

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE À FINALITÉ SPÉCIALISÉE (BIOLOGIE APPLIQUÉE ET ENTREPRISE)

Régulation traductionnelle du remodelage mitochondrial dans la différenciation hépatogénique d'iPSCs

Dorn, Charline

Award date:
2021

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



Faculté des Sciences

**Le contrôle traductionnel du remodelage mitochondrial dans la différenciation
hépatogénique**

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Charline DORN

Août 2020

a)

Université de Namur
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@unamur.be - <http://www.unamur.be>

Le contrôle traductionnel du remodelage mitochondrial dans la différenciation hépatogénique

DORN Charline

Résumé

Lors de diverses études réalisées sur plusieurs types de différenciation cellulaire, un remodelage mitochondrial a été observé. Or, le processus de biogenèse mitochondriale est connu pour être régulé de façon traductionnelle, entre autres. De plus, durant certains types de différenciation, une régulation traductionnelle a été mise en évidence. Dans le but de comprendre les mécanismes traductionnels éventuellement impliqués dans la biogenèse mitochondriale survenant au cours de la différenciation hépatogénique, une étude *in vitro* de différenciation hépatogénique de cellules souches humaines pluripotentes induites (iPSCs) a été effectuée. Le modèle de différenciation utilisé contient deux types de protocoles : un standard (STD) basé sur divers cocktails de cytokines et un amélioré (HC3X) qui comprend en plus une induction de 3 facteurs de transcriptions spécifiques ainsi qu'une concentration élevée en acides aminés. Durant ce mémoire, une caractérisation du remodelage mitochondrial a été effectuée par l'évaluation de l'abondance de l'ADN mitochondriale ainsi que des protéines mitochondriales. Il a été montré qu'il y avait une augmentation de l'abondance mitochondriale à partir du jour 12. Un autre paramètre a été caractérisé : la traduction globale. Celle-ci semble légèrement augmentée au jour 12 pour ensuite diminuer au cours de la différenciation et ce, plus fortement dans les conditions HC3X. Lors de précédentes études, une implication potentielle de la voie mTOR avait été présentée. Cependant, aucune modification des acteurs de la voie mTOR n'a été remarqué. Par contre, une implication potentielle de la régulation traductionnelle par eIF2 α semble apparaître, étant donné que l'abondance protéique de p-eIF2 α tend à augmenter au cours de la différenciation suivant le protocole HC3X.

Mémoire de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Août 2020

Promoteur: P. Renard

Co-Promoteur : T. Arnould

Remerciements

Tout d'abord, je souhaite remercier ma promotrice, le Pr. Renard P., pour son suivi, ses conseils judicieux ainsi que sa compréhension qui m'ont permis d'apprendre énormément durant la réalisation de ce mémoire.

Ensuite, je remercie aussi mon encadrant, Marino, pour sa patience, ses conseils, son ouverture d'esprit et son soutien. Je le remercie pour tout ce qu'il m'a appris tant au niveau scientifique que sur le plan humain et pour m'avoir supportée tous les jours.

Je remercie également le Pr. Arnould T. ainsi que les membres du jury composé du Pr. Hamer I., Pr. Gilet N., Pr. Boonen M., Nolmans A.

Je remercie tous les membres de l'URBC, et en particulier l'équipe DYSO, pour leur accueil chaleureux et l'aide bienvenue à tout moment. Merci également à Damien, Lola, Morgane, Emilie, Myriam, Maude, Antoine et Guy pour leur aide, soutien et bonne humeur.

Je remercie mes premiers compagnons de bureau : Robin, Mathieu L. et Mathieu VL pour ces merveilleuses conversations et fous rires ; mes seconds compagnons de bureau : Pauline, Camille, Oya, Justine et Florent pour ces bons moments, ces cactus et les mardis gras.

Enfin, je remercie particulièrement ma famille, So et PauPau pour leur aide durant de nombreuses soirées, et leur soutien continu qui m'ont permis de ne jamais baisser les bras.

Liste des abréviations

4EBP1	Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein1
AAT	α -1-antitrypsine
ADNmt	ADN mitochondrial
AGO	Argonaute protein 2
aKG	α -cétoglutarate
Akt	RAC alpha-sérine/thréonine kinase
ALB	Albumine
ATF4	Activating transcription factor 4
ATP6	ATP synthase subunit a
BM-MSCs	Bone marrow mesenchymal stem cells
BMP4	Bone Morphogenetic protein
BSA	Bovine serum albumine
CHX	Cycloheximide
Ct	Cycle threshold
CYP3A4	Cytochrome P450 3A4
CYTB	Cytochrome b
DNMTs	ADN méthyltransférase
DRP1	Dynamin-related protein1
DSMO	Dimethyl sulfoxide
eIF	Eukariotic initiation factor
eIF2	Eukaryotic initiation factor 2
ERK	Extracellular signal regulated kinases
ERRa	Oestrogen related receptor α
ETC	Electron transport chain
FOXA1	Hepatocytes nuclear factors 3a
FOXA2	Hepatocyte nuclear factor 3b
GATA4	GATA binding protein 4
GATA6	GATA binding protein 6
GCN2	General control nonderepressible 2
GSK3b	Glycogen synthase kinase 3 b
HMTs	Histones méthyltransférases
HNF1a	Hepatocytes nuclear factor 1a
HNF4a	Hepatocyte nuclear factor 4a
HNFs	Hepatocytes nuclear factors
hPSCs	Human pluripotent stem cell
HRI	Heme-regulated eIF2 α regulator
HSP	Heavy strand promoter 1
iPSCs	Induced pluripotent stem cells
IRES	Internal ribosome entry site
ITAFs	IRES Trans-Acting Factors
JHDMs	Jumoji C domain demethylases
LAMTOR	Late endosomal/lysosomal adaptator and MAPK and mTOR activator

LDM	Liver differentiation medium
LRPPRC	Leucine rich pentatricopeptide protein
LSP	Light strand pormoter
MAPK	Mitogen activated protein kinase
Mixl1	Homeobox protein Mixl1
MIXL1	Homeobox protein Mixl1
mLst8	Mammalian lethal with SEC13 protein 8
MNF1	Mitofusine 1
MNF2	Mitofusine 2
mtCO1	Cytochrome c oxidase subunit 1
mtCO2	Cytochrome c oxidase subunit 2
mtHSP70	Mitochondrial heat shock protein 70
mTOR	Mammalian target of rapamycine
mtRPOL	ARN polymérase mitochondriale
mtTFA	Mitochondrial transcription factor A
ND1	NDAH ubiquinone oxidoreductase chain 1
ND2	NDAH ubiquinone oxidoreductase chain 2
NDUFB8	NADH deshydrogenase 1 beta subcomplex subunit 8
NDUFS6	NADH deshydrogenase iron-sulfur 6
NRF1	Nuclear respiratory factor 1
NRF2	Nuclear respiratory factor 2
Oct4	Octamer binding protein
ONECUT1	Hepatocyte nuclear factor 6, OC1
OPA1	Dynamin-like 120kDa protein
PBS	Phosphate Buffer Saline
PDCD4	Programmed cell death protein 4
PDK	Pyruvate déshydrogénase kinases
PDX1	Pancreatic and duodenal homeobox 1
PERK	Protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase
PFA	Paraformaldéhyde
PGC1a	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 (alpha)
PI3K	Phosphoinositol-3 kinases
PIB	Protease Inhibitor Buffer
PIC	Protease Inhibitor Cocktail
PKR	Protein kinase R
POLG	DNA polymerase gamma
PROX1	Prospero homeobox protein
RAPTOR	Regulatory associated protein of TOR1
Rheb	RAS homolog enriched in brain
RISC	RNA-induced silencing complex
ROS	Reactive oxygen species
RT	Room temperature
S6K1	Kinase S6
SDHB	Succinate deshydrogenase iron-sulfur subunit

SLIRP	Stem-loop interacting RNA binding protein
SOX17	Transcription factor SOX17
SUnSET	Surface sensing of translation
TACO	Translational activator of cytochrome c oxidase 1
TBP	TATA-box binding protein
TCA	Tricarboxylic acid
TCF7L2	Transcription factor 7-like 2
TEFM	Facteur de transcription d'élongation
TET	Ten-eleven translocation
TFB2M	Facteur de transcription mitochondriale B2
TLB	Triton lysis buffer
TOMM20	Translocase of outer mitochondrial membrane 20
TOP	5' oligopyrimidine tracts
TSC1/2	Tuberous sclerosis protein 1/2
UCP2	Mitochondrial uncoupling protein 2
UQCRC2	Cytochrome b-c1 subunit 2
Wnt3A	Wnt family member 3

Table des matières

I.	Introduction	6
1.	Ontogenèse du foie	7
2.	Modèles de différenciation hépatogénique.....	8
3.	Remodelage mitochondrial durant la différenciation	9
3.1.	Métabolisme	10
3.2.	Transcription et réplication de l'ADN mitochondrial	12
4.	Implication de la régulation traductionnelle sur la mitochondrie.....	13
4.1.1.	Régulation traductionnelle par la voie mTOR.....	14
4.1.2.	Régulation traductionnelle par eIF2 α	15
II.	Matériels et méthodes.....	17
1.	Culture cellulaire	17
2.	Différenciation hépatogénique (Boon et al., 2020)	17
3.	Extraction d'ARN, reverse transcription et qPCR.....	18
4.	Extraction d'ADNg et évaluation du nombre de copies d'ADNmt par cellule	18
5.	Extraction de protéines et WB.....	18
6.	Sunset	19
7.	Marquages en immunofluorescence	19
III.	Résultats	21
1.	Différenciation hépatogénique à partir d'iPSCs.....	21
1.1.	Morphologie	21
1.2.	Expression génique.....	21
2.	Biogenèse mitochondriale	22
2.1.	ADNmt	23
2.2.	Abondance des mitochondries via un marquage par immunofluorescence.....	23
2.3.	Transcrits codants pour des protéines mitochondriales	23
2.4.	Abondance des protéines mitochondriales	24
2.5.	PGC1 α et TCF7L2.....	26
3.	Régulation traductionnelle	27
3.1.	Traduction globale.....	27
3.2.	Voie eIF2 α	27
3.3.	Voie mTOR	28
IV.	Conclusion.....	33
V.	Références	34
VI.	Annexes	41

I. Introduction

Actuellement, diverses maladies hépatiques comme l'insuffisance hépatique aiguë ou encore des maladies chroniques du foie ne peuvent être traitées qu'avec une transplantation orthotopique de foie. Cependant, les listes d'attente sont longues et il y a un manque crucial de donneurs. L'utilisation de la thérapie cellulaire semble de plus en plus prometteuse pour le remplacement de divers tissus. Le développement de protocoles de différenciation, pour les types cellulaires composant le foie, reproductibles et robustes est important pour aller plus loin dans ces perspectives de traitements. De plus, une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents au développement d'un organe aussi complexe que le foie pourrait améliorer de futures thérapies (Si-Tayeb, Noto, et al., 2010; Blackford et al., 2019).

Le foie est composé de divers types cellulaires tels que les hépatocytes, les cellules endothéliales, les cellules de Kupffer, les cholangiocytes, les cellules de stellaires ou encore les « pit cells ». L'organisation et la communication entre ces cellules permettent au foie d'assurer de multiples fonctions comme : la détoxification, le stockage de glycogène, la régulation de la synthèse de cholestérol et son transport, le métabolisme de l'urée ainsi que la sécrétion de protéines du plasma comme l'albumine et des apolipoprotéines (Tanimizu et al., 2007; Si-Tayeb, Lemaigre, et al., 2010). Cet organe possède également une fonction endocrine par la sécrétion de diverses hormones (insulin-growth factor, angiotensinogène et thrombopoietine) ainsi qu'une fonction exocrine par la sécrétion de bile (Si-Tayeb, Lemaigre, et al., 2010).

Lors de diverses études, un remodelage mitochondrial a été observé durant différents types de différenciations comme l'endodermique (Ma et al., 2019), l'adipogénique (Drehmer et al., 2016) ou encore la différenciation neuronale et cardiaque (Bahat & Gross, 2019) et la différenciation hépatogénique (Wanet et al., 2014; Boon et al., 2020). Or, la biogenèse mitochondriale est connue pour être en partie régulée de façon traductionnelle (Zhang et al., 2016), comme ce sera détaillé plus loin dans cette introduction. De plus, il a été observé qu'une régulation traductionnelle est impliquée dans plusieurs types de différenciations cellulaires telles que : l'adipogénique de cellules souches mésenchymateuses (Spangenberg et al., 2013) et de cellules murines 3T3-L1 (Fromm-Dornieden et al., 2012), la neurogénique (Fujii et al., 2017; Liao et al., 2018) et la différenciation hépatique à partir de progéniteurs hépatiques HepaRG (Parent et al., 2007, 2008). Enfin, lors d'une étude transcriptomique réalisée dès le début du processus de biogenèse mitochondriale survenant lors de la différenciation hépatogénique, divers acteurs de la régulation traductionnelle ont été mis en évidence (Wanet et al., 2017; Boon et al., 2020). Le but de ce mémoire est donc d'étudier la différenciation hépatogénique, et plus précisément l'implication potentielle de la régulation traductionnelle dans le remodelage mitochondrial ayant lieu en début de différenciation.

Les différenciations se font à partir de cellules souches. Il existe différents types de cellules souches : les multipotentes, les pluripotentes, les totipotentes et les pluripotentes induites. Les cellules totipotentes sont capables de se différencier en un organisme entier avec les annexes extra-embryonnaires aussi. Les cellules pluripotentes ont la capacité de se différencier en trois types de feuillet embryonnaires différents mais pas de former les tissus extra-embryonnaires comme le placenta. Les cellules multipotentes sont issues de tissus fœtaux ou adultes et peuvent se différencier en un ou plusieurs types cellulaires, ce sont des cellules qui sont déjà engagées dans un type de feuillet germinatif. Les cellules pluripotentes induites sont des cellules adultes

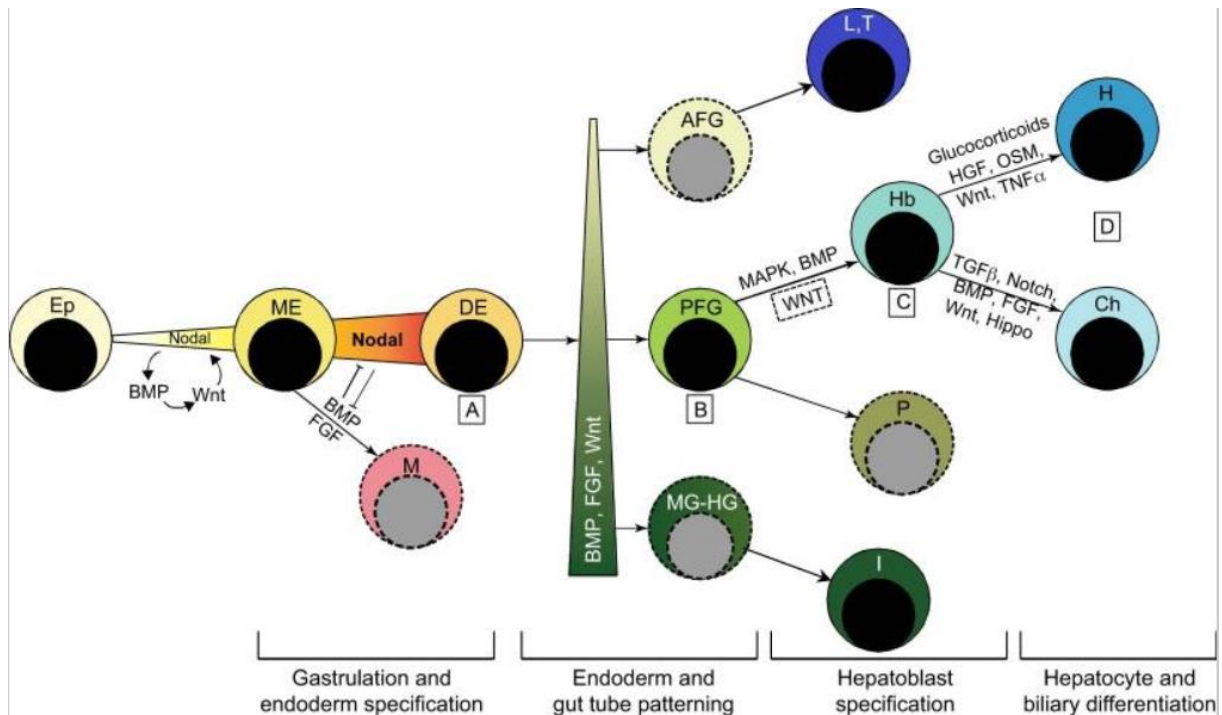


Figure 1: Schéma d'ensemble du développement du foie (Gordillo, Evans, & Gouon-Evans, 2015).

Lors du développement du foie, des points de transition sont passés (A-D). Tout d'abord, l'épiblaste se différencie en mésendoderme sous l'action combinée de signal Nodal, de BMP et de Wnt. (A), le mésendoderme subi une ségrégation en mésoderme et endoderme définitif (DE). (B), l'endoderme définitif est ensuite divisé en 3 parties : le tube digestif primitif haut, antérieur et postérieur. (C), c'est celui-ci qui va donner naissance aux progéniteurs pancréatiques et hépatiques. (D), Ces progéniteurs hépatiques ont un double potentiel de différenciation. En effet, ils sont capables de devenir soit des cholangiocytes, soit des hépatocytes.

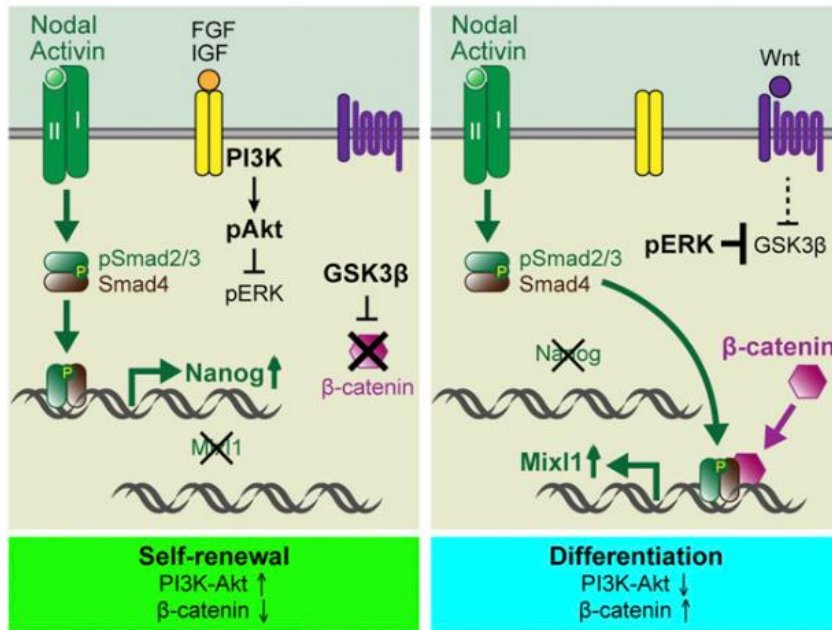


Figure 2: Réseau de signalisation entre l'Activine et les autres voies de signalisation dans les ESCs (Oshimori & Fuchs, 2012).

Nodal/Activine et l'action de la voie PI3K/Akt permettent le maintien de la propriété d'auto-renouvellement. Nodal/Activine induit l'activation de la voie canonique smad2/3 dont une cible principale est *Nanog*. L'activation de la voie PI3K/Akt, peut être effectuée grâce à des facteurs de croissance comme FGF et IGFs, menant à une augmentation de l'activité de ERK. Lorsque ce dernier n'est pas inhibé, il y a une suppression de l'activité GSK3β menant à une stabilisation de la β-catenine. Or, l'association de la de la β-catenine et de p-smad2/3-smad4 influence la transcription de gènes favorisant la différenciation des ESCs.

qui ont été reprogrammées, grâce à la surexpression de facteurs de transcription critiques de la pluripotence (Takahashi et al., 2006), pour présenter des caractéristiques de cellules embryonnaires comme la capacité d'auto-renouvellement et de pluripotence.

Dans cette introduction, l'ontogenèse du foie va d'abord être abordée, suivie d'une brève explication de différents modèles de différenciation hépatogénique. Ensuite, le remodelage mitochondrial va être développé avec une explication sur son métabolisme ainsi que la transcription et la réplication de l'ADN mitochondrial. Enfin, un dernier point sera consacré à la régulation traductionnelle et plus particulièrement la voie mTOR et eIF2 α .

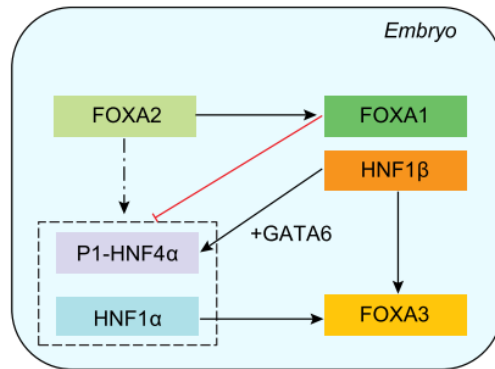
1. Ontogenèse du foie

Le développement du foie débute par la formation du bourgeon embryonnaire. Celle-ci commence par la transformation de l'épiblaste en mésendoderme suite à une activation du signal Nodal (**Figure 1**) (Gordillo et al., 2015). En effet, ce signal donné de l'épiblaste à l'ectoderme favorise l'expression de BMP4 (bone morphogenetic protein 4), qui une fois sur son récepteur sérine/thréonine kinase situé sur les cellules de l'épiblaste, induit l'expression de Wnt3 (Wnt family member 3) (Shen, 2007). Ensuite, une ségrégation du mésendoderme en mésoderme et endoderme a lieu grâce à une augmentation du signal Nodal favorisant l'expression de gènes spécifiques à l'endoderme comme SOX17 (transcription factor SOX17) (Tanimizu et al., 2007; Shen, 2007; Gordillo et al., 2015; Russell et al., 2018) (**Figure 2**). Cette augmentation de signal Nodal se fait grâce à l'action couplée de Nodal préexistant et de Wnt3. Le Nodal induit la phosphorylation de smad2/3 qui est alors capable de former un complexe avec phospho-smad4 (p-smad4). Le signal Wnt3 induit l'inhibition de GSK3 β (Glycogen synthase kinase 3 β), permettant à la β -caténine de se lier au complexe p-smad2/3/p-smad4 activant la transcription de Mixl1 (homemobox protein Mixl1) (Oshimori et al., 2012). Mixl1, est une homeoprotéine exprimée dans les progéniteurs mésendodermiques qui, en réponse à un signal Nodal élevé, induit l'expression de gènes spécifiques à l'endoderme comme SOX17 (Shen, 2007). En outre, l'endoderme exprime également les facteurs de transcription FOXA2 (hepatocyte nuclear factor 3 β) et GATA4/6 (GATA binding protein 4/6).

L'endoderme définitif est divisé en 3 domaines progéniteurs (le tube digestif primitif antérieur, moyen et postérieur). C'est à partir de la partie antérieure de ce tube digestif primitif que le foie est formé ainsi que le pancréas, l'estomac, les poumons et la thyroïde (Gordillo et al., 2015). Le bourgeon hépatique provient de l'épaississement associé à une migration et une différenciation des cellules de la partie ventrale du tube digestif primitif antérieur qui vont envahir le septum transverse (Gordillo et al., 2015). La partie latérale du mésoderme ainsi que les cellules mésenchymateuses présentes dans le septum transverse sécrètent du BMP4, ce qui régule l'expression de Wnt3.

Aux jours 56-58 de gestation chez l'homme, les cellules de l'endoderme définitif vont ensuite se transformer en progéniteurs hépato-pancréatiques. Ceux-ci expriment des facteurs de transcription comme SOX17 et Hhex (hematopoietically expressed homeobox). Ces progéniteurs présentent également une abondance plus élevée de FOXA2 et GATA4/6. Ensuite, ces cellules vont générer deux lignages cellulaires : des progéniteurs pancréatiques exprimant PDX1 (pancreatic and duodenal homeobox 1) et des hépatoblastes caractérisés par l'expression de HNF1 β (hepatocyte nuclear factor 1 β) et HNF4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α) (Shin et al., 2013; Gordillo et al., 2015; Ober et al., 2018). Les hépatoblastes commencent également à

A HNF regulatory network in the developing embryo



B HNF regulatory network in the liver

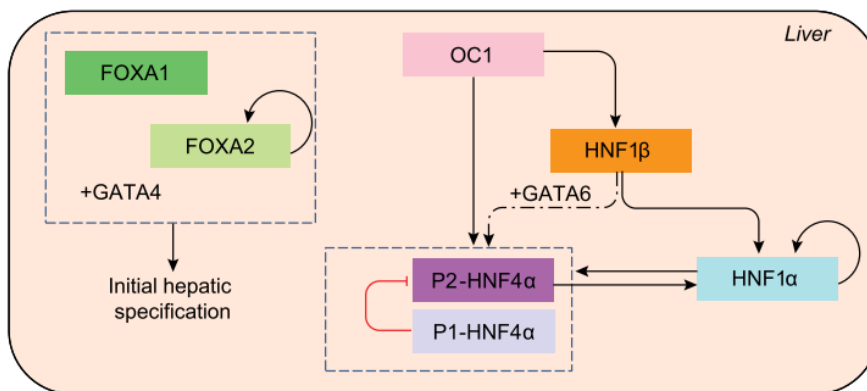


Figure 3: Schéma récapitulatif du réseau de régulation des HNFs (Lau et al., 2018).

(A) Réseau de régulation des HNFs dans les stades précoces du développement du foie. FOXA2 induit l'expression de FOXA1. Celui-ci régule négativement l'expression génique de HNF4α et HNF1α. FOXA3 est régulé positivement par HNF1α et HNF1β. Ce dernier, en association avec GATA6, régule également HNF4α. (B) régulation des HNFs dans le foie. FOXA1, FOXA2 et GATA4 sont impliqués dans la spécification hépatique. FOXA2 est capable de s'auto-réguler. OC1 régule positivement HNF1β et HNF4α. HNF1β se lie ensuite au promoteur de HNF4α et HNF1α.

exprimer des marqueurs plus spécifiques du foie comme : l'alpha-foetoprotéine, l'albumine (ALB) ainsi que la transthyréline (Shin et al., 2013). L'albumine est produite par le foie et sert de transport pour diverses substances comme des enzymes, des vitamines ou des hormones. Elle possède également une fonction de régulateur osmotique dans le sang. L'alpha-foetoprotéine est un analogue de l'albumine chez le fœtus et est détectée dans le sang d'une femme enceinte. La transthyréline est une protéine de transport de la vitamine A et de la thyroxine.

Vient ensuite la spécification hépatique avec une différenciation des hépatoblastes en 2 types cellulaires, soit en cholangiocytes, soit en hépatocytes. Ces derniers présentent une expression spécifique de PROX1 (prospero homeobox protein 1) et d'HNF4α. Enfin, les hépatocytes subissent une maturation où ils expriment de façon plus importante certains marqueurs fonctionnels tels que l'albumine et une diminution de l'expression d'alpha-foetoprotéine (Tanimizu et al., 2007; Lemaigre, 2009; Shin et al., 2013; Gordillo et al., 2015).

