



## Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : <http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints> ID : 17463

**To cite this version :**

Bonnemaison, Charlotte. *Développement et validation de sondes d'hybridation in-situ pour le tracking des cellules souches mésenchymateuses canines dérivées du tissu adipeux*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2017, 66 p.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: [staff-oatao@inp-toulouse.fr](mailto:staff-oatao@inp-toulouse.fr).

# DÉVELOPPEMENT ET VALIDATION DE SONDES D'HYBRIDATION *IN SITU* POUR LE TRACKING DES CELLULES SOUCHES MÉSENCHYMATEUSES CANINES DERIVÉES DU TISSUS ADIPEUX

---

THESE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement  
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

*par*

**BONNEMAISON Charlotte**

Née, le 01/05/1990 à Toulouse (31)

---

**Directeur de thèse : Mme Isabelle RAYMOND-LETRON**

---

## JURY

PRESIDENT :  
**M. Philippe KEMOUN**

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :  
**Mme Isabelle RAYMOND-LETRON**  
**M. Michel FRANC**

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE  
Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITE :  
**M. Alain PINTON**

Chercheur à l'Institut National de la Recherche Agronomique et à l'Ecole  
Vétérinaire de TOULOUSE



*Répartition des Enseignants-Chercheurs par Département.*

Mise à jour : 06/09/2016

**DIRECTRICE : ISABELLE CHMITELIN**

ELEVAGE ET PRODUITS/SANTÉ PUBLIQUE VÉTÉRINAIRE	SCIENCES BIOLOGIQUES ET FONCTIONNELLES	SCIENCES CLINIQUES DES ANIMAUX DE COMPAGNIE, DE SPORT ET DE LOISIRS
<p><b>Responsable : M. SANS</b></p> <p><u>ALIMENTATION ANIMALE :</u> M. ENJALBERT Francis, PR Mme PRIYMENKO Nathalie, MC Mme MEYNADIER Annabelle, MC</p> <p><u>EPIDEMIOLOGIE :</u> Mme Mathilde PAUL, MC</p> <p><u>MALADIES REGLEMENTEES-ZOONOSES-MEDECINE PREVENTIVE DES CARNIVORES DOMESTIQUES-DROIT VETERINAIRE :</u> M. PICAUVET Dominique, PR</p> <p><u>PARASITOLOGIE-ZOOLOGIE :</u> M. FRANC Michel, PR M. JACQUIET Philippe, PR M. LIENARD Emmanuel, MC Mme BOUHSIRA Emilie, MC</p> <p><u>HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS :</u> M. BRUGERE Hubert, PR M. BAILLY Jean-Denis, PR Mme BIBBAL Delphine, MC Mme COSTES Laura, AERC Mme DAVID Laure, MCC</p> <p><u>PATHOLOGIE DE LA REPRODUCTION :</u> M. BERTHELOT Xavier, PR M. BERGONIER Dominique, MC Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, PR Mme HAGEN-PICARD Nicole, PR M. NOUVEL Laurent-Xavier, MC Mme MILA Hanna, MC</p> <p><u>PATHOLOGIE DES RUMINANTS :</u> M. SCHELCHER François, PR M. FOUCRAS Gilles, PR M. CORBIERE Fabien, MC M. MAILLARD Renaud, MC M. MEYER Gilles, PR</p> <p><u>PRODUCTION ET PATHOLOGIE AVIAIRE ET PORCINE :</u> Mme WARET-SZKUTA Agnès, MC M. JOUGLAR Jean-Yves, MC M. GUERIN Jean-Luc, PR M. LE LOC'H Guillaume, MC</p> <p><u>PRODUCTIONS ANIMALES AMELIORATION GENETIQUE ECONOMIE :</u> M. DUCOS Alain, PR M. SANS Pierre, PR M. RABOISSON Didier, MC</p>	<p><b>Responsable : Mme GAYRARD</b></p> <p><u>ANATOMIE :</u> M. MOGICATO Giovanni, MC M. LIGNEREUX Yves, PR Mme DEVIERS Alexandra, MC</p> <p><u>ANATOMIE PATHOLOGIQUE - HISTOLOGIE :</u> M. DELVERDIER Maxence, PR Mme LETRON-RAYMOND Isabelle, MC Mme BOURGES-ABELLA Nathalie, PR Mme LACROUX Caroline, PR</p> <p><u>BIOLOGIE MOLECULAIRE :</u> Mme BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle, MC</p> <p><u>MICROBIOLOGIE – IMMUNOLOGIE - MALADIES INFECTIEUSES :</u> M. MILON Alain, PR M. BERTAGNOLI Stéphane, PR M. VOLMER Romain, MC Mme BOULLIER Séverine, MC Mme DANIELS Héléne, MC</p> <p><u>BIostatISTIQUES :</u> M. CONCORDET Didier, PR M. LYAZRHI Faouzi, MC</p> <p><u>PHARMACIE-TOXICOLOGIE :</u> M. PETIT Claude, PR Mme CLAUW Martine, PR M. GUERRE Philippe, PR M. JAEG Philippe, MC</p> <p><u>PHYSIOLOGIE –PHARMACOLOGIE THERAPEUTIQUE :</u> M. BOUSQUET-MELOU Alain, PR Mme GAYRARD-TROY Véronique, PR Mme FERRAN Aude, MC M. LEFEBVRE Hervé, PR</p> <p><u>BIOCHIMIE :</u> Mme BENNIS-BRET Lydie, MC</p> <p><u>ANGLAIS :</u> M. SEVERAC Benoît, PLPA Mme MICHAUD Françoise, PCEA</p>	<p><b>Responsable : Mme CADIERGUES</b></p> <p><u>ANESTHESIOLOGIE</u> M. VERWAERDE Patrick, MC</p> <p><u>CHIRURGIE :</u> M. AUTEFAGE André, PR M. ASIMUS Erik, MC M. MATHON Didier, MC Mme MEYNAUD-COLLARD Patricia, MC Mme PALIERNE Sophie, MC</p> <p><u>MEDECINE INTERNE :</u> Mme DIQUELOU Armelle, MC M. DOSSIN Olivier, MC Mme LAVOUE Rachel, MC Mme GAILLARD-THOMAS Elodie, MCC</p> <p><u>OPHTALMOLOGIE :</u> M. DOUET Jean-Yves, MC</p> <p><u>DERMATOLOGIE :</u> Mme CADIERGUES Marie-Christine, PR</p> <p><u>IMAGERIE MEDICALE</u> M. CONCHOU Fabrice, MC</p> <p><u>BIOLOGIE MOLECULAIRE :</u> Mme TRUMEL Catherine, PR</p> <p><u>PATHOLOGIE DES EQUIDES :</u> M. CUEVAS RAMOS Gabriel, MC Mme PRADIER Sophie, MC Mme LALLEMAND Elodie, AERC</p>



## REMERCIEMENTS

### **A Monsieur le Professeur Philippe KEMOUN**

Maitre de conférences des Universités, Praticien hospitalier en Odontologie  
Lauréat de l'Université Paul Sabatier

*Qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury  
Hommages respectueux*

### **A Madame le Docteur Isabelle RAYMOND-LETRON**

Maitre de conférences en Histologie à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
Service d'anatomie pathologique

*Qui m'a fait l'honneur de diriger cette thèse. Pour votre grande disponibilité et votre  
investissement dans le projet.  
Profonde gratitude et respect le plus sincère*

### **A Monsieur le Professeur Michel FRANC**

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
Service Parasitologie et Maladies Parasitaires

*Qui a aimablement accepté de faire partie de ce jury de thèse. Pour votre  
collaboration précieuse au sein de ma thèse.  
Sincères remerciements*

### **A Monsieur le Docteur Alain PINTON**

Chercheur à l'Institut National de la Recherche Agronomique et à l'Ecole Nationale  
Vétérinaire de Toulouse  
Laboratoire de cytogénétique

*Qui a accepté de me guider dans ce projet. Pour votre disponibilité, vos conseils  
techniques, le temps consacré et surtout pour votre gentillesse.  
Sincères remerciements*



## TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION .....	6
1. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE : .....	7
1.1. Les cellules souches mésenchymateuses – intérêt en médecine régénérative.....	7
1.1.1. Définition d'une cellule souche mésenchymateuse.....	7
1.1.2. Etendue de la recherche actuelle sur les CSM.....	8
1.1.3. Les cellules souches mésenchymateuses d'origine adipeuse .....	9
1.2. Mécanisme d'action des ASC : données actuelles .....	11
1.2.1. Propriété de régénération des ASC.....	11
1.2.2. Propriétés paracrines et immuno-modulatrices des ASC .....	11
1.2.3. Administration et biodistribution des ASC .....	12
1.2.3.1. Les différentes voies d'administration .....	12
1.2.3.2. Le « homing » ou guidage des ASC vers le tissu lésé .....	13
1.2.3.3. Notion de niche cellulaire .....	15
1.3. Le « tracking » des cellules souches – méthodes actuelles.....	16
1.3.1. Marquage en temps réel – non invasif :.....	16
1.3.1.1. Marquage direct :.....	16
1.3.1.2. Marquage indirect :.....	19
1.3.2. Marquage <i>post-mortem</i> .....	21
1.3.2.1. Immunohistochimie .....	21
1.3.2.2. Hybridation <i>in-situ</i> .....	22
1.3.2.3. PCR quantitative .....	23
1.3.3. Bilan sur les techniques de marquage .....	23
1.4. Sondes dirigées vers les chromosomes sexuels .....	25
1.5. Choix du modèle animal .....	26
2. PARTIE EXPERIMENTALE .....	28
2.1. MATERIELS ET METHODES.....	28
2.1.1. Objectif de notre étude .....	28
2.1.2. La culture cellulaire .....	29
2.1.2.1. Culture à partir de tissu cutané .....	29
2.1.2.1.1. Mise en culture des morceaux de peau .....	29
2.1.2.1.2. Division.....	30
2.1.2.1.3. Récupération des cellules en division.....	31
2.1.2.1.4. Fixation .....	31



2.1.2.1.5.	Etalement des cellules sur lamelles.....	31
2.1.2.2.	Culture à partir de sang.....	31
2.1.2.2.1.	Prélèvement et mise en culture.....	31
2.1.2.2.2.	Arrêt des cultures et fixation.....	32
2.1.2.2.3.	Etalement des cellules sur lamelles.....	32
2.1.3.	Microdissection.....	32
2.1.3.1.	Préparation des lamelles.....	32
2.1.3.2.	Matériel pour microdissection.....	32
2.1.3.3.	Procédure de microdissection.....	33
2.1.4.	Première amplification par PCR.....	33
2.1.4.1.	Pré-amplification.....	33
2.1.4.2.	Amplification.....	34
2.1.5.	Réalisation des sondes.....	35
2.1.5.1.	Marquage ADN (kit BioPrime®).....	35
2.1.5.2.	Précipitation des sondes.....	35
2.1.5.3.	Préparation des sondes.....	36
2.1.6.	Protocole d'hybridation <i>in-situ</i> adapté aux lames cytologiques.....	36
2.1.6.1.	Préparation des lames cytologiques.....	36
2.1.6.2.	Hybridation.....	37
2.1.6.2.1.	Hybridation avec l'Hybridizer® DAKO.....	37
2.1.6.2.2.	Hybridation avec pré-étapes de dénaturation.....	37
2.1.6.3.	Lavages stringents.....	37
2.1.6.4.	Préparation des anticorps et révélation.....	37
2.1.7.	Protocole d'hybridation <i>in-situ</i> adapté aux coupes histologiques.....	38
2.1.7.1.	Préparation des lames.....	38
2.1.7.1.1.	Réalisation des lames.....	38
2.1.7.1.2.	Déparaffinage et réhydratation.....	38
2.1.7.1.3.	Etapes de prétraitement.....	38
2.1.7.2.	Hybridation.....	39
2.1.7.2.1.	Avec pré-étapes de dénaturation.....	39
2.1.7.2.2.	Avec l'Hybridizer DAKO.....	39
2.1.7.3.	Lavages.....	39
2.1.7.4.	Préparation des anticorps et révélation.....	39
2.2.	RESULTATS.....	41
2.2.1.	Réalisation des sondes.....	41
2.2.2.	Test des sondes sur mélanges de cellules mâles et femelles.....	43

2.2.3. Test des sondes sur coupes histologiques .....	44
2.3. DISCUSSION .....	50
3. CONCLUSION .....	53
BIBLIOGRAPHIE (logiciel ZOTERO) .....	54
ANNEXES .....	65

## TABLE DES ANNEXES

Annexe 1 : Détails des produits utilisés dans notre étude.....	65
Annexe 2 : Caryotype de chien : .....	66

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

### Liste des figures :

Figure 1 : Répartition du nombre d'essai clinique sur les CSM en Europe ( <i>www.clinical.gov</i> ).....	8
Figure 2 : Illustration du "homing" des ASC (Zhao, Zhang 2016) .....	14
Figure 3 : Schéma bilan des différentes techniques de marquage direct.(Cen et al. 2016) .....	19
Figure 4 : Schéma bilan des différentes techniques de marquage indirect. (Cen et al. 2016).....	21
Figure 5 : Température de fusion moléculaire d'un fragment d'ADN (Noiret, 2016) .....	22
Figure 6 : Etalement des chromosomes de chien sur cellule en métaphase.....	29
Figure 7 : Schéma de la méthode FISH avec sonde du chromosome X (ou Y) .....	41
Figure 8 : Métaphase de chien mâle après hybridation des sondes du chromosome X et Y (x1000) ...	41
Figure 9 : Noyau de cellule de chien mâle après hybridation des sondes des chromosomes X et Y (x1000).....	42
Figure 10 : Images de FISH du marquage des chromosomes sexuels avec les sondes des chromosomes X et Y - signal amplifié (x1000) .....	43
Figure 11 : Images de FISH sur mélange de cellules sanguines canines avec sondes des chromosomes X et Y (x400) .....	43
Figure 12 : Images de FISH sur mélanges de cellules canines mâle et femelle avec sondes des chromosomes X et Y et après amplification du signal (x1000).....	44
Figure 13 : Schéma des différentes cellules visibles en coupe histologique transversale de testicule ..	45
Figure 14 : Schéma des étapes de la méiose.....	45
Figure 15 : Sondes hybridées sur coupe histologique de testicule de chien après 2 min de pepsine (x400) .....	46
Figure 16 : Sondes hybridées sur coupe histologique testiculaire de chien après 2 min de pepsine (x1000).....	46
Figure 17 : Sondes hybridées sur coupe histologique de testicule de chien après 2 min de pepsine et amplification des signaux (x1000).....	47
Figure 18 : Sondes hybridées sur coupe testiculaire de chien après 4 min de pepsine .....	48
Figure 19 : Sondes hybridées sur coupe histologique de testicule après 15 min de pepsine .....	49

### Liste des tableaux :

Tableau 1 : Avantages et Inconvénients des différentes méthodes de marquage : .....	24
Tableau 2 : Cycles d'incubation au thermal cycler avec "extraction cocktail" :.....	33
Tableau 3 : Cycles d'incubation au thermal cycler avec "pré-amp cocktail" : .....	34
Tableau 4 : Cycles d'incubation dans le thermal cycler avec "amplification cocktail" :.....	34
Tableau 5 : Composants à ajouter pour la précipitation des sondes : .....	35

## LISTE DES ABBREVIATIONS

- CSM = MSC = Cellule souche mésenchymateuse (Mesenchymal Stem Cells)
- IPS = Cellule souche pluripotente induite
- Inserm = Institut national de la santé et de la recherche médicale
- ASC = Cellules souches mésenchymateuses dérivées du tissu adipeux (Adipose Stem Cells)
- ISCT = International Society for Cellular Therapy
- IFATS = International Federation for Adipose Therapeutics and Science
- SVF = Fraction Stromale Vasculaire
- ISCT = International Society for Cellular Therapy
- VEGF = Vascular Endothelial Growth Factor = Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
- HGF = Hepatocyte Growth Factor = Facteur de croissance des hépatocytes
- TGF- $\beta$ 2 = Transforming Growth Factor  $\beta$  2 = facteur de croissance transformant  $\beta$  2
- FGF-2 = Fibroblast Growth Factor = Facteur de croissance des fibroblastes 2
- GM-CSF = Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor = Facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages
- IL-6 = Interleukine 6
- TNF- $\alpha$  = Tumor Necrosis Factor = Facteur de nécrose tumorale
- IGF1 = Insulin-like Growth Factor = Facteur de croissance 1 ressemblant à l'insuline
- BDNF = Brain-Derived Neurotrophic Factor = Facteur neurotrophique issu du cerveau
- IL-10 = Interleukine 10
- IRM = Imagerie par Résonance Magnétique
- PET = Positron Emission Tomography = Tomographie par émission de positons
- SPECT = Single photon emission computed tomography = Tomographie par émission mono-photonique
- QDs = quantum dots = boîtes quantiques (nanoparticules multifonctionnelles, inorganiques, fluorescentes et semi-conductrices)
- BLI = Imagerie bioluminescente

## INTRODUCTION

La médecine régénérative offre des thérapies de plus en plus innovantes de nos jours. Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) sont très étudiées car en plus du fait qu'elles sont accessibles au prélèvement, elles ont un potentiel de différenciation intéressant et des propriétés de régulation des réactions immunitaires. Elles ont été décrites pour la première fois par Alexander Friedenstein en 1968 comme des cellules mésodermiques dérivées de la moelle osseuse non hématopoïétique (Friedenstein et al. 1968). Le terme « cellule souche mésenchymateuse » a été introduit pour la première fois par Caplan en 1991 (Caplan 1991).

