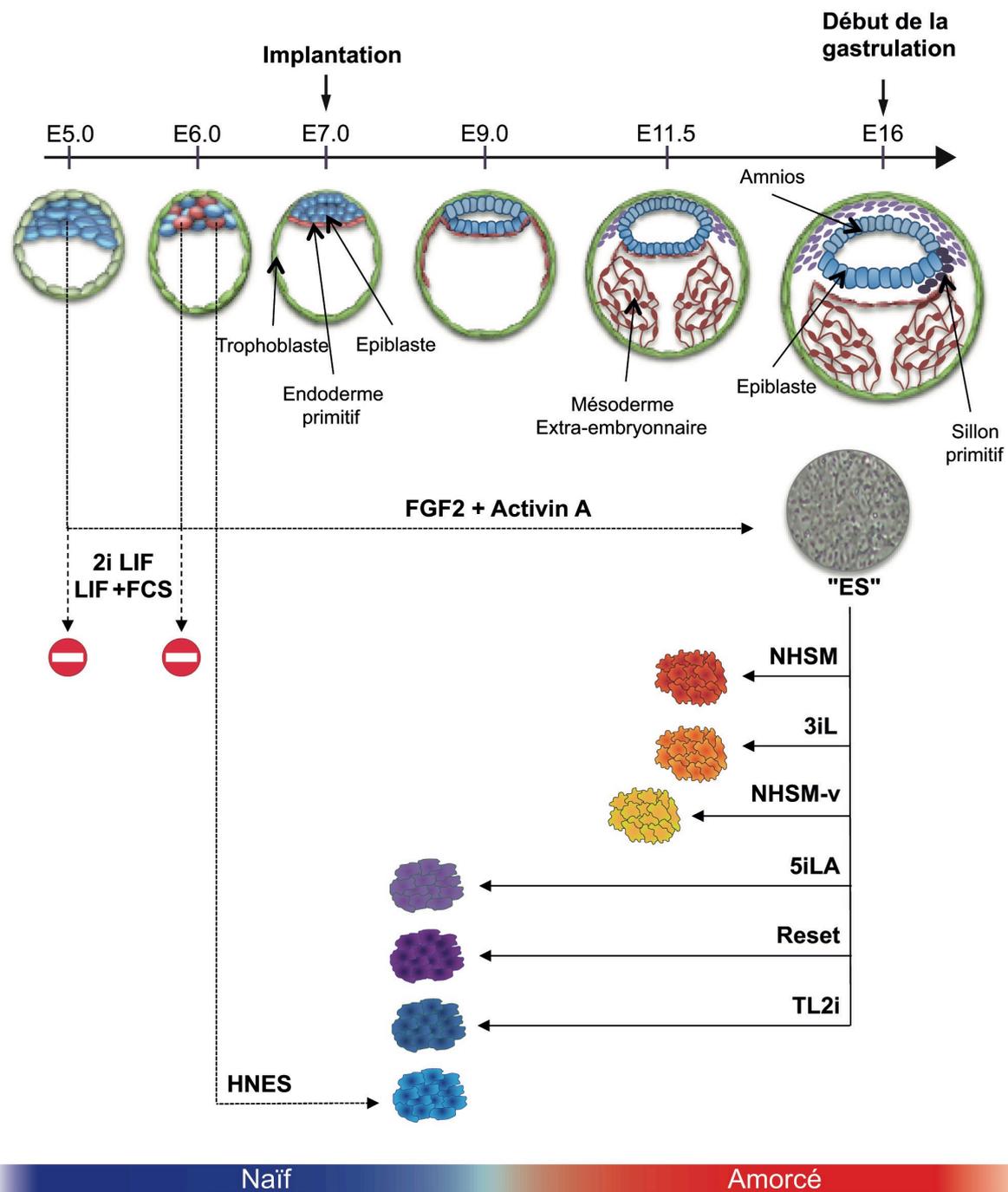
508

### Figure 3

509

510

511



512