Lors du développement hépatique, plusieurs protéines de types HNFs sont impliquées. Les HNFs sont des facteurs de transcriptions qui sont classés en 4 familles : les HNF1, FOXA, HNF4 et ONECUT ; chacun possédant des régions distinctes en lien avec leur domaine fonctionnel (Lau et al., 2018). Les HNF1 (α et β) agissent en tant qu'hétérodimères ou homodimères (Lau et al., 2018). FOXA1, 2 et 3 agissent sous forme monomérique. Les HNF4 (α et γ) activent la transcription de gène de manière ligand-dépendante (Lau et al., 2018). Tous ces HNFs font partie d'un réseau de régulation (**Figure 3**). FOXA2 agit en amont de ce réseau de régulation transcriptionnelle car il est impliqué dans l'activation d'expression de FOXA1 (hepatocyte nuclear factor 3α), HNF4α et HNF1α (hepatocyte nuclear factor 1α). FOXA1 a un rôle opposé à FOXA2 puisqu'il réprime l'expression d'HNF4α et HNF1α. De plus, il y a une compétition entre FOXA1 et 2 pour des sites de liaison. FOXA3, quant à lui, est impliqué plus tard dans le développement hépatique étant donné que sa transcription est activée par HNF1α et HNF1β (Lau et al., 2018). La forme beta régule l'expression de gènes dans les premières étapes du développement (au niveau de l'endoderme et de la spécification hépatique) tandis que la forme alpha régule les étapes ultérieures. La forme alpha n'est donc pas un activateur précoce de la transcription d'HNF4α contrairement à la forme β qui l'est lorsqu'elle s'associe à GATA6 (Lau et al., 2018). Chez l'adulte par contre, HNF1α coopère avec ONECUT 1 (hepatocyte nuclear factor 6, OC1) pour réguler l'expression d'HNF4α dans les cellules hépatiques. De plus, HNF4α se lie au promoteur d'HNF1α et celui-ci est également capable de s'autoréguler. Enfin, l'expression de FOXA1 et 2 est primordiale pour le développement des hépatocytes puisque ces facteurs de transcription, en association avec GATA4, induisent l'expression de l'albumine permettant ainsi la spécification hépatique (Lau et al., 2018).

2. Modèles de différenciation hépatogénique

La différenciation hépatogénique peut se faire à partir de différents types de cellules souches telles que des hPSCs (human pluripotent stem cells) (Heidariyan et al., 2018), des hESCs (human embryonic stem cells) (Hay et al., 2007), des BM-MSCs (bone marrow mesenchymal stem cells) (Wanet et al., 2014) ou encore des iPSCs (induced pluripotent stem cells) (Song et al., 2009; Si-Tayeb, Noto, et al., 2010; Chen et al., 2012; Boon et al., 2020). Lors de la différenciation hépatogénique à partir de BM-MSCs, il a été observé qu'un remodelage mitochondrial apparaît au cours de la différenciation accompagné d'un shift métabolique en faveur d'un métabolisme oxydatif (Wanet et al., 2014). Ce shift oxydatif a également été

observé dans le modèle iPSCs (Boon et al., 2020). Au cours de ce travail, ce sont les modèles de différenciation à partir de BM-MSCs et d'iPSCs qui vont être abordés.

La différenciation hépatogénique à partir de BM-MSCs a été étudiée dans notre laboratoire (Wanet et al., 2014). Ces cellules sont multipotentes, elles sont engagées dans la lignée mésodermique. Or, la différenciation hépatogénique est naturellement issue de la lignée endodermique. Cependant, ces cellules sont capables de se trans-différencier en hépatocytes suite à l'exposition à diverses cytokines, facteurs de croissance et cofacteurs. Le protocole utilisé dans cette différenciation comporte 3 phases. Les 2 premiers jours sont consacrés à une expansion cellulaire, les 2 périodes suivantes de 10 jours permettent respectivement l'induction et la maturation hépatique. Cependant, ce modèle présente certains inconvénients tels qu'une hétérogénéité de réponse au sein de la population cellulaire et une quantité de matériel limité. En effet, l'efficacité de la différenciation diminue avec le nombre de passages. Or, pour certaines techniques, telle que le polysome profiling, une grande quantité de matériel est requise. Pour avoir la quantité de matériel nécessaire, le sixième passage cellulaire est dépassé et, passé cette étape, ces cellules ne montrent pas une différenciation hépatogénique efficiente. De plus, cette dernière présente une grande variabilité entre les différents donneurs. Pour pallier, à ces problèmes, il a été décidé de changer de modèle cellulaire pour utiliser celui des iPSCs. En effet, ces cellules ont une capacité plus importante à produire du matériel, elles ne sont pas affectées par de nombreux passages et étant une lignée cellulaire, il n'y a pas de variabilité inter-individus. De plus, étant pluripotentes, leur différenciation hépatogénique est plus proche de la réalité.

Le protocole de différenciation hépatogénique à partir d'iPSCs utilisé lors de ce mémoire est celui du laboratoire du Professeur C. Verfaillie (KULeuven) (Boon et al., 2020). Ce protocole présente 2 particularités. La première est que les cellules iPSCs ont été génétiquement modifiées pour insérer 3 gènes inductibles à la doxycycline (*HNF1α*, *FOXA3* et *PROX1*) ; ces 3 facteurs de transcriptions permettent la transcription de transcrits spécifiques du foie. Ces 3 facteurs ont été choisis suite à une analyse transcriptomique comparant les cellules hépatocyte-like obtenues à la fin du protocole classique basé sur l'exposition d'iPSCs à divers cocktails cytokiniques (Roelandt et al., 2013) avec des hépatocytes humains primaires (Boon et al., 2020). La deuxième particularité est la forte concentration en acides aminés ajoutée au milieu de culture. Cela a été motivé par l'analyse du milieu de culture d'hépatocytes primaires humains qui a montré une forte déplétion en acides aminés (Boon et al., 2020). Suite à ces 2 améliorations du protocole de différenciation, la maturation hépatique s'en trouve améliorée avec un plus haut taux d'expression et de sécrétion d'albumine, une expression plus élevée d'alpha-1-antitrypsine (AAT) et de cytochrome P450 3A4 (CYP3A4), une enzyme produite par le foie importante pour le métabolisme de médicaments (Boon et al., 2020).

3. Remodelage mitochondrial durant la différenciation

Lors de l'étude réalisée sur la différenciation hépatogénique de BM-MSCs, il a été montré que le réseau mitochondrial est plus fragmenté dans les cellules différenciées par rapport aux cellules souches (Wanet et al., 2014), contrairement aux autres types de différenciation telles que la différenciation adipocytaire (Uldry et al., 2006), myogénique (Fortini et al., 2016) ou encore ostéogénique (Chen et al., 2008). Les auteurs ont également observé une augmentation de l'abondance mitochondriale au jour 5 de la différenciation caractérisée par : une

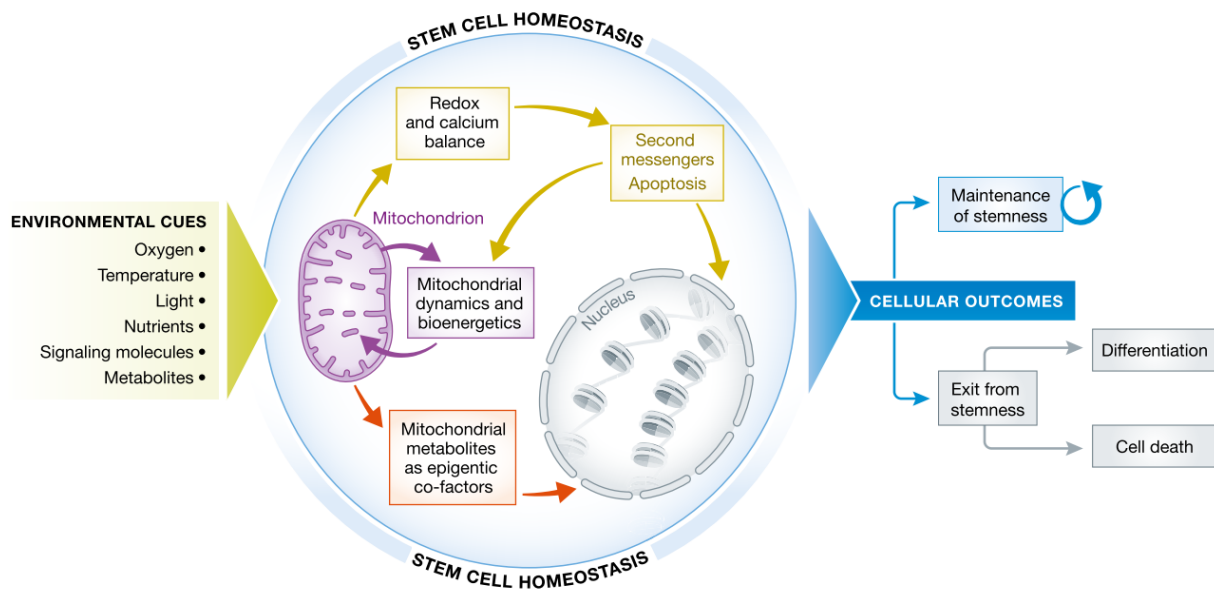


Figure 4 : Régulation mitochondriale de l'homéostasie des cellules souches (Lisowski, Kannan, Mlody, & Prigione, 2018).

En réponse à divers facteurs environnementaux, les mitochondries subissent un remodelage à différents niveaux : la morphologie du réseau mitochondrial et la bioénergétique (mauve), l'état d'oxydation (vert) et le paysage épigénétique (orange). Les conséquences de ce remodelage sont doubles, soit il y aura un maintien de leur état « souche », soit il y aura une sortie de cet état. La sortie de l'état « souche » peut également aller dans 2 directions différentes : la différenciation ou la mort cellulaire.

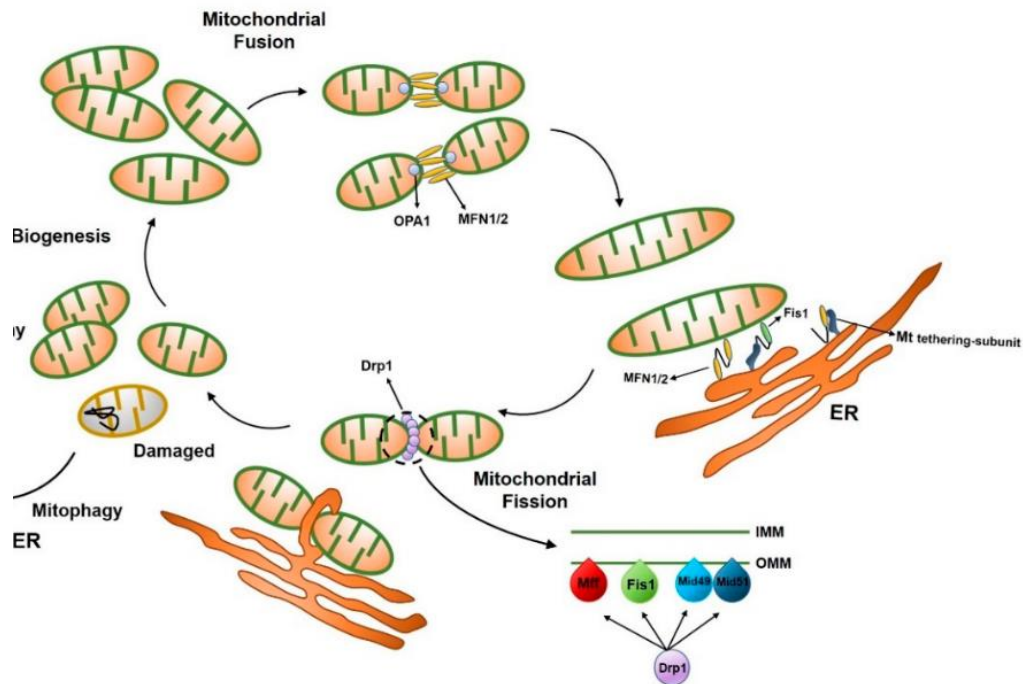


Figure 5 : Processus de fusion et fission mitochondriales (Seo, Yoon, & Do, 2018).

Les mitochondries changent de morphologie suite à un cycle de fusion et de fission. Les principaux acteurs de la fusion sont : Opa1, Mfn1 et Mfn2, qui permettent un lien entre la membrane mitochondriale interne (IMM) et externe (OMM). Pour la fission la protéine la plus importante est Drp1, formant une structure en anneau au point de contact avec le réticulum endoplasmique. Drp1 possède divers adaptateurs à l'OMM : Fis1, Mid49 et Mid51.

augmentation du nombre de copies d'ADNmt, un rapport de surface mitochondrie/cytoplasme plus élevé, ainsi qu'une augmentation de l'abondance de protéines mitochondriales comme mtHSP70 (mitochondrial heat shock protein 70), mtCO2 (cytochrome c oxidase subunit 2), COX4 (cytochrome c oxidase subunit 4) et ATPsynthase α (ATP5 α) dans les cellules différenciées. Ils ont aussi mis en évidence la présence d'un shift métabolique passant le glycolytique à oxydatif (Wanet et al., 2014). Cette biogenèse mitochondriale est un phénomène précoce dans le processus de différenciation, dont la durée totale est de 22 jours. Une analyse transcriptomique a donc été réalisée aux jours 3 et 5, correspondant au début du remodelage mitochondrial (Wanet et al., 2017). Les résultats montrent une induction de PGC1 α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha) dans la condition différenciation aux jours 3 et 5. Or, PGC1 α interagit avec plusieurs régulateurs transcriptionnels impliqués dans la biogenèse mitochondriale (NRF2 (Nuclear respiratory factor 2) et ERR α (oestrogen related receptor α)) et la différenciation hépatique (comme : HNF4 α , FOXO1 et le récepteur au glucocorticoïdes) (Wanet et al., 2017). Le modèle de différenciation hépatogénique à partir d'iPSCs étudié dans ce travail, présente également un remodelage mitochondrial avec shift métabolique en faveur d'un métabolisme oxydatif, mais également une augmentation d'expression de PGC1 α (Boon et al., 2020). Un des objectifs de ce travail est donc de caractériser la dynamique du remodelage mitochondrial présent dans cette différenciation hépatogénique à partir d'iPSCs.

3.1.Métabolisme

Durant la différenciation hépatogénique, un remodelage mitochondrial ainsi qu'un shift métabolique en faveur d'un métabolisme oxydatif est observé aussi bien dans le modèle de différenciation hépatogénique de BM-MSCs que dans le modèle de différenciation hépatogénique d'iPSCs (Wanet et al., 2014; Boon et al., 2020). Ce métabolisme oxydatif permet de transférer des électrons du NADH et FADH₂, à l'oxygène, ce qui induit une accumulation de H⁺ dans l'espace intermembranaire et donc un gradient électrochimique. Ce phénomène est possible grâce à la chaîne de transport d'électrons se trouvant dans cette membrane interne. Les points d'entrée des électrons sont le complexe I (NADH ubiquinone oxidoreductase) et le complexe II (succinate deshydrogenase - SDH). Les deux autres complexes de cette chaîne sont le complexe III (co-enzyme Q) et le complexe IV (cytochrome c oxydase). L'ATP synthase, parfois considérée comme une cinquième complexe, utilise le gradient pour former de l'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique (Barros et al., 2020).

Les mitochondries jouent un rôle essentiel dans ces différenciations. En effet, elles influencent le devenir cellulaire grâce à leur dynamique, leur bioénergétique, leur capacité de régulation des ROS (reactive oxygen species) ainsi que leur lien avec l'épigénétique (**Figure 4**) (Lisowski et al., 2018).

Premièrement, la dynamique mitochondriale est une séquence répétée de fission et de fusion d'un réseau interconnecté de mitochondries (**Figure 5**). Généralement, plus ce réseau est réticulé, plus les cellules sont actives et donc ont un besoin énergétique plus élevé et principalement une production de celle-ci par le métabolisme OXPHOS. Par contre, pour les cellules quiescentes, métaboliquement moins actives, on observe des mitochondries plus sphériques et donc moins connectées (Lisowski et al., 2018; Seo et al., 2018). Un changement vers un métabolisme glycolytique s'accompagne d'une activation de DRP1 (dynamin-related protein1), permettant la fission mitochondriale, tandis qu'un changement vers un métabolisme

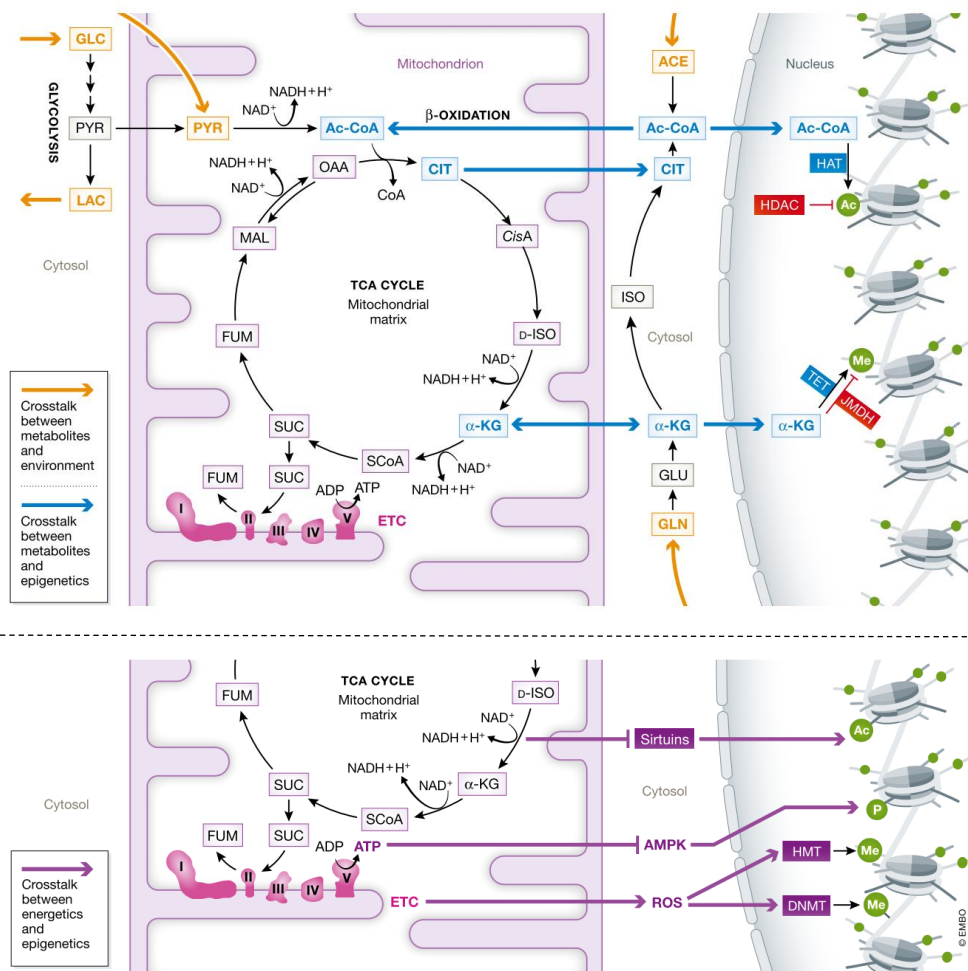


Figure 6 : Représentation des interactions entre le métabolisme mitochondrial et les mécanismes de régulation de la chromatine (Lisowski et al., 2018).

En orange, sont représentées les interactions avec le milieu extracellulaire, en bleu, les métabolites mitochondriaux impliqués dans ces interactions et en mauve, les interactions entre bioénergétique et épigénétique.

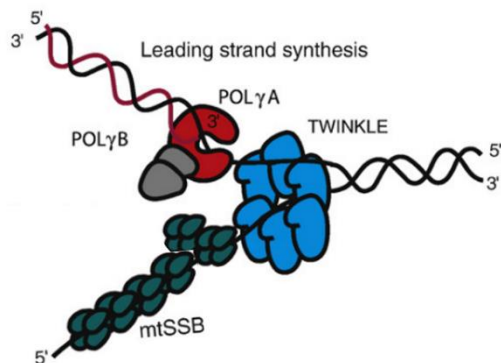


Figure 7 : schéma de l'initiation de la réplication de l'ADNmt (Wanrooij & Falkenberg, 2010).

L'hélicase TWINKLE (en bleu) sépare les deux brins d'ADNmt en se déplaçant de 5' vers 3'. mtSSB (en vert foncé) stabilise les brins en conformation simple brin et stimule la synthèse d'ADN par la polymérase POL γ (en rouge et gris).

oxydatif induira l'expression des protéines MFN1 et 2 (mitofusin 1 et 2) et OPA1 (dynamin-like 120kDa protein) (Lisowski et al., 2018; Bahat et al., 2019). Les cellules souches présentent un métabolisme principalement glycolytique, alors que la glycolyse est moins efficace en termes de production d'énergie. Cependant, cela serait lié à leur besoin élevé en précurseurs provenant de ce métabolisme et de la voie des pentoses phosphates pour maintenir leur niveau de prolifération (Wanet et al., 2015; Lisowski et al., 2018; Yu et al., 2018). De plus, UCP2 (mitochondrial uncoupling protein 2) est également plus élevé dans les hPSCs (human pluripotent stem cells), cette protéine est impliquée dans le transport des métabolites (malate, oxaloacétate, aspartate) (Cunningham et al., 2020) hors de la mitochondrie, favorise la glycolyse et la formation de nucléotides par la voie des pentoses phosphates ce qui régule l'oxydation du glucose (Wanet et al., 2015; Lisowski et al., 2018; Seo et al., 2018). Enfin, une expression élevée de transcétolase dans les PSCs est aussi observée, cette molécule relie la glycolyse des pentoses phosphates étant donné qu'elle permet la formation de fructose-6P et glycéraldéhyde-3P à partir de xylulose-5P et erythrose-4P (Wanet et al., 2015).

Deuxièmement, le métabolisme connecte les signaux environnementaux avec la transcription (Lisowski et al., 2018). En effet, les métabolites produits par le cycle TCA (tricarboxylic acid) induisent une régulation de la chromatine en agissant comme substrats ou co-facteurs d'enzymes de modification de la chromatine (Lisowski et al., 2018; Bahat et al., 2019) (**Figure 6**). Un de ces métabolites est le citrate. Celui-ci, une fois exporté hors de la mitochondrie, peut être converti, grâce à la citrate lyase, en acétyl-CoA. Celui-ci est un donneur groupe acétyl lors de l'acétylation d'histones, menant à une activation transcriptionnelle. Dans les cellules non-différenciées, il y a un taux plus élevé de pyruvate déshydrogénase kinases (PDK), inhibitrices de l'activité du complexe pyruvate deshydrogenase, favorisant la glycolyse induisant une entrée plus faible de pyruvate dans le cycle TCA, ce pyruvate restant dans le cytosol sera converti en lactate (Wanet et al., 2015; Lisowski et al., 2018; Bahat et al., 2019). Un autre métabolite primordial est l' α -cétoglutarate (α KG) qui est exporté dans le cytosol. L' α KG est capable d'entrer dans le noyau où il sert de substrat à la protéine TET (ten-eleven translocation) lors de la méthylation de l'ADN, menant à une répression transcriptionnelle. De plus, ce métabolite sert également de substrat aux protéines JHDMs (jumoji C domain demethylases) catalysant la déméthylation d'histones, menant soit à une activation, soit à un silencing de gènes (Lisowski et al., 2018; Bahat et al., 2019). Le taux de méthylation génomique a une influence sur le nombre de copies d'ADNmt. En effet, dans les PSCs le taux de répllication d'ADNmt est bas dû à une faible expression de l'ADN polymérase mitochondriale (POLGA, DNA polymerase gamma) grâce à une hyperméthylation d'un de ses exons (Lisowski et al., 2018; Bahat et al., 2019).

Enfin, la modulation des ROS (par la mitochondrie influence le devenir cellulaire. La préférence glycolytique des cellules souches permet un taux réduit de ROS. Or, ceux-ci détériorent les composants cellulaires dont le matériel génétique. En particulier, l'ADNmt est très sensible aux ROS étant donné l'absence d'histones et la proximité avec ces radicaux libres, majoritairement produits par la chaîne de transporteurs d'électrons (Wanet et al., 2015; Lisowski et al., 2018; Yu et al., 2018; Bahat et al., 2019). Le stress oxydatif peut également influencer le paysage épigénétique de la cellule par des oxydations d'ADN méthyltransférase (DNMTs), d'histones méthyltransférases (HMTs) ou directement de bases nucléotidiques (Lisowski et al., 2018; Bahat et al., 2019). De plus, les ROS peuvent agir comme messenger secondaire en ciblant une réponse cellulaire impliquant l'expression de NRF2 (nuclear

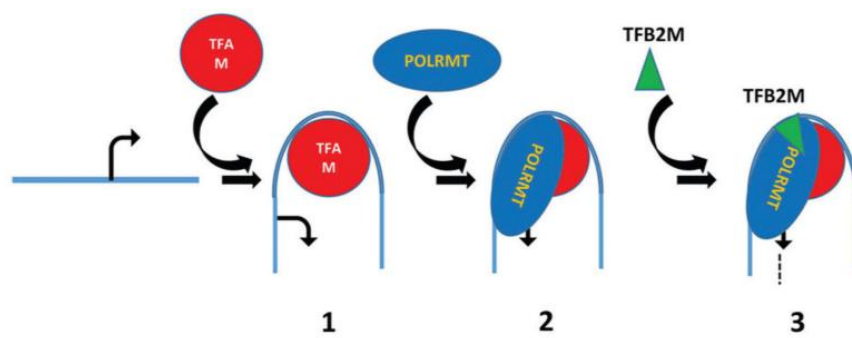


Figure 8 : Schéma de l'initiation de la transcription de l'ADNmt (Shokolenko & Alexeyev, 2017).

mtTFA ou TFAM se lie à un site de haute affinité en amont du promoteur. Ensuite, POLRMT est recruté au complexe TFAM/ADNmt. Enfin, TFB2M vient s'associer au complexe TFAM/ADNmt/POLRMT afin de former un complexe tertiaire capable d'initier la transcription de l'ARN.

respiratory factor 2) influençant la pluripotence et le devenir cellulaires de cellules souches (Lisowski et al., 2018; Dai et al., 2020).

3.2. Transcription et réplication de l'ADN mitochondrial

L'ADN mitochondrial (ADNmt) humain est composé d'un double brin circulaire de ~16 600 paires de bases. Ce génome mitochondrial ne contient pas d'introns et code pour 22 ARNt, 2 ARNr et 13 protéines de la chaîne respiratoire. Une région non codante, la boucle D, contient des éléments de contrôles de la réplication et la transcription de l'ADNmt (Asin-Cayuela et al., 2007; Gustafsson et al., 2016; DeBalsi et al., 2017; Falkenberg, 2018).