Certains effets thérapeutiques des cellules souches mésenchymateuses ont été démontrés sans réellement connaître leur mécanisme d'action. Or pour pouvoir mettre un produit thérapeutique à base de CSM sur le marché du médicament, il est nécessaire de prouver au préalable son efficacité, sa sécurité, sa biodistribution ainsi que sa pharmacodynamique.

Les études scientifiques et les essais précliniques s'orientent donc actuellement sur ces différents aspects. Cependant, pour étudier ces cellules souches il faut parvenir à les suivre *in-situ* (dans les tissus) et donc à les tracer sans altérer leur nature ou leur fonctionnement.

De nombreux marqueurs ont jusque-là été utilisés afin de suivre les cellules souches : des techniques classiques (CSM avec gène rapporteur codant une protéine fluorescente en vert ou un marqueur intégré pendant la culture des CSM et révélé avec un anticorps spécifique), des techniques de suivi *in-vivo* avec des traceurs radioactifs ou encore l'incorporation de nanoparticules de fer radioactif dans les cellules souches avec révélation par des techniques d'imagerie (Sensebé, Fleury-Cappellesso 2013). Ces différents marqueurs sont tous des marqueurs extrinsèques : ils sont rajoutés à la cellule souche et peuvent par conséquent modifier sa nature ou son fonctionnement.

Certains marqueurs intrinsèques à la cellule humaine ont été étudiés, comme par exemple la séquence « Alu » chez l'Homme. Il s'agit d'une séquence très répétée et spécifique d'espèce. Elle peut facilement être quantifiée par PCR quantitative ou visualisée en histologie après l'utilisation d'anticorps spécifiques. Par conséquent c'est le marqueur de choix actuel pour détecter la présence de cellules souches humaines xénotransplantées dans les tissus des modèles animaux immunocompromis (notamment murin). Par contre, il n'existe actuellement pas de marqueur intrinsèque permettant de suivre une cellule souche de l'espèce lorsqu'elle est administrée dans cette même espèce.

Le chromosome est un élément intrinsèque à toute cellule nucléée. Il se trouve donc être un bon élément à tracer car il pourrait être révélé à n'importe quel moment *ex-vivo* sans altérer préalablement la fonction ou la nature des cellules souches.

Dans les projets de l'unité de recherche (STROMALab) et pour notre étude, le modèle canin représente un deuxième modèle mis en œuvre après des premières validations dans le modèle murin afin de renforcer les premiers résultats. Il est également utilisé dans le but de développer des thérapies innovantes pour des applications directes en médecine vétérinaire.

## 1. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE :

### 1.1. Les cellules souches mésenchymateuses – intérêt en médecine régénérative

#### 1.1.1. Définition d'une cellule souche mésenchymateuse

Les cellules souches sont des cellules qui ont la capacité de s'auto-renouveler indéfiniment en générant des cellules filles identiques pour maintenir le pool de cellules souches. Elles peuvent également donner naissance à plusieurs types de cellules différenciées. On parle alors de différenciation asymétrique puisque après chaque division, une cellule se renouvelle tandis que l'autre se différencie et acquiert les caractéristiques du tissu concerné.

Il existe deux types de cellules souches : les cellules souches pluripotentes et les cellules souches multipotentes. Les cellules souches pluripotentes peuvent donner tous les types de cellules de l'organisme appartenant aux trois feuillets (ectoderme, endoderme et mésoderme). Il s'agit des cellules souches embryonnaires ou des cellules souches pluripotentes induites (IPS).

D'après l'Inserm (Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale), les cellules souches mésenchymateuses sont des cellules multipotentes, c'est-à-dire qu'elles peuvent se différencier en un nombre limité de types cellulaires (appartenant au mésoderme). Ces CSM sont présentes dans tout l'organisme au sein du tissu adipeux, de la moelle osseuse, des tissus de soutien des organes, mais aussi au sein des os, des cartilages, des muscles, etc...

Elles sont particulièrement faciles à prélever, comme par exemple dans le tissu adipeux (ex : ASC : Adipose Derived Stem Cells). Lorsque les conditions sont réunies, elles peuvent donner naissance à des cellules cartilagineuses, osseuses, graisseuses, des fibres musculaires, des cardiomyocytes, etc...

Ces cellules sécrètent un certain nombre de facteurs dont des facteurs de croissance qui sont alors utilisés par les cellules environnantes. Elles produisent également des facteurs anti-inflammatoires, entraînant une immunosuppression locale et favorisant la fonction des cellules régulatrices de l'immunité. Ces propriétés auraient un rôle de protection contre le rejet de greffe.

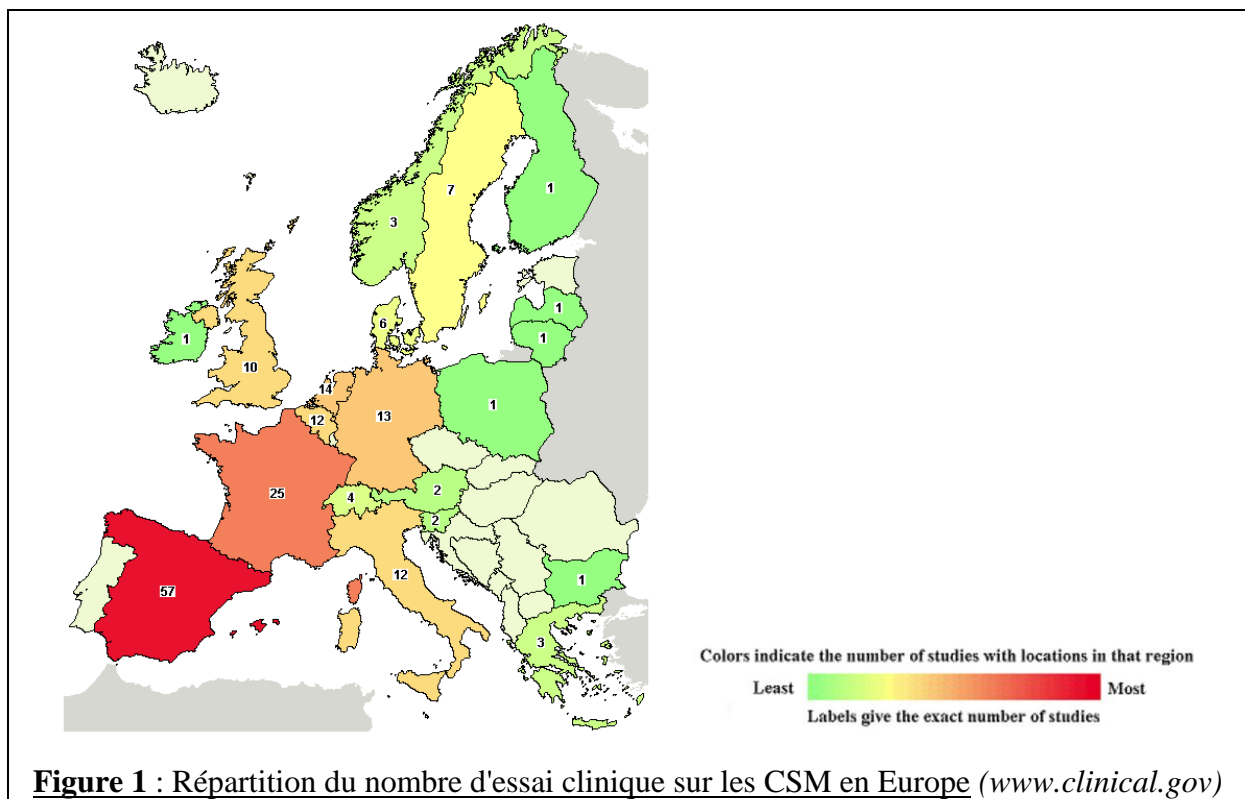
Dans un souci d'harmonisation, l'International Society for Cellular Therapy (ISCT) a décidé en 2006 de dénommer ces cellules sous le terme de « Multipotent Mesenchymal Stromal Cells » et de déterminer des critères minimums pour les définir (Casteilla 2011) :

- l'adhérence au plastique sous des conditions de culture standard,
- la présence d'antigène spécifique à leur surface à plus de 90% : CD73, CD90, CD105; et au moins 98% d'entre elles n'expriment pas les marqueurs hématopoïétique suivants : CD45, CD34, CD14, CD19, CD11a et HLA-DR,
- la capacité *in-vitro* de donner naissance à des lignées cellulaires dérivées du mésenchyme telles que les adipocytes, les ostéoblastes et les chondrocytes.

### 1.1.2. Etendue de la recherche actuelle sur les CSM

La recherche sur les CSM est en pleine expansion ces dernières années. Sur le site de publications scientifiques PubMed ([www.pubmed.com](http://www.pubmed.com)), le terme « mesenchymal stem cells » abouti sur 43559 résultats en 2016 contre 5368 en 2006. On note aussi 10708 en entrant le terme « pluripotent induced stem cells » en 2016. Cela témoigne de l'importance accordée aux CSM dans la recherche en médecine régénérative.

D'après le site [clinicaltrial.gov](http://clinicaltrial.gov), 655 essais cliniques utilisant des cellules souches mésenchymateuses (tout type confondu) sont actuellement en cours dont 140 en Europe avec une forte participation de l'Espagne et de la France (**Figure 1**). Cependant, ce nombre d'étude clinique en cours sur les CSM est légèrement sous-estimé. En effet, si on regarde plus particulièrement les cellules souches dérivées du tissu adipeux (ASC) en entrant les termes « adipose derived stromal cells », il y a 77 études supplémentaires en cours.



**Figure 1** : Répartition du nombre d'essai clinique sur les CSM en Europe ([www.clinical.gov](http://www.clinical.gov))

Toutes ces études concernent des maladies très différentes. Par exemple dans les 20 premières, les ASC sont utilisées pour traiter :

- des escarres,
- des ischémies,
- des avortements,
- des problèmes de l'érection,
- de l'arthrose,
- du diabète de type II,
- des lésions cérébrales,
- de la sclérose en plaque,
- de l'insuffisance rénale,
- des accidents vasculaires cérébraux,
- des infarctus du myocarde,
- la maladie d'Alzheimer,
- l'autisme,
- la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA),
- la maladie de Parkinson,
- la bronchite chronique,
- la discopathie dégénérative
- et l'alopécie androgénique.

Ceci traduit le fort potentiel des CSM pour traiter un grand nombre de maladie d'origine très variées.

#### 1.1.3. Les cellules souches mésenchymateuses d'origine adipeuse

L'étude des ASC a débuté en 2001. Une équipe de chercheur a montré la présence de cellules de type fibroblastiques, dans la graisse prélevée par liposuccion chez l'Homme, capables de se différencier en cellules de la lignée mésodermique (Zuk et al. 2001).

Depuis leur découverte, des milliers d'articles ont été publiés utilisant plusieurs terminologies, telles que les « adipose-derived stem cells » (ADSCs), « adipose-derived adult stem cells » (ADAS), « adipose-derived mesenchymal stem cells » (AD-MSCs), « adipose MSCs » (AMSCs) et « adipose stromal/stem cells » (ASC). Dans le but d'éviter toute confusion, l'IFATS (International Federation for Adipose Therapeutics and Science) a défini le terme ASC pour « Adipose-derived Stem Cells » qui réfère ainsi à des cellules stromales multipotentes adhérentes au plastique, isolées à partir de la fraction stromale vasculaire ou SVF (Zuk 2013).

La liposuccion permet de récupérer entre 100mL et plusieurs litres de graisse. Il a de plus été montré qu'à partir de 300mL de graisses issues de liposuccion, 10 à 100 millions de cellules souches pouvaient être obtenues dont 90% seraient viables (Locke, Windsor, Dunbar 2009). Le tissu adipeux apparaît alors comme une source idéale d'ASC puisqu'il permet d'obtenir prêt de 500 fois plus de cellules souches que dans la moelle osseuse pour un même volume et ne nécessite qu'une anesthésie locale pour le prélèvement (Maumus et al. 2011).



*In-vitro*, les cellules du tissu adipeux blanc peuvent être séparées par digestion enzymatique en deux populations : les adipocytes matures et la fraction stromale vasculaire (SVF). La SVF est composée de plusieurs types cellulaires :

- des pré-adipocytes : ils sont relativement immatures et se différencient en adipocytes,
- des précurseurs vasculaires et cellules endothéliales : ils participent à la vascularisation du tissu adipeux et permettent ainsi son développement,
- des péricytes : ils se situent dans la lame basale de l'endothélium des capillaires,
- des cellules d'origine hématopoïétique : macrophages, lymphocytes, cellules souches hématopoïétiques,
- des cellules nerveuses : innervation principalement sympathique dont le neurotransmetteur est la noradrénaline régulant, entre autre, la lipolyse,
- des fibroblastes,
- des cellules souches mésenchymateuses.

La culture de la SVF sous certaines conditions permet d'éliminer la plupart des cellules. De plus en utilisant la capacité des ASC à adhérer au plastique, il est possible de les isoler facilement et de les cultiver *in-vitro* afin de les faire se multiplier. Leur identité de surface est ensuite vérifiée par cytométrie de flux.