La réplication de l'ADNmt est distincte de celle de l'ADN génomique (**Figure 7**). La polymérase utilisée est la DNA polymérase gamma (POLG), composée de plusieurs sous-unités. La sous-unité alpha est la sous-unité catalytique. En outre, elle joue également un rôle de relecture pour vérifier (Gustafsson et al., 2016), grâce à son domaine exonucléase 3' - 5', le brin néosynthétisé. La sous-unité beta promeut l'interaction avec le brin guide et augmente l'activité catalytique de l'alpha (Shi et al., 2016; Falkenberg, 2018). Une autre protéine impliquée dans la réplication de l'ADNmt est la DNA hélicase TWINKLE, permettant le passage de POLG. mtSSB (mitochondrial single-stranded DNA-binding protein) sont des protéines qui se disposent autour du simple brin parental pour le stabiliser et pour le protéger d'une synthèse d'ARN aléatoire par mtRPOL (Gustafsson et al., 2016; Shi et al., 2016; Falkenberg, 2018). mtTFA (mitochondrial transcription factor A) a aussi un rôle dans cette réplication car il est impliqué dans la compaction de l'ADNmt (Wanrooij et al., 2010). En effet, l'ADNmt se trouve sous forme de nucléoïde, c'est-à-dire empaqueté dans un complexe de nucléoprotéines et mtTFA y est la plus représentée. mtTFA contient 2 sites de liaison à l'ADNmt (non séquence spécifique) et forme des boucles induisant la compaction (Falkenberg, 2018). Enfin, cette réplication est localisée au niveau des points de contact entre la mitochondrie et le RE, là où la fission mitochondriale a lieu (Falkenberg, 2018; Tilokani et al., 2018).

La transcription de protéines encodées par l'ADNmt (**Figure 8**) est différente de la transcription des protéines codées par l'ADN nucléaire. Cela commence par la liaison de mtTFA à des sites de haute affinité situés en amont des promoteurs HSP1 (heavy strand promoter 1) et LSP (light strand promoter) (Shokolenko et al., 2017). Ensuite, l'ARN polymérase mitochondriale (mtRPOL) est recrutée grâce à une interaction avec le domaine C terminal de mtTFA (Asin-Cayuela et al., 2007; Shokolenko et al., 2017). Le complexe d'initiation se forme par l'ajout du facteur de transcription mitochondrial B2 (TFB2M), une protéine induisant des modifications structurales de mtRPOL permettant le recrutement du promoteur au site catalytique de mtRPOL. À l'ajout du facteur de transcription mitochondrial d'élongation (TEFM), l'élongation de l'ARNm peut poursuivre et TFB2M est dissocié.

Suite à la caractérisation du remodelage mitochondrial réalisée sur le modèle de différenciation hépatogénique de BM-MSCs, il a été montré que le processus de biogenèse mitochondriale débute dès le jour 5 du programme de différenciation *in vitro* qui en compte 22. Comme mentionné précédemment, une analyse transcriptomique a donc été effectuée aux jours 3 et 5 (Wanet et al., 2017). Les résultats montrent également des changements au niveau de transcrits associés à la fonction de traduction, comme un enrichissement des gènes associés aux

ribosomes y compris des ribosomes mitochondriaux. De plus, une surexpression de certains facteurs impliqués dans des voies de régulation de la traduction comme eIF2 (eukaryotic initiation factor2) et mTOR (mammalian target of rapamycin) a été mise en évidence (Wanet et al., 2017). 4EBP1 (eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein1), un inhibiteur de la traduction cap-dépendante, présente également une diminution en début de différenciation. Enfin, l'expression en ARNm et l'abondance protéique de certaines protéines mitochondriales telles que mtHSP70 (une protéine chaperonne, dont la traduction est régulée de façon cap-dépendante), ne sont pas en adéquation ; c'est-à-dire que le niveau de transcrit n'est pas modifié durant la différenciation alors que son abondance protéique est augmentée (Wanet et al., 2017). Dans le modèle de différenciation hépatogénique à partir d'iPSCs, une analyse transcriptomique a également été réalisée et en plus de la biogenèse mitochondriale, un enrichissement des acteurs de la voie mTOR, de la voie eIF2a, ainsi que la traduction globale ont été mis en évidence (Boon et al., 2020). Un autre objectif de ce travail est de caractériser la traduction globale ainsi que les voies de régulation mTOR et eIF2a.

4. Implication de la régulation traductionnelle sur la mitochondrie

La traduction est le processus de la synthèse protéique. Celle-ci étant fortement énergivore, la production d'énergie par la mitochondrie doit s'adapter en fonction des demandes (Morita et al., 2015). Cette adaptation se traduit par exemple par un changement au niveau du métabolisme en faveur d'un métabolisme oxydatif. De plus, un lien existe entre la traduction et la phosphorylation oxydative dans les cellules mammaliennes (Morita et al., 2013). En effet, mTORC1 régule la biogenèse et l'activité mitochondriale par l'inhibition de 4EBP1 ce qui promeut la traduction d'ARNm (provenant de l'ADN nucléaire) codant pour des protéines mitochondriales. Cette augmentation de traduction nécessite une augmentation de la capacité de production d'énergie (Morita et al., 2013).

Dans le but d'évaluer la potentielle implication de la régulation traductionnelle dans le processus de biogenèse mitochondriale ayant lieu durant la différenciation hépatogénique, le même modèle *in vitro* de BM-MSCs a été utilisé. Pour avoir une indication sur l'intensité de traduction des transcrits, une analyse de profil polysomal (« polysome profiling ») était prévue ; c'est une méthode permettant de récupérer plusieurs fractions de polysomes en fonction du nombre de ribosomes liés à l'ARNm. Ces fractions peuvent ensuite être analysées par RNAseq afin de déterminer quels ARNm sont plus traduits dans une condition donnée (Faye et al., 2014). Cependant, cette technique requiert beaucoup de matériel et, suite aux inconvénients cités précédemment, cela n'était pas possible avec le modèle avec les BM-MSCs. C'est pourquoi nous avons opté pour le modèle de différenciation hépatogénique à partir d'iPSCs.

Cette synthèse protéique peut s'effectuer par 2 processus différents : la traduction cap-dépendante et indépendante. Lors de cette dernière, l'attachement du ribosome à l'ARNm se fait par une séquence IRES (internal ribosome entry site). Cette dernière est capable de recruter le ribosome dans l'ARNm plutôt qu'à l'extrémité 5' (Pichon et al., 2012; Kwan et al., 2019). Ces séquences IRES sont variables en termes de structure et de taille (entre 9 et >1000 nucléotides). Les ARNm présentant un site IRES ne constituent qu'une petite partie (10%) des ARNm mammaliens. Ceux-ci codent pour des protéines impliquées dans la mitose, dans les étapes précoces du développement, mais aussi pour des protéines impliquées dans les réponses à divers stress cellulaires (comme l'hypoxie, une infection virale, l'apoptose ou encore un

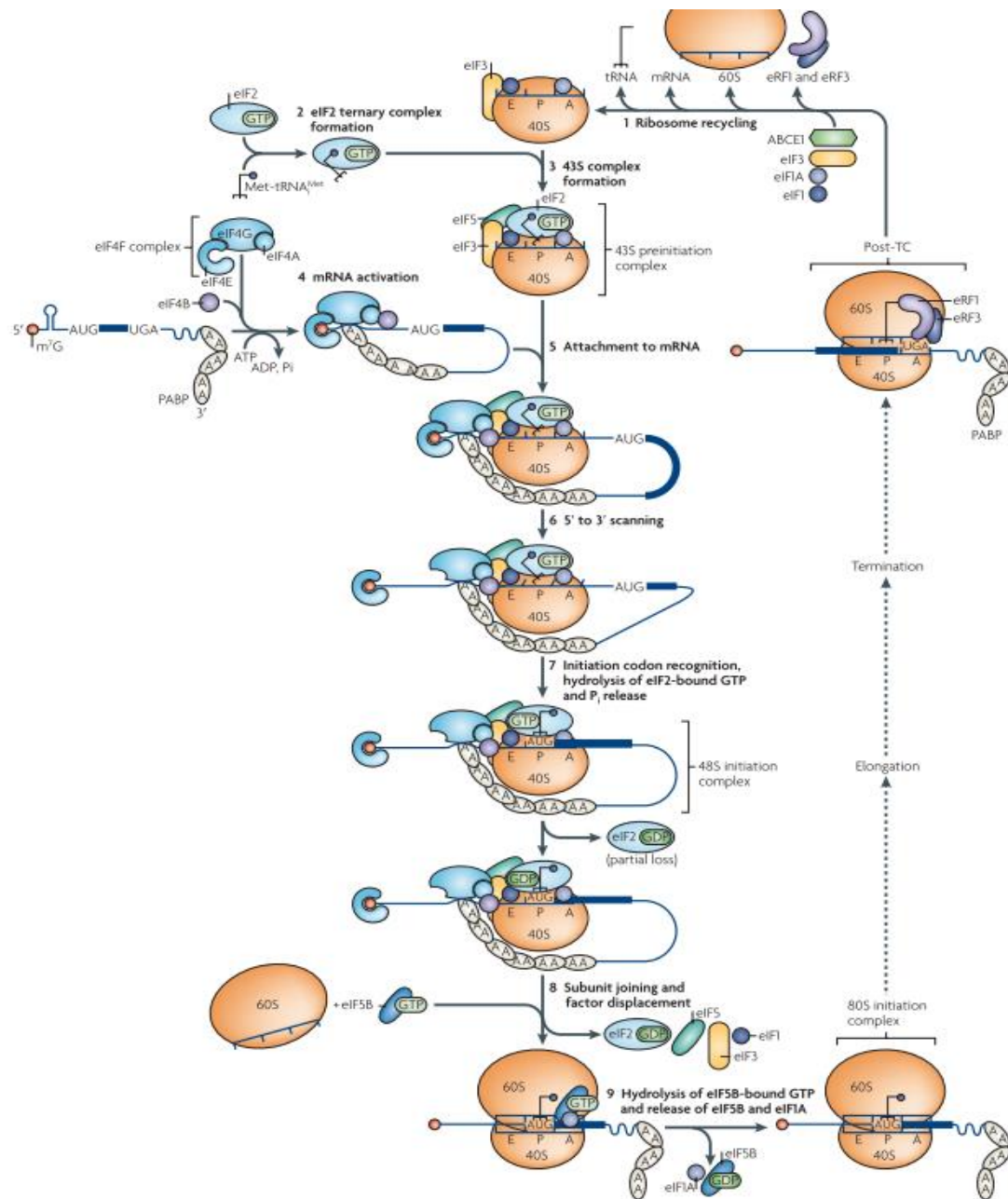


Figure 9 : Représentation de l'initiation de la traduction cap-dépendante (Jackson, Hellen, & Pestova, 2010).

L'initiation de la traduction cap-dépendante se déroule en 8 phases (2-9). Ces phases sont possibles suite au recyclage de complexes post-terminaison (post-TCs ;1) pour avoir les sous-unités 40S et 60S séparées. (2) Formation du complexe eIF2-GTP-tRNA^{Met}. (3) formation du complexe de préinitiation 43S contenant les sous-unités 40S, eIF1, eIF1A, eIF3, eIF5 et eIF2-GTP-tRNA^{Met}. (4) Les complexes 43S se lie à l'ARNm. (6) Le complexe 43S scanne la région 5'UTR en direction 3'. (7) Le codon d'initiation est reconnu et donc le complexe d'initiation 48S se forme. En passant de 43S à 48S, le complexe se rapproche du brin d'ARNm, ce qui libère eIF1 et permet l'hydrolyse du lien eIF2-GTP par eIF5. (8) Celui-ci permet également l'association de la sous-unité 60S et la libération d'eIF2-GDP, eIF1, eIF3, eIF4, eIF4F et eIF5. (9) Enfin, il y aura une dissociation d'eIF1A et eIF5B-GDP et la formation d'un complexe 80S compétent à l'élongation.

manque de nutriments) (Kwan et al., 2019). Beaucoup de ces ARNm contenant une séquences IRES peuvent être traduit de façon cap-dépendante et changer pour une traduction IRES lors de stress cellulaires. De plus, ce processus utilise des facteurs d'initiation qui lui sont propres. Ceux-ci sont des ITAFs (IRES Trans-Acting Factors), des protéines de liaison à l'ARN qui aident à l'initiation de la traduction en se liant directement à la sous-unité 40S du ribosome. (Pichon et al., 2012; Kwan et al., 2019; Yang et al., 2019).

La traduction cap-dépendante se passe en 3 étapes : l'initiation, l'élongation et la terminaison. L'initiation (**Figure 9**) requiert la formation du ribosome 80S par l'association des sous-unité 60S et 40S. Cette association nécessite la formation du complexe de préinitiation 43S contenant la sous-unité 40S associée à eIF3, eIF1A, eIF1, eIF5 et eIF2-GTP-Met-tRNA (Sonenberg et al., 2009; Jackson et al., 2010; Kanai et al., 2019). D'abord eIF1A, eIF1 et eIF3 sont recrutés à la sous-unité 40S puis, seulement l'eIF2-GTP-Met-tRNA est lié (Sonenberg et al., 2009; Hershey et al., 2018). Ce complexe de préinitiation 43S se lie à la coiffe à l'extrémité 5'UTR de l'ARNm grâce au complexe eIF4F. Ce dernier comprend eIF4E, une protéine d'attachement à la coiffe ; eIF4G, une protéine scaffold du complexe ; eIF4A, une RNA hélicase ; eIF4H stimulant l'activité hélicase d'eIF4A ; et eIF4B, une GTPase permettant une activation d'eIF2. Le rôle de ce complexe eIF4F est donc de préparer l'ARNm à l'attachement ribosomal (Sonenberg et al., 2009; Jackson et al., 2010; Hershey et al., 2018; Kanai et al., 2019).

Ensuite, ces complexes eIF4F et 43S scannent l'ARNm de 5' vers 3' jusqu'au codon AUG où une hydrolyse du lien eIF2F-GTP a lieu, induisant la formation du complexe d'initiation 48S. La sous-unité 60S du ribosome est capable de s'y lier avec eIF5B-GTP et une libération d'eIF2-GDP, eIF5, eIF3 et eIF1 (Jackson et al., 2010; Hershey et al., 2018). La dernière étape de l'initiation comprend une hydrolyse d'eIF5B-GTP avec une libération d'eIF5B et eIF1A. Le complexe d'initiation 80S peut donc commencer l'élongation (Sonenberg et al., 2009; Jackson et al., 2010).

Cette initiation de la traduction peut être régulée de plusieurs manières comme par la voie mTOR, la voie MAPK/ERK (mitogen activated protein kinase/extracellular signal regulated kinases), la phosphorylation d'eIF2 α , les granules d'ARN ou encore les structures 5'UTR (Gabut et al., 2020). Ce travail va se concentrer sur la régulation traductionnelle par mTOR et par eIF2 α .

4.1.1. Régulation traductionnelle par la voie mTOR

La régulation de la traduction peut se faire par la voie mTOR (**Figure 10**) (Tahmasebi et al., 2018; Proud, 2018; Kanai et al., 2019). mTOR est une sérine/thréonine kinase qui répond à divers stimuli comme les hormones (insuline), nutriments (acides aminés), facteurs de croissance (IGFs) et des changements énergétiques pour réguler la croissance et la prolifération cellulaire et donc, la traduction (Morita et al., 2015). mTOR peut se trouver dans 2 complexes différents, mTORC1 et mTORC2. Le complexe mTORC1 est composé de mTOR, mLst8 (mammalian lethal with SEC13 protein 8), une protéine interagissant avec mTOR et promouvant son activité kinase, Raptor (regulatory associated protein of TOR1), une protéine de liaison et de Rheb (RAS homolog enriched in brain), une GTPase. Rheb fait le lien avec le milieu extracellulaire étant donné qu'il est sensible à divers stimuli induits par des facteurs de croissance ou des acides aminés activant des voies comme celles des MAP (mitogen activated protein) kinases ou de PI3K (phosphoinositol-3 kinases) (Proud, 2018). Une fois les récepteurs

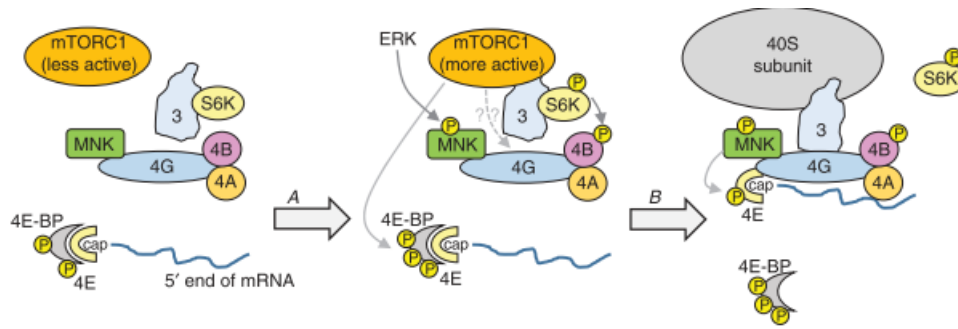


Figure 10 : Régulation de la traduction cap-dépendante par mTORC1 (Proud, 2018).

La traduction cap-dépendante peut être régulée suite à l'action du complexe mTORC1. En effet, celui-ci a deux cibles directes : S6K1 et 4EBP1. La phosphorylation de S6K1 permet la phosphorylation de eIF4B, nécessaire à l'initiation de la traduction. 4EBP1, quant à lui, séquestre le facteur eIF4E, indispensable à l'initiation de la traduction. C'est pourquoi, une fois 4EBP1 phosphorylé, eIF4E sera libre de s'associer aux autres sous-unités du complexe de pré-initiation 43S. Une autre étape primordiale à l'initiation est la phosphorylation de eIF4E par MNK (MAP kinase-interacting serine/threonine-protein kinase 1) actif. Ce dernier est activé par ERK.

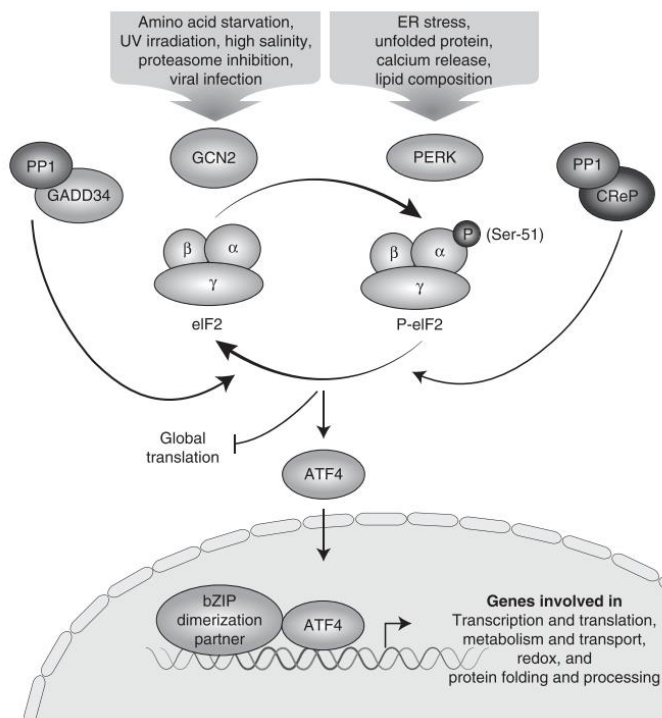


Figure 11 : Représentation de la régulation d'eIF2 (Wek, 2018).

eIF2 est composé de 3 sous-unités : α , β et γ . La phosphorylation de la sous-unité α induit une régulation globale de la traduction. En effet, cette phosphorylation induit une diminution de l'initiation de la traduction globale ainsi qu'une traduction préférentielle d'ATF4, un activateur transcriptionnel qui, en se dimérisant avec d'autres facteurs de la famille des basic zipper, régule l'expression de gènes ISR (integrated stress response), codant pour des

protéines impliquées dans l'adaptation aux stress. 2 kinases peuvent induire la phosphorylation d'eIF2 α : GCN2 et PERK. GCN2 est activé suite à des stress nutritionnels et PERK par des perturbations au niveau du réticulum endoplasmique. La déphosphorylation d'eIF2 α est effectuée par PP1c (type 1 protein phosphate complex) combiné à CReP (Protein phosphatase 1 regulatory subunit 15B) en conditions basales ; ou par GADD34 suite à un feedback de l'ISR. Notons que 2 autres kinases PKR (protein kinase R) et HRI (heme-regulated eIF2 α regulator), non représentées sur le schéma peuvent également phosphoryler eIF2 α .

à activité tyrosine kinase activés par des facteurs de croissance, par exemple, Akt (RAC alpha-sérine/thréonine kinase) sera phosphorylé par la voie PI3K. Akt phosphorylé phosphoryle à son tour le complexe TSC1/2 (tuberous sclerosis protein 1/2), ce qui l'inhibe. Or, ce complexe inhibe la formation de Rheb-GTP. Donc, l'inhibition du complexe TSC1/2 permet une élévation de l'abondance de GTP-Rheb et donc de complexe mTORC1 actifs. Lors de signaux induits par la présence d'acides aminés, les RAG-GTPases recrutent mTORC1 au lysosome où Rheb-GTP est situé (Morita et al., 2015; Sabatini, 2017; Proud, 2018).

Le complexe mTORC1 influence la traduction cap-dépendante de diverses manières (Proud, 2018). Lorsqu'il est activé, il est capable de phosphoryler 4EBP1 sur 4 résidus différents (Thr37, Thr46, Ser65 et Thr70). Or, cette protéine est un inhibiteur de la traduction cap-dépendante. En effet, il séquestre eIF4E jusqu'à ce qu'il soit libéré grâce à l'action du complexe mTORC1 (**Figure 10**) (Tahmasebi et al., 2018; Proud, 2018). mTORC1 a également une action sur la traduction cap-dépendante via la phosphorylation de la kinase S6 (S6K1) qui phosphoryle la protéine ribosomale S6 et eIF4B. Or, eIF4B promeut l'activité hélicase de la protéines eIF4A. S6K1 phosphoryle également PDCD4 (programmed cell death protein 4), une protéine empêchant eIF4G de se lier avec eIF4A et l'ARN. PDCD4 phosphorylé n'est plus capable de séquestrer eIF4G et donc celui-ci est capable de former le complexe eIF4F. De plus, mTORC1 interagit avec eIF3, une protéine scaffold intermédiaire du complexe d'initiation, ce qui promeut l'attachement à la sous-unité 40S (Morita et al., 2015; Proud, 2018). mTORC1 joue également un rôle indirect dans le contrôle du métabolisme énergétique en stimulant l'activité de divers régulateurs transcriptionnels comme PGC1 α .

mTOR induit, par la régulation de 4EBP1, la traduction de certains transcrits dont les ARNm TOP (5' oligopyrimidine tracts) (Morita et al., 2015). Ceux-ci codent pour des composants du processus de traduction ainsi que pour des protéines ribosomales. Ces ARNm présentent une particularité à l'extrémité 5', une suite de 4-14 pyrimidines après la coiffe appelée motif 5' terminal oligopyrimidine (Morita et al., 2015). Cette longue séquence structurée en 5'UTR la rend plus sensible à l'action d'eIF4A. De plus, les inhibiteurs de mTOR influencent l'enrichissement des ARNm codant pour des protéines impliquées dans la régulation des fonctions mitochondriales (Morita et al., 2015). En effet, ces inhibiteurs sont capables de réguler, de diminuer l'expression de régulateurs transcriptionnels des fonctions mitochondriales comme PGC-1 α et ERR- α . Lorsque l'expression et l'activité de PGC-1 α sont diminuées, il y a une réduction de l'expression de gènes mitochondriaux codés par l'ADN nucléaire ainsi qu'une diminution de la consommation en oxygène (Morita et al., 2015). mTOR influence donc la transcription et la traduction de protéines mitochondriales dans un concept d'homéostasie énergétique cellulaire (Morita et al., 2013, 2015). Ces protéines mitochondriales régulées par mTOR sont : des protéines ribosomales mitochondriales, mtTFA, ainsi que des composants des sous-unités I et V de la chaîne de transport d'électrons (Morita et al., 2013, 2015).

4.1.2. Régulation traductionnelle par eIF2 α

La traduction cap-dépendante peut également être régulée par d'autres voies. Par exemple, il existe une régulation au niveau d'eIF2 α (**Figure 11**). En effet, eIF2 est un complexe trimérique qui, en association avec du GTP permet l'approvisionnement en ARN initiateur de méthionyl-transfert (Met-tRNAⁱ) du complexe préinitiateur 43S (Wek, 2018). Une fois l'initiation lancée, eIF2-GDP est recyclé en eIF2-GTP pour une prochaine initiation par eIF2B. Lorsque la sous-unité alpha d'eIF2 est phosphorylée sur la sérine-51, la traduction globale va être impactée car,

cette sous-unité se lie sur une partie régulatrice d'eIF2B et empêche le recyclage d'eIF2-GDP (Wek, 2018). Ce type de régulation inhibitrice survient lors de stress dans le but d'économiser l'énergie et les nutriments normalement réservés pour la synthèse protéique (Wek, 2018). Diverses kinases peuvent phosphoryler eIF2 α , en fonction du stress induit. S'il y a des perturbations dans le cytosol (comme une déprivation en acides aminés, des irradiation UV ou encore l'inhibition du protéasome), ce sera la kinase GCN2 (general control nonderepressible 2) qui sera impliquée. Tandis que PERK (protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase) est activée lors de dérèglements au niveau du reticulum endoplasmique. Les deux autres kinases pouvant être impliquées sont PKR (Protein kinase R) lors de réponse immunitaire innée à une infection virale et HRI (heme-regulated eIF2 α regulator) en réponse à une déplétion en hème (Wek, 2018). La phosphorylation d'eIF2 α favorise la traduction d'ATF4 (activating transcription factor 4), un activateur transcriptionnel qui en association avec d'autres facteurs de transcription, régule la transcription de gènes permettant une adaptation aux stress (Wek, 2018).

Objectifs

L'objectif global de ce mémoire est de caractériser la potentielle régulation traductionnelle contribuant au remodelage mitochondrial durant la différenciation hépatogénique d'iPSCs. Pour ce faire, comme premier sous-objectif, il a d'abord fallu implémenter cette différenciation hépatogénique au laboratoire et contrôler son efficacité par l'évaluation de l'expression de divers marqueurs. Le second sous-objectif consistait à caractériser la dynamique du remodelage mitochondrial lors de la différenciation hépatogénique et à déterminer à quel moment la biogenèse mitochondriale a lieu. L'abondance mitochondriale a été évaluée par le nombre de copies d'ADNmt par cellule, la caractérisation de l'expression génique ainsi que de l'abondance protéique de composants mitochondriaux. Le dernier sous-objectif est d'investiguer la potentielle régulation traductionnelle de cette biogenèse mitochondriale. Pour cela, le niveau de traduction globale a été évalué ainsi qu'une caractérisation de l'abondance et/ou la phosphorylation de divers acteurs de la régulation traductionnelle par la voie mTOR et eIF2 α .

II. Matériels et méthodes

1. Culture cellulaire

Les cellules iPSCs sont lavées avec du PBS (Phosphate Buffer Saline) et récupérées suite à une incubation de 7 min, à 37°C, dans de l'Actutase (Innovative Cell Technologies, #AT-104). Ensuite, du PBS est ajouté dans le but de diluer l'Actutase et les cellules sont centrifugées 5 min à 0.3 rcf avant d'être suspendues etensemencées à 60 000 cellules par cm².

Les cellules sont cultivées dans du milieu mTeSR++ sur des plaques 6 puits précédemment coatées. Pour le coating, du Matrigel hEsc qualified Matrix (Corning, 354277) est utilisé avec une incubation d'au moins une heure à 37°C. Le milieu mTeSR++ est préparé avec du mTeSR™ Plus Basal Medium (Stemcell Technologies, #05826, Canada) supplémenté avec 20% de mTeSR™ Plus 5X Supplement (Stemcell Technologies, #05827, Canada), 1/100 penicillin/streptavidin (Gibco). Lors de passages, 1/100 de Revitacell (ThermoFisher, A2644501) est ajouté aux cellules ; ce milieu est changé 24h après par du milieu mTeSR sans Revitacell.

2. Différenciation hépatogénique (Boon et al., 2020)

Pour la différenciation hépatogénique, les cellules sontensemencées avec le même protocole que pour la culture cellulaire sauf pour le coating utilisé. Celui employé pour la différenciation est le Basement membrane Matrix Growth Factor reduced (Corning, 354230). Le même milieu mTeSR++ est utilisé les 2 jours précédents le début de la différenciation. Lors des deux premiers jours de la différenciation, les cellules sont cultivées dans du LDM (Liver Differentiation Medium) supplémenté avec de l'Activine A (Peprotech, 140-14e) à 10ng/μL, du Wnt3A (R&D, 5036-WN-010) 10 ng/μL et du DMSO (dimethyl sulfoxide) (ROTH, A994.1) à 0.6%. Du jour deux au jour quatre, le même milieu avec la même supplémentation, excepté le Wnt3a, est utilisé. Ces 4 premiers jours ont pour but de diriger les cellules vers une l'endoderme définitif. À partir du jour quatre, il y a 2 types de protocoles : le standard (STD) et l'amélioré (HC3X).

Le protocole STD utilise le LDM. Du jour 4 au jour 8 avec un changement de milieu au jour 6, le LDM est supplémenté avec du BMP4 (Peprotech, 120-05et) à 50ng/ml et 0.6% de DMSO. Les 4 jours suivants utilisent du milieu supplémenté avec du FGfα (Peprotech, 100-17a) à 20ng/ml et du DMSO 0.6% avec un changement de milieu tous les 2 jours. Ces deux phases représentent la spécification hépatique. Enfin, du jour 12 au jour 20 vient la maturation hépatique avec une supplémentation du milieu grâce à du HGF (Peprotech, 100-39) à 20 ng/ml et 2% de DMSO.

Dans le protocole HC3X le LDM est supplémenté avec de la doxycycline (Sigma, D9891-1G) à 5 μg/ml à partir du jour 4 et jusqu'à la fin. Du jour 12 au jour 20, le milieu comprend également du EAA (Essentiel Amino Acid) 50X (ThermoScientific, 11130051) et du NEAA (Non-Essential Amino Acid) 100X (ThermoScientific, 11140050). Enfin, de la glycine (ROTH, 089280403) à 20g/L est ajoutée du jour 14 au jour 20. Le reste du protocole est semblable au STD mais sans DMSO.

3. Extraction d'ARN, reverse transcription et qPCR

Les cellules sont lysées dans le puits grâce à du tampon de lyse LBA+glycérol provenant du kit ReliaPrep™ RNA Tissue Miniprep System (Promega, #Z6111, USA) et grattées à l'aide d'un cell scrapper. Ensuite, le lysa ARN est récupéré et conservé à -80°C. L'extraction et la purification est réalisée selon les instructions du kit. La concentration d'ARN est évaluée grâce à la densité optique à 260nm (Implen, Westburg). Les échantillons d'ARN sont stockés à -80°C ou une reverse transcription est directement réalisée.

Pour la transcription inverse, 1µg d'ARN est dilué dans un volume total de 12µL d'H₂O RNase free. Cette transcription utilise GoScript™ Reverse Transcription Mix et des random primers (Promega, A2801, USA). Le mix de RT, préparé sur glace, contient 4µL de Random hexamer Buffer, 2µL d'Enzyme mix et 2µL d'H₂O RNase free par échantillon. Les 8µL de mix de rétrotranscription sont ajoutés aux 12µL d'ARN et les échantillons sont incubés 5min à 25°C, puis 60min à 20°C et enfin 15 min à 70°C. les échantillons d'ADNc sont brièvement centrifugés (« spin ») et stockés à -80°C.

Les échantillons d'ADNc sont dilués 100X et un mixe de réaction est préparé avec par puits : 4µL d'eau RNase-free, 10µL de SYBRGreen GoTak qPCR Master Mix (Promega, A3002, USA), 1µL de primer forward (à une concentration stock de 6µM) et 1µL de primer reverse (à une concentration stock de 6µM). La qPCR est réalisée à l'aide de ViiA 7 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific). Les primers utilisés sont listés dans le **Tableau 1**. L'analyse des données a été faite avec la méthode ΔC_q , pour les gènes ne présentant pas ou très peu d'expression dans la condition D0 ($\Delta C_q = C_{t\text{condition}} - C_{t\text{RPL19}}$). Concernant les autres gènes, les données ont été analysées par la méthode des $\Delta\Delta C_q$. Les données ont été normalisées à RPL19 comme housekeeping gene.

4. Extraction d'ADNg et évaluation du nombre de copies d'ADNmt par cellule

Pour l'extraction d'ADNg, le kit Quiagen DNeasy blood and tissue (69504) a été utilisé. Un tampon de lyse est préparé avec 200µL de PBS, 200µL de buffer AL et 20µL de protéinase K pour environ 2millions de cellules. Les cellules sont donc lysées directement dans le puits, grattées grâce à un cell scrapper, récupérées et le lysat d'ADN est conservé à -80°C. Le reste de l'extraction est réalisée suivant les instructions du fabricant. Les échantillons d'ADNg sont stockés à -20°C. La concentration en ADN est évaluée grâce à une mesure de l'OD à 260nm (Implen, Westburg). Une real-time qPCR est effectuée comme décrit précédemment mais, avec une concentration en ADNg de 5ng/µL. Pour chaque condition, l'expression de 2 gènes nucléaires, TBP (TATA-box binding protein) et la Becline et 2 gènes mitochondriaux, ND2 et ND1 (NDAH ubiquinone oxidoreductase chain 1 et 2), est analysée. Pour évaluer le nombre de copies d'ADNmt par cellule, la moyenne des C_t (cycle threshold) de TBP et Becline a été soustrait à la moyenne des C_t de ND2 et ND2 ($2^{2^{-(\Delta C_{tDx} = C_{t\text{mito}} - C_{t\text{nucl}})}}$).

5. Extraction de protéines et WB

Pour l'extraction des protéines, un tampon de lyse TLB (Triton lysis buffer) est utilisé à raison de 150µL pour environ 2M de cellules. Ce TLB contient : Tris HCl pH7.5 20 mM; NaCl 150 mM; Glycerol 15%, SDS 2%, Triton 1%, PIC (Protease Inhibitor Cocktail, Roche, 11836145001); PIB (Protease Inhibitor Buffer, 25mM NaVO₄ (Sigma, USA); 125mM NaF

(Merck, Germany); 250mM Beta-glycerophosphate (VWR, Belgium); 250mM para-Nitrophenylphosphate (pNPP, Sigma, USA)), SuperNuclease 1/150 (Sino Biological Inc., SSNP04) et de l'H₂O. Les cellules sont lysées directement dans le puits, grattées avec un cell scraper, récupérées et le lysat protéique est conservé à -80°C. Les lysats sont ensuite centrifugés 10 min, à 12°C, à 16rcf. Le surnageant est collecté et un dosage protéique utilisant du Pierce 660nm (Thermo Scientific, 22660) est effectué selon les instructions du fabricant afin d'évaluer la concentration protéique des échantillons.

Les échantillons sont préparés pour charger 20µg de protéines par condition, dans du LDS sample loading buffer (Invitrogen by Fisher Scientific, NP007). Les gels de western blot utilisés sont des NuPage Bis-Tris 4-12% (ThermoFisher, NP0321BOX); la migration est effectuée selon les instructions du fabricant dans du tampon de migration MES SDS Running Buffer 20X (Life Technologies, NP0002). Le ladder utilisé est du LDS (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, NP007). Le transfert est réalisé en transfert liquide pendant 2h à 100V dans du tampon de transfert (Tris 25mM; Glycine 192mM; Méthanol 20%). Les membranes utilisées lors du transfert sont soit en PVDF (Immobilon Membrane, IPFL00010), soit en nitrocellulose (Biorad, #1620112). Une fois le transfert fini, les membranes sont bloquées dans de l'Intercept Blocking Buffer PBS (LI-COR, 927-70001) pendant 1h, à RT. Les membranes sont ensuite incubées O/N (over night) avec leur anticorps primaire (les anticorps utilisés sont listés dans le **Tableau 2**), à 4°C; lavées 3 fois 5 min avec du PBS-Tween 0.1%, incubées avec leur anticorps secondaire (les anticorps utilisés sont listés dans le **Tableau 2**) durant 1h à RT et lavées encore 3 fois 5 min au PBS-Tween 0.1%. Enfin, elles sont séchées et la fluorescence est révélée sur le scanner Odyssey LYCOR.

6. Sunset

Le taux global de synthèse de protéine est évalué par SUnSET comme décrit dans (Schmidt, Calvarino, Ceppi & Pierre, 2009). Brièvement, les cellules ont été exposées à la puromycine (Sigma, P8833) à une concentration finale de 10µg/ml pendant 10 min. La puromycine est un analogue du tyrosyl-t-RNA et va donc prendre sa place lors de la synthèse protéique et la stopper. Ensuite, les cellules sont lavées au PBS avant d'être lysées dans du TLB (voir ci-dessus) directement dans le puits; le reste de l'extraction protéique est réalisée comme expliqué précédemment. Deux contrôles négatifs ont été sélectionnés: un sans puromycine et un avec de la cycloheximide, un inhibiteur de l'élongation de la traduction, filtrée à une concentration finale de 20µg/ml pendant 30 min. Ces contrôles sont récoltés de la même manière que les autres conditions.

7. Marquages en immunofluorescence

Pour la visualisation des protéines, des marquages en immunofluorescence suivis d'observation par microscopie confocale ont été réalisés. Pour ce faire, les cellules sontensemencées sur des couvres-objets stériles coatés avec le coating de différenciation (voir point 2.) dans des puits de plaques 24 puits. Les cellules sont lavées 3 fois au PBS puis, fixées avec de la paraformaldéhyde 4% (PFA) pendant 10 min à RT. Les cellules sont ensuite lavées 3 fois au PBS et perméabilisées avec du PBS-Triton 0.1% pendant 20 min à RT. Enfin, les cellules sont incubées avec du PBS-BSA 2% pendant 1h à RT.

Pour l'immunomarquage, les anticorps primaires et secondaires sont dilués dans du PBS-BSA 2%. Les couvre-objets sont placés sur une goutte de 30µL d'anticorps primaire à 4°C O/N. Avant de les faire incuber sur une goutte de 30 µL d'anticorps secondaires pendant 1h à RT, les couvre-objets sont lavés 3 fois 5 min au PBS. Pour le marquage de la chromatine, du DAPI (1023627001, Sigma-Aldrich) est combiné aux anticorps secondaires. Enfin, les coverslips sont de nouveaux lavés 3 fois 5 min au PBS et montés sur lames à l'aide de Mowiol (4-88, Sigma-Aldrich). Les lames sont gardées O/N à 4°C avant l'analyse au microscope confocal Leica (Leica microsystem, Wetzlar, Germany).

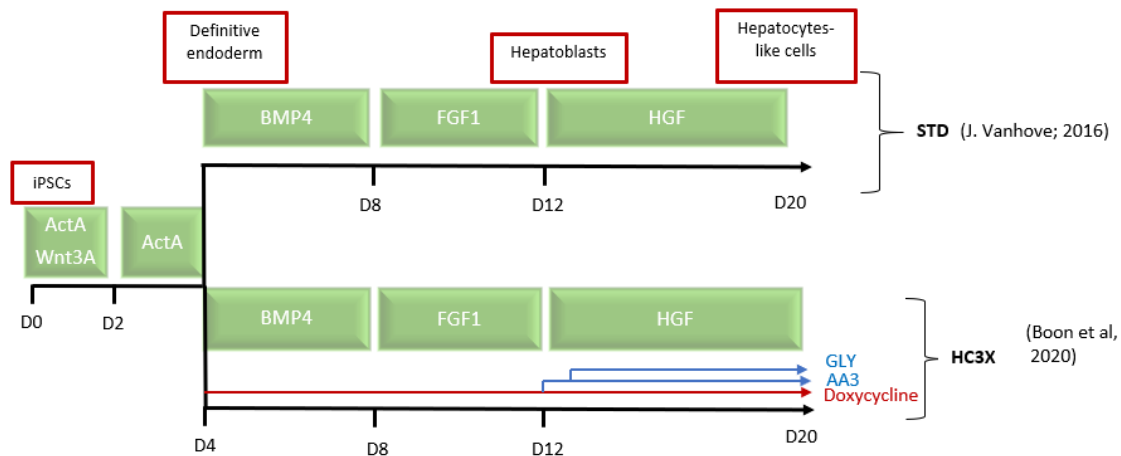


Figure 12 : Représentation du protocole utilisé pour différencier les cellules iPSCs en hepatocytes-like d'iPSCs.

Schéma récapitulatif du protocole de différenciation hépatogénique. Le protocole standard (STD) (Vanhove et al., 2016) est basé seulement sur une incubation en présence de cocktails de cytokines (les concentrations sont indiquées dans la section matériels et méthodes). Le protocole amélioré au niveau métabolique et transcriptionnel (HC3X) (Boon et al., 2020) utilise en plus de cytokines, une expression forcée de 3 facteurs de transcription (HNF1 α , FOXA3 et PROX1) induite par la doxycycline administrée à partir du jour 4, et une haute concentration en acides aminés à partir du jour 12 et une addition de glycine à partir du jour 14.

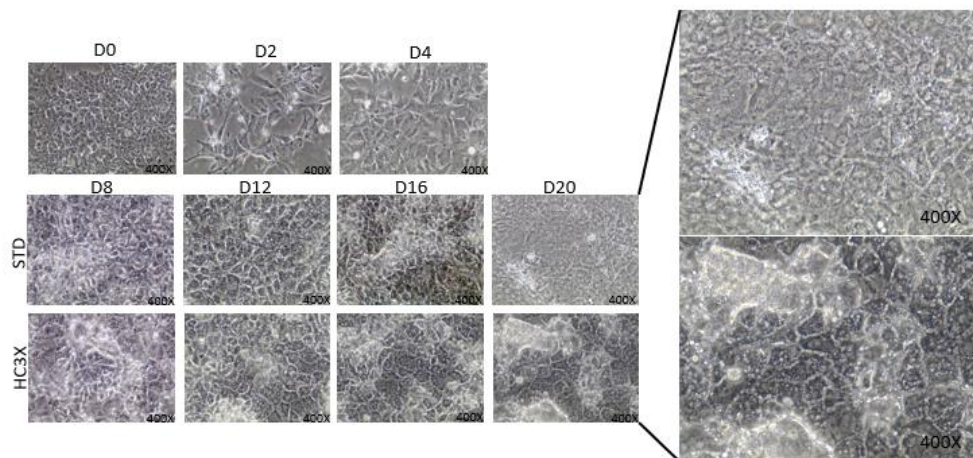


Figure 13 : Différenciation hépatogénique d'iPSCs.

Micrographies à contraste de phase (400X) du jour 0, du jour 2 (pendant la formation de l'endoderme définitif), du jour 4 (endoderme définitif), du jour 12 (durant la spécification hépatique), du jour 16 (durant la maturation hépatique) et au jour 20 (cellules hépatocytes-like).

III. Résultats

1. Différenciation hépatogénique à partir d'iPSCs

Lors de la différenciation hépatogénique, deux types de contrôles ont été réalisés à chaque différenciation. Le premier étant l'observation de changements morphologiques des cellules durant la différenciation, et le second l'évaluation de l'expression génique de divers marqueurs hépatogéniques et de pluripotence.

1.1.Morphologie

Lorsque les cellules ont atteint environ 70% de confluence, la différenciation commence avec un changement de milieu comprenant de l'Activine A ainsi que du Wnt3A (**Figure 12**). À ce moment-là, les cellules souches montrent une forme ronde et elles forment des colonies. Au jour deux, il y a eu de la mort cellulaire et les cellules ont une forme plus fibroblastique. Au jour 4, les cellules ont proliféré jusqu'à confluence (**Figure 13**).

Durant la spécification hépatique, des différences de hauteurs apparaissent dans les 2 types de protocoles et disparaissent pendant la maturation hépatique. La forme des cellules devient de plus en plus polygonale avec le temps et ce, plus fortement dans le protocole HC3X. Or, la morphologie polygonale est caractéristique des hépatocytes.

1.2.Expression génique

L'efficacité de la différenciation, peut également être évaluée par l'expression génique de divers marqueurs (**Figure 14**). Premièrement un marqueur de pluripotence : Oct4 (Octamer Binding Protein 4) un facteur de transcription qui, contrôle l'expression de gènes impliqués dans l'auto-renouvellement. Comme attendu, l'expression génique de ce facteur de transcription diminue fortement au cours de la différenciation.

Deuxièmement, l'expression des 3 facteurs de transcription dont l'expression est induite par la doxycycline dans le protocole HC3X a été évaluée : HNF1 α , FOXA3 et PROX1. Pour rappel, les cellules iPSCs utilisées ont été modifiées génétiquement par l'insertion de ces 3 gènes, sous le contrôle d'un promoteur inductible par la doxycycline (voir point 2., Matériels et méthodes). Dans le protocole STD, l'expression génique d'*HNF1 α* augmente lors de la spécification hépatique pour se stabiliser dans la maturation. Tandis que dans le protocole HC3X, son expression augmente tout au long de la différenciation et jusqu'à 6 fois plus au jour 20 des HC3X par rapport au STD. L'expression de FOXA3 dans le protocole STD augmente lors de la spécification hépatique pour se stabiliser ensuite dans la maturation, alors que dans le protocole HC3X, son expression augmente tout au long de la différenciation et plus fortement dans les HC3X que les STD. Pour l'expression génique de PROX1, c'est à partir de la spécification hépatique qu'elle augmente jusqu'à la fin de la différenciation dans les deux protocoles mais, l'augmentation est plus marquée dans les HC3X que les STD. Ces 3 facteurs sont donc correctement induits grâce à la doxycycline dans le protocole HC3X.

Troisièmement, l'expression de facteurs de transcription spécifiques à la différenciation hépatique comme *GATA4* et *HNF4 α* . L'expression génique de *GATA4* augmente au jour 4 pour

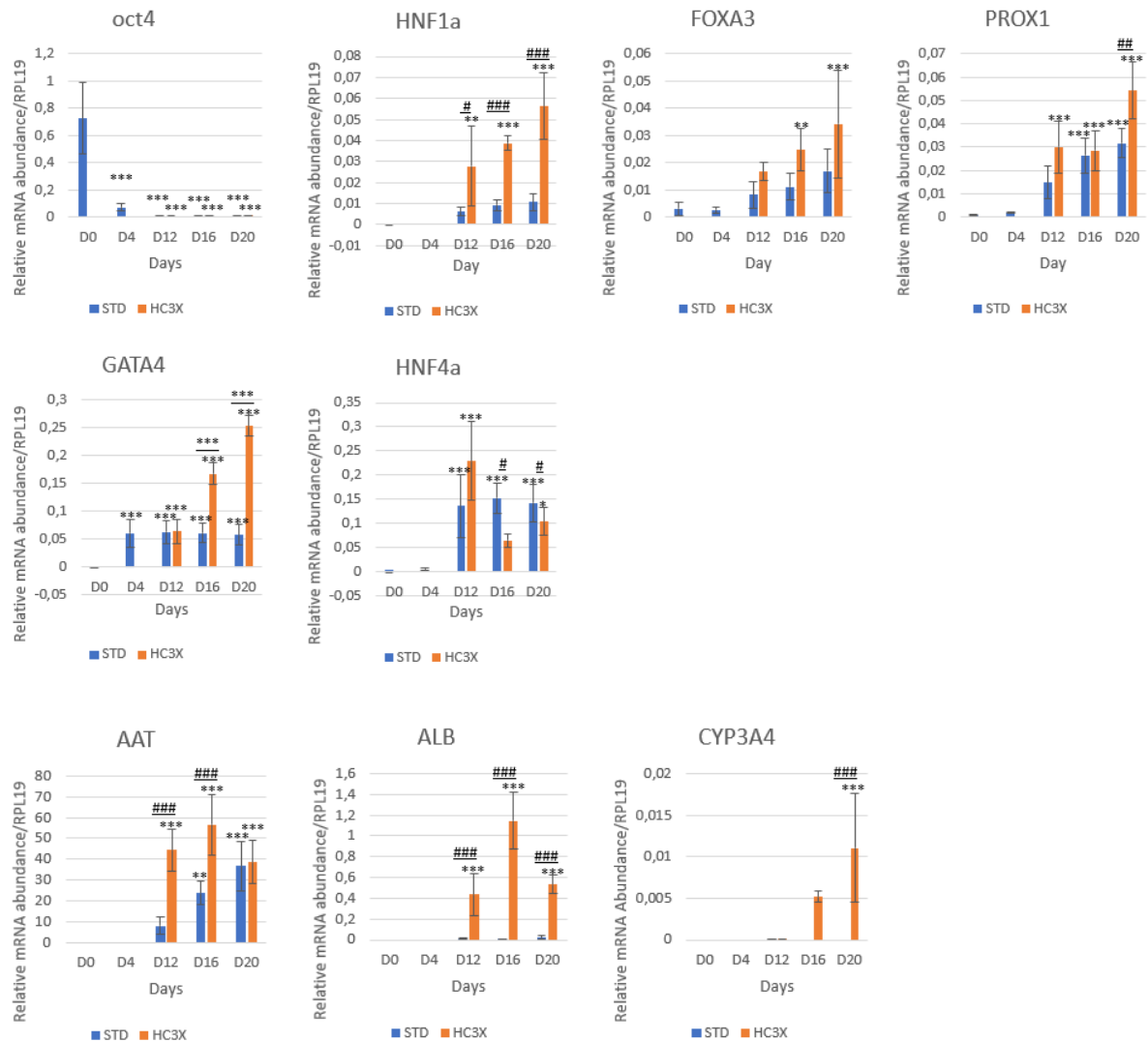


Figure 14 : Effet du protocole de différenciation sur les marqueurs de pluripotence et de différenciation hépatogénique.

Les cellules iPSCs ont été soumises aux protocoles de différenciation standard (STD) et amélioré (HC3X) et récoltées après 0, 4, 12, 16 et 20 jours de culture. L'abondance en ARNm du facteur de pluripotence Oct4, des 3 facteurs de transcription induits de manière exogène au cours de la différenciation utilisant le protocole HC3X (HNF1 α , FOXA3 et PROX1), de marqueurs de différenciation hépatique (GATA4 et HNF4 α) et de marqueurs hépatiques plus fonctionnels (ALB, AAT et CYP3A4) a été mesurée par RT-qPCR. Les résultats sont exprimés comme la moyenne $\pm$ 1 écart-type (n=5) des différents ARNm relativement à l'abondance du housekeeping gene RPL19, en utilisant la formule du $2^{\Delta Ct}$. Un test ANOVA OneWay a été effectué, suite à un test de Tukey, sur l'ensemble des conditions. *** : extrêmement significatif (p< 0.01) ; ** : très significatif (p< 0.5) ; * : significatif (p< 0.1), par rapport au jour 0. ### : extrêmement significatif (p< 0.01) ; ## : très significatif (p< 0.5) ; # : significatif (p< 0.1), entre STD et HC3X.

se stabiliser pour le reste de la différenciation lors du protocole STD. Dans le protocole HC3X, l'expression au jour 12 est similaire au jour 12 du protocole STD, tandis que durant la maturation hépatique, l'expression augmente de plus en plus. L'expression génique de *HNF4α* augmente lors de la spécification hépatique du protocole STD pour rester stable dans le reste de la différenciation. Tandis que dans le protocole HC3X, au jour 12, l'expression est plus élevée que dans la condition STD, pour ensuite être plus basse aux jours 16 et 20. Comme attendu, l'expression de *GATA4* augmente à partir de la formation de l'endoderme et reste constante dans les conditions STD tandis que le protocole HC3X augmente son expression, comme décrit dans l'article de référence (Boon et al., 2020). Les modifications d'expression d'*HNF4α* dans le protocole STD sont également similaires à celles décrites dans l'article de Boon et al.

Enfin, l'expression génique de protéines assurant une des fonctions hépatiques a été évaluée comme l'AAT, l'albumine (ALB) et CYP3A4 (cytochrome P450 3A4). L'expression génique de AAT augmente au cours de la différenciation STD alors que dans la différenciation améliorée, cela augmente jusqu'au jour 16 pour ensuite diminuer dans le jour 20 mais, les taux sont toujours plus élevés dans les conditions HC3X. L'expression génique de ALB augmente dans la différenciation améliorée jusqu'au jour 16 pour ensuite diminuer au jour 20. Tandis que dans les conditions STD, l'expression d'ALB augmente au jour 12 pour diminuer au jour 16 et de nouveau augmenter au jour 20. L'expression génique de CYP3A4 est minime dans le protocole STD tandis que dans les conditions HC3X, l'expression de CYP3A4 augmente de plus en plus avec le temps passé dans le milieu AAGLY (milieu riche en acides aminés, voir point 2. Matériels et méthodes). Toutes ces variations d'expression sont similaires à celles décrites dans l'article de références (Boon et al., 2020).

Sur base des données morphologiques, avec une morphologie polygonale après 20 jours de différenciation, et de ces données d'expression génique, tant des 3 facteurs induits par la doxycycline que des de facteurs spécifiques à la différenciation hépatogénique, nous pouvons considérer que le protocole de différenciation hépatogénique des iPSCs est bien maîtrisé au laboratoire, et que nous pouvons maintenant aborder les questions relatives à la biogenèse mitochondriales et à la régulation traductionnelle.

2. Biogenèse mitochondriale

Pour rappel, dans le modèle de différenciation hépatogénique à partir de BM-MSCs, un remodelage mitochondrial caractérisé par une augmentation de l'abondance d'ADNmt et de protéines mitochondriales a été mis en évidence en début de différenciation (Wanet et al., 2014). Dans le modèle utilisé durant ce mémoire, c'est-à dire celui de la différenciation hépatogénique d'iPSCs, une augmentation de l'abondance de protéines mitochondriales avait également été mise en évidence, mais, en comparant seulement le jour 0 et le jour 20. On ne sait donc pas quand précisément le processus de biogenèse mitochondriale débute (Boon et al., 2020). Un des objectifs de ce travail est donc de caractériser le remodelage mitochondrial présent dans la différenciation hépatogénique d'iPSCs afin de déterminer le début de l'augmentation de l'abondance mitochondriale.