Les ASC et la SVF ont le potentiel d'être utilisées en thérapie cellulaire. La SVF a quelques avantages par rapport aux ASC dans le traitement de certaines maladies grâce à la présence de cellules endothéliales circulantes couplées aux ASC. L'inconvénient principal est que le nombre de cellules qui doit être utilisé pour le traitement est limité à ce qui peut être extrait du patient. Inversement, l'utilisation des ASC purifiées permet d'obtenir une quantité plus importante de cellules souches après une phase d'amplification par culture cellulaire (environ 10-15 jours). Ainsi, elles donnent un avantage thérapeutique certain (Locke, Feisst, Meidinger 2015).

Ces cellules souches présentent également de nombreux antigènes de surface. Seulement, une caractérisation claire de la population des ASC avec le meilleur potentiel thérapeutique demeure incertaine d'après les différentes études menées. C'est pourquoi, les autorités de l'IFATS et de l'ISCT (International Society for Cellular Therapy) ont établi des critères minimums pour définir des ASC non cultivées présentes dans la SVF et des ASC cultivées par adhérence au plastique (Bourin et al. 2013). Comme toutes les CSM, les ASC de la SVF ou les ASC purifiées expriment les marqueurs CD73, le CD90 et CD105 (Dominici et al. 2006).

- Dans la SVF, les ASC sont caractérisées en plus par l'expression des marqueurs CD34 et la non expression des marqueurs CD235a et CD31.
- Les ASC purifiées expriment en plus le marqueur CD44 et n'expriment pas CD45 et CD31. L'expression de CD34 est donc perdue après la culture par adhérence au plastique.

Les ASC peuvent être différenciées des CSM dérivées de la moelle osseuse par leur positivité pour CD36 et leur négativité pour CD106. La différenciation en adipocyte, chondroblaste et ostéoblaste permet de compléter leur identification (Bourin et al. 2013; Baer 2014).

## 1.2. Mécanisme d'action des ASC : données actuelles

### 1.2.1. Propriété de régénération des ASC

Plusieurs mécanismes peuvent être responsables du potentiel de régénération des ASC (Bajek et al. 2016). Quelques études suggèrent que les ASC agissent en se différenciant vers un type de cellule spécifique, remplaçant ainsi les populations défectueuses *in-vivo*. Toutefois, les études menées sur les modèles animaux, qui permettent de suivre les ASC *in-vivo* n'ont pas confirmé cette hypothèse (Gimble, Bunnell, Guilak 2012). A part pour le phénotype mésenchymateux « classique » (c'est-à-dire qui se différencie en adipocytes, ostéoblastes et chondrocytes), aucune étude ne confirme la différenciation totale et fonctionnelle des cellules souches de type mésenchymateuses. En effet, le phénotype des cellules différenciées est essentiellement mis en évidence par l'expression de marqueurs spécifiques de phénotype « cellule différenciée » et non par la démonstration de la fonctionnalité de ces cellules (Casteilla 2011).

Plusieurs études suggèrent que la différenciation des CSM peut conduire à des cellules intermédiaires ayant deux phénotypes et qui co-expriment à la fois des marqueurs spécifiques de la cellule et des marqueurs de cellule souche sans obtenir de fonction spécifique à proprement parler (Rose et al. 2008). Dans ce cas, les CSM subissant une différenciation spécifique ne feraient qu'exprimer les marqueurs de « vraies cellules différenciées » sans apporter la preuve de leurs fonctionnalités. Un autre problème non résolu est de savoir si la trans-différenciation des cellules est bien le résultat de leur fusion, considérée comme le principal mécanisme de formation de nouvelles cellules fonctionnelles (Utsunomiya et al. 2010). Une étude a montré qu'aucune fusion n'était détectée entre les ASC différenciées en hépatocytes et les hépatocytes de l'hôte (Aurich et al. 2009), laissant toujours cette question en suspens.

Un autre mécanisme d'action des ASC proposé est la modulation des niches de cellules souches de l'hôte en stimulant le recrutement des cellules souches endogènes vers la zone lésée et leur engagement vers une lignée cellulaire spécifique. Les ASC peuvent aussi être une source d'antioxydants, de piègeurs de radicaux libres et de protéines chaperonnes de choc thermique au niveau du site du tissu lésé (Friedenstein et al. 1968). Actuellement, plusieurs chercheurs pensent que les ASC entraînent la régénération cellulaire des tissus et organes, principalement en sécrétant des cytokines et facteurs de croissance (Gimble, Bunnell, Guilak 2012).

### 1.2.2. Propriétés paracrines et immuno-modulatrices des ASC

Les ASC entraînent la régénération d'un tissu en sécrétant des cytokines et des facteurs de croissance, qui stimulent la restauration des fonctions normales du tissu ou en réduisent les dégâts (Bajek et al. 2016). Ces molécules ont des effets positifs sur le système nerveux central, le système immunitaire, le cœur, les muscles et aussi la vitalité générale des cellules.

Ces cellules ont des propriétés angiogéniques impressionnantes dont la capacité d'induire une néo-vascularisation dans un tissu par l'expression des VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), HGF (Hepatocyte Growth Factor), TGF- $\beta$ 2 (Transforming Growth Factor  $\beta$ ), FGF-2 (Fibroblast Growth Factor), et GM-CSF (Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor) (Gir et al. 2012; Sterodimas et al. 2010). De plus en réponse à un stimulus inflammatoire,

l'expression des facteurs angiogéniques (VEGF, HGF, IGF-1) et des facteurs hématopoïétiques / inflammatoires (G-CSF, M-CSF, IL-6, TNF- $\alpha$ ) augmente chez les ASC (Kilroy et al. 2007).

Elles ont également des propriétés anti-apoptotiques. Parmi les facteurs sécrétés, l'IGF-1 (Insulin-like Growth Factor) participe à la protection des cardiomyocytes vis-à-vis de l'apoptose (Sadat et al. 2007). Ces cellules souches favorisent aussi la régénération des cellules du système nerveux central. Elles montrent une activité neuroprotectrice en sécrétant le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (bdnf), le facteur neurotrophique dérivé des cellules gliales, le facteur de croissance nerveuse et des IGF (Salgado et al. 2010). Les facteurs de croissance sécrétés stimulent aussi la croissance des fibroblastes et kératinocytes (Hong et al. 2013).

De plus, elles sont également immuno-privilegiées grâce à l'absence d'expression du HLA-DR (récepteur appartenant au complexe majeur d'histocompatibilité de classe II) et à l'inhibition de la prolifération des lymphocytes activés allogéniques (Aust et al. 2004; Gonzalez-Rey et al. 2010; Mitchell et al. 2006). Les ASC inhibent la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, stimulent la production des cytokines anti-inflammatoires IL-10 et induisent la formation des lymphocytes T régulateurs spécifiques d'antigènes (Gonzalez-Rey et al. 2010). Les propriétés immunosuppressives des ASC résultent aussi de la production de prostaglandines E2 et 2,3 dioxigénase indole (Gimble et al. 2011) qui agissent sur les lymphocytes T. Elles protègent aussi de la réaction de greffon contre l'hôte après une transplantation de cellules souches allogéniques (Yañez et al. 2006). Les propriétés immuno-modulatrices ont été confirmées à la fois *in-vitro* et *in-vivo* (Baer 2014; Le Blanc et al. 2003; Mizuno-Kamiya 2013; Patel et al. 2008; Bajek et al. 2016).

Ainsi les ASC possèdent un large éventail de propriétés. Toutefois il est également indispensable de connaître leur biodistribution dans l'organisme afin s'assurer que les ASC agissent au lieu d'intérêt (ex : tissu lésé).

### 1.2.3. Administration et biodistribution des ASC

#### 1.2.3.1. Les différentes voies d'administration

Il existe différentes voies potentielles d'administration des ASC :

##### La voie d'administration systémique :

Les ASC sont délivrées par injection intraveineuse (IV), intra-péritonéale (IP), intra-artérielle (IA) ou intracardiaque (IC). Elles sont ensuite « autoguidées » vers le site lésé. En effet, les CSM (et donc les ASC) expriment des récepteurs aux cytokines et chimiokines à leur surface. Ces récepteurs leur permettent de migrer au site lésionnel grâce à des gradients chimiotactiques sécrétés par le tissu inflammatoire (phénomène appelé « homing ») (Locke, Feisst, Meidinger 2015).

Cependant, le nombre de cellules qui migrent vers le tissu lésé demeure encore incertain par cette voie d'administration. Il a notamment été montré qu'une grande partie des cellules injectées en IV s'accumulaient en grande partie dans les poumons mais aussi dans le foie, le cœur et le cerveau. Le risque d'embolie pulmonaire ou d'infarctus ne peut donc pas être négligé, tout comme la perturbation du flux sanguin (Prockop, Olson 2007).

Les ASC ont été utilisées en injection intraveineuse pour traiter, entre autres, des dysfonctions de la vessie (Zhang et al. 2012), des troubles de l'érection (Fandel et al. 2012), des insuffisances rénales chroniques (Quimby et al. 2016). Des ASC ont été implantées dans les artères rénales pour empêcher le rejet après une transplantation rénale (Kato et al. 2014). Il a également été montré que l'obstruction d'artères cérébrales pouvait être améliorée par injection d'ASC par l'artère carotide (Du et al. 2014).

#### La voie d'administration locale :

Les ASC sont délivrées par injection *in-situ* ou par application topique au niveau du tissu lésé. Cette voie d'administration s'affranchit de la nécessité de guidage des ASC par gradient chimiotactique vers le site lésé car les cellules sont directement en contact avec la zone cible. Un autre avantage est qu'elle s'affranchit aussi des risques décrits pour la voie systémique (embolie, infarctus, perturbation du flux sanguin). Cependant, cette voie d'administration présente aussi des risques. En effet, c'est une méthode qui peut s'avérer être plus invasive et les cellules sont directement injectées dans un microenvironnement potentiellement incompatible (Muschler, Nakamoto, Griffith 2004).

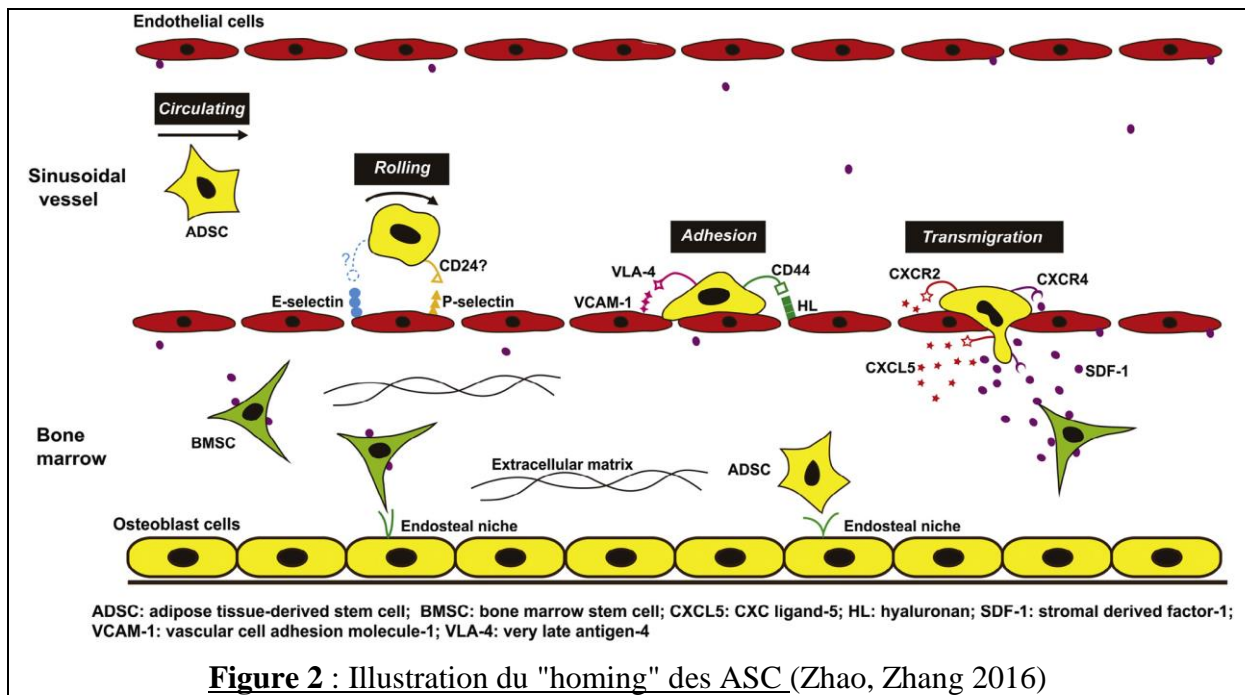
Les ASC ont été utilisées, entre autre, pour traiter des dysfonctions de la vessie par injection locale d'ASC dans la paroi vésicale (Zhang et al. 2012), pour traiter des troubles de l'érection par injection intracaverneuse (Fandel et al. 2012) ou encore pour traiter l'incontinence urinaire de stress par injection urétrale (Yamamoto et al. 2012).

La voie d'administration doit donc être étudiée et choisie prudemment avant toute application clinique pour une efficacité thérapeutique optimale avec un minimum de risque.

#### 1.2.3.2. Le « homing » ou guidage des ASC vers le tissu lésé

La moelle osseuse joue un rôle essentiel en guidant (« homing ») et supportant les cellules souches mésenchymateuses dérivées de la moelle osseuse (BMSC), qui sont le prototype de toute cellule souche mésenchymateuse, incluant les ASC. Il est difficile de déterminer si les ASC sont arrêtées dans les vaisseaux ou si elles subissent une migration trans-endothéliale immédiatement après perfusion. En effet, il manque des données décrivant l'exacte position des ASC juste après injection (Karp, Leng Teo 2009).

Une étude récente a recensé ce qui était décrit sur le « homing » des ASC et a essayé d'en faire une synthèse (Zhao, Zhang 2016). Un schéma bilan a été réalisé dans cette étude afin de représenter le mécanisme de « homing » des ASC supposé à l'heure actuelle (**Figure 2**). Ce mécanisme ressemble au mécanisme de migration des leucocytes vers les sites inflammatoires.



**Figure 2 :** Illustration du "homing" des ASC. (Zhao, Zhang 2016)

### 1<sup>ère</sup> étape : le « rolling » :

Des récepteurs aux chimiokines et leurs ligands sont essentiels pour la migration des leucocytes vers le site inflammatoire. Récemment des composants similaires ont été trouvés pour les CSM. Les cellules de l'endothélium des vaisseaux sinusoides de la moelle osseuse expriment les sélectines E et P. Toutefois les ligands aux sélectines E et P présents sur les leucocytes n'ont pas été retrouvés sur les CSM. Cependant, des études ont montré que des ligands glycosylés, présents sur les CSM, interagissaient avec les sélectines E et P (Yang et al. 1999; Katayama 2003). Une étude de cytométrie de flux a suggéré que le CD24, une molécule capable de supporter le « rolling » des monocytes, neutrophiles et cellules cancéreuses métastatiques, était un potentiel ligand aux sélectines P (Bailey et al. 2009).

### 2<sup>ème</sup> étape : l'adhésion aux cellules endothéliales :

Tout comme les cellules souches hématopoïétiques, les CSM expriment plusieurs types de molécules d'adhésion, notamment des intégrines (Potocnik, Brakebusch, Fässler 2000) et des isoformes du CD44 (Lapidot 2005).