La biogenèse mitochondriale peut être évaluée de différentes façons. Premièrement, par la visualisation de ses protéines en immunofluorescence. Deuxièmement, par l'évaluation du

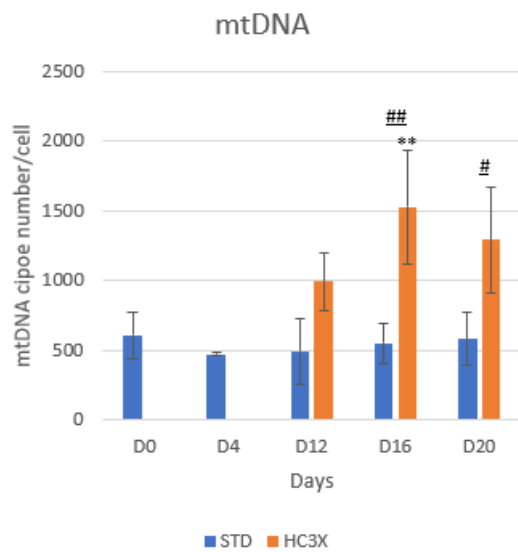


Figure 15 : Effets de la différenciation hépatogénique d'iPSCs sur l'abondance de l'ADN mitochondrial.

Les cellules exposées au protocole standard (STD, bleu) ou amélioré (HC3X, orange) ont été récoltées aux jours 0, 4, 12, 16 et 20. L'abondance de l'ADNmt a été analysée par qPCR (gènes mitochondriaux ND1 et ND2 par rapport aux gènes nucléaires TBP et Becline). Les données sont présentées comme la moyenne $\pm$ 1 écart-type (n=3). Un test ANOVA OneWay a été effectué, suite à un test de Tukey, sur l'ensemble des conditions. *** : extrêmement significatif ($p < 0.01$) ; ** : très significatif ($p < 0.05$) ; * : significatif ($p < 0.1$), par rapport au jour 0. ### : extrêmement significatif ($p < 0.01$) ; ## : très significatif ($p < 0.05$) ; # : significatif ($p < 0.1$), entre STD et HC3X.

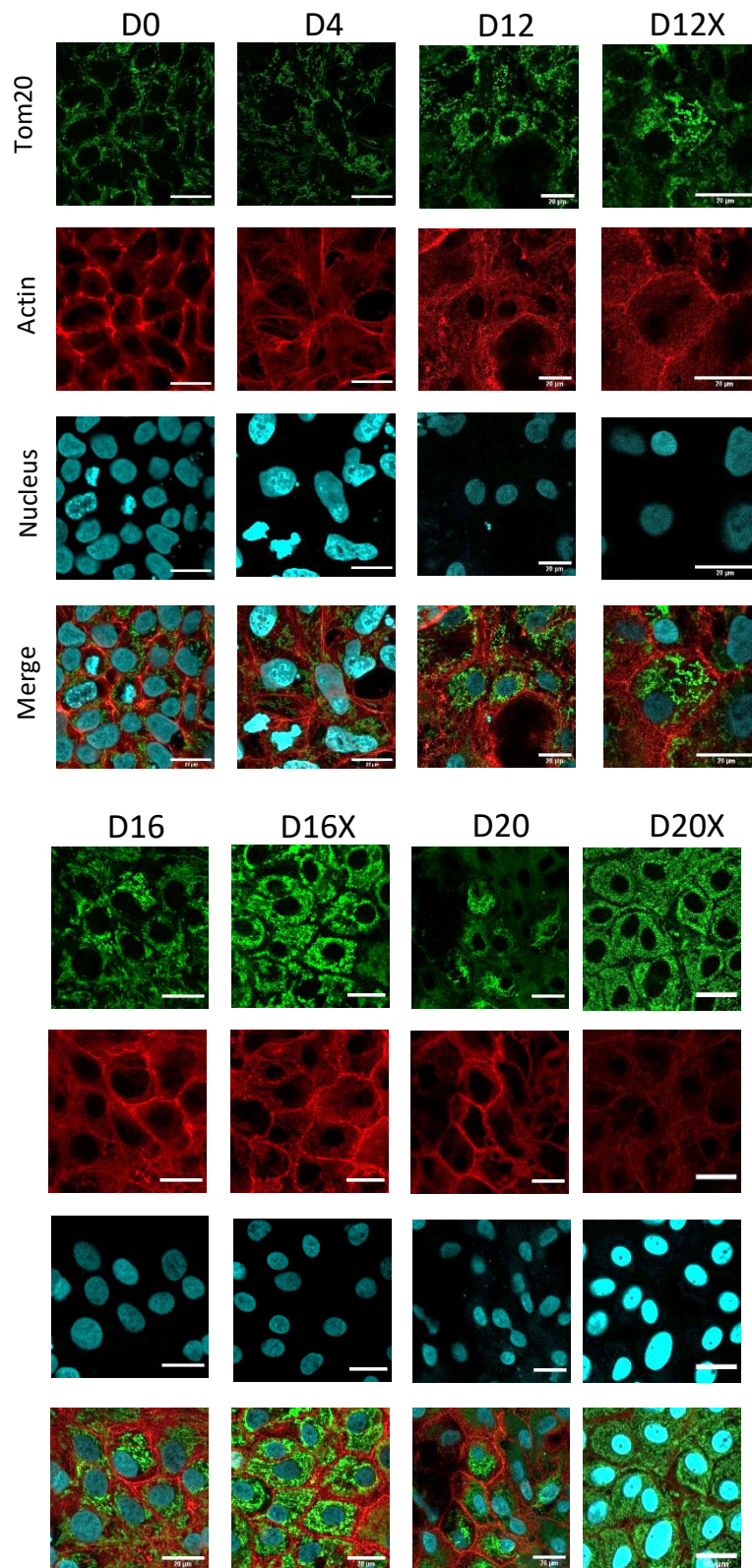


Figure 16 : Effet de la différenciation hépatogénique d'iPSCs sur l'abondance mitochondriale, visualisée par marquage de TOMM20 en immunofluorescence.

Les cellules cultivées sur couvre-objets ont été exposées durant 0, 4, 12, 16 et 20 jours au protocole de différenciation standard (D0, D4, D12, D16, D20 ou amélioré (D12X, D16X, D20X) avant d'être

marquées avec un anticorps dirigé contre TOMM20 et révélé en vert. La phalloïdine marquant l'actine (en rouge) permet de révéler les contours cellulaires tandis que la chromatine est marquée par du DAPI en bleu. Les micrographies ont été obtenues par observation des lames en microscopie confocale (barre d'échelle = 20 μ M ; n=2).

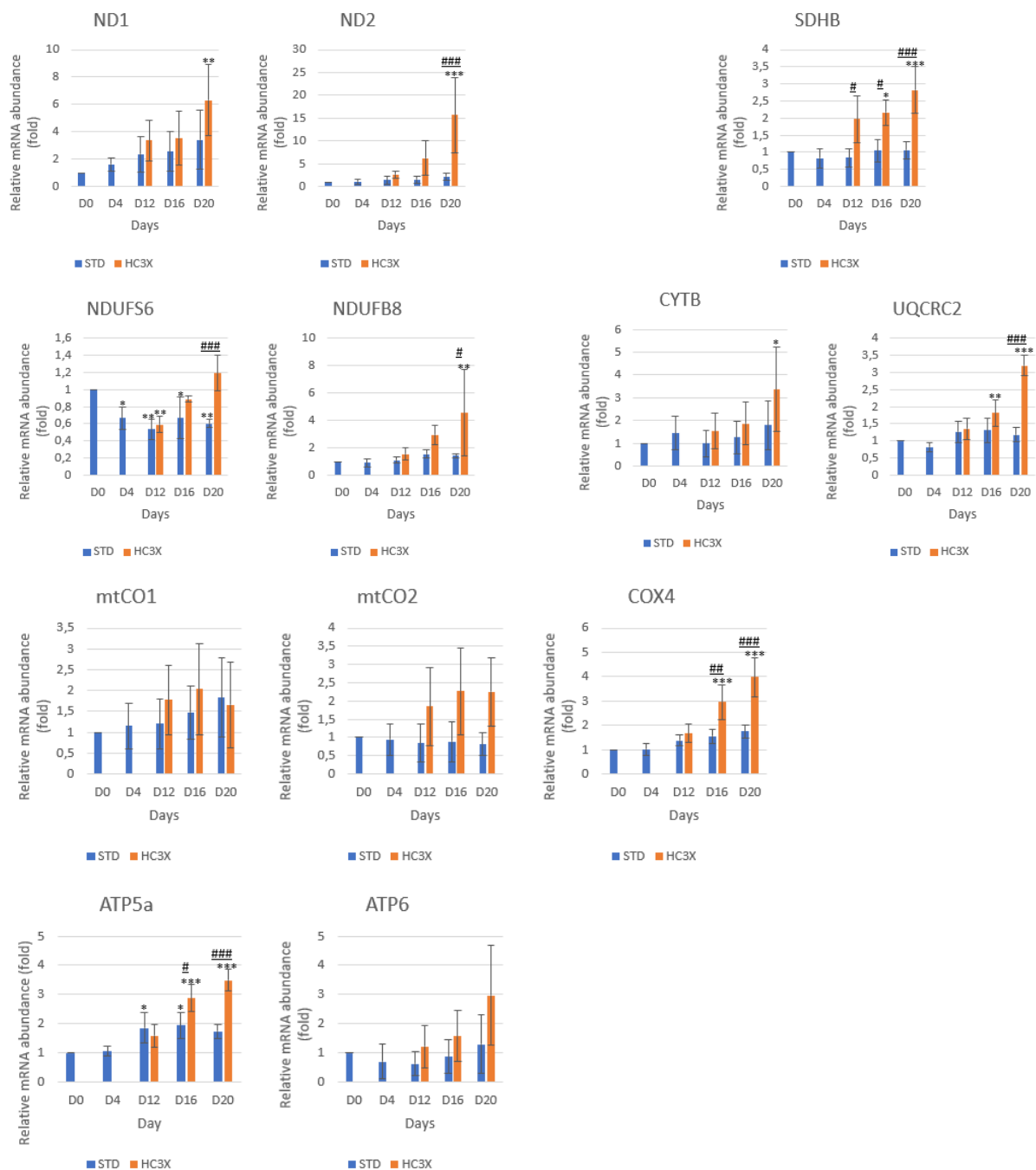


Figure 17 : Effets de la différenciation hépatogénique d'iPSCs sur l'abondance en ARNm des sous-unités de la chaîne de transport d'électrons.

Les cellules iPSCs ont été soumises aux protocoles de différenciation standard (STD) et amélioré (HC3X) et récoltées après 0, 4, 12, 16 et 20 jours de culture. L'abondance en ARNm a été mesurée par RT-qPCR. Les résultats sont exprimés comme la moyenne $\pm$ 1 écart-type ($n=5$) des différents ARNm relativement à l'abondance du housekeeping gene RPL19, puis, exprimée relativement par rapport au jour 0. Complexe I : ND1, ND2, NDUFB8 et NDUFS6. Complexe II : SDHB. Complexe III : CYTB, UQCRC2. Complexe IV : mtCO1, mtCO2 et cox4. Complexe V : ATP5 α et ATP6. Les données sont représentées en moyenne $\pm$ écart-type ($n=4$). Un test ANOVA OneWay a été effectué, suite à un test de Tukey, sur l'ensemble des conditions. *** : extrêmement significatif ($p < 0.01$) ; ** : très significatif ($p < 0.5$) ; * :

significatif ($p < 0.1$), par rapport au jour 0. ### : extrêmement significatif ($p < 0.01$) ; ## : très significatif ($p < 0.5$) ; # : significatif ($p < 0.1$), entre STD et HC3X.

nombre de copies d'ADNmt par cellule par qPCR. Enfin, par l'observation de l'abondance protéique de diverses protéines mitochondriales par WB.

2.1.ADNmt

Une première façon de caractériser l'abondance mitochondriale est par la mesure de son nombre de copies en ADNmt par cellule (**Figure 15**). Celui-ci ne présente pas de modifications lors de la différenciation STD, tandis que dans les conditions HC3X, cela commence à augmenter au jour 12, mais pas de manière significative, pour ensuite augmenter au jour 16 et enfin diminuer légèrement au jour 20. L'augmentation observée aux jours 16 et 20 est significative.

Il semblerait donc que le protocole amélioré induise une augmentation de l'abondance mitochondriale et ce, à partir du jour 12. Lors de la différenciation hépatogénique de BM-MSCs, l'augmentation de l'abondance en ADNmt a été observée plus tôt, au jour 5.

2.2.Abondance des mitochondries via un marquage par immunofluorescence

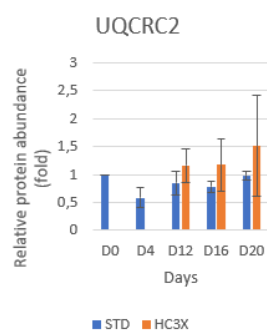
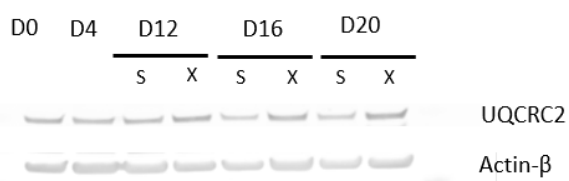
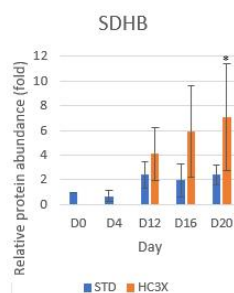
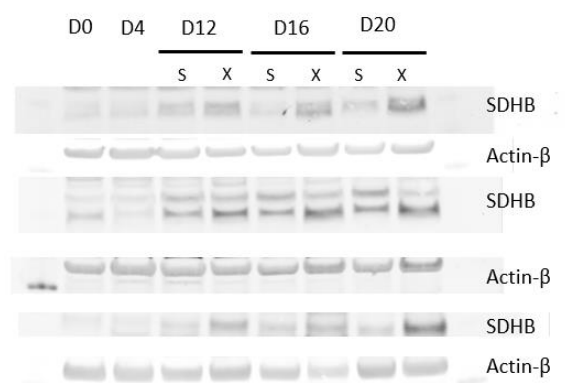
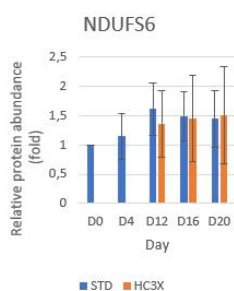
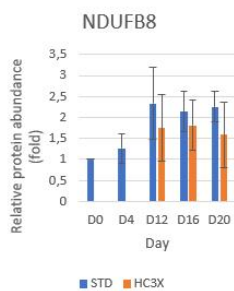
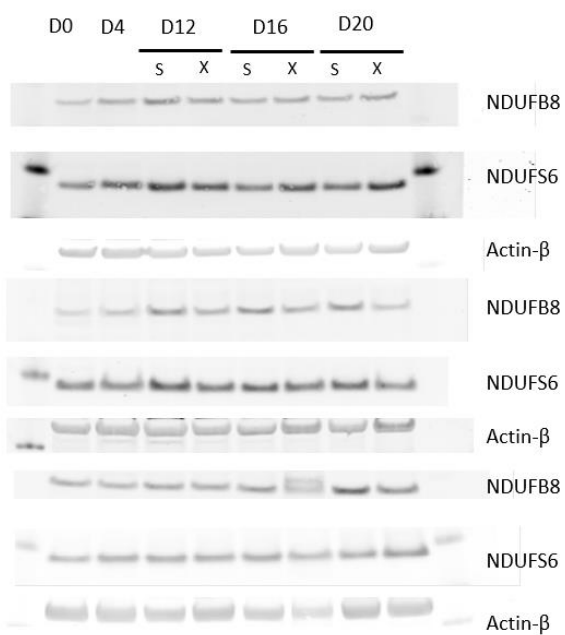
Une deuxième approche pour visualiser la dynamique de la biogenèse mitochondriale durant la différenciation hépatique consiste à observer les protéines mitochondriales par immunofluorescence. Les mitochondries sont marquées par des anticorps anti-TOMM20 (translocase of outer mitochondrial membrane 20) (**Figure16**). L'abondance mitochondriale tend à augmenter à partir de la spécification hépatique puis, une différence peut se remarquer à partir du jour 16, avec une abondance plus forte dans les conditions HC3X que STD.

Les données obtenues, au niveau de la différenciation HC3X, sont en adéquation avec les modifications de l'abondance de l'ADN mitochondrial. Ce protocole amélioré semble favoriser la biogenèse mitochondriale au cours de la différenciation hépatogénique. Cependant, sur les micrographies, l'augmentation de l'abondance mitochondriale est également perceptible avec du protocole STD, ce qui n'est pas le cas avec l'évaluation de l'abondance de l'ADNmt.

2.3. Transcrits codants pour des protéines mitochondriales

Dans l'article de Boon et. al, un shift métabolique a été montré sur le modèle de différenciation hépatogénique à partir d'iPSCs, mais ceci n'a été évalué qu'au jour 20. Une caractérisation de l'abondance des protéines de la chaîne de transport d'électrons au cours de la progression du processus de différenciation, pourrait aider à évaluer si la biogenèse mitochondriale est induite dès les premiers jours du processus de différenciation, comme dans les BM-MSCs, ou plus tardivement. Pour chaque complexe de l'ETC, l'expression de gènes encodés par de l'ADNmt et de gènes codés par de l'ADN nucléaire a été évaluée (excepté le complexe II dont les sous-unités sont toutes codées par l'ADN nucléaire) (**Figure 17**).

Le complexe I, appelé NADH ubiquinone oxido-reductase, est composé de 45 protéines dont 7 sont encodées par l'ADNmt. Parmi ces dernières, l'expression des sous-unités ND1 et ND2 (encodées par l'ADNmt) faisant partie de la base du complexe, a été analysée par RT-qPCR (Barros et al., 2020). L'expression génique de ND1 et ND2 augmente durant la différenciation standard et encore plus au cours de celle qui est améliorée pour atteindre un niveau significatif au jour 20. Deux autres sous-unités ont été analysées NDUFS6 (NADH deshydrogenase iron-sulfur 6) et NDUF8 (NADH deshydrogenase 1 beta subcomplex subunit 8) (encodées par



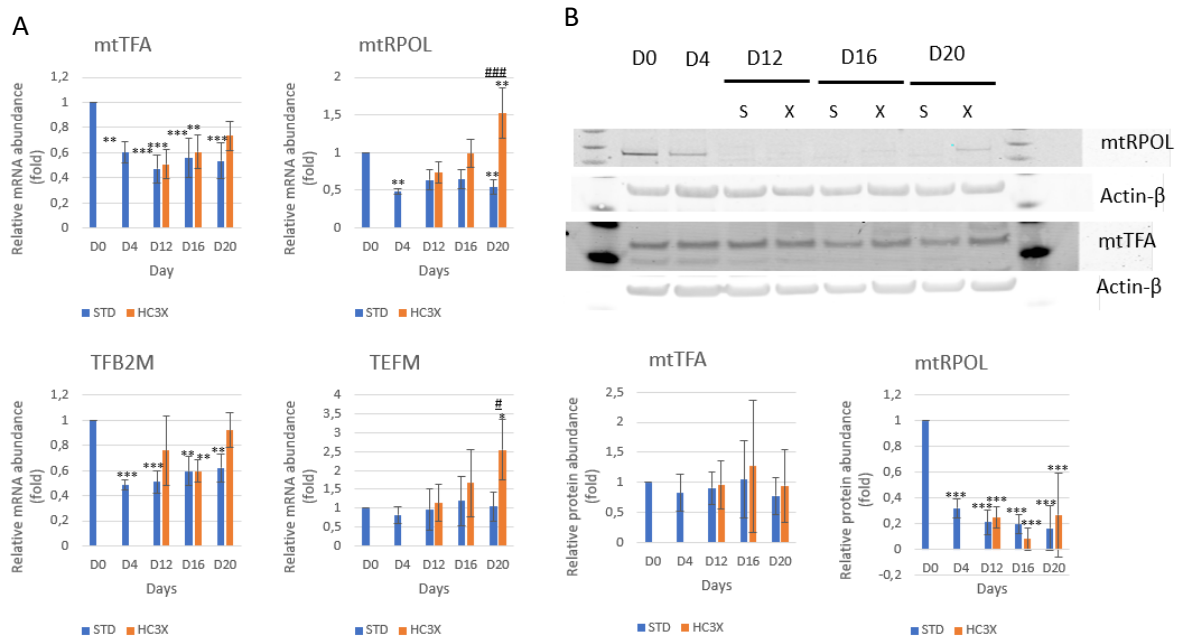


Figure 19 : Effets de la différenciation hépatogénique d'iPSCs sur l'abondance en ARNm (n=4) et en protéines (n=3) d'acteurs de la transcription mitochondriale : mtTFA, TEFM, TFB2M et mtRPOL.

(A) Les cellules iPSCs ont été soumises aux protocoles de différenciation standard (STD) et amélioré (HC3X) et récoltées après 0, 4, 12, 16 et 20 jours de culture. L'abondance en ARNm a été analysé par RT-qPCR. Les résultats sont exprimés comme la moyenne $\pm$ 1 écart-type (n=4) des différents ARNm relativement à l'abondance du housekeeping gene RPL19, puis, exprimée relativement par rapport au jour 0. (B) 20 μ g de protéines des mêmes conditions expérimentales (S = conditions STD ; X = conditions HC3X) ont été déposées sur un gel de polyacrylamide 4-12%. L'actine- β est utilisée comme contrôle de charge. Des acteurs de la transcription mitochondriale mtTFA, TEFM, TFB2M et mtRPOL ont été détectés. Un Blot représentatif de 3 réplicats indépendants est montré. Le signal correspondant à chaque protéine d'intérêt a été normalisé par rapport à l'actine- β correspondante puis, exprimées relativement par rapport au jour 0. Les données sont représentées en moyenne $\pm$ écart-type (n=3). Un test ANOVA OneWay a été effectué, suite à un test de Tukey, sur l'ensemble des conditions. *** : extrêmement significatif ($p < 0.01$) ; ** : très significatif ($p < 0.05$) ; * : significatif ($p < 0.1$), par rapport au jour 0. ### : extrêmement significatif ($p < 0.01$) ; ## : très significatif ($p < 0.05$) ; # : significatif ($p < 0.1$), entre STD et HC3X.

l'ADN nucléaire), qui sont des facteurs d'assemblage du complexe (Barros et al., 2020). Dans le protocole STD, l'expression génique de NDUFS6 diminue jusqu'à la spécification hépatique puis se stabilise, tandis que cela augmente lors de la maturation hépatique dans les conditions HC3X. L'expression génique de NDUFB8 ne montre aucune modification dans la différenciation STD alors qu'elle augmente significativement au terme de la maturation de la HC3X.

Le complexe II, nommé succinate déshydrogénase, est formé de 4 sous-unités, toutes codées par l'ADN nucléaire, dont SDHB (succinate deshydrogenase iron-sulfur subunit) (Barros et al., 2020). Celui-ci présente une expression génique non modifiée dans le protocole STD tandis que cela augmente fortement dans les conditions HC3X.

Le complexe III, co-enzyme Q ou encore cytochrome c reductase comprend notamment CYTB (cytochrome b) (encodé par l'ADNmt), la sous-unité catalytique, dont l'expression génique n'augmente que durant la différenciation améliorée, tout comme l'expression d'UQCRC2 (cytochrome b-c1 subunit 2), un élément de structure du complexe, encodé par l'ADN nucléaire (Barros et al., 2020).

Le complexe IV, aussi appelé cytochrome c oxydase, est composé de 3 sous-unités catalytique codées par l'ADNmt (mtCO1, mtCO2 et mtCO3). L'expression génique de mtCO1 semble augmenter à partir du jour 16 dans la différenciation STD tandis qu'elle augmenterait plus tôt, au jour 12, dans la différenciation améliorée. mtCO2 ne présente pas de modification d'expression les conditions STD alors que celle-ci tend à augmenter dans la différenciation HC3X, mais toujours sans atteindre le seuil de significativité. L'expression génique de COX4 (encodée par le génome nucléaire), un des premiers éléments de structure du complexe, semble augmenter légèrement à partir du jour 12 pour ensuite se stabiliser dans la différenciation STD, tandis qu'elle augmente au cours de la différenciation améliorée.

L'ATPsynthase, parfois désignée comme complexe V, est composée de 29 sous-unités dont l'ATP5 α (encodé par l'ADN nucléaire), un élément de structure, et ATP6 (ATP synthase subunit a) (encodé par l'ADNmt), un élément de l'interface de conduction de protons (Barros et al., 2020). Dans la différenciation STD, l'expression génique d'ATP5 α augmente au jour 12, pour ensuite se stabiliser alors que l'augmentation se poursuit tout au long de la différenciation améliorée. L'expression génique d'ATP6 ne montre pas de modifications durant la différenciation STD alors qu'elle augmente progressivement dans les conditions HC3X mais, sans atteindre le seuil de significativité.

Globalement, ces données montrent une augmentation de l'expression de gènes codant pour des protéines de la chaîne de transport d'électrons à partir du jour 12, et ce, de façon plus marquée dans la différenciation améliorée. Nous n'observons pas de différence majeure entre l'expression des sous-unité codées par le génome mitochondrial et celle des sous-unités codées par le génome nucléaire.

Est-ce que l'abondance protéique évolue de la même façon ? (**Figure 18**)

2.4. Abondance des protéines mitochondriales

Les protéines NDUFB8 et NDUFS6 faisant partie du complexe I, montrent une tendance à la hausse au cours de la différenciation mais, cette tendance reste non significative. De plus, les profils sont similaires entre les conditions STD et HC3X. L'augmentation significative du

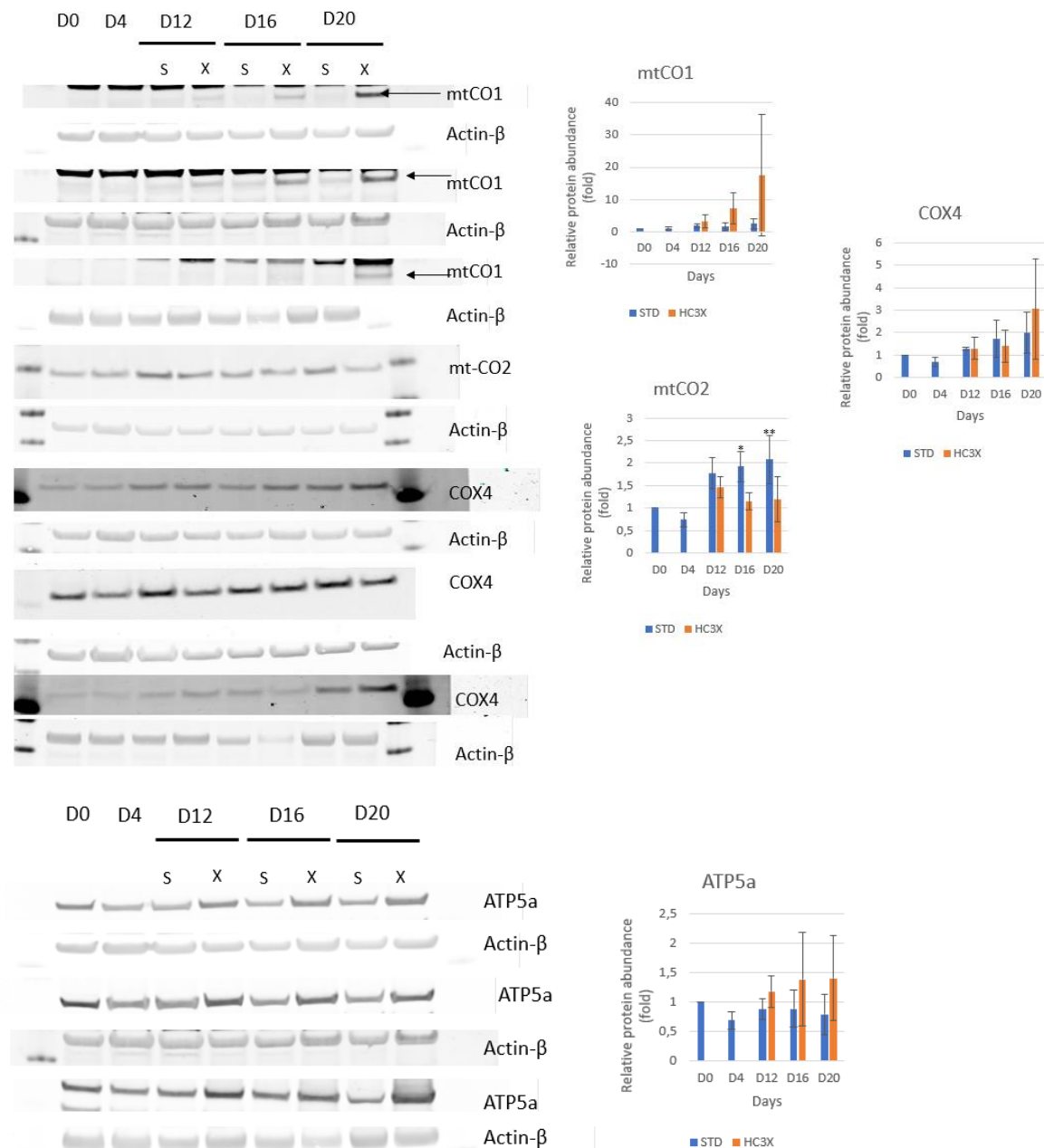


Figure 18 : Effets de la différenciation hépatogénique d'iPSCs sur l'abondance protéique de composants de la chaîne de transport d'électrons.

Les cellules iPSCs ont été soumises aux protocoles de différenciation standard (STD) et amélioré (HC3X) et récoltées après 0, 4, 12, 16 et 20 jours de culture. 20µg de protéines ont été chargés pour chaque condition (S = conditions STD ; X = conditions HC3X) sur un gel de polyacrylamide 4-12%. L'actine-β est utilisé comme contrôle de charge. Des protéines des différents complexes de la chaîne de transport d'électrons ont été détectées. Complexe I : NDUFB8 et NDUFS6. Complexe II : SDHB. Complexe III : UQCRC2. Complexe IV : mtCO1, mtCO2 et COX4. Complexe V : ATP5α. Le signal correspondant à chaque protéine d'intérêt a été normalisé par rapport à l'actine-β correspondante puis, exprimé relativement par rapport au jour 0. Les données sont représentées en moyenne ± écart-type (n=3). Un test ANOVA OneWay a été effectué, suite à un test de Tukey, sur l'ensemble des conditions. *** : extrêmement significatif (p< 0.01) ; ** : très significatif (p< 0.5) ; * : significatif (p< 0.1), par rapport au jour 0.

transcrit codant pour NDUFB8 observée au jour 20, et plus fortement dans les conditions HC3X, ne se vérifie donc pas au niveau protéique.

Dans le complexe II, l'abondance protéique de SDHB augmente durant la spécification hépatique et se stabilise durant le reste de la différenciation avec le protocole STD, tandis que cela continue à augmenter dans la maturation de la différenciation améliorée. Pour le protocole HC3X, l'abondance en ARNm suit les mêmes tendances, tandis que dans les conditions STD, une augmentation à partir du jour 12 est observée pour l'abondance protéique et non pour l'ARNm. Bien que ces effets soient observables pour chacun des 3 réplicats analysés, ces résultats ne sont pas significatifs d'un point de vue statistique. Davantage de réplicats devraient être analysés pour confirmer cette tendance.

UQCRC2, compris dans le complexe III, ne montre pas de modification d'abondance protéique aussi bien dans les conditions STD que HC3X, alors que son expression génique augmente fortement au jour 20 dans la différenciation HC3X.

mtCO1, mtCO2 et COX4 font partie du complexe IV. L'abondance protéique de mtCO1 est légèrement augmentée de la différenciation STD tandis qu'elle augmente fortement dans les conditions HC3X tout au long de la différenciation, alors que son abondance en ARNm ne montre pas de modification significative. L'abondance protéique de mtCO2 augmente à partir de la spécification hépatique pour se stabiliser par la suite dans la différenciation STD, alors que dans l'HC3X, cela augmente au jour 12 mais de façon plus faible que le STD, pour ensuite diminuer pour le reste de la différenciation. Ce résultat est inattendu car c'est la seule sous-unité de l'ETC pour laquelle l'augmentation d'abondance est plus marquée avec le protocole STD que dans le protocole HC3X. Rappelons que, l'expression génique n'est pas modifiée dans les conditions STD alors qu'elle tend à augmenter dans les HC3X. L'abondance protéique de COX4 augmente à partir du jour 16 et se stabilise jusqu'à la fin de la différenciation HC3X, tandis qu'aucune modification n'est observée dans les conditions STD (**Figure 17**). Aux jours 12 et 16, il n'y a pas de différence entre les conditions STD et HC3X mais, au jour 20, l'abondance est plus élevée dans la condition HC3X. Ces modifications suivent la même tendance que l'abondance en ARNm.

L'ATP5 α , composant du complexe ATPsynthase, présente une abondance protéique qui est non modifiée dans les conditions STD, alors que son abondance en ARNm augmente. Mais une tendance à augmenter peut être observée dans la maturation hépatique du protocole HC3X, plus visible en ARNm qu'en protéines.

L'abondance de la majorité des protéines de la chaîne de transport d'électrons est augmentée dans la différenciation améliorée et ce à partir au jour 12, même si le seuil de significativité n'est pas atteint pour chacune des protéines testées. Cependant, certaines différences sont observées entre l'abondance des ARNm et des protéines. Ces divergences seront discutées plus loin. Afin de compléter la cartographie mitochondriale, nous avons voulu savoir si des protéines autres que celles de la chaîne de transport d'électrons, et en particulier des acteurs de la transcription mitochondriale, montraient des modifications similaires durant la différenciation.

Des protéines impliquées dans la transcription de l'ADNmt mitochondrial ont aussi été évaluées au niveau transcrit et protéique (**Figure 19**). mtTFA, une protéine de liaison à l'ADNmt permettant le recrutement de la polymérase mtRPOL (**Figure 8**), montre une diminution de l'expression génique à partir au jour 4 pour rester stable durant le reste de la différenciation

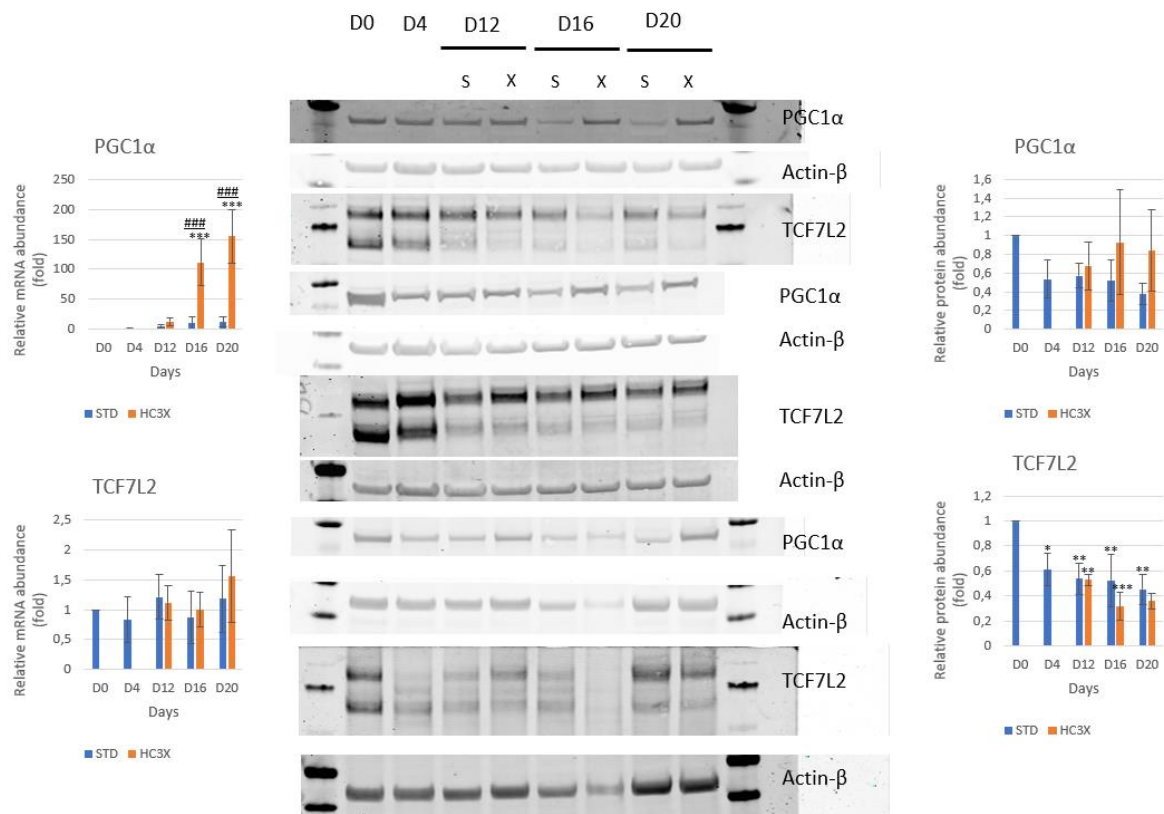


Figure 20 : Effet de la différenciation hépatogénique d'iPSCs sur l'expression génique et l'abondance protéique de PGC1α et TCF7L2.

A gauche, les cellules iPSCs ont été soumises aux protocoles de différenciation standard (STD) et amélioré (HC3X) et récoltées après 0, 4, 12, 16 et 20 jours de culture. L'abondance en ARNm de PGC1α, un régulateur positif de la biogenèse mitochondriale et de TCF7L2, un régulateur négatif de PGC1α, a été analysée par RT-qPCR. Chaque condition a été normalisée par rapport au HKG RPL19 puis, exprimée relativement par rapport au jour 0. Les données sont représentées en moyenne $\pm$ écart-type (n=4). 3

A droite et au centre, les cellules iPSCs ont été soumises aux protocoles de différenciation standard (STD) et amélioré (HC3X) et récoltées après 0, 4, 12, 16 et 20 jours de culture. 20μg de protéines ont été chargés pour chaque condition (S = conditions STD ; X = conditions HC3X) sur un gel de polyacrylamide 4-12%. L'actine-β est utilisée comme contrôle de charge. Les mêmes régulateurs de la biogenèse mitochondriale ont été détectés. Le signal correspondant à chaque protéine d'intérêt a été normalisé par rapport à l'actine-β correspondante puis, exprimé relativement par rapport au jour 0. Les données sont représentées en moyenne $\pm$ écart-type (n=3). Un test ANOVA OneWay a été effectué, suite à un test de Tukey, sur l'ensemble des conditions. *** : extrêmement significatif (p< 0.01) ; ** : très significatif (p< 0.5) ; * : significatif (p< 0.1), par rapport au jour 0. ### : extrêmement significatif (p< 0.01) ; ## : très significatif (p< 0.5) ; # : significatif (p< 0.1), entre STD et HC3X.

quel que soit le protocole utilisé. Au niveau protéique, mtTFA ne montre aucune modification aussi bien dans les conditions HC3X que STD. L'expression génique de mtRPOL suit les mêmes modifications que l'expression génique de mtTFA dans le protocole STD tandis que son expression augmente fortement après 20 jours en présence du protocole HC3X. Par contre, son abondance protéique diminue fortement dès le jour 4 pour rester stable durant le reste de la différenciation dans les 2 protocoles. L'expression génique d'un facteur l'initiation, TFB2M, et d'un facteur d'élongation, TEFM, a également été analysé. Pour TFB2M, son expression diminue dès le jour 4 pour se stabiliser dans la suite de la différenciation STD et augmente légèrement en fin de différenciation HC3X. L'expression de TEFM, n'est pas modifiée dans les conditions STD alors qu'elle augmente dans le jour 20 HC3X.

Globalement, l'expression génique et l'abondance protéique de ces acteurs de la transcription mitochondriale ne semblent pas corrélées aux modifications de l'abondance des protéines de la chaîne de transport d'électrons. Cela peut être dû à certaines régulations, qui seront illustrées dans la discussion.

2.5. PGC1 α et TCF7L2

Suite à la caractérisation du processus de biogenèse mitochondriale survenant au cours de la différenciation hépatogénique de BM-MSCs, les chercheurs ont étudié divers régulateurs de cette biogenèse dont PGC1 α . L'abondance des transcrits ainsi que l'abondance protéique de PGC1 α augmentent durant la différenciation (Wanet et al., 2017). De plus, il a été décrit qu'une diminution de l'expression de l'abondance protéique de TCF7L2 (transcription factor 7-like 2), un régulateur négatif de PGC1 α , survient au cours de la différenciation (Wanet et al., 2017). Le but ici est déterminer si c'est également le cas dans le modèle de différenciation hépatogénique à partir d'iPSCs (**Figure 20**).

Dans la différenciation hépatogénique d'iPSCs, l'expression génique de PGC1 α augmente légèrement durant la différenciation effectuée avec le protocole STD et très fortement encore plus dans les conditions HC3X, mais ce n'est pas corrélé au niveau protéique : l'abondance protéique de PGC1 α diminue au jour 4 et continue de diminuer dans les conditions STD tandis que cela reste stable dans les conditions HC3X. Au terme de la différenciation, l'abondance de PGC1 α est donc deux fois plus élevée dans la condition HC3X que dans la condition STD, bien que cette différence ne soit pas statistiquement significative. Quant à TCF7L2, bien que son expression génique soit stable au cours de la différenciation quel que soit le protocole utilisé, son abondance protéique diminue durant la différenciation. Une différence se marque entre les conditions STD et HC3X à partir du jour 16, avec une diminution plus prononcée pour le protocole HC3X.

Le protocole amélioré semble diminuer l'abondance protéique de TCF7L2, ce qui contribuerait à induire l'expression génique de PGC1 α , comme nous l'observons. Cependant, contrairement à ce qui est observé dans le modèle de BM-MSCs (Wanet et al., 2017), cette augmentation de l'abondance des transcrits de PGC1 α ne se traduit pas par une augmentation de l'abondance protéique de ce co-régulateur.

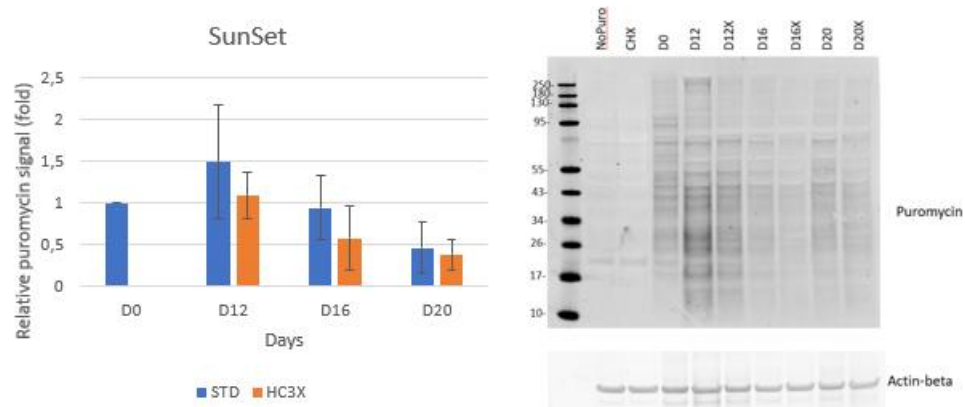


Figure 21 : Effet de la différenciation hépatogénique d'iPSCs sur la traduction globale.

Les cellules iPSCs ont été soumises aux protocoles de différenciation standard (STD) et amélioré (HC3X) et récoltées après 0, 12, 16 et 20 jours de culture et la traduction globale a été caractérisée par un SUNSET. Les contrôles négatifs sont : une condition sans puromycine (NoPuro) et une condition avec du cycloheximide (CHX). Un Western Blot représentatif de 5 réplicats indépendants, montrant le signal puromycine obtenu, est présenté. Le signal issu de la révélation de la puromycine a été quantifié, rapporté à celui de l'actine- β correspondante, puis exprimé relativement par rapport au jour 0. Les données sont représentées en moyenne $\pm$ écart-type ($n=5$). Un test ANOVA OneWay a été effectué, suite à un test de Tukey, sur l'ensemble des conditions. Aucune différence significative n'a été mise en évidence.

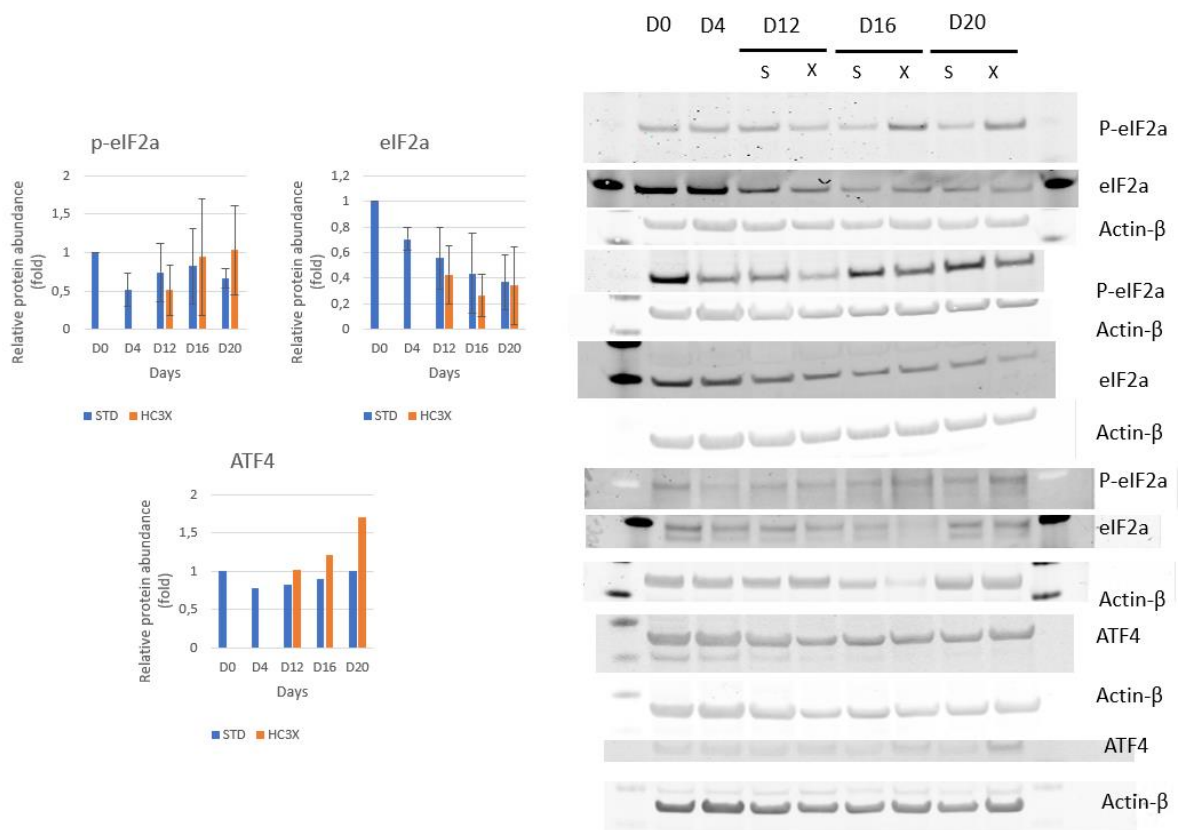


Figure 22 : Effets de la différenciation hépatogénique d'iPSCs sur la voie eIF2α.

Les cellules iPSCs ont été soumises aux protocoles de différenciation standard (STD) et amélioré (HC3X) et récoltées après 0, 4, 12, 16 et 20 jours de culture. 20µg de protéines ont été chargés pour chaque condition (S = conditions STD ; X = conditions HC3X) sur un gel de polyacrylamide de 4-12%. L'actine-β est utilisée comme contrôle de charge. La forme phosphorylée (p-eIF2α) et la forme totale (eIF2α) (n=3) ont été révélées, ainsi que ATF4 (n=2), dont le transcrit est une cible de p-eIF2α. Le signal correspondant à chaque protéine d'intérêt a été normalisé par rapport à l'actine-β correspondante puis, exprimé relativement par rapport au jour 0. Les données sont représentées en moyenne ± 1 écart-type (n=3). Un test ANOVA OneWay a été effectué, suite à un test de Tukey, sur l'ensemble des conditions. Aucune différence significative n'a été mise en évidence.

3. Régulation traductionnelle

Suite aux analyses transcriptomiques réalisées sur la différenciation hépatogénique à partir de BM-MSCs et d'iPSCs, un enrichissement des facteurs de la voie mTOR, de la voie eIF2 α et de la traduction globale a été mis en évidence dans les cellules en cours de différenciation (Wanet et al., 2017; Boon et al., 2020). Un des objectifs est donc la caractérisation de la traduction globale durant la différenciation hépatogénique d'iPSCs, ainsi que des acteurs de la voie mTOR et eIF2 α impliqués dans la régulation traductionnelle.

3.1. Traduction globale

Une évaluation de la traduction globale a donc été effectuée grâce à la méthode de SUnSET. Cette méthode se base sur l'utilisation de la puromycine, un analogue du tyrosyl-t-RNA. Les cellules sont mises en présence de puromycine 10min avant d'être lysées. Durant ces 10 min, les protéines qui sont en cours de traduction vont incorporer la puromycine à la place du tyrosyl-t-RNA ce qui entraîne l'arrêt de leur traduction. Le signal de puromycine détecté représente toutes les protéines qui étaient en cours de traduction pendant ces 10 min. La traduction globale (**Figure 21**) représentée par le signal puromycine tend à augmenter au jour 12 pour ensuite diminuer dans le reste de la différenciation, bien que cet effet ne soit pas significatif. De plus, la traduction globale semble moins élevée dans les conditions HC3X que les STD.

Il semble y avoir une augmentation de la traduction dans le jour 12 pour les deux types de protocoles, suivie d'une diminution globale de la traduction. Afin de déterminer si ce profil de traduction est corrélé à des modifications des deux principaux axes de régulation traductionnelle, les voies mTOR et eIF2 α ont été investiguées.

3.2. Voie eIF2 α

Comme expliqué précédemment, eIF2 contient 3 sous-unités et la phosphorylation de la sous-unité α empêche la traduction cap-dépendante pour favoriser la traduction d'ATF4 qui en associations avec d'autres facteurs de transcription induit l'expression de gènes permettant l'adaptation aux stress (Wek, 2018). L'abondance protéique de la forme totale d'eIF2 α (**Figure 22**) tend à diminuer durant la différenciation aussi bien dans les conditions STD que HC3X. L'abondance protéique de phospho-eIF2 α , quant à elle, tend à diminuer au jour 4 pour revenir au même niveau qu'au jour 0 dans le reste de la différenciation, avec les 2 protocoles. Cependant, que ces profils d'abondance et de phosphorylation de eIF2 α ne sont pas modifiés de manière significative, ce que l'on peut éventuellement imputer au fait que l'un des 3 réplicats a un comportement différent des deux autres. L'abondance protéique d'ATF4, dont la traduction est favorisée lors de la phosphorylation d'eIF2 α , reste stable dans le protocole STD tandis qu'elle montre une tendance à augmenter dans la maturation hépatique de la différenciation HC3X.

Ces résultats suggèrent qu'une régulation par eIF2 α pourrait exister dans le protocole HC3X au vu de la tendance à l'augmentation de la phosphorylation d'eIF2 α , qui induirait l'augmentation d'ATF4 dans les conditions HC3X. Cependant, cette hypothèse requiert clairement davantage de réplicats car aucune de ces données n'est statistiquement significative.

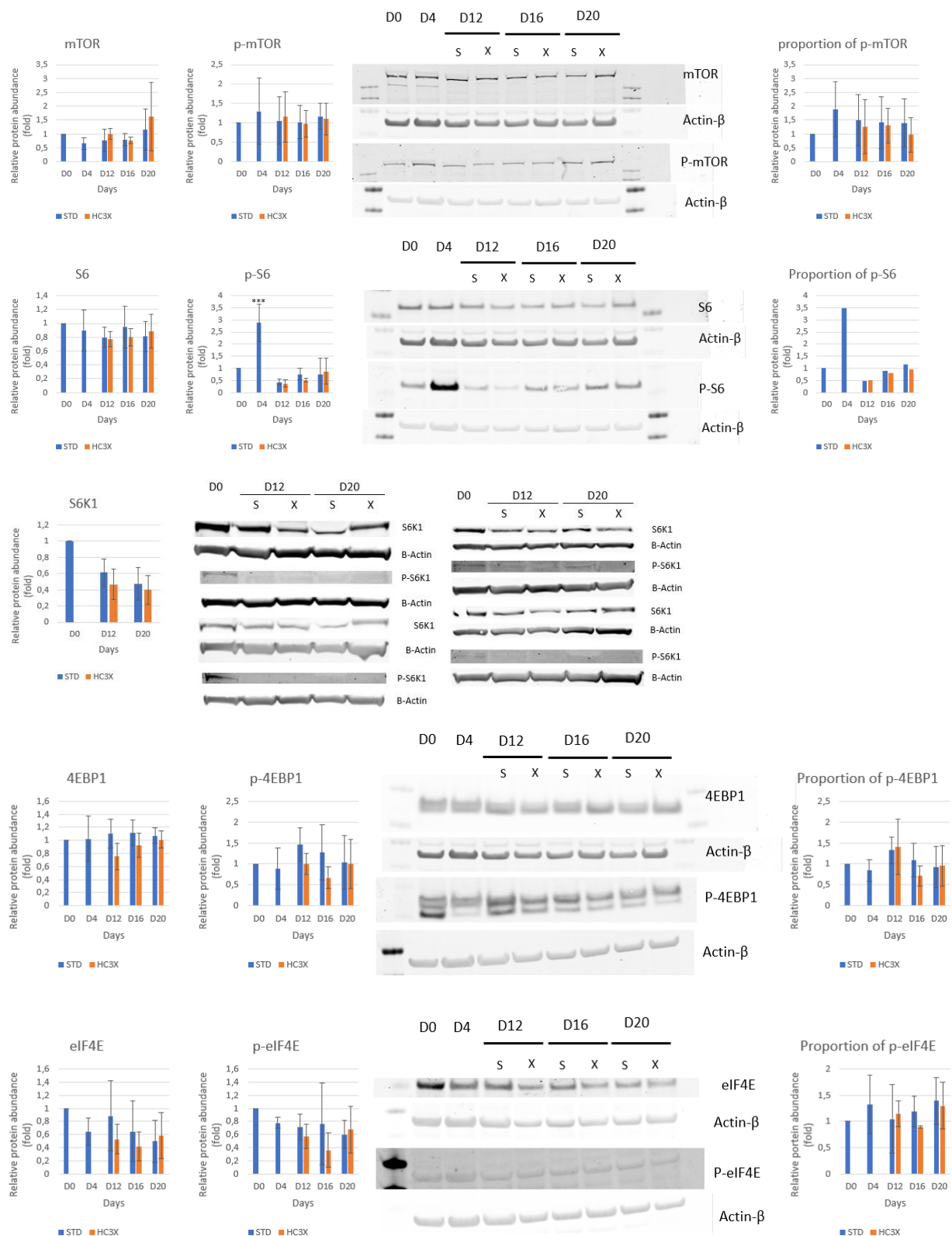


Figure 23 : Effets de la différenciation hépatogénique d'iPSCs sur la voie mTOR et ses acteurs impliqués dans la régulation traductionnelle.