Pour les BMSC (Bone Marrow derived Stem Cells ou Cellule Souches Dérivées de la Moelle Osseuse), le rôle dominant de l'intégrine  $\alpha 4 \beta 1$  (VLA-4 ou « Very Late Antigen – 4 ») dans l'interaction avec VCAM-1 (« Vascular Cell Adhesion Molecule – 1 ») présente sur l'endothélium vasculaire a été suggéré par Bonig et Papayannopoulou (Bonig 2006; Papayannopoulou et al. 2001). Une autre étude a montré que les ASC exprimaient aussi la VLA-4 (De Ugarte et al. 2003).

Il a également été montré que le CD44, exprimé à la surface des ASC interviendrait dans l'adhésion des cellules souches à l'endothélium vasculaire de la moelle osseuse. Or le CD44 est le récepteur principal de l'acide hyaluronique, un des composants de la matrice extracellulaire des cartilages articulaires. Le rôle du CD44 dans l'adhésion des cellules est donc encore à approfondir (De Ugarte et al. 2003; Katz et al. 2005; Choudhery et al. 2013; Screven et al. 2014; Wu et al. 2013).

### 3<sup>ème</sup> étape : Transmigration des ASC :

Le SDF-1 (« Stromal Derived Factor-1 ») appartient à la famille des chimiokines et est exprimé à la fois par les BMSC et les cellules endothéliales (Lapidot 2005). Le CXCR4, qui agit sur les récepteurs SDF-1, est exprimé sur les cellules souches humaines et les précurseurs cellulaires. L'interaction SDF-1/CXCR4 est principalement impliquée dans la transmigration des ASC.

L'expression du ligand CXCL5 par les cellules épithéliales a fréquemment été observée lors de réponse inflammatoire. Il est supposé que le CXCL5 induit la migration des ASC par gradient chimiotactique (Zhang et al. 2010; Walz et al. 1997).

Les ASC migrent alors à travers les cellules de l'endothélium sinusoidal, suivant les gradients SDF-1 et CXCL5, au sein de la moelle osseuse où elles s'installent dans des niches endostéales (zone entourant directement l'os, en contact avec les ostéoblastes producteurs d'os) (Zhao, Zhang 2016).

#### 1.2.3.3. Notion de niche cellulaire

*In-vivo*, les cellules souches résident dans une niche très complexe, composée d'un groupe de cellule, de molécules de signal et de matrice extracellulaire situés dans un site tissulaire spécial, qui contrôle le renouvellement et la mobilisation des cellules souches (Zhao, Zhang 2016). La localisation exacte et la composition des niches d'ASCs *in-vivo* demeurent mal connues. Cela s'explique par le fait que les ASC ne sont pas des cellules natives mais une population artificielle établie et maintenue en culture à long terme *in-vitro*. Par conséquent, c'est une population hétérogène et le phénotype de cellules qui la compose diffère selon les conditions et durées de culture (Buschmann et al. 2013). Jusqu'à présent, de nombreuses études ont tenté d'identifier la localisation *in-situ* des ASC dans le tissu adipeux en utilisant l'immunohistochimie sur coupe tissulaire (Lin et al. 2008; Zannettino et al. 2008). Par exemple, il a été montré que les ASC étaient localisées dans les capillaires et dans l'adventice périvasculaire des gros vaisseaux du tissu adipeux. Dans les capillaires, ces cellules coexistent avec les péricytes et les cellules endothéliales. Dans l'adventice des grands vaisseaux, les ASC existent en tant que fibroblastes spécialisés. De plus, les cellules musculaires lisses vasculaires et les péricytes seraient des niches cellulaires possibles pour les ASC (Lin et al. 2008). D'autre part, la moelle osseuse est un réservoir de différents types de cellules souches. Des études antérieures ont démontré que les ASC pourraient être localisées dans la moelle osseuse après injection chez des modèles animaux (phénomène de homing), indépendamment des voies d'administration (Lin et al. 2011; Han et al. 2010; Zhao, Zhang 2016).

### 1.3. Le « tracking » des cellules souches – méthodes actuelles

Depuis le début de la recherche sur les CSM, il est vite devenu essentiel de connaître le devenir des cellules souches dans l'organisme. Il est donc indispensable de savoir différencier une cellule souche du reste du tissu. Différentes méthodes de marquage des CSM ont été utilisées. On retrouve deux grands types de marquage : le marquage *post-mortem* qui reste le gold standard en termes de sensibilité et spécificité et le marquage en temps réel, non invasif. Ces deux grands types ne sont pas à opposer, mais tendent à être complémentaire pour la compréhension du devenir des cellules souches.

#### 1.3.1. Marquage en temps réel – non invasif :

Plusieurs techniques de marquage en temps réel ont vu le jour, présentant chacune des avantages et inconvénients. Deux grands types de marquage en temps réel existent : le marquage direct (**Figure 3**) et le marquage indirect (**Figure 4**).

##### 1.3.1.1. Marquage direct :

Le marquage direct nécessite l'introduction d'un marqueur dans la cellule ou à sa surface avant implantation. Plusieurs techniques de marquage direct existent :

###### ➤ IRM ou Imagerie par Résonance Magnétique :

L'IRM est une technique basée sur l'enregistrement des changements des propriétés électromagnétiques des atomes d'hydrogène provoquée par des impulsions répétées d'ondes électromagnétiques à une certaine radiofréquence dans un champ magnétique statique.

Le marquage à l'oxyde de fer est utilisé pour tracer les cellules souches pendant une longue période grâce à l'IRM (McColgan, Sharma, Bentley 2011). Le marqueur le plus souvent utilisé dans les études précliniques et cliniques est la particule super-magnétique d'oxyde de fer (SPIO). Cette méthode est très sensible et a été utilisée pour suivre des cellules souches neuronales chez un patient pendant 3 semaines (Zhu, Zhou, XingWu 2006). L'IRM offre l'avantage d'une haute résolution spatiale, avec une morphologie des organes en détails et des informations de fonctionnement. Le nombre de cellules utilisées pour le « SPIO tracking » chez l'Homme varie entre  $3,71 \times 10^5$  et  $17,4 \times 10^6$  cellules (Zhang et al. 2011). L'inconvénient de cette méthode est qu'elle n'est pas adaptée au suivi à long terme des cellules (Li et al. 2008). En effet, les SPIO peuvent sortir des cellules transplantées avec le temps en étant incorporées dans des macrophages ou d'autres types de cellules et ainsi, une partie du fer peut demeurer dans l'espace interstitiel. Le signal perçu n'est alors pas forcément corrélé à une cellule viable, il y a donc un biais dans la détection (Li et al. 2008; Bengel, Schachinger, Dimmeler 2005; Chen et al. 2009).

Le perfluorocarbène (PFC) peut également être détecté par IRM 19-F (Fluorine-19) et utilisé pour tracer les CSM (Ahrens, Zhong 2013). Les cellules sont marquées dans une émulsion de PFC avant transplantation et détectées par IRM 19-F. Celle-ci est basée sur l'enregistrement des changements des propriétés électromagnétiques des atomes de fluor et non pas d'hydrogène comme dans l'IRM classique. L'avantage principal de ce système est le faible signal de « bruit de fond » car le 19-F est présent en très faible concentration dans l'organisme. C'est une

méthode assez sensible puisqu'elle permet de détecter entre  $10^4$  et  $10^5$  cellules par voxel (pixel en trois dimensions) (Ahrens, Zhong 2013). Cette technique a déjà été utilisée pour tracer des cellules souches avec succès (Partlow et al. 2007; Boehm-Sturm et al. 2011; Bible et al. 2012). Le gadolinium chélate ( $Gd^{3+}$ -DTPA) a également été utilisé mais le SPIO a été préféré de par sa meilleure biocompatibilité.

➤ Tomographie par émission de positons (PET-scan) ou mono-photonique (SPECT) :

La tomographie par émission de positons (PET) est une technique qui permet de mesurer quantitativement et en trois dimensions, une activité métabolique ou moléculaire d'un organe grâce aux émissions de photons produites par l'annihilation des positons issus d'un atome radioactif présent sur le traceur utilisé. Les radio-nucléotides utilisés sont principalement le  $^{18}F$ ,  $^{124}I$ ,  $^{68}Ga$  (Cen et al. 2016).

La tomographie par émission mono-photonique (SPECT) est une technique qui reste proche de la PET, à la différence que le produit radioactif utilisé est émetteur de rayons gamma (constitués de photons). La détection des rayons gamma est faite par une caméra constituée d'un collimateur et de détecteurs de rayons gamma. La PET est donc en général une technique plus sensible (car pas de collimateur), cependant la gamme de produits radioactifs émetteurs de rayons gamma est bien plus grande. Les radio-nucléotides utilisés sont le plus souvent le  $^{111}In$ ,  $^{131}I$  et  $^{99m}Tc$  (Cen et al. 2016).

Les radionucléides utilisées ont des durées de demi-vie différentes (allant de quelques heures à quelques semaines), ce qui détermine le temps dont on dispose pour suivre une cellule marquée dans l'organisme :  $^{99m}Tm$  – 6 heures,  $^{111}In$  – 2,8 jours,  $^{18}F$  – 109 minutes,  $^{64}Cu$  – 12 heures (Gambhir 2009).

L'oxynate d'indium ( $^{111}In$ ) a une demi-vie relativement longue d'environ 2,8 jours (Kraitchman, Bulte 2009). Des études ont montré son efficacité pour suivre des MSC dans des modèles précliniques pendant 7 jours (Kraitchman et al. 2005). Cependant la fuite du signal et l'altération du phénotype des cellules limite la traduction du signal.

Une étude avec le radionucléide  $^{18}F$  FDG (fluorodeoxyglucose) comme marqueur de cellule souche hématopoïétique dans le traitement des infarctus aigus et chroniques du myocarde a montré une traçabilité du marqueur jusqu'à 20 heures par PET (Kang et al. 2006).

Il est possible de détecter entre  $6,2 \times 10^3$  et  $2,5 \times 10^4$  cellules en utilisant ces méthodes (Kraitchman, Bulte 2009).

L'un des avantages majeurs de la PET ou SPECT est la grande sensibilité (femto- et nanomolaire respectivement) qui permet la détection d'une faible quantité de signal (Adonai et al. 2002; Wu, Tseng, Gambhir 2004).

Cependant, ces méthodes présentent également des inconvénients. Premièrement, elles ont une faible résolution spatiale en comparaison à l'IRM, ce qui peut gêner la localisation du signal. Mais le récent développement des PET-CT et SPECT-CT avec tomодensitométrie intégrée donne une visualisation anatomique bien meilleure, permettant une plus grande détection du signal (Gambhir 2009). Deuxièmement, les SPIO peuvent avoir une influence sur la morphologie générale et la capacité proliférative des cellules marquées qui peut biaiser



l'interprétation dans les études menées (Bos et al. 2004; Chen et al. 2009). De plus il existe une radio-toxicité de ces marqueurs qui dépend à la fois du radio-nucléotide utilisé et de la dose (Carr et al. 1995; Zanzonico et al. 2006). Troisièmement, le nombre de cellules augmente avec les divisions mais le nombre de radio-isotopes reste le même, il y a donc un effet dilution avec le temps et les divisions qui biaise le signal observé.

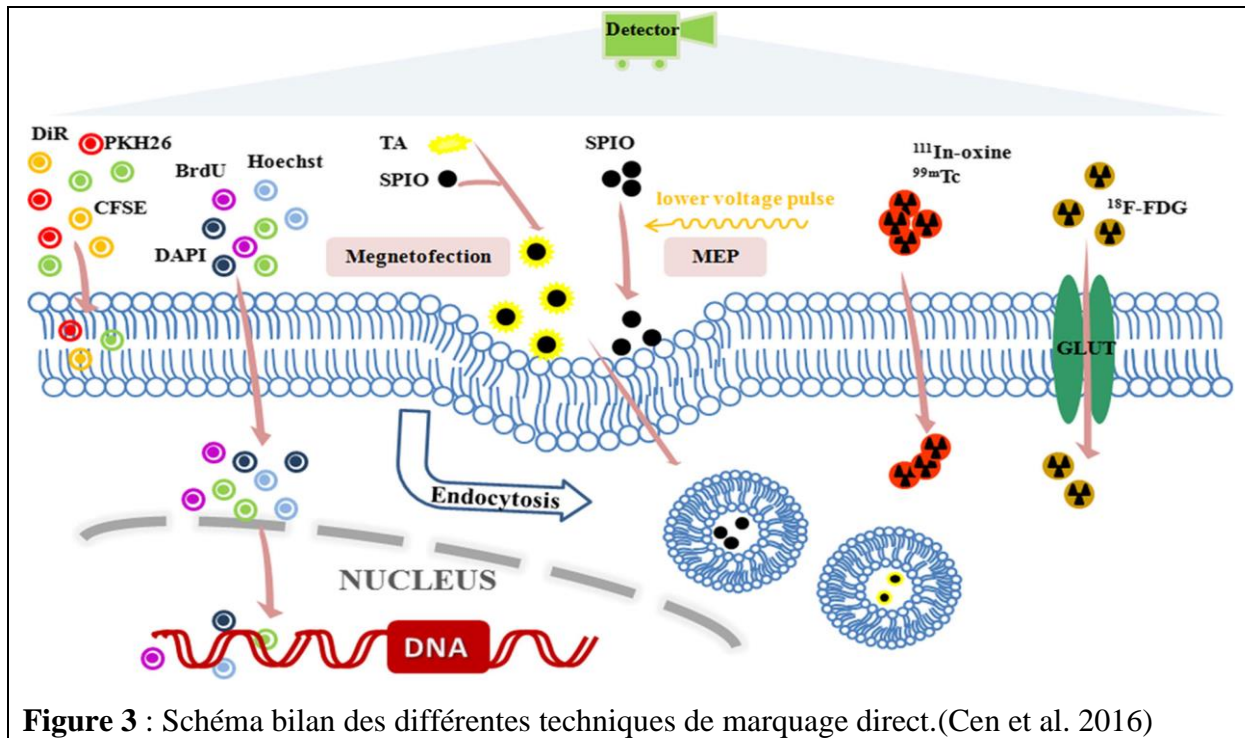
➤ Fluorescence optique :

L'utilisation de sondes fluorescentes (colorants ou nanoparticules) est une autre technique de marquage direct. Le marquage peut être localisé à différents endroits :

- soit dans le noyau (4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), bis-benzimide (Hoechst), 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)),
- soit dans la membrane de la cellule (PKH26, 1,1 dioctadecyl-3,3,3,3-tetramethylindotricarbocyanine iodide (DiR)),
- soit dans le cytoplasme de la cellule (chloromethyl-benzamido octadecyl indocarbocyanines [CM-Dil])
- soit à la fois dans le noyau, la membrane et le cytoplasme (carboxyfluorescein succinimidyl amino ester (CFSE)).

Grace à leur stabilité et leur propriété non toxique, les sondes fluorescentes CellTrackers™ ont gagné en popularité pour le marquage des cellules souches. Ces sondes contiennent le groupe chlorométhyl ou bromométhyl qui réagit avec des thiols qui sont alors transformés en un thioether coloré fluorescent, non perméable cellulaire (qui reste donc piégé dans la cellule). Le marquage avec les sondes fluorescentes permet une visualisation directe des cellules en monocouche avec une haute résolution (Sutton et al. 2008; Fu, Kraitchman 2010).