Les cellules iPSCs ont été soumises aux protocoles de différenciation standard (STD) et amélioré (HC3X) et récoltées après 0, 4, 12, 16 et 20 jours de culture. 20µg de protéines ont été chargés pour chaque condition (S = conditions STD ; X = conditions HC3X) sur un gel de polyacrylamide 4-12%. L'actine-β est

utilisée comme contrôle de charge mTOR et sa forme phosphorylée ainsi que 3 de ses cibles directes et indirectes (S6K1 (n=4), S6, 4EBP1 et eIF4E) et leur formes phosphorylées (p-S6K1, p-S6, p-4EBP1 et p-eIF4E) ont été détectées. Le signal correspondant à chaque protéine d'intérêt a été normalisé par rapport à l'actine- β correspondante puis, exprimé relativement par rapport au jour 0. Les données sont représentées en moyenne $\pm$ 1 écart-type (n=3). Pour S6K1, les conditions récoltées ne comprennent pas le jour 4 et 16. Un test ANOVA OneWay a été effectué, suite à un test de Tukey, sur l'ensemble des conditions. Aucune différence significative n'a été mise en évidence. *** : extrêmement significatif ($p < 0.01$) ; ** : très significatif ($p < 0.05$) ; * : significatif ($p < 0.1$), par rapport au jour 0.

3.3. Voie mTOR

Comme expliqué précédemment, mTOR activé régule la traduction grâce à son action sur divers acteurs influençant l'initiation de la traduction. L'abondance de la forme totale de mTOR (**Figure 23**) reste relativement stable au cours des deux types de différenciation. L'abondance protéique de p-mTOR n'est pas modifiée non plus tant avec le protocole STD qu'HC3X. Etant donné qu'il n'y a pas de changements ni dans la forme totale, ni dans p-mTOR, le calcul de la proportion de p-mTOR donne le même profil.

Une des cibles directes de mTOR est S6K1, qui à son tour phosphoryle S6. L'abondance protéique de la forme totale de S6K1 semble diminuer au cours de la différenciation et ce, plus fortement dans les conditions HC3X. Bien que la qualité du blot ne soit pas bonne, la forme phosphorylée de S6K1 (p-S6K1) tend à diminuer plus fortement au cours de la différenciation, quel que soit le protocole utilisé.

L'abondance protéique de la forme totale de S6 n'est pas modifiée au cours de la différenciation quel que soit le protocole mais, la forme phosphorylée augmente jusqu'à 3 fois au jour 4 pour montrer une tendance à diminuer en début de spécification hépatique et augmenter durant le reste de la différenciation pour atteindre le même niveau qu'au jour 0. Lorsque le calcul de la proportion de p-S6 est effectué, le même profil que p-S6 est observé.

Une autre cible de p-mTOR est 4EBP1, une protéine qui séquestre eIF4E et donc empêche l'initiation de la traduction cap-dépendante tant qu'il n'est pas phosphorylé. L'abondance protéique de la forme totale de 4EBP1 ne change pas durant la différenciation quel que soit le protocole utilisé. L'abondance protéique de p-4EBP1 reste relativement stable au cours des différenciations HC3X et STD. Le calcul de la proportion de p-4EBP1 rend un même profil de stabilité au cours de la différenciation.

Une fois qu'eIF4E est libéré, il peut se faire phosphoryler afin d'entrer dans le complexe d'initiation de la traduction. L'abondance protéique de la forme totale d'eIF4E semble diminuer au jour 4 pour se stabiliser durant le reste de la différenciation aussi bien dans les conditions HC3X que STD. L'abondance protéique de p-eIF4E diminue légèrement au jour 4 pour se stabiliser durant le reste de la différenciation quel que soit le protocole utilisé. Le calcul de la proportion de p-eIF4E montre qu'il n'y a pas de changement au cours de la différenciation ni de distinctions entre les niveaux dans les conditions HC3X et STD.

Ces résultats suggèrent qu'il n'y a pas de changements dans la voie mTOR au cours de la différenciation hépatogénique d'iPSCs, étant donné qu'il n'y a pas de modification de l'abondance des formes actives de ses cibles directes comme S6K1 et 4EBP1 et indirectes comme S6 et eIF4E.

Dans l'article de Boon et al., les auteurs ont montré qu'il y a une implication de la voie mTOR dans l'induction de l'expression génique de CYP3A4 dans les cellules HepG2. En effet, suite à un traitement à la rapamycine, l'abondance en ARNm de CYP3A4 diminue fortement (jour 20). Ils ont également étudié la réponse cellules des HepG2 au milieu de culture utilisé dans le protocole STD comparé à celui utilisé à partir du jour 14 de la différenciation améliorée, donc celui avec une forte concentration en acides aminés, et ce milieu amélioré influence positivement l'abondance protéique de CYP3A4, mais aussi l'influence d'un KO TSC1, faisant partie du complexe inhibant Rheb, un composant du complexe mTORC1. Celui-ci induit une forte augmentation de l'abondance protéique de CYP3A4. Ces résultats, qui semblent

contradictoires aux nôtres, suggèrent que la voie mTOR intervient au cours du processus de différenciation HC3X, mais il s'agit ici de cellules HepG2 et non d'iPSCs.

Discussion et perspectives

L'efficacité de la différenciation est vérifiée de 2 manières : morphologiquement et par l'expression de divers gènes hépato-spécifiques. Ces changements morphologiques et géniques survenant durant la différenciation hépatogénique d'iPSCs sont dus, en partie, aux différentes cytokines contenues dans le milieu de différenciation.

En effet, celui-ci contient par exemple de l'Activine A dans les premiers jours de différenciation afin d'imiter le signal Nodal impliqué dans les étapes précoces du développement du foie. En effet, Nodal induit l'expression de gènes spécifiques à l'endoderme comme *SOX17* (Gordillo et al., 2015; Russell et al., 2018).

Durant les deux premiers jours de la différenciation, en plus de l'Activine A, il y a également du Wnt3A. C'est l'action couplée de ces deux cytokines qui favorise l'expression de gènes endodermiques comme *SOX17* et *GATA4* (Shen, 2007; Oshimori et al., 2012; Pauklin et al., 2015; Mukherjee et al., 2020). En effet, Nodal induit la phosphorylation de smad2/3, celui-ci est donc capable de former un complexe avec la forme active, phosphorylée de smad4. Wnt3A, quant à lui, induit l'inhibition de GSK3 β (Routledge et al., 2019). Or, GSK3 β actif inhibe la β -caténine, qui subit alors une dégradation par le protéasome. Lorsque la β -caténine est libre, elle est capable de former un complexe avec p-smad2/3/p-smad4. Ce complexe peut ainsi transloquer dans le noyau et activer la transcription de *Mixl1*. Ce dernier est exprimé dans les progéniteurs mésendodermiques et, suite à l'action du signal Nodal, induit l'expression de *SOX17* (Shen, 2007; Mukherjee et al., 2020). De plus, l'interaction suivante entre Wnt3A et *SOX17* permet l'activation de *FOXA2*, faisant partie de la famille des HNFs (Hannoun et al., 2016).

À partir du jour 4, il y a ajout du BMP4. Celui-ci est introduit pour imiter la sécrétion de BMP4 effectuée par le mésoderme cardiaque adjacent durant l'embryogenèse (Hannoun et al., 2016). BMP4 favorise la spécification de l'endoderme primitif grâce à l'activation de *GATA4* (Hannoun et al., 2016). Dans nos résultats, l'abondance en ARNm de *GATA* augmente à partir du jour 4 suite à l'action de Nodal, mais reste stable durant la période où BMP4 est ajouté. *GATA4* est primordial pour la différenciation hépatique étant donné, qu'en association avec *FOXA1* et 2, il induit l'expression de l'albumine (Lau et al., 2018). On pourrait poser l'hypothèse que l'augmentation de l'expression de l'albumine serait en partie due à cette augmentation de *GATA4*.

Durant la maturation hépatique, il y a une introduction de HGF et α FGF. HGF, quand il est sur son récepteur Met va activer plusieurs sortes de cascades : activation de PI3K/Akt, ce qui va activer mTOR, la voie PLC γ /Rap1, favorisant l'adhésion cellulaire, ainsi que Ras/SOS/Rac/Rho jouant un rôle également dans l'adhésion cellulaire et la motilité. De plus, dans le milieu de base de différenciation hépatogénique (LDM), il y a également de la dexaméthazone, connue pour induire l'expression de gènes matures, hépato-spécifiques (Hannoun et al., 2016).

La vérification par les modifications d'expression génique au cours de la différenciation hépatogénique est importante pour vérifier l'efficacité de chaque différenciation. Par exemple, nous avons vérifié l'abondance des transcrits des 3 facteurs de transcription induits par la doxycycline durant le protocole HC3X. Deux de ces 3 FT sont impliqués dans un réseau d'interactions avec d'autres membres des HNFs. Le rôle de HNF1 α est d'activer, en association

avec HNF1 β , la transcription de FOXA3. Lors de la vérification de l'efficacité de la différenciation, un autre membre de la famille des HNFs est analysé : HNF4 α . Celui-ci, contrôle l'expression d'HNF1 α et β , GATA4 et 6 ou encore FOXA1,2 et3 (Lau et al., 2018).

Lors de la caractérisation de la biogenèse mitochondriale, diverses protéines de la chaîne de transport d'électrons ont été analysées aussi bien au niveau des transcrits qu'au niveau protéique. La conclusion de ces résultats est, qu'il semble y avoir une augmentation globale de l'abondance de ces protéines au cours de la différenciation hépatogénique d'iPSCs. Par contre, la tendance croissante les plus élevées suite au protocole amélioré. Cependant, certaines divergences sont observées entre l'abondance en ARNm et en protéines.

Une forte différence entre l'abondance en ARNm et en protéines, apparaît pour mtCO1, composant du complexe IV de l'ETC. L'ARNm mitochondrial a la possibilité d'être stabilisé dans la mitochondrie par mtPAP, la polymérase polyA mitochondriale et le complexe LRPPRC / SLIRP (leucine rich pentatricopeptide protein / stem-loop interacting RNA binding protein) qui stabilise les ARNm qui ne sont pas engagés avec un ribosome mitochondrial. L'activation de la traduction de l'ARNm de mtCO1 peut se faire grâce à TACO1 (translational activator of cytochrome c oxidase 1), une protéine de la matrice mitochondriale, qui interagirait avec l'ARNm et le ribosome favorisant l'initiation de la traduction (Dennerlein et al., 2017). L'abondance en ARNm de mtCO1 semble augmenter légèrement durant le protocole HC3X, alors qu'une tendance plus prononcée est remarquée au niveau protéique. On pourrait hypothétiser que ce qui est détecté en WB serait, la forme mature de mtCO1 plus sa forme transitoire. En effet, la traduction de mtCO1 se fait en plusieurs étapes et, mtCO1 peut s'accumuler sous forme transitoire (Dennerlein et al., 2015; Priesnitz et al., 2018). Cependant, mtCO1 n'est détecté qu'à un seul poids moléculaire ce qui montre que la majorité de la protéine est sous forme mature. Une autre régulation de la traduction de mtCO1 est via miR-1, un microARN qui, couplé avec AGO2 (Argonaute protein 2), fait partie du complexe RISC (RNA-induced silencing complex), capable de lier les ARNm et de réguler leur stabilité et traduction. Ce complexe Ago2-miR-1, se lie sur plusieurs transcrits de sous-unités de l'ETC et favorise leur traduction (Priesnitz et al., 2018). On pourrait émettre l'hypothèse que AGO2/miR-1 favorise la traduction de mtCO1.

Pour compléter la cartographie du processus de la biogenèse mitochondriale, une évaluation des protéines impliquées dans la transcription de l'ADNmt a été effectuée. Avec une augmentation de la biogenèse mitochondriale, on s'attendrait à avoir une augmentation de mtTFA étant donné que celui-ci est impliqué dans la transcription des gènes de l'ADN mitochondrial. Or, dans le modèle de différenciation hépatogénique à partir d'iPSCs, il semble rester stable. On peut émettre l'hypothèse qu'un taux basal de cette protéine est suffisant pour produire tous les transcrits nécessaires à la biogenèse mitochondriale.

Un des objectifs de ce travail était de caractériser les potentielles régulations traductionnelles ayant lieu au cours de la différenciation hépatogénique d'iPSCs. Lors de l'analyse de la traduction globale, on a remarqué qu'il semblait y avoir une augmentation de la traduction globale au jour 12 suivie d'une diminution durant le reste de la différenciation et ce, plus fortement suivant le protocole HC3X. Une des hypothèses était que ces tendances au niveau de la traduction globale soient peut-être dues à la régulation traductionnelle par la voie eIF2 α . Une analyse protéique de ses acteurs a donc été effectuée. On observe qu'il y a une tendance à

augmenter de la forme phosphorylée d'eIF2 α au cours de la différenciation et ce, plus fortement dans les conditions HC3X. Cela est en accord avec une fonction de p-eIF2 α de diminuer la traduction globale.

Une autre propriété principale de cette protéine est de favoriser les acteurs de l'ISR dont ATF4 (B'Chir et al., 2013; Baird et al., 2020). L'abondance protéique de celui-ci a donc été évaluée par WB. Les modifications de l'abondance de ce facteur semblent suivre celles de p-eIF2 α . Afin de mieux caractériser ce type de régulation traductionnelle, d'autres acteurs devraient être investigués.

Lors de la différenciation hépatogénique d'iPSCs, nous avons pu observer une augmentation de l'abondance mitochondriale tout au long du processus de différenciation et ce, plus fortement avec le protocole amélioré. Or, PGC1 α peut être influencé par p38 MAPK via la suppression de la répression de PGC1 α par p61 et, en augmentant la stabilité de PGC1 α (Finck et al., 2006; Reznick et al., 2006). Et, p38 MAPK peut être activé par divers facteurs de croissance (Finck et al., 2006). De plus, PGC1 α interagit et co-active d'autres facteurs de transcription comme ERRs. Celui-ci régule divers gènes impliqués dans le métabolisme du glucose et la biogenèse mitochondriale (Gureev et al., 2019).

Une autre propriété de PGC1 α est de se lier à et de co-activer l'activité transcriptionnelle de NRF1 sur le promoteur de mtTFA. On pourrait donc penser que la diminution de l'abondance des transcrits de mtTFA avec le protocole STD serait due à cette même diminution dans l'abondance protéique de PGC1 α dans les conditions STD.

Le précédent modèle de différenciation hépatogénique à partir de BM-MSCs laissait penser à une régulation traductionnelle par la voie mTOR (Wanet et al., 2017), ainsi que l'étude effectuée sur les HepG2 par (Boon et al., 2020). Or, cela ne semble pas être le cas dans notre modèle de différenciation à partir d'iPSCs.

Pourtant, suite à l'introduction dans le milieu d'une forte concentration en acides aminés, on pourrait penser que cela activerait la voie mTOR. En effet, les acides aminés sont impliqués dans la formation du complexe mTORC1. Une fois ces acides aminés en contact avec le lysosome, cela va induire la dissociation de la V-ATPase avec p18. Or, celui-ci fait partie du complexe LAMTOR (late endosomal/lysosomal adaptator and MAPK and mTOR activator) composé de p18, LAMTOR-2,3,4 et 5, qui sont liés à RagA/B et RagC/D. Quand ce complexe n'est plus associé à la V-ATPase, mTORC1 peut venir s'y lier et s'activer (Heberle et al., 2015; Roux et al., 2018; Baird et al., 2020).

Dans le modèle de différenciation amélioré à partir d'iPSCs (HC3X), une forte concentration en acides aminés est ajoutée au milieu à partir du jour 12. On s'attendrait donc à une augmentation de l'activité de mTOR à ce jour dans le protocole HC3X, mais ce n'est pas le cas. Par contre, on remarque une tendance à l'augmentation de p-eIF2 α et celui-ci est capable d'inhiber mTOR grâce à ATF4, qui est capable d'augmenter l'expression de REDD1. Ce dernier est connu pour interagir avec TSC afin d'inhiber le signal mTOR (Heberle et al., 2015; Roux et al., 2018; Baird et al., 2020).

Cette potentielle inhibition de mTOR par p-eIF2 α induirait peut-être cette non modification de mTOR au cours de la différenciation HC3X mais, permettrait quand même un signal basal de mTOR tout au long de la différenciation, peut être nécessaire à l'obtention d'une différenciation hépatogénique efficace.

IV. Conclusion

La différenciation hépatogénique à partir d'iPSCs est un modèle efficace pour étudier les mécanismes sous-jacents à cette différenciation. Un premier objectif de ce travail était de pouvoir utiliser de façon reproductible les deux types de différenciation (standard et amélioré) de ce modèle dans le laboratoire. Cet objectif est rempli puisque, cette différenciation montre de manière reproductible une augmentation de facteurs spécifiques aux hépatocytes. Un deuxième objectif était de caractériser le processus de biogenèse mitochondriale au cours de cette différenciation. Pour ce faire, une analyse des protéines mitochondriales a été réalisée. Il semblerait que l'abondance protéique des protéines de la chaîne de transport d'électrons augmente globalement au cours de la différenciation. L'abondance mitochondriale a également été visualisée par immunofluorescence et, cela montre une tendance à l'augmentation durant la différenciation et ce plus intensément dans le protocole HC3X. Une dernière façon d'évaluer l'abondance mitochondriale a été réalisée par l'analyse de l'abondance de l'ADN mitochondriale. Un nouveau protocole d'extraction d'ADN a dû être mis au point avant de pouvoir évaluer le nombre de copies d'ADNmt par cellule durant la différenciation. Suite à ces résultats, il semblerait qu'une augmentation de l'abondance mitochondriale a lieu au cours de la différenciation et qu'elle commence au jour 12. De plus, cette augmentation est plus forte avec le protocole HC3X. Un dernier objectif était de caractériser la traduction globale ainsi que les acteurs de la régulation traductionnelle de la voie mTOR et eIF2 α . Lors de l'analyse de la traduction globale, on remarque une augmentation de celle-ci au jour 12, et une tendance à la diminution dans le reste de la différenciation. Une conclusion de cette caractérisation est qu'il n'y a pas de modification au niveau des acteurs de mTOR durant la différenciation hépatogénique d'iPSCs. Une seconde observation, est une tendance, à ce stade non significative, à l'augmentation de p-eIF2 α au cours de la différenciation et ce, plus fortement dans les conditions HC3X. Ce dernier résultat est en corrélation avec les tendances de modification de l'abondance globale. Une investigation plus approfondie des acteurs de la régulation traductionnelle par p-eIF2 α pourrait potentiellement montrer son implication au niveau du remodelage mitochondrial.

V. Références

- Asin-Cayuela, Jordi and Gustafsson, Claes M. (2007), Mitochondrial Transcription and Its Regulation in Mammalian Cells. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(3): 111–117.
- B'Chir, Wafa, Maurin, Anne Catherine, Carraro, Valérie, Averous, Julien, Jousse, Céline, Muranishi, Yuki, Parry, Laurent, Stepien, Georges, Fafournoux, Pierre and Bruhat, Alain (2013), The EIF2 α /ATF4 Pathway Is Essential for Stress-Induced Autophagy Gene Expression. *Nucleic Acids Research*, 41(16): 7683–7699. available at <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23804767/> [10 August 2020].
- Bahat, Amir and Gross, Atan (2019), Mitochondrial Plasticity in Cell Fate Regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 294(38): 13852–13863.
- Baird, Thomas D and Wek, Ronald C (2020), Thematic Review Series: Nutrient Control of Metabolism and Cell Signaling Eukaryotic Initiation Factor 2 Phosphorylation and Translational Control in Metabolism 1,2. available at <https://academic.oup.com/advances/article/3/3/307/4591529> [10 August 2020].
- Barros, Mario H. and McStay, Gavin P. (2020), Modular Biogenesis of Mitochondrial Respiratory Complexes. *Mitochondrion*, 50: 94–114.
- Blackford, Samuel J.I., Ng, Soon Seng, Segal, Joe M., King, Aileen J.F., Austin, Amazon L., Kent, Deniz, Moore, Jennifer, Sheldon, Michael, Ilic, Dusko, Dhawan, Anil, Mitry, Ragai R. and Rashid, S. Tamir (2019), Validation of Current Good Manufacturing Practice Compliant Human Pluripotent Stem Cell-Derived Hepatocytes for Cell-Based Therapy. *Stem Cells Translational Medicine*, 8(2): 124–137.
- Boon, Ruben, Kumar, Manoj, Tricot, Tine, Elia, Ilaria, Ordovas, Laura, Jacobs, Frank, One, Jennifer, De Smedt, Jonathan, Eelen, Guy, Bird, Matthew, Roelandt, Philip, Doglioni, Ginevra, Vriens, Kim, Rossi, Matteo, Aguirre Vazquez, Marta, Vanwelden, Thomas, Chesnais, François, El Taghdouini, Adil, Najimi, Mustapha, Sokal, Etienne, Cassiman, David, Snoeys, Jan, Monshouwer, Mario, Hu, Wei-Shou, Lange, Christian, Carmeliet, Peter, Fendt, Sarah-Maria and Verfaillie, Catherine M (2020), Amino Acid Levels Determine Metabolism and CYP450 Function of Hepatocytes and Hepatoma Cell Lines. *Nature communications*. available at <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15058-6> [26 March 2020].
- Chen, Chien-Tsun, Shih, Yu-Ru V., Kuo, Tom K., Lee, Oscar K. and Wei, Yau-Huei (2008), Coordinated Changes of Mitochondrial Biogenesis and Antioxidant Enzymes During Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*, 26(4): 960–968. available at <http://doi.wiley.com/10.1634/stemcells.2007-0509> [31 December 2019].
- Chen, Yu Fan, Tseng, Chien Yu, Wang, Hsei Wei, Kuo, Hung Chih, Yang, Vincent W. and Lee, Oscar K. (2012), Rapid Generation of Mature Hepatocyte-like Cells from Human Induced Pluripotent Stem Cells by an Efficient Three-Step Protocol. *Hepatology*, 55(4): 1193–1203.
- Cunningham, Corey N and Rutter, Jared (2020), 20,000 Picometers under the <sc>OMM</Sc> : Diving into the Vastness of Mitochondrial Metabolite Transport. *EMBO reports*, 21(5). available at <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.15252/embr.202050071> [25 July 2020].

- Dai, Xiaozhen, Yan, Xiaoqing, Wintergerst, Kupper A, Cai, Lu, Keller, Bradley B, Tan, Yi and Edu, Brad Keller@louisville (2020), Nrf2: Redox and Metabolic Regulator of Stem Cell State and Function Nrf2 Regulates the Balance between Embryonic Stem Cell Stemness and Germ Layer Differentiation by Finely Tuning the Expression of Pluripotency Genes. *Trends in Molecular Medicine*, 26(2): 185–200. available at <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2019.09.007> [9 August 2020].
- DeBalsi, Karen L., Hoff, Kirsten E. and Copeland, William C. (2017), Role of the Mitochondrial DNA Replication Machinery in Mitochondrial DNA Mutagenesis, Aging and Age-Related Diseases. *Ageing Research Reviews*, 33: 89–104.
- Dennerlein, Sven and Rehling, Peter (2015), Human Mitochondrial COX1 Assembly into Cytochrome c Oxidase at a Glance. *JCS Advance Online Article. Posted on*, 128: 1–5.
- Dennerlein, Sven, Wang, Cong and Rehling, Peter (2017), Plasticity of Mitochondrial Translation. *Trends in Cell Biology*, 27(10): 712–721.
- Drehmer, Daiana Leila, de Aguiar, Alessandra Melo, Brandt, Anna Paula, Petiz, Lyvia, Cadena, Sílvia Maria Suter Correia, Rebelatto, Carmen K., Brofman, Paulo R.S., Filipak Neto, Francisco, Dallagiovanna, Bruno and Abud, Ana Paula Ressetti (2016), Metabolic Switches during the First Steps of Adipogenic Stem Cells Differentiation. *Stem Cell Research*, 17(2): 413–421.
- Falkenberg, Maria (2018), Mitochondrial DNA Replication in Mammalian Cells: Overview of the Pathway. *Essays in Biochemistry*, 62: 287–296. available at <https://doi.org/10.1042/EBC20170100> [5 December 2019].
- Faye, Mame Daro, Graber, Tyson E. and Holcik, Martin (2014), Assessment of Selective mRNA Translation in Mammalian Cells by Polysome Profiling. *Journal of Visualized Experiments*, (92).
- Finck, Brian N. and Kelly, Daniel P. (2006), PGC-1 Coactivators: Inducible Regulators of Energy Metabolism in Health and Disease. *Journal of Clinical Investigation*, 116(3): 615–622. available at [/pmc/articles/PMC1386111/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16386111/) [13 August 2020].
- Fortini, P., Ferretti, C., Iorio, E., Cagnin, M., Garribba, L., Pietraforte, D., Falchi, M., Pascucci, B., Baccarini, S., Morani, F., Phadngam, S., De Luca, G., Isidoro, C. and Dogliotti, E. (2016), The Fine Tuning of Metabolism, Autophagy and Differentiation during in Vitro Myogenesis. *Cell Death and Disease*, 7(3).
- Fromm-Dornieden, Carolin, von der Heyde, Silvia, Lytovchenko, Oleksandr, Salinas-Riester, Gabriela, Brenig, Bertram, Beissbarth, Tim and Baumgartner, Bernhard G. (2012), Novel Polysome Messages and Changes in Translational Activity Appear after Induction of Adipogenesis in 3T3-L1 Cells. *BMC Molecular Biology*, 13: 9–9. available at <http://www.biomedcentral.com/1471-2199/13/9> [2 August 2020].
- Fujii, Kotaro, Shi, Zhen, Zhulyn, Olena, Denans, Nicolas and Barna, Maria (2017), Pervasive Translational Regulation of the Cell Signalling Circuitry Underlies Mammalian Development. *Nature Communications*, 8(1): 1–13. available at www.nature.com/naturecommunications [2 August 2020].
- Gabut, Mathieu, Bourdelais, Fleur and Durand, Sébastien (2020), Ribosome and Translational Control in Stem Cells. *Cells*, 9(2): 497. available at www.mdpi.com/journal/cells [2 August 2020].