Les « Quantum dots » (QD), une nouvelle classe de sondes fluorescentes, ont récemment été adoptées pour le marquage *in-vivo* et *ex-vivo* des CSM (Rota et al. 2007; Muller-Borer et al. 2007; Slotkin et al. 2007; Lin et al. 2007). Les QD sont des nanoparticules multifonctionnelles, inorganiques, fluorescentes et semi-conductrices. En comparaison aux sondes fluorescentes organiques, les QD présentent un avantage optique qui permet d'utiliser des dispositifs d'imagerie optique multicolores plus larges, variant des ultra-violets au proche infrarouge suivant les QD utilisées. Les QD ne peuvent pas être transférées aux cellules adjacentes à cause de leur trop grande taille (environ 10nm) comparé aux GAP jonctions (environ 1nm) et restent donc au sein de la cellule initiale (Rosen et al. 2007). Cependant, les effets des QD sur la prolifération des cellules et leur différenciation demeurent incertains. D'autres obstacles entrent en jeu, comme le fait que les QD ont tendance à s'agréger dans le cytosol et qu'il est difficile d'introduire les QD dans les cellules.



#### 1.3.1.2. Marquage indirect :

Le marquage indirect repose sur l'introduction d'un « gène rapporteur » à l'ADN de la cellule, gène qui codera pour une protéine, un récepteur ou une enzyme qui sera reconnu par une sonde spécifique ou par un système d'imagerie (Nguyen, Nag, Wu 2010). Seules les cellules viables sont capables de transcrire le « gène rapporteur » (Gu et al. 2012).

Plusieurs techniques de marquage indirect existent :

##### ➤ Imagerie optique :

L'utilisation de GFP (Green Fluorescent Protein) constitue une des premières applications des « gènes rapporteurs » dans l'imagerie de l'expression des trans-gènes. Les protéines fluorescentes sont très sensibles et émettent un fort signal. La protéine est encodée seulement si la cellule est viable. Le signal ne sera alors émis que par les cellules vivantes. Cependant, à cause de l'excitation par la lumière, de l'absorption par les tissus et de la réfraction tissulaire, la profondeur d'étude des tissus est limitée à 2mm (Massoud, Gambhir 2003; Shah et al. 2004; Contag 2007). C'est pour cela que la plus grande application des « gène rapporteur » fluorescents dans l'étude des CSM est l'analyse *post-mortem*.

L'imagerie bioluminescente (BLI) avec utilisation de « gènes rapporteurs » est basée sur l'émission de lumière et sa détection par des caméras spécifiques avec dispositif à couplage de charge (CCD) (Contag et al. 2000). Comme toutes les autres applications de « gènes rapporteurs », le signal BLI n'est émis que par les cellules vivantes. La BLI est habituellement utilisée pour suivre les CSM chez les petits animaux (Chen et al. 2009; Rodriguez-Porcel et al. 2005; Wu et al. 2003). Deux « gènes rapporteurs » sont couramment utilisés en BLI : le Fluc et la Renilla luciférase (Rluc). La Fluc-BLI est basée sur l'oxydation d'un substrat D-luciférine par l'enzyme FLuc (réaction qui nécessite de l'oxygène, du magnésium et de l'ATP) et résulte

par l'émission d'une lumière déviée dans le rouge (500-700nm). C'est un signal fort. La Rluc-BLI ne nécessite pas de cofacteurs mais résulte en un signal de plus faible longueur d'onde (450-550nm) donnant un signal moins fort, plus difficile à détecter chez l'animal vivant (Gambhir 2009). La BLI donne une information plane, limitée aux informations peu profondes. Elle est donc limitée aux petits animaux et aux tissus superficiels chez les animaux de plus grand format.

➤ PET et SPECT :

Le « gène rapporteur » est une enzyme ou un récepteur qui requiert l'administration exogène d'une sonde contenant un traceur. Le radionucléide substrat est alors retenu dans la cellule ou à sa surface et peut être localisé et quantifié par PET ou SPECT.

Une information quantitative peut être extrapolée grâce au pourcentage de radio-isotope par gramme injectés dans le tissu. Ça permet de quantifier des zones couvertes par les cellules mais pas le nombre exact de cellules (Gyöngyösi et al. 2008). La durée de vie des sondes est très courte (de l'ordre de quelques heures) mais comme cette méthode n'est pas invasive, le suivi des cellules souches est possible, à intervalles réguliers, jusqu'à 4 semaines (Gyöngyösi et al. 2008; Wu et al. 2006; Pei et al. 2014).

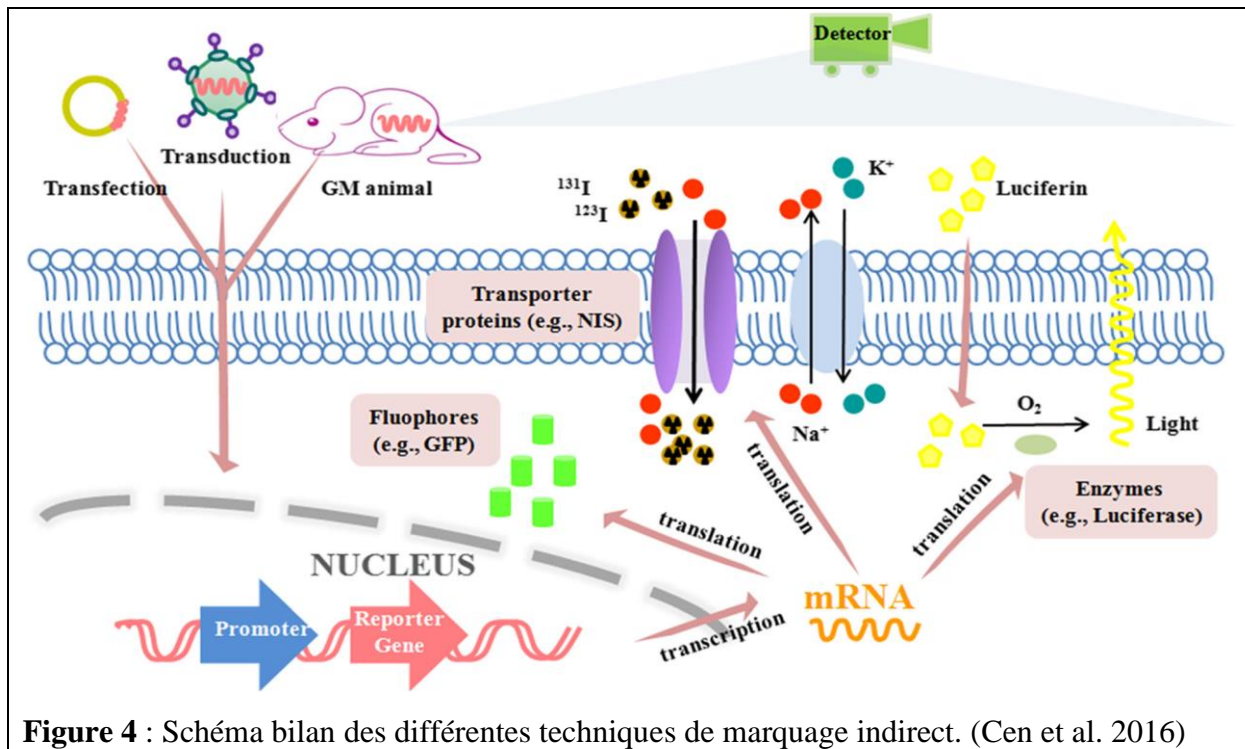
La sensibilité par PET est de l'ordre du fentomolaire ( $10^{-12}$  mol/L), supérieur à l'IRM ( $10^{-5}$  mol/L) mais pas aussi sensible que l'imagerie optique à faible profondeur ( $10^{-15}$  mol/L).

Trois systèmes de « gènes rapporteurs » ont été décrits par PET ou SPECT. Le système le plus utilisé est basé sur la production d'une enzyme intracellulaire (HSV1-tk ou Herpes Simplex Virus type 1 thymidine kinase) qui phosphoryle un substrat exogène qui est alors retenu dans la cellule à cause de sa charge négative. Ce système engendre un fort signal. Par contre comme c'est une protéine d'origine virale, il peut y avoir une réponse immunitaire de la part de l'hôte qui diminue alors le signal (Hsieh et al. 2008). Un deuxième système repose sur l'utilisation d'un récepteur à la dopamine ( $D_2R$ ) avec la PET (MacLaren et al. 1999). Dans ce cas, le « gène rapporteur » code pour une protéine membranaire qui se lie à une sonde exogène (3-(2'-[18F]-fluoroethyl)-spiperone) qui aura été introduite et sera détectée par PET. Cependant ce système est limité à la détection de l'interaction d'un récepteur avec une seule molécule, le signal est donc moins perceptible. Un troisième système repose sur l'encodage d'un symport sodium/iode (NIS) qui est une protéine transmembranaire thyroïdienne, qui en conditions physiologiques transporte l'iode dans les cellules en échange du sodium (Kim et al. 2005; Kang et al. 2005). Ce système a été utilisé avec la PET et le traceur  $^{124}I$  mais aussi avec la SPECT et le traceur  $^{123}I$  (Gambhir 2009).

➤ IRM :

Le « gène rapporteur » est typiquement un gène codant une métalloprotéine intracellulaire comme la transferrine, la ferritine ou la tyrosinase, qui captent une grande quantité du fer présent dans le cytoplasme. La détection est alors non-invasive (Gu et al. 2012; Gambhir 2009) et dépend de la quantité de fer capté et la durée pendant laquelle le fer reste dans la cellule. Cependant le fer capté produit une information à long terme qui peut masquer la viabilité de la cellule (Kraitchman, Bulte 2009), en effet une cellule morte retient encore le fer qui est alors encore détecté par IRM.

Certaines études suggèrent que seul un gène codant pour une protéine riche en lysine pouvait être un « gène rapporteur » détectable à l'IRM (Gilad et al. 2007).



### 1.3.2. Marquage *post-mortem*

#### 1.3.2.1. Immunohistochimie

L'immunohistochimie est une méthode de localisation de protéines dans les cellules d'une coupe de tissu, par détection d'antigènes au moyen d'anticorps. Le couple anticorps-antigène peut être visualisé de plusieurs façons : soit l'anticorps est couplé à une enzyme (ex : peroxydase) qui peut catalyser une réaction de production de couleur (ex : coloration immunoperoxydase), soit l'anticorps est marqué avec un fluorophore (ex : FITC, Rhodamine, Texas Red ou Alexa Fluor).

Des anticorps spécifiques d'espèce, des bio-marqueurs spécifique de genre ou spécifique humain sont indispensables pour suivre des cellules souches humaines lors de xénotransplantation (transfert d'une espèce à une autre). Le marqueur « antigène nucléaire humain » reconnaît un déterminant antigénique de l'histone humaine H1 et est exprimé dans toutes les cellules nucléées humaines. L'anticorps généré contre l'antigène nucléaire humain a été largement utilisé pour suivre des cellules humaines xénotransplantées dans des tissus animaux. Malheureusement, la plupart de ces études se sont focalisées sur des coupes de tissus congelées, et non pas sur des coupes incluses en paraffine. De plus, un anticorps spécifique humain reconnaissant les antigènes sanguins comme le TRA-1-85 ou les antigènes du complexe mineur/majeur d'histocompatibilité ont aussi été testés mais n'ont pas donné de résultats satisfaisants en terme de largeur d'application, d'expression ubiquiste ou d'expression de longue durée pendant la différenciation (Allard et al. 2014).

Deux bio-marqueurs ubiquistes ont montré des résultats satisfaisants pour suivre des CSM humaines xénotransplantées dans des tissus animaux, dont les coupes de tissus sont incluses en paraffine. Il s'agit des marqueurs Ku80 et « human mitochondria » (hMito) (Allard et al. 2014). La localisation de l'immuno-coloration est confinée au noyau pour Ku80 et au cytoplasme pour hMito. Ku80 n'est jamais détecté chez les tissus de souris, de rat et de cochon, confirmant sa spécificité à l'espèce humaine. Etonnamment, l'anticorps hMito reconnaît une protéine homologue chez le cochon qui rend le suivi des CSM humaines xénotransplantées impossible chez cette espèce (Allard et al. 2014).

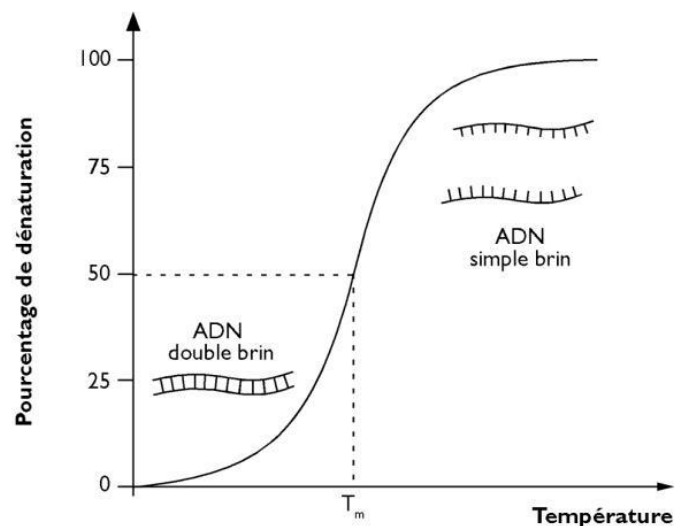
### 1.3.2.2. Hybridation *in-situ*

L'hybridation *in-situ* (HIS) est une méthode de localisation de séquence de nucléotides connus monobrin (ARN ou ADN) sur une coupe histologique de tissu. La sonde est marquée afin d'être visualisée grâce à des isotopes radioactifs ou des produits fluorescents (FISH), des haptènes (biotine ou digoxigénine) ou des enzymes.

#### Principe de l'hybridation *in-situ* :

L'ADN est une chaîne d'acides nucléiques double brins, constituée de deux brins d'acide nucléiques complémentaires contenant quatre désoxyribonucléotides différents reliés entre eux par des liaisons phosphodiester. Chacun des quatre nucléotides comporte une base, dont l'adénine (A), la cytosine (C), la guanine (G) et de la thymidine (T). Les deux brins sont opposés mais toujours A en face de T et C en face de G grâce à des liaisons hydrogènes. La technique d'hybridation *in-situ* est basée sur les propriétés chimiques de l'ADN. Une sonde ADN synthétisée à partir d'une séquence choisie peut s'hybrider spécifiquement avec le brin d'ADN correspondant à l'intérieur des cellules cibles (ici les CSM).

L'utilisation des sondes sur lames histologiques incluses en paraffine nécessite des étapes de prétraitement comme le toluène (un dissolvant de paraffine) et une protéase. Ensuite la sonde est hybridée à l'ADN cible par un processus de dénaturation-hybridation reposant sur une élévation de température suivi d'un abaissement de cette dernière. Les liaisons hydrogènes entre les paires de bases sont sensibles à la chaleur, elles se cassent à haute température, donnant ainsi des molécules d'ADN simple brin (**Figure 5**). Cette température est appelée température de fusion ( $T_m$ ), elle dépend de la longueur du fragment d'ADN, de sa composition en bases et de la présence de certains ions dans le milieu (Noiret 2016).