- Gordillo, Miriam, Evans, Todd and Gouon-Evans, Valerie (2015), Orchestrating Liver Development. *Development (Cambridge, England)*, 142(12): 2094–108. available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26081571> [24 February 2019].
- Gureev, Artem P., Shaforostova, Ekaterina A. and Popov, Vasily N. (2019), Regulation of Mitochondrial Biogenesis as a Way for Active Longevity: Interaction between the Nrf2 and PGC-1 α Signaling Pathways. *Frontiers in Genetics*, 10(MAY): 435.
- Gustafsson, Claes M., Falkenberg, Maria and Larsson, Nils-Göran (2016), Maintenance and Expression of Mammalian Mitochondrial DNA. *Annual Review of Biochemistry*, 85(1): 133–160.
- Hannoun, Zara, Steichen, Clara, Dianat, Noushin, Weber, Anne and Dubart-Kupperschmitt, Anne (2016), The Potential of Induced Pluripotent Stem Cell Derived Hepatocytes. *Journal of Hepatology*, 65(1): 182–199. available at <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168827816001586?via%3Dihub> [20 May 2019].
- Hay, David C, Zhao, Debiao, Ross, Arlene, Mandalam, Ramkumar, Lebkowski, Jane and Cui, Wei (2007), Direct Differentiation of Human Embryonic Stem Cells to Hepatocyte-like Cells Exhibiting Functional Activities. *Cloning and stem cells*, 9(1): 51–62. available at <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/clo.2006.0045> [25 March 2019].
- Heberle, Alexander Martin, Prentzell, Mirja Tamara, van Eunen, Karen, Bakker, Barbara Marleen, Grellscheid, Sushma Nagaraja and Thedieck, Kathrin (2015), Molecular Mechanisms of MTOR Regulation by Stress. *Molecular and Cellular Oncology*, 2(2). available at <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27308421/> [4 August 2020].
- Heidariyan, Zeinab, Ghanian, Mohammad Hossein, Ashjari, Mohsen, Farzaneh, Zahra, Najarasl, Mostafa, Rezaei Larijani, Mehran, Piryaee, Abbas, Vosough, Massoud and Baharvand, Hossein (2018), Efficient and Cost-Effective Generation of Hepatocyte-like Cells through Microparticle-Mediated Delivery of Growth Factors in a 3D Culture of Human Pluripotent Stem Cells. *Biomaterials*, 159: 174–188.
- Hershey, John W.B., Sonenberg, Nahum and Mathews, Michael B. (2018), Principles of Translational Control. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*: a032607.
- Jackson, Richard J, Hellen, Christopher U T and Pestova, Tatyana V (2010), The Mechanism of Eukaryotic Translation Initiation and Principles of Its Regulation. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11(2): 113–27. available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20094052> [19 March 2019].
- Kanai, Akio, Preiss, Thomas, Fujiwara, Toshinobu, Tahmasebi, Soroush, Sonenberg, Nahum and Amiri, Mehdi (2019), Translational Control in Stem Cells. available at www.frontiersin.org [17 April 2019].
- Kasai, Shuya, Shimizu, Sunao, Tatara, Yota, Mimura, Junsei and Itoh, Ken (2020), Regulation of Nrf2 by Mitochondrial Reactive Oxygen Species in Physiology and Pathology. *Biomolecules*, 10(2). available at [/pmc/articles/PMC7072240/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32444440/) [11 August 2020].
- Kasai, Shuya, Yamazaki, Hiromi, Tanji, Kunikazu, Engler, Máté János, Matsumiya, Tomoh and Itoh, Ken (2019), Role of the ISRRATF4 Pathway and Its Cross Talk with Nrf2 in Mitochondrial Quality Control. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 64: 1–12.

- Kwan, Thaddaeus and Thompson, Sunnie R. (2019), Noncanonical Translation Initiation in Eukaryotes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 11(4): a032672. available at <http://cshperspectives.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a032672> [10 May 2019].
- Lau, Hwee Hui, Hui, Natasha, Ng, Jin, Sai, Larry, Loo, Weng, Jasmen, Joanita Binte, Kee, Adrian and Teo, Keong (2018), *The Molecular Functions of Hepatocyte Nuclear Factors – In and beyond the Liver*.
- Lemaigre, Frédéric P. (2009), Mechanisms of Liver Development: Concepts for Understanding Liver Disorders and Design of Novel Therapies. *Gastroenterology*, 137(1): 62–79. available at <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2009.03.035>
- Liao, Yumei, Zhuang, Xiaoji, Huang, Xiaojie, Peng, Yinghui, Ma, Xuanyue, Huang, Zhi-Xing, Liu, Feng, Xu, Junyu, Wang, Ying, Chen, Wei-Min, Ye, Wen-Cai and Shi, Lei (2018), A Bivalent Securinine Compound SN3-L6 Induces Neuronal Differentiation via Translational Upregulation of Neurogenic Transcription Factors. *Frontiers in Pharmacology*, 9(APR): 290. available at <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2018.00290/full> [2 August 2020].
- Lisowski, Pawel, Kannan, Preethi, Mlody, Barbara and Prigione, Alessandro (2018), Mitochondria and the Dynamic Control of Stem Cell Homeostasis. *EMBO reports*, 19(5). available at <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.15252/embr.201745432> [28 March 2020].
- Ma, Yuejiao, Ma, Minghui, Sun, Jie, Li, Weihong, Li, Yaqiong, Guo, Xinyue and Zhang, Haiyan (2019), CHIR-99021 Regulates Mitochondrial Remodelling via β -Catenin Signalling and MiRNA Expression during Endodermal Differentiation. *Journal of cell science*, 132(15).
- Morita, Masahiro, Gravel, Simon Pierre, Chénard, Valérie, Sikström, Kristina, Zheng, Liang, Alain, Tommy, Gandin, Valentina, Avizonis, Daina, Arguello, Meztli, Zakaria, Chadi, McLaughlan, Shannon, Nouet, Yann, Pause, Arnim, Pollak, Michael, Gottlieb, Eyal, Larsson, Ola, St-Pierre, Julie, Topisirovic, Ivan and Sonenberg, Nahum (2013), MTORC1 Controls Mitochondrial Activity and Biogenesis through 4E-BP-Dependent Translational Regulation. *Cell Metabolism*, 18(5): 698–711.
- Morita, Masahiro, Gravel, Simon Pierre, Hulea, Laura, Larsson, Ola, Pollak, Michael, St-Pierre, Julie and Topisirovic, Ivan (2015), MTOR Coordinates Protein Synthesis, Mitochondrial Activity. *Cell Cycle*, 14(4): 473–480.
- Mukherjee, Shreyasi, Chaturvedi, Praneet, Rankin, Scott, Fish, Margaret, Wlizla, Marcin, Paraiso, Kitt, MacDonald, Melissa, Chen, Xiaoting, Weirauch, Matthew, Blitz, Ira, Cho, Ken and Zorn, Aaron (2020), Sox17 and β -Catenin Co-Occupy Wnt-Responsive Enhancers to Govern the Endodermal Gene Regulatory Network. *bioRxiv*: 2020.02.19.956565. available at <https://doi.org/10.1101/2020.02.19.956565> [13 August 2020].
- Ober, Elke A. and Lemaigre, Frédéric P. (2018), Development of the Liver: Insights into Organ and Tissue Morphogenesis. *Journal of Hepatology*, 68(5): 1049–1062. available at <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.01.005>
- Oshimori, Naoki and Fuchs, Elaine (2012), The Harmonies Played by TGF- β in Stem Cell Biology. *Cell Stem Cell*, 11(6): 751–764. available at

<http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2012.11.001>

- Parent, Romain and Beretta, Laura (2008), Translational Control Plays a Prominent Role in the Hepatocytic Differentiation of HepaRG Liver Progenitor Cells. *Genome Biology*, 9(1): R19. available at <http://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2008-9-1-r19> [2 August 2020].
- Parent, Romain, Kolippakkam, Deepak, Booth, Garrett and Beretta, Laura (2007), Mammalian Target of Rapamycin Activation Impairs Hepatocytic Differentiation and Targets Genes Moderating Lipid Homeostasis and Hepatocellular Growth. *Cancer Research*, 67(9): 4337–4345. available at <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17483347/> [2 August 2020].
- Pauklin, Siim and Vallier, Ludovic (2015), Activin/Nodal Signalling in Stem Cells. *Development (Cambridge)*, 142(4): 607–619. available at <https://dev.biologists.org/content/142/4/607> [10 August 2020].
- Pichon, Xavier, A. Wilson, Lindsay, Stoneley, Mark, Bastide, Amandine, A King, Helen, Somers, Joanna and E Willis, Anne (2012), RNA Binding Protein/RNA Element Interactions and the Control of Translation. *Current Protein & Peptide Science*, 13(4): 294–304.
- Priesnitz, Chantal and Becker, Thomas (2018), Pathways to Balance Mitochondrial Translation and Protein Import. *Genes and Development*, 32(19–20): 1285–1296.
- Proud, Christopher G. (2018), Phosphorylation and Signal Transduction Pathways in Translational Control. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*: a033050. available at <http://cshperspectives.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a033050> [10 May 2019].
- Reznick, Richard M. and Shulman, Gerald I. (2006), The Role of AMP-Activated Protein Kinase in Mitochondrial Biogenesis. *The Journal of Physiology*, 574(1): 33–39. available at <http://doi.wiley.com/10.1113/jphysiol.2006.109512> [13 August 2020].
- Richter-Dennerlein, Ricarda, Oeljeklaus, Silke, Lorenzi, Isotta, Ronsör, Christin, Bareth, Bettina, Schendzielorz, Alexander Benjamin, Wang, Cong, Warscheid, Bettina, Rehling, Peter and Dennerlein, Sven (2016), Mitochondrial Protein Synthesis Adapts to Influx of Nuclear-Encoded Protein. *Cell*, 167(2): 471–483.e10.
- Roelandt, Philip, Vanhove, Jolien and Verfaillie, Catherine (2013), Chapter 11 Directed Differentiation of Pluripotent Stem Cells to Functional Hepatocytes. *Pluripotent Stem Cells: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, 997: 1–7.
- Routledge, Daniel and Scholpp, Steffen (2019), Mechanisms of Intercellular Wnt Transport. *Development (Cambridge)*, 146(10). available at <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31092504/> [10 August 2020].
- Roux, Philippe P. and Topisirovic, Ivan (2018), Signaling Pathways Involved in the Regulation of mRNA Translation. *Molecular and Cellular Biology*, 38(12). available at <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29610153/> [4 August 2020].
- Russell, Jacquelyn O and Monga, Satdarshan P (2018), Wnt/ β -Catenin Signaling in Liver Development, Homeostasis, and Pathobiology. *Annual review of pathology*, 13: 351–378. available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29125798> [10 March 2019].
- Sabatini, David M. (2017), Twenty-Five Years of MTOR: Uncovering the Link from

- Nutrients to Growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(45): 11818–11825. available at www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1716173114 [2 August 2020].
- Seo, Bong, Yoon, Sang and Do, Jeong (2018), Mitochondrial Dynamics in Stem Cells and Differentiation. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12): 3893. available at <http://www.mdpi.com/1422-0067/19/12/3893> [28 March 2020].
- Shen, Michael M. (2007), Nodal Signaling: Development Roles and Regulation. *Development*, 134(6): 1023–1034. available at <https://dev.biologists.org/content/134/6/1023> [25 July 2020].
- Shi, Yonghong, Posse, Viktor, Zhu, Xuefeng, Hyvärinen, Anne K., Jacobs, Howard T., Falkenberg, Maria and Gustafsson, Claes M. (2016), Mitochondrial Transcription Termination Factor 1 Directs Polar Replication Fork Pausing. *Nucleic Acids Research*, 44(12): 5732–5742.
- Shin, Donghun and Monga, Satdarshan Pal Singh (2013), Cellular and Molecular Basis of Liver Development. *Comprehensive Physiology*, 3(2): 799–815.
- Shokolenko, Inna N. and Alexeyev, Mikhail F. (2017), Mitochondrial Transcription in Mammalian Cells. *Frontiers in Bioscience - Landmark*, 22(5): 835–853.
- Si-Tayeb, Karim, Lemaigre, Frédéric P. and Duncan, Stephen A. (2010), Organogenesis and Development of the Liver. *Developmental Cell*, 18(2): 175–189.
- Si-Tayeb, Karim, Noto, Fallon K., Nagaoka, Masato, Li, Jixuan, Battle, Michele A., Duris, Christine, North, Paula E., Dalton, Stephen and Duncan, Stephen A. (2010), Highly Efficient Generation of Human Hepatocyte-like Cells from Induced Pluripotent Stem Cells. *Hepatology*, 51(1): 297–305.
- Sonenberg, Nahum and Hinnebusch, Alan G. (2009), Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets. *Cell*, 136(4): 731–745. available at <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.042>
- Song, Zhihua, Cai, Jun, Liu, Yanxia, Zhao, Dongxin, Yong, Jun, Duo, Shuguang, Song, Xijun, Guo, Yushan, Zhao, Yang, Qin, Han, Yin, Xiaolei, Wu, Chen, Che, Jie, Lu, Shichun, Ding, Mingxiao and Deng, Hongkui (2009), Efficient Generation of Hepatocyte-like Cells from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Research*, 19(11): 1233–1242. available at <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2009.107>
- Spangenberg, Lucia, Shigunov, Patricia, Abud, Ana Paula R., Cofré, Axel R., Stimamiglio, Marco A., Kuligovski, Crisciele, Zych, Jaiesa, Schittini, Andressa V., Costa, Alexandre Dias Tavares, Rebelatto, Carmen K., Brofman, Paulo R.S., Goldenberg, Samuel, Correa, Alejandro, Naya, Hugo and Dallagiovanna, Bruno (2013), Polysome Profiling Shows Extensive Posttranscriptional Regulation during Human Adipocyte Stem Cell Differentiation into Adipocytes. *Stem Cell Research*, 11(2): 902–912.
- Tahmasebi, Soroush, Amiri, Mehdi and Sonenberg, Nahum (2018), Translational Control in Stem Cells. *Frontiers in genetics*, 9: 709. available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30697227> [24 October 2019].
- Takahashi, Kazutoshi and Yamanaka, Shinya (2006), Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126(4): 663–676. available at <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16904174/> [9 August 2020].

- Tanimizu, Naoki and Miyajima, Atsushi (2007), Molecular Mechanism of Liver Development and Regeneration. *International Review of Cytology*, 259: 1–48. available at <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0074769606590011?via%3Dihub> [10 March 2019].
- Tilokani, Lisa, Nagashima, Shun, Paupe, Vincent and Prudent, Julien (2018), Mitochondrial Dynamics: Overview of Molecular Mechanisms. *Essays in Biochemistry*, 62(3): 341–360.
- Uldry, Marc, Yang, Wenli, St-Pierre, Julie, Lin, Jiandie, Seale, Patrick and Spiegelman, Bruce M. (2006), Complementary Action of the PGC-1 Coactivators in Mitochondrial Biogenesis and Brown Fat Differentiation. *Cell Metabolism*, 3(5): 333–341.
- Wanet, Anaïs, Arnould, Thierry, Najimi, Mustapha and Renard, Patricia (2015), Connecting Mitochondria, Metabolism, and Stem Cell Fate. *Stem cells and development*, 24(17): 1957–71. available at <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/scd.2015.0117> [10 March 2019].
- Wanet, Anaïs, Caruso, Marino, Domelevo Entfellner, Jean-Baka, Najar, Mehdi, Fattaccioli, Antoine, Demazy, Catherine, Evraerts, Jonathan, El-Kehdy, Hoda, Pourcher, Guillaume, Sokal, Etienne, Arnould, Thierry, Tiffin, Nicki, Najimi, Mustapha and Renard, Patricia (2017), The Transcription Factor 7-Like 2-Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator-1 Alpha Axis Connects Mitochondrial Biogenesis and Metabolic Shift with Stem Cell Commitment to Hepatic Differentiation. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 35(10): 2184–2197. available at <http://doi.wiley.com/10.1002/stem.2688> [10 March 2019].
- Wanet, Anaïs, Remacle, Noémie, Najar, Mehdi, Sokal, Etienne, Arnould, Thierry, Najimi, Mustapha and Renard, Patricia (2014), Mitochondrial Remodeling in Hepatic Differentiation and Dedifferentiation. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 54: 174–185. available at <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2014.07.015>
- Wanrooij, Sjoerd and Falkenberg, Maria (2010), The Human Mitochondrial Replication Fork in Health and Disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1797(8): 1378–1388.
- Wek, Ronald C. (2018), Role of EIF2 α Kinases in Translational Control and Adaptation to Cellular Stress. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(7): a032870. available at <http://cshperspectives.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a032870> [10 May 2019].
- Yang, Yun and Wang, Zefeng (2019), IRES-Mediated Cap-Independent Translation, a Path Leading to Hidden Proteome. *Journal of Molecular Cell Biology*, 911(10): 911–919.
- Yu, Seungyoon B. and Pekkurnaz, Gulcin (2018), Mechanisms Orchestrating Mitochondrial Dynamics for Energy Homeostasis. *Journal of Molecular Biology*, 430(21): 3922–3941.
- Zhang, Yi and Xu, Hong (2016), Translational Regulation of Mitochondrial Biogenesis. *Biochemical Society Transactions*, 44(6): 1717–1724.

VI. Annexes

Tableau 1 : Primers utilisés en RealTimeqPCR

Gene	Name	Sequence (5' → 3')
RPL19	60S ribbosomal protein L19	F : ATTGGTCTCATTGGGGTCTAAC
		R : AGTATGCTCAGGCTTCAGAAGA
AAT	α 1-antitrypsin	F : AGGGCCTGAAGCTAGTGGAT
		R : TCCTCGGTGTCCTTGACTTC
ALB	Albumine	F : ATGCTGAGGCAAAGGATGTC
		R : AGCAGCAGCACGACAGAGTA
HNF1a	Hepatic nuclear factor 1a	F : ACACCTCAACAAGGGCACTC
		R : TGGTAGCTCATCACCTGTGG
FOXA3	Forkhead box 3	F : ATTCTCTCTGGCATGGGTTG
		R : AAATTCCCCACACCCTAACC
PROX1	prospero homeobox protein 1	F : TCACCTTATTCGGGAAGTGC
		R : GGAGCTGGGATAACGGGTA
Oct4		F : GATGGCGTACTGTGGGCCC
		R : TGGGACTCCTCCGGGTTTTG
HNF4a	Hepatic nuclear factor 4a	F : ACTACGGTGCCTCGAGCTGT
		R : GGCACTGGTTCCTCTTGTCT
mtTFA	Mitochondrial transcription factor A	F : GGGAAGGTCTGGAGCAGAG
		R : TGGACAACCTGCCAAGACAG
mtCO1	Cytochrom c oxydase subunit 1	F : CATCAATGTCTCCATACAATTCCT
		R : CTGCAGCCCTTCAATGAGT
ATP5A1	ATP5A protein	F : TCCAGAAATGCTTTGGGTTC
		R : GCTCCAAGAATACGCTCTTCA
GATA4	GATA binding protein 4	F : TCCAAACCAGAAAACGGAAG
		R : CTGTGCCCCGTAGTGAGATGA
ND2 (mitochondriale)	NADH deshydrogenase subunit 2	F : TGTTGGTTATACCCTTCCCGTACTA
		R : CCTGCAAAGATGGTAGAGTAGATGA
TBP	TATA box	F : TCCCGCCTGGTGCCCTACTC
		R : CGCCCAGCCAGCCAGTAGTA
CYP3A4	Cytochrome P450 3A4	F : TTCCTCCCTGAAAGATTCAGC
		R : GTTGAAGAAGTCCTCCTAAGCT
ND1 (mitochondriale)	NDAH ubiquinone oxidoreductase chain 1	F : CACCCAAGAACAGGGTTTGT
		R : TGGCCATGGGTATGTTGTAA
Becline	Becline	F : CCCTCATCACAGGGCTCTCTCCA
		R : GGGACTGTAGGCTGGGAAGTATGC
ND1 (nucléaire)		F : CAACATCGAATACGCCGCAG

	NDAH ubiquinone oxidoreductase chain 1	R : AATCGGGGGTATGCTGTTCG
ND2 (nucléaire)	NDAH ubiquinone oxidoreductase chain 2	F : CCATCTTTGCAGGCACACTC
		R : GCTTCTGTGGAACGAGGGTT
mtCO1	Cytochrome c oxidase subunit 1	F : CCTGACTGGCATTGTATTAGC
		R : TTTTGGCGTAGGTTTGGTCT
mtCO2	Cytochrome c oxidase subunit 2	F : AGATGCAATTCCCGGACGT
		R : CATGAAACTGTGGTTTGCTCC
COX4	Cytochrome c oxidase subunit 4	F : GGCTACCAGGGTATTTAGC
		R : TTCACAACACTTTCATGAGC
NDUFB8	NADH deshydrogenase 1 beta subcomplex subunit 8	F : TTAAACCCCGCCCCTGTTG
		R : TGGGAGGCTTCTTCACGTTT
NDUFS6	NADH deshydrogenase iron-sulfur 6	F : TTCGGTTTGTAGGTCGTCAGA
		R : CCATCGCACGCTATCACCC
CYTB	Cytochrome b	F : ACCCCCTAGGAATCACCTCC
		R : GCCTAGGAGGTCTGGTGAGA
SDHB	Succinate deshydrogenase iron-sulfur subunit	F : CACCCGAAGGATTGACACCA
		R : CGTAGAGCCCGTCCAGTTTC
UQCRC2	cytochrome b-c1 subunit 2	F : TCAATGTCACCACAGCACCA
		R : ATTAGCCAAGGCATTCCGGT
PGC1a	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha	F : TCCTTTCTCTCGCCCAACACGATCT
		R : GCATCCGACAGGACAAACAGTGGA
TCF7L2	Transcription factor 7-like 2	F : CCTGGCACCGT AGGACAAATC
		R : GAGGGAACCTGGACATGGAAGC
TFB2M	Facteur de transcription mitochondriale B2	F : GGAGTGCAATCCAGGTCC
		R : GAGCCCTCGAGAAGACATAGC
TEFM		F : GAAAGAGAAAGACTTAAGGCAG

	Facteur de transcription d'élongation	R : AAGCATCTCCACCTCTCTCC
mtRPOL	ARN polymérase mitochondriale	F : CTTACGATCAAGGTGAGCC
		R : CCGAGAACATCTCCTGTAGACTCTT
ATP6	ATP synthase subunit a	F : CCGACTAATCACCACCCAACA
		R : CGAGGAGGTTAGTTGTGGCA

Tableau 2 : Anticorps utilisés en Western Blot et Immunofluorescence

Antibody	Species	Company	Source	Dilution	Timing	Code
4EBP1	Rabbit	Cell Signaling	WB	1/2000	1hRT or O/N 4°C	#9644
p-4EBP1 (T37/46)	Rabbit	Cell Signaling	WB	1/2000	O/N 4°C	#2855
eIF4E	Mouse	Santa Cruz	WB	1/1000	1hRT or O/N 4°C	sc-9976
p-eIF4E	Rabbit	Cell Signaling	WB	1/1000	O/N 4°C	#9741
eIF4G1	Mouse	Santa Cruz	WB	1/1000	O/N 4°C	sc-133155
mTor	Rabbit	Cell Signaling	WB	1/1000	O/N 4°C	#2972
p-mTor (S2448)	Rabbit	Cell Signaling	WB	1/1000	O/N 4°C	#2971
H3	Rabbit	Cell Signaling	WB	1/4000	O/N 4°C	#4499
Puromycin	Mouse	Merck Millipore	WB	1/5000	O/N 4°C	MABE343
Tom20	Mouse	Santa Cruz	IF	1/200	O/N 4°C	sc-17764
eIF4A1/2	Mouse	Santa Cruz	WB	1/1000	O/N 4°C	sc-377315
COX4	Mouse	Lifetech	WB	1/1000	O/N 4°C	A21348
mtTFA	Mouse	Santa Cruz	WB	1/1000	O/N 4°C	SC-166965
PGC1a	Rabbit	Santa Cruz	WB	1/1000	O/N 4°C	SC-13067
OXPHOS Cocktail (ATP5a, UQCRC2, SDHB, CYTB et mtCO1)	Mouse	Abcam	WB	1/1000	O/N 4°C	ab110413
ATF4	Mouse	Santa Cruz	WB	1/1000	O/N 4°C	sc-390063
S6	Rabbit	Cell Signaling	WB	1/1000	O/N 4°C	2217
p-S6	Rabbit	Cell Signaling	WB	1/1000	O/N 4°C	2215
S6K1	Rabbit	Cell Signaling	WB	1/1000	O/N 4°C	#9202

p-S6K1	Rabbit	Cell Signaling	WB	1/1000	O/N 4°C	#9205
TCF7L2	Rabbit	Cell Signaling	WB	1/1000	O/N 4°C	#2569
eIF2a	Mouse	Santa Cruz	WB	1/1000	O/N 4°C	Sc-133132
p-eIF2a	Rabbit	Cell Signaling	WB	1/1000	O/N 4°C	#9721
NDUFS6	Rabbit	Abcam	WB	1/1000	O/N 4°C	ab195807
mtRPOL	Mouse	Santa Cruz	WB	1/1000	O/N 4°C	sc-365082
B-actin	Mouse	Sigma	WB	1/20000	1hRT or O/N 4°C	T5168
Secondary antibodies red targeted mouse	Goat	LI-COR Biosciences	WB	1/10000	1hRT	926-68070
Secondary antibodies green targeted rabbit	Goat	LI-COR biosciences	WB	1/10000	1hRT	926-32211
Secondary antibodies green targeted mouse	Goat	LI-COR biosciences	WB	1/1000	1hRT	926-32210
Secondary antibodies red targeted rabbit	Goat	LI-COR biosciences	WB	1/10000	1hRT	926-68071
Secondary antibodies red target mouse (Alexa Fluor 568 nm)	Goat	Thermo Fisher Scientific	IF	1/1000	1hRT	#A11004
Secondary antibodies red target rabbit (Alexa Fluor 568 nm)	Goat	Thermo Fisher Scientific	IF	1/1000	1hRT	#A11011
Secondary antibodies green target mouse (Alexa Fluor 488 nm)	Goat	Thermo Fisher Scientific	IF	1/1000	1hRT	#A11001
Secondary antibodies green target rabbit (Alexa Fluor 488 nm)	Goat	Thermo Fisher Scientific	IF	1/1000	1hRT	#A11008
Secondary antibodies green target goat (Alexa Fluor 488 nm)	Donkey	Thermo Fisher Scientific	IF	1/1000	1hRT	#A11055
Secondary antibodies far red target mouse (Alexa Fluor 633 nm)	Goat	Thermo Fisher Scientific	IF	1/1000	1hRT	#A21050