**Figure 5 :** Température de fusion moléculaire d'un fragment d'ADN (Noiret, 2016)

Ensuite, vient l'étape du lavage stringent. Il permet d'enlever l'ADN qui ne s'est pas hybridé. Plus une solution sera stringente (température élevée, concentration en Na<sup>+</sup> faible) moins l'hybridation moléculaire de l'ADN sera facile. Seuls les brins d'ADN très similaires pourront s'apparier, l'hybridation est dite spécifique. Au contraire, moins une solution sera stringente (faible température, concentration en Na<sup>+</sup> élevée), plus l'hybridation moléculaire de l'ADN sera facile, et moins l'hybridation sera spécifique. Le lavage stringent permet ici d'éliminer les sondes s'étant liées de manière non spécifique à l'ADN de la cellule cible (Noiret 2016).

#### Applications au « tracking » des CSM :

La séquence Alu humaine, est une séquence hautement répétée, spécifique d'espèce, de 300 paires de bases. Une sonde spécifique vient s'hybrider à la séquence Alu. Cette sonde est marquée par des techniques d'immunohistochimie. La localisation de la coloration est alors confinée au noyau. La séquence Alu est la plus intense et la plus exprimée des marqueurs tissulaires analysés, également retrouvé dans les derniers stades de la spermatogenèse. C'est le marqueur de choix dans le suivi *post-mortem* de CSM xénotransplantées (Allard et al. 2014).

L'ADN Cot-1 est un ADN qui est habituellement utilisé pour bloquer les hybridations non spécifiques sur coupe tissulaire ou neutraliser les séquences répétitives pour les cartographies chromosomiques chez l'homme. En effet, il contient la plupart des séquences d'ADN répétitives et pratiquement aucune des séquences uniques (non répétées) du génome humain. Cet ADN a été marqué avec de la biotine et utilisé comme sonde d'HIS pour aller s'hybrider sur les séquences répétitives humaines (Noiret 2016). L'ADN Cot-1 est également aujourd'hui un bon marqueur des cellules souches humaines xénotransplantées dans le tissu murin.

#### 1.3.2.3. PCR quantitative

La PCR quantitative (qPCR), aussi appelée PCR en temps réel, est une méthode particulière de PCR permettant de mesurer la quantité initiale d'ADN d'un échantillon. A chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN total est mesurée grâce à un marqueur fluorescent. L'obtention de la cinétique complète de la réaction de polymérisation permet d'obtenir une quantification absolue de la quantité initiale d'ADN cible.

Il est donc possible de quantifier la séquence Alu dans un tissu donné, en utilisant une sonde fluorescente spécifique de la séquence Alu. Cette quantification donne ensuite, en extrapolant, un nombre de CSM dans un tissu xénotransplanté (Noiret 2016). Cette méthode est uniquement quantitative et ne permet pas de visualiser les cellules ou les tissus. De plus la méthode qPCR ne fait pas la différence entre les cellules vivantes ou les cellules apoptotiques. C'est donc plutôt une méthode complémentaire.

#### 1.3.3. Bilan sur les techniques de marquage

Toutes les techniques de marquage présentées ci-dessus présentent des avantages et des inconvénients. Il n'existe pas de marqueur idéal à l'heure actuelle pour suivre les CSM. Toutes ces méthodes sont donc complémentaires et apportent des informations différentes. Le tableau (**Tableau 1**), résume les avantages et inconvénients de chaque méthode (Fu, Kraitchman 2010; Heslop et al. 2015; Noiret 2016).

**Tableau 1 : Avantages et Inconvénients des différentes méthodes de marquage :**

	<b>Technique (marqueurs)</b>	<b>Avantage</b>	<b>Inconvénients</b>
<b>Non invasif direct</b>	IRM (SPIO, PFC)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Résolution spatiale et temporelle élevée</li> <li>- Détail des tissus mous</li> <li>- Visualisation morphologique et fonctionnelle</li> <li>- Pas de radiations ioniques</li> <li>- Suivi à moyen terme</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Faible sensibilité</li> <li>- Coûteux</li> <li>- Dilution du signal avec le temps</li> <li>- Pas de discrimination cellule morte / vivante</li> <li>- Quantification difficile</li> <li>- Toxicité par accumulation de certaines sondes</li> </ul>
	PET/SPECT ( <sup>99m</sup> Tc, <sup>111</sup> In, <sup>18</sup> F, <sup>64</sup> Cu)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sensibilité élevée (picomolaire)</li> <li>- Bonne pénétration tissulaire</li> <li>- Information par « points chauds »</li> <li>- Agents approuvés cliniquement</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Radiations ioniques</li> <li>- Coûteux</li> <li>- Faible résolution spatiale</li> <li>- Nécessite CT scan ou IRM pour les détails anatomiques</li> <li>- Suivi limité par la demi-vie des traceurs</li> <li>- Dilution du signal avec le temps</li> </ul>
	Fluorescence optique (Fluorophores, QD)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sensibilité très élevée</li> <li>- Faible coût</li> <li>- Pas de radiations ioniques</li> <li>- Suivi à court terme</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Atténuation des photons</li> <li>- Faible pénétration tissulaire</li> <li>- Auto-fluorescence : bruit de fond +++</li> <li>- Cyto-toxicité potentielle des QD</li> </ul>
<b>Non invasif indirect</b>	Fluorescence (GFP) / Bioluminescence (Luciférase)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Système contrôlable</li> <li>- Rapide</li> <li>- Pas de dilution du signal avec le temps</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Modification génétique</li> <li>- Résolution spatiale limitée</li> <li>- Faible pénétration tissulaire (limité aux animaux de petite taille)</li> </ul>
	PET/SPECT (sonde pour HSV1-tk, D <sub>2</sub> R, symport Na/I)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sensibilité élevée</li> <li>- Bonne pénétration tissulaire</li> <li>- Information par « points chauds »</li> <li>- Pas de dilution du signal avec le temps</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Modification génétique</li> <li>- Radiations ioniques</li> <li>- Coûteux</li> <li>- Faible résolution spatiale</li> <li>- Nécessite CT scan ou IRM pour les détails anatomiques</li> </ul>
	IRM (transferrine, ferritine, tyrosinase)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Résolution spatiale et temporelle élevée</li> <li>- Détail des tissus mous</li> <li>- Visualisation morphologique et fonctionnelle</li> <li>- Pas de radiations ioniques</li> <li>- Pas de dilution du signal</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Modification génétique</li> <li>- Faible sensibilité</li> <li>- Coûteux</li> <li>- Quantification difficile</li> <li>- Toxicité par accumulation de certaines sondes</li> </ul>

<i>Post-mortem</i>	Immunohistochimie (Ku80, hMito)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sensibilité et spécificité très élevés</li> <li>- Pas de toxicité cellulaire ante-mortem, ni modifications génétiques</li> <li>- Haute résolution cellulaire</li> <li>- Rapidité</li> <li>- Faible coût</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Visualisation en 2D d'une petite partie tissulaire</li> <li>- Pas d'information structurelle</li> <li>- Sacrifice d'animaux</li> <li>- Uniquement en xénotransplantation</li> </ul>
	Hybridation <i>in-situ</i> (Séquence Alu)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sensibilité et spécificité très élevées</li> <li>- Pas de toxicité cellulaire ante-mortem, ni modifications génétiques</li> <li>- Haute résolution cellulaire</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Visualisation en 2D d'une petite partie tissulaire</li> <li>- Pas d'information structurelle</li> <li>- Sacrifices d'animaux</li> <li>- Manipulations sur plusieurs jours</li> <li>- Plus coûteux</li> <li>- Uniquement en xénotransplantation</li> </ul>
	PCR quantitative (Séquence Alu)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sensibilité et spécificité très élevées</li> <li>- Pas de toxicité cellulaire ante-mortem, ni modifications génétiques</li> <li>- Méthode quantitative</li> <li>- Rapide</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Uniquement quantitatif, pas d'informations structurelles, ni visualisation des cellules et tissus</li> <li>- Sacrifices d'animaux</li> <li>- Uniquement en xénotransplantation</li> </ul>

En analyse *post-mortem*, aucun marqueur ne permet de suivre les cellules souches d'une espèce, injectées dans cette même espèce sans préalablement avoir recours à des modifications génétiques, structurelles ou fonctionnelles des CSM.

Cependant il est possible de marquer un chromosome d'intérêt dans chaque cellule nucléée, dont les cellules souches. Il est donc en théorie, possible d'injecter des cellules souches mâles chez une femelle de la même espèce. Puis en *post-mortem*, d'utiliser une sonde dirigée contre les chromosomes sexuels en particulier le chromosome Y (uniquement présent chez le mâle et donc dans les cellules souches d'origine masculine) pour révéler par des techniques d'hybridation *in-situ* et d'immunohistochimie la présence des cellules souches injectées au sein du tissu étudié.

#### 1.4. Sondes dirigées vers les chromosomes sexuels

Des études ont déjà montré l'utilisation de sondes dirigées vers les chromosomes sexuels pour le sexage des animaux. Pour certaines espèces très utilisées en recherche comme la souris, des sondes sont commercialisées. Pour d'autres espèces (comme le chien), les sondes doivent être créées. Dans tous les cas, l'utilisation des sondes dirigées contre les chromosomes sexuels ont été utilisées pour le suivi des cellules souches que chez des femelles avec donneur mâle.

Une équipe de chercheur a créé une sonde spécifique du chromosome Y chez le macaque rhésus (car aucune sonde commerciale n'existait). Cette sonde a été testée sur cellules en métaphases avec succès (Taguchi et al. 2003). Elle a également été utilisée sur des tissus de singe rhésus mâle et femelle inclus en paraffine (jéjunum, rein, foie, pancréas) (Xia et al. 2007).



Des sondes commerciales chez le chien ont été utilisées dans une étude. Ces sondes marquent une partie des chromosomes sexuels et non le chromosome en entier. Cette sonde a été utilisée pour sexer le sperme de chien par méthode FISH (OI et al. 2013).

Une étude a montré l'utilisation de sonde anti-Y de souris pour détecter les CSM mâles transplantées chez une souris femelle dans un tissu pulmonaire (Trotman et al. 2004) par hybridation *in-situ* et marquage par immunohistochimie.

Une étude clinique a été menée avec succès chez quatre femmes avec hépatite alcoolique, qui ont eu une transplantation de cellules souches mâle (Dalakas et al. 2010). La technique FISH pour le chromosome Y avec immuno-coloration a démontré la possibilité des cellules souches mésenchymateuses dérivées de la moelle osseuse à se différencier en myofibroblastes hépatiques (Harvey et al. 1997).

L'utilisation de sonde sélective du chromosome Y permet d'éviter les problèmes rencontrés avec les autres techniques de marquage, notamment la transduction du vecteur viral dans la cellule, le marquage trans-génétique, les effets cytotoxiques, la dilution du signal, ou sa diffusion aux cellules adjacentes. Tout cela, en fait un bon traceur sur le long terme. Le seul inconvénient est que le marqueur de chromosome Y ne peut pas être utilisé pour des transplantations autologues ou d'un donneur femelle (Cen et al. 2016).

### 1.5. Choix du modèle animal

La souris a longtemps été l'espèce de choix pour étudier les cellules souches chez les mammifères. Elle est relativement peu coûteuse, se reproduit rapidement et peut être modifiée génétiquement assez facilement. Cependant, les expériences sur les souris pour prédire l'efficacité des thérapies à base de cellules souches reste controversée. L'échec de multiples modèles murins pour précisément décrire la particularité des maladies humaines ont contraint les chercheurs à rechercher d'autres espèces animales qui représenteraient un meilleur modèle prédictif de l'homme (Harding, Roberts, Mirochnitchenko 2013).

Les gros animaux, comme les lapins, chiens, cochons, chèvres, moutons, et primates non-humains, se sont alors avérés être de meilleurs modèles que les souris. En effet, ils ont une durée de vie plus longue, ce qui facilite les études longitudinales critiques pour la plupart des applications de cellules souches. De nombreux paramètres physiologiques (ex : les propriétés du système immunitaire) sont beaucoup plus proches de l'Homme que ceux des rongeurs. Les gros animaux ont un rôle significatif dans l'établissement de la sécurité des applications de cellules souches car les doses de produits biologiques, la voie d'administration et les résultats du traitement peuvent être extrapolés facilement à l'Homme. Un autre avantage est la possibilité d'utiliser des équipements et techniques développées pour des applications en médecine humaine (chirurgie, imagerie,...). Ces espèces sont également plus réalistes pour l'estimation de la qualité et des coûts d'un nouveau traitement (Harding, Roberts, Mirochnitchenko 2013).

Le chien est un bon modèle pour étudier les maladies chez l'Homme. La physiologie, la présentation des maladies et les réponses cliniques chez le chien sont bien plus similaires à l'Homme en comparaison aux autres espèces animales classiquement utilisées. Parmi les 400 maladies héréditaires environ connues chez le chien, plus de la moitié ont une équivalence chez

l'Homme. Les chiens développent un nombre de tumeurs spontanées qui ont un comportement biologique et des caractéristiques histopathologiques similaires aux tumeurs développées chez l'Homme. De plus il y a plus de similarités dans les mécanismes de développement des tumeurs entre l'Homme et le chien qu'avec d'autres modèles animaux (Starkey et al. 2005). La physiologie du chien est comparable à celle de l'Homme dans la réponse et le métabolisme des drogues chimiques utilisées en routine pour les études de toxicité pharmacologiques. Le chien est également biologiquement plus comparable à l'Homme dans la cinétique des cellules souches, et la réponse aux cytokines (Schneider et al. 2008).

Dans les projets de l'unité de recherche (STROMALab) et pour notre étude, le modèle canin représente un deuxième modèle mis en œuvre après des premières validations dans le modèle murin afin de renforcer les premiers résultats. Il est également utilisé dans le but de développer des thérapies innovantes pour des applications directes en médecine vétérinaire.

Pour l'étude des ASC, les modèles murins utilisent souvent des modèles immunodéprimés comme la souris nude qui permettent la transplantation et l'étude *in vivo* des cellules humaines. Les outils d'identification des cellules humaines dans les tissus murins sont aisés car ils utilisent des marqueurs spécifiques d'espèce. Par contre, les études mise en œuvre chez le chien, modèle totalement immunocompétent, ne peuvent utiliser que des ASC canines et nécessitent donc la mise au point de nouveaux outils dédiés pour l'identification des cellules transplantées. C'est pour répondre à cette problématique technique et scientifique que cette thèse a été réalisée.

## 2. PARTIE EXPERIMENTALE

Cette étude s'inscrit dans un projet de recherche sur les cellules souches mené par l'unité de recherche STROMALab (Université de Toulouse, CNRS ERL5311, EFS, INP-ENVT, Inserm U1031, UPS, Toulouse, France, Dr Isabelle Raymond Letron). Ce projet avait besoin de développer un outil technologique pour répondre à une problématique scientifique : identifier des cellules d'une espèce administrées dans les tissus de la même espèce.

Pour la réalisation de cet outil, le Dr Alain Pinton de la plateforme de cytogénétique, unité de recherche GenPhySE (Université de Toulouse, INRA, INPT, ENVT, Toulouse, France), a mis à disposition ses compétences scientifiques et technologiques pour la création des sondes chromosomiques.

Enfin, le matériel biologique d'origine canin (sang et biopsies cutanées) a été fourni sur le site de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse en collaboration avec le Pr. Michel Franc et de Dr Patricia Meynaud.

### 2.1. MATERIELS ET METHODES

#### 2.1.1. Objectif de notre étude

L'objectif de cette étude est de créer une sonde spécifique du chromosome Y et une sonde spécifique du chromosome X chez le chien par des techniques de microdissection, chromosomique pour la réalisation d'expérimentations de FISH (hybridation *in-situ* en fluorescence). L'objectif est pouvoir distinguer des cellules mâles de cellules femelles dans différents tissus.

Le but final, est de suivre des CSM de chien mâle, transplantées chez une chienne femelle, en utilisant une sonde spécifique du chromosome Y du chien (présent uniquement chez le mâle). Les CSM étant des cellules nucléées, elles contiennent également les chromosomes sexuels. En injectant des CSM mâles chez une femelle, le marquage d'une cellule par la sonde du chromosome Y indique alors forcément une cellule souche. Cette méthode permettra la détection de CSM à un instant *t* de la vie de l'animal. Elle n'influence pas le comportement, la morphologie, ou la nature des CSM. La sonde du chromosome X a également été créée en tant que témoin, pour être sûr que l'absence de signal « chromosome Y » ne résulte pas d'un défaut d'hybridation.

Le modèle murin ayant déjà été largement utilisé dans l'étude des CSM, il a été décidé de faire cette étude sur le chien, d'une part car c'est un modèle « gros animal » qui se rapproche donc plus de l'Homme que la souris (par exemple pour les doses administrées) et d'autre part pour les applications cliniques des CSM en médecine vétérinaire.

Le chien mâle possède 78 chromosomes : 38 paires de chromosomes autologues acrocentriques, 1 grand chromosome X sub-métacentrique et 1 petit chromosome Y métacentrique (**Annexe 2**). Les chromosomes sexuels sont donc facilement identifiables parmi les autres chromosomes (**Figure 6**).



**Figure 6** : Etalement des chromosomes de chien sur cellule en métaphase

Chromosomes sexuels entourés en rouge : grand chromosome (X) et petit chromosome (Y)

*D'après Izabela Szczerbal and Marek Switonski (2016). Chromosome Abnormalities in Domestic Animals as Causes of Disorders of Sex Development or Impaired Fertility, Insights from Animal Reproduction, Dr. Rita Payan Carreira (Ed.), InTech*

Tous les milieux, réactifs et autres composants utilisés, au cours des manipulations, sont détaillés et regroupés dans le tableau en annexe (**Annexe 1**).

### 2.1.2. La culture cellulaire

Afin de créer les sondes, il faut récupérer les chromosomes sexuels de chien. Pour cela, des cultures cellulaires ont été effectuées afin de récupérer des cellules en métaphase de mitose (phase de division pendant laquelle les chromosomes sont bien individualisés).

#### 2.1.2.1. Culture à partir de tissu cutané

Le but des cultures à partir de tissu cutané est d'obtenir des cellules appelées fibroblastes. Ces cellules sont plus fragiles que des cellules sanguines type leucocytes, mais ce type de culture permet en théorie de récupérer plus de cellules en métaphase que par un autre type de culture.

Un prélèvement de peau (2cm sur 0,5 cm) de chien malinois mâle a été réalisé à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse au service de chirurgie, sur « déchet chirurgical », au moment de l'exérèse d'une masse.

Les manipulations suivantes sont réalisées sous PSM (poste de sécurité microbiologique).

##### 2.1.2.1.1. Mise en culture des morceaux de peau

Des boîtes de culture (Falcon ® 25cm<sup>2</sup>) sont utilisées. Dans chaque boîte, 1mL de milieu de culture n°1 (Gibco F-12 Nut Mix (Ham) + sérum veau foetal + Antibiotique/Antimycotique) est introduit. Le milieu est réparti uniformément sur tout le fond de la boîte, puis l'excédent est aspiré à l'aide d'une pipette pasteur.

Le morceau de peau est détaillé en nombreux petits morceaux d'environ 2mm chacun. Une dizaine de petits morceaux sont alors introduits dans chaque boîte, à l'aide d'une pipette pasteur, en veillant à bien les séparer les uns des autres sur tout le fond de la boîte.

L'excédent de milieu est à nouveau aspiré avec une pipette pasteur. Les boîtes sont mises à sécher verticalement pendant environ 10min afin que les morceaux de peau adhèrent bien au fond de la boîte.

Ensuite, 1mL du même milieu n°1 est introduit dans chaque boîte. Ces dernières sont alors placées horizontalement à l'étuve à 37°C pendant 2 à 4 jours.

Au bout de 2 jours, une vérification, à l'aide d'un microscope inversé, est réalisée pour s'assurer qu'il n'y ait pas de contaminations visibles dans les boîtes. Puis le milieu est renouvelé : sous PSM, le milieu de culture présent dans chaque boîte est retiré à l'aide d'une pipette pasteur et d'un aspirateur chirurgical. Un millilitre du même milieu n°1 est réintroduit dans chaque boîte. Ces dernières sont à nouveau placées à l'étuve, horizontalement pendant 2 à 4 jours à 37°C.

Le milieu n°1 est ainsi renouvelé 2 fois par semaine, en contrôlant à chaque fois, l'absence de contamination dans les boîtes et la présence quantitative des fibroblastes autour des morceaux de peau.

Lorsque plus de 20 fibroblastes par champs autour d'un morceau de peau (au bout de 10 jours environ) sont observés, le milieu de culture est changé pour devenir plus sélectif des fibroblastes. Le milieu n°2 (Gibco DMEM) va progressivement être introduit. Au lieu de réintroduire 1mL de milieu n°1 dans chaque boîte, c'est un mélange de 0,5mL de milieu n°1 + 0,5mL de milieu n°2 qui va être introduit.

Le milieu de culture des boîtes est à nouveau renouvelé 2 fois par semaine avec le mélange 0,5mL de milieu n°1 et 0,5mL de milieu n°2 jusqu'à ce que les boîtes soient remplies de cellules (environ 15 jours supplémentaires).

#### 2.1.2.1.2. Division

Par mesure de précaution, les morceaux de peau sont introduits dans une nouvelle boîte afin de les remettre en culture.

Les boîtes alors démunies de leurs morceaux de peau, contiennent principalement des cellules fibroblastiques à tous les stades de division.

Afin de répartir uniformément les cellules dans les boîtes, trois lavages à la trypsine sont réalisés. Les boîtes sont ensuite tapées afin de décoller le plus de cellules possible. Puis 5mL de milieu n°2 est introduit dans chaque boîte, ce qui neutralise l'effet de la trypsine.

Quatre heures après, le milieu est renouvelé avec 5mL de milieu n°2 et 2mL de milieu n°1. Les cellules qui étaient alors en suspension sont retirées de la boîte avec le milieu.

Deux jours après, 2 lavages successifs à la trypsine sont à nouveau effectués puis les boîtes sont tapées afin de décoller le plus de cellules possible. Le milieu contenant les cellules en suspension de chaque boîte est transféré dans un tube Falcon® 50mL contenant 5ml de milieu n°2.

Le tube est centrifugé 5min à 1300 t/min. Le surnageant est retiré par aspiration. Le culot contenant les cellules est remis en suspension avec 2mL de milieu n°2. Enfin, la suspension est transférée à volume égal dans 2 boîtes de culture Falcon® 75cm<sup>2</sup> contenant chacune 10mL de milieu n°2. Ces deux boîtes sont alors placées à l'étuve à 37°C pour la nuit.

Le lendemain, il y a normalement de nombreuses cellules en division (ce qui est recherché). Ce sont celles qui se détachent le plus facilement du tapis cellulaire. Les boîtes vont donc juste être tapées sans rajouter de trypsine.

#### 2.1.2.1.3. Récupération des cellules en division

Les boîtes vont être tapées afin de décoller les cellules en division. Elles se retrouvent alors en suspension dans le milieu de culture que contient la boîte.

Ce milieu de culture est récupéré et introduit dans un tube Falcon® 50mL. Le tube est centrifugé 5min à 1380t/min. le surnageant est ensuite retiré par aspiration.

Afin de réaliser un choc hypotonique, 15mL de solution choc 1/6 (sérum de veau nouveau-né dilué au 1/6<sup>ème</sup> avec de l'eau distillée) sont ajoutés dans le tube. Ce dernier est ensuite placé au bain marie à 37°C pendant 20min.

#### 2.1.2.1.4. Fixation

Le tube est retiré du bain marie. Entre 1 et 2mL de fixateur (solution contenant 1 volume d'acide acétique 100% + 3 volumes d'éthanol 100%, exemple 20mL d'acide acétique et 60mL d'éthanol) sont ajoutés. La solution est rapidement mélangée à l'aide d'un vortex. Le tube est ensuite centrifugé 5 minutes à 1300t/min. Le surnageant est retiré par aspiration.

Entre 10 et 15mL de fixateur sont ajoutés dans le tube. Le culot est remis en suspension à l'aide du vortex. Le tube est centrifugé 5 min à 1300t/min. Puis le surnageant est retiré par aspiration.

A nouveau, entre 10 et 15mL de fixateur sont ajoutés, le culot est remis en suspension à l'aide du vortex. Le tube est centrifugé 5 min à 1500t/min. Le surnageant est ensuite retiré par aspiration.

#### 2.1.2.1.5. Etalement des cellules sur lamelles

Le culot contenant les cellules est remis en suspension à l'aide d'une pipette pasteur.

Des lamelles précédemment stockées dans un bocal d'eau distillée à 4°C vont être utilisées.

Pour une lamelle, le bord en haut à gauche est cassé afin de l'orienter. L'excédent d'eau est retiré en posant le bord de la lamelle sur du papier buvard. Une goutte du culot est déposée sur la lamelle puis étalée en soufflant vers le bas. La lamelle est mise à sécher sur un portoir.

Une fois sèches, les lamelles sont stockées à -20°C dans un tube rempli d'éthanol 100%.

### 2.1.2.2. Culture à partir de sang

#### 2.1.2.2.1. Prélèvement et mise en culture

La culture de cellules sanguines se fait à partir de prélèvement de sang sur tube hépariné. Pour cela deux chiens ont été prélevés à la veine céphalique, en collaboration avec le Pr. M. Franc de l'unité de parasitologie de l'ENVT : un chien beagle de 6 mois et un chien beagle de 9 ans à raison de deux tubes par chien.

Un tube de culture est réalisé pour un tube de prélèvement afin de maximiser la réussite des cultures. Dans un tube Falcon® de 50mL, 10mL de milieu RPMI sont introduits. Ensuite 1 goutte d'héparine et 100µL de Pokeweed (un agent mitogène, qui induit notamment la prolifération des lymphocytes) sont ajoutés. Enfin, environ 20 gouttes de sang hépariné sont introduites dans le tube. Le mélange est rapidement homogénéisé et placé à l'étuve à 37°C pendant 72h [48-96h].

#### 2.1.2.2.2. Arrêt des cultures et fixation

Après 72h à l'étuve, 100µL de colchicine est ajoutée dans chaque tube. Les tubes sont replacés à l'étuve à 37°C pendant 2h. Les tubes sont ensuite sortis de l'étuve, centrifugés 10min à 1600t/min et le surnageant est retiré par aspiration.

Puis 20mL de choc hypotonique 1/6<sup>ème</sup> (qui aura préalablement été décongelé dans un bain marie à 37°C) sont ajoutés. Les tubes sont remis 20min à l'étuve à 37°C. Puis 4-5 gouttes de fixateur sont ajoutées avant de centrifuger les tubes 10min à 1800t/min. Le surnageant est ensuite retiré par aspiration.

Le culot est remis en suspension dans 20mL de fixateur à l'aide du vortex, puis centrifugé 10min à 1800t/min. Le surnageant est retiré par aspiration. Ces dernières étapes sont répétées encore une fois (fixateur, centrifugation, retrait surnageant).

#### 2.1.2.2.3. Etalement des cellules sur lamelles

Cet étalement se fait comme l'étalement cellulaire précédemment décrit (cf. 2.1.2.1.5, page 31).

### 2.1.3. Microdissection

#### 2.1.3.1. Préparation des lamelles

Afin de faciliter la microdissection, il est indispensable d'enlever une partie du cytoplasme habituellement présent autour des chromosomes sur les métaphases à l'aide de la trypsine : une solution contenant 0,05g de trypsine et 50mL de PBS stérile est préparée. La lamelle est trempée 30 secondes dans cette solution puis rincée dans du PBS stérile.

Les lamelles sont ensuite colorées avec du colorant Giemsa. La solution de coloration contient 3mL de colorant Giemsa et 40mL d'eau stérile. La lamelle est immergée 4min dans cette solution puis rincée dans de l'eau stérile. Elle est ensuite mise à sécher avant de microdisséquer.

#### 2.1.3.2. Matériel pour microdissection

Pour la microdissection, des microtubes Safelock Eppendorff 0,2mL sont préparés avec chacun 2,5µL de PBS stérile à l'intérieur. Ces microtubes recevront les chromosomes microdisséqués.

Un microscope inversé CARL ZEISS Axiovert 25 équipé d'un bras de micromanipulation sur lequel on installe une aiguille à microdissection est utilisé pour microdisséquer. Les aiguilles à microdissection sont façonnées à l'aide d'un NARISHIGE PC-10 Puller à partir de tiges en verre adaptées.

### 2.1.3.3. Procédure de microdissection

La mise au point optique est faite sur une cellule en métaphase. Une goutte d'eau stérile est apposée sur la lamelle en regard de la zone d'intérêt. Les chromosomes X ou Y sont repérés puis grattés avec l'aiguille afin de les détacher (**Figure 6**). Les chromosomes collent alors à l'extrémité de l'aiguille.

Celle-ci est retirée du microscope et introduite dans un microtube. Le bout de l'aiguille est cassé sur le côté du microtube afin que le chromosome se retrouve dedans.

Par expérience, il faut introduire au minimum 10 copies du chromosome X dans un microtube et au minimum 15 copies du chromosome Y dans un autre microtube.

### 2.1.4. Première amplification par PCR

La première amplification a été réalisée à l'aide du kit commercial PicoPLEX WGA kit de Rubicon Genomics<sup>inc</sup> distribué par New England Biolabs<sup>inc</sup>, référence E26205. Le protocole décrit ci-dessous est largement inspiré de celui donné dans le kit.

Les microtubes Safelock Eppendorf 0,2mL contiennent à cette étape 2,5µL de PBS et les chromosomes issus de la microdissection : microtubes avec minimum 10 copies du chromosome X et les microtubes avec minimum 15 copies du chromosome Y.

La méthode décrite ci-dessous équivaut pour 5 microtubes.

Dans chaque microtube, une goutte d'huile minérale est rajoutée pour limiter l'évaporation. Les microtubes sont rapidement centrifugés afin de bien définir les deux phases. Puis 2,5µL de « Cell Extraction Buffer » sont ajoutés par tube (volume total = 15µL).

#### 2.1.4.1. Pré-amplification

L'« Extraction Cocktail » (pour 5 tubes) est préparé avec 24µL « d'Extraction Enzyme Dilution Buffer » et 1µL de « Cell Extraction Enzyme ». Dans chaque microtube, 5µL d'extraction cocktail sont introduits (Volume total = 10µL).

Les microtubes sont mis à incuber dans le thermal cycler (2720 Thermal Cycler applied Biosystems by Life Technologies<sup>inc</sup>) selon les cycles décrits dans le tableau ci-dessous (Tableau 2).

**Tableau 2** : Cycles d'incubation au thermal cycler avec "extraction cocktail" :

Cycles	Température	Temps
1	75°C	10 minutes
	95°C	4 minutes
	12°C	Hold



Le « Pré-Amp Cocktail » (pour 5 tubes) est préparé avec 24 $\mu$ L de « Pre-Amp Reaction Mix » et 1 $\mu$ L de « Pre-Amp Enzyme ». Dans chaque tube, 5 $\mu$ L de « Pré-Amp Cocktail » sont ajoutés (Volume total = 15 $\mu$ L).

Les microtubes sont mis à incuber dans le thermal cyler suivant les cycles décrits dans le tableau ci-dessous (Tableau 3):

**Tableau 3** : Cycles d'incubation au thermal cyler avec "pré-amp cocktail" :

Cycles	Température	Temps
1	95°C	2 minutes
12	95°C	15 secondes
	15°C	50 secondes
	25°C	40 secondes
	35°C	30 secondes
	65°C	40 secondes
	75°C	40 secondes
1	4°C	Hold

Les tubes sont rapidement centrifugés avant de passer à l'étape suivante.

#### 2.1.4.2. Amplification

« L'Amplification Cocktail » (pour 5 tubes) est préparé avec 125 $\mu$ L « d'Amplification Reaction Mix », 4 $\mu$ L « d'Amplification Enzyme » et 171 $\mu$ L de « Nuclease Free Water ». Dans chaque microtube, 60 $\mu$ L d'Amplification Cocktail sont ajoutés (Volume total=75 $\mu$ L).

Les microtubes sont mis à incuber dans le thermal cyler suivant les cycles décrits dans le tableau ci-dessous (Tableau 4):

**Tableau 4** : Cycles d'incubation dans le thermal cyler avec "amplification cocktail" :

Cycles	Température	Temps
1	95°C	2 minutes
14	95°C	15 secondes
	65°C	1 minute
	75°C	1 minute

Les microtubes sont directement placés à -20°C.

*Afin d'obtenir plus de matériel et par conséquent plus de sondes, il est possible de réamplifier en prenant 8µL de solution d'ADN déjà amplifié et de suivre les étapes du kit PicoPlex® à partir de l'ajout du « Pré-amp cocktail ».*

## 2.1.5. Réalisation des sondes

### 2.1.5.1. Marquage ADN (kit BioPrime®)

Le marquage ADN est réalisé à l'aide du kit BioPrime® DNA Labelling System de Invitrogen™ by life technologies™ (Référence 18094-011).

Normalement la concentration d'ADN à marquer doit être d'environ 50ng/µL (1µg si non purifié) selon le protocole décrit dans le kit. Comme l'ADN présent dans les tubes n'est pas dosé, la quantité de solution d'ADN utilisée est plus grande que celle recommandée : 8µL à la place des 1µL recommandés.

Un tube contenant 8µL d'ADN issu de l'amplification, 20µL de Primers 2,5X et 12,5µL d'eau stérile est préparé.

Le tube est placé 5 min au bain marie à 100°C (mettre un bouchon anti-pression) afin de dénaturer l'ADN. Puis il est mis dans la glace au minimum 3 minutes afin de stopper la réaction.

Il est brièvement mis à centrifuger. Puis 5µL de dNTP 10X (contenant les bases AGC et un peu de T – hors kit) sont ajoutés, ainsi que 3,5µL d'UTP marqué (hors kit) qui est soit de la biotine pour le chromosome X, soit de la digoxigénine pour le chromosome Y et enfin 1µL d'enzyme Klenow qui va permettre d'introduire les bases marquées au sein de l'ADN.

Le contenu du tube est mélangé par retournement puis placé 7h (minimum 1h30) au bain-marie à 37°C avant d'ajouter 5µL de « Stop buffer » par tube. Le volume total est alors de 55µL/tube.

### 2.1.5.2. Précipitation des sondes

Les tubes sont centrifugés et préparés ensuite en fonction du tableau ci-dessous (Tableau 5) :

**Tableau 5** : Composants à ajouter pour la précipitation des sondes :

	Concentration (µg/µL)	Quantité (µg)	Volume final (µL) pour 1 tube	Volume final (µL) pour 2 tubes	Volume final (µL) pour 3 tubes
ADN			55	110	165
ADN Saumon	10	150	15	15	15
ADN Compétiteur	1	15	15	30	45
NaCl			3,54	5,82	8,11
Ethanol 100%			1000	1000	1000

L'ADN Compétiteur est de l'ADN contenant des séquences répétées (non spécifiques des chromosomes X et Y) qui s'hybride sur les séquences répétées de la sonde la rendant plus spécifique.

Le tube est mélangé par retournement (pas de vortex) et placé à -20°C une nuit (ou 3h à -80°C).

#### 2.1.5.3. Préparation des sondes

Le tube est centrifugé à 13000 t/min pendant 30 min à 4°C.

Le surnageant est éliminé par retournement du tube puis 1mL d'éthanol à 70% froid (-20°C) est ajouté. Le culot est décollé à l'aide du vortex. Ensuite le tube est mis à centrifugé à 13000 t/min pendant 10min à 4°C. Ces étapes sont répétées encore une fois.

Le surnageant est retiré par retournement. Pour enlever le maximum de gouttes d'éthanol, une pipette micrométrique p100 est utilisée. Les tubes sont placés sous cloche à vide pendant 8min pour les sécher.

La solution d'hybridation (solution 50% formaldéhyde à 37°C) est ajoutée (15µL). Les tubes sont mis au bain-marie à 37°C. Au bout de quelques minutes, la sonde est remise en suspension. Le tube est laissé au bain marie minimum 4h en mélangeant toutes les heures au vortex. Le tube est conservé à -20°C si la sonde n'est pas utilisée directement.

#### 2.1.6. Protocole d'hybridation *in-situ* adapté aux lames cytologiques

##### 2.1.6.1. Préparation des lames cytologiques

###### Cellules en métaphase :

Les lames cytologiques avec cellules en métaphase nécessitent la mise en culture de cellules sanguines. Elles sont préparées et étalées de la même manière que pour les lamelles servant à la microdissection (en utilisant des lames au lieu de lamelles) (paragraphe 2.1.2.2 page 31).

###### Cellules en interphase :

Pour utiliser les sondes sur des cellules avec chromosomes condensés, il n'est pas utile de faire de culture de sang. Cette méthode a été utilisée pour les lames de mélange de cellules mâle et femelle.

Le sang est prélevé sur tube hépariné. Le sang total est transféré dans un tube Falcon® 50mL, 20mL de choc hypotonique 1/6<sup>ème</sup> (qui aura préalablement été décongelé dans un bain marie à 37°C) est ajouté. Le tube est placé 20min à l'étuve à 37°C. Puis 4-5 gouttes de fixateur sont ajoutées avant de centrifuger le tube 10min à 1800t/min. Le surnageant est ensuite retiré par aspiration. Le culot est remis en suspension dans 20mL de fixateur à l'aide du vortex, puis centrifugé 10min à 1800t/min. Le surnageant est retiré par aspiration.

Le culot contenant les cellules est ensuite étalé sur des lames de la même manière que pour les lamelles servant à la microdissection (en utilisant des lames au lieu de lamelles) (paragraphe 2.1.2.2 page 31).

### 2.1.6.2. Hybridation

#### 2.1.6.2.1. Hybridation avec l'Hybridizer® DAKO

La sonde (15µL) est déposée sur la lame cytologique, une lamelle est alors apposée dessus. Il faut compter un volume de sonde de 15µL total, donc si pour tester les deux sondes (des chromosomes X et Y) sur la même lame, il suffit d'utiliser 7,5µL de chaque sonde. Les bords de la lamelle sont scellés avec du rubber cement.

Les lames sont alors mises dans l'Hybridizer® DAKO avec un programme de 8 minutes à 75°C puis 24h à 37°C.

#### 2.1.6.2.2. Hybridation avec pré-étapes de dénaturation

Un autre type d'hybridation a également été testé. Au lieu de chauffer en même temps la lame et la sonde afin qu'elles se dénaturent puis s'hybrident entre elles, la dénaturation de ces dernières est réalisée séparément avant de les assembler.

La dénaturation des lames commence par un bain dans une solution composée de SSC 2X et de formamide 70% (un agent dénaturant qui permet d'abaisser la température de dénaturation en dessous des 100°C habituels) pendant 2 min à 72°C. Les lames sont ensuite déshydratées en les plaçant dans trois bains d'éthanol froid (-20°C) successifs à 70%, 90% puis 100% pendant 2 minutes chacun. Les lames sont séchées au sèche-cheveux avec de l'air froid.

La sonde est remise en suspension avec une pipette micrométrique p20. Les tubes sont alors mis dans un bain marie à 100°C pendant 10 min afin de dénaturer les sondes. Ils sont ensuite placés 5 min dans la glace (pour stopper la réaction) puis rapidement centrifugés avant d'être déposés sur la lame cytologique.

La sonde (15µL) est déposée sur la lame, et une lamelle est scellée dessus. Le tout est alors placé dans une cassette avec un fond d'eau (boîte humide) et à l'étuve à 37°C pendant une nuit.

#### 2.1.6.3. Lavages stringents

Trois lavages successifs sont réalisés : un premier lavage dans une solution saline sodium citrate 2 fois concentrée (SSC 2X) qui permet de stabiliser la sonde (solution chargée positivement), un deuxième lavage dans du SSC 0,4X 4min à 72°C qui permet d'enlever l'excès de sonde et enfin un troisième lavage dans du PBT = PBS + BSA. Le Tween est un agent détergent et le BSA permet de saturer les sites pour que les anticorps ne s'accrochent pas n'importe où.

#### 2.1.6.4. Préparation des anticorps et révélation

Préparer dans deux tubes :

- Pour la sonde du chromosome Y : 100µL de PBT + 1µL d'Anticorps anti-Digoxigénine marqué à la fluorescéine FITC (signal fluorescent vert)
- Pour la sonde du chromosome X : 100µL de PBT + 1µL de streptavidine couplée à une molécule fluorescence Alexa 594 (signal fluorescent rouge).

Pour tester les deux sondes sur la même lame, il suffit de préparer les anticorps dans le même tube : 100µL de PBT + 1µL d'anticorps anti-DIG + 1µL de streptavidine.

Environ 100µL de solution d'anticorps sont déposés par lame. Une grande lamelle est déposée dessus. Le tout est placé dans une boîte humide pendant 1h.

La lamelle est retirée, puis trois lavages successifs de 5 minutes chacun dans une solution de PBS + Tween sont réalisés.

Une goutte de Vectashield® (qui permet de maintenir la fluorescence) avec DAPI (un intercalant d'ADN) qui donne la fluorescence bleue aux chromosomes) est déposée sur la lame ainsi qu'une lamelle dessus.

La visualisation des lames se fait sur un microscope à fluorescence à épifluorescence ImagerZ2 couplé à un système d'analyse d'image Cytovision de Leica.

### 2.1.7. Protocole d'hybridation *in-situ* adapté aux coupes histologiques

Pour ce protocole, le kit « Histology FISH Accessory Kit » de DAKO (REF. K4799) a été utilisé. Le protocole présenté est détaillé dans le guide d'utilisation du kit DAKO avec quelques modifications apportées suite à de précédentes études réalisées avec ce kit (Noiret 2016).

#### 2.1.7.1. Préparation des lames

##### 2.1.7.1.1. Réalisation des lames

Les tissus à étudier sont fixés au formol à 10% tamponné et inclus en blocs de paraffine.

Les blocs tissulaires sont coupés à 4µm d'épaisseur au microtome et sont recueillis sur des lames depuis un bain-marie puis séchées à l'air libre. Les coupes sont ensuite placées à l'étuve à 40°C.

##### 2.1.7.1.2. Déparaffinage et réhydratation

Les lames sont plongées dans du toluène pendant 5 minutes. Cette étape est réalisée 3 fois consécutives afin d'enlever la couche de paraffine qui conserve les tissus.

Les coupes sont ensuite réhydratées en les plongeant dans des bains :

- Alcool à 96% : 2 fois 2 minutes, en renouvelant le bain
- Alcool à 70% : 2 fois 2 minutes, en renouvelant le bain
- SSC 2X pendant 2 minutes
- 

##### 2.1.7.1.3. Etapes de prétraitement

Les lames sont plongées dans la solution de prétraitement du kit DAKO diluée 1X à 95°C au bain-marie pendant 10 minutes (couvercle fermé). Elles sont ensuite laissées à refroidir dans la même solution à température ambiante pendant 15 minutes (couvercle retiré) puis transférées dans du SSC 2X deux fois pendant 3 minutes, en renouvelant le bain.

Les lames sont ensuite disposées sur l'Hybridizer DAKO à 37°C. Quelques gouttes de pepsine froide (4°C) du kit DAKO sont déposées sur les échantillons pendant un temps variable (à définir selon le tissu utilisé : entre 2 et 15 minutes selon les recommandations du kit commercial) à 37°C puis éliminées par rinçage dans du SSC 2X deux fois pendant 3 minutes.

### 2.1.7.2. Hybridation

#### 2.1.7.2.1. Avec pré-étapes de dénaturation

Les lames et la sonde sont dénaturées séparément :

- Les lames : elles sont déshydratées dans des bains d'alcool à 70%, 90% puis 100% à hauteur de 2 minutes dans chaque bain à température ambiante. Elles sont ensuite plongées dans une solution de SSC 2X, 70% formamide pendant 2 minutes à 72°C au bain-marie. Tout de suite après, elles sont de nouveau déshydratées dans des bains d'alcool froid (-20°C) à 70%, 90% puis 100% à hauteur de 2 minutes dans chaque bain. Les lames sont ensuite laissées à sécher.
- La sonde : elle est dénaturée dans au bain-marie à 100°C pendant 10 minutes, puis plongées dans la glace pendant minimum 3 minutes.

La sonde est appliquée immédiatement après, à hauteur de 15µL par lame, des lamelles sont apposées et scellées avec du rubber cement.

Les lames contenant les sondes sont mises à l'étuve à 37°C dans une boîte humide durant une nuit.

#### 2.1.7.2.2. Avec l'Hybridizer DAKO

Les coupes de tissu sont déshydratées dans une série de bains d'alcool à des concentrations de plus en plus élevées : 70%, 90% puis 100% à hauteur de 2 minutes dans chaque bain. Les coupes sont laissées sécher complètement à l'air libre.

La sonde est appliquée (15µL/lame) sur les lames contenant les coupes de tissu déshydratées. Une lamelle est apposée sur chaque lame et scellée à l'aide de rubber cement.

Les lames sont placées dans l'Hybridizer DAKO. La dénaturation va se faire à 75°C pendant 8 minutes et l'hybridation à 37°C sur la nuit (14 à 20h)

### 2.1.7.3. Lavages

Les lamelles sont retirées des lames. Les lames sont plongées dans une solution de SSC 2X à température ambiante. Une solution de SSC 0,4X est portée à 72°C au bain-marie. Une fois la température atteinte, les lames sont plongées dans cette solution pendant 2 minutes puis réceptionnées dans une solution de PBT à température ambiante.

#### 2.1.7.4. Préparation des anticorps et révélation

Préparer dans deux tubes :

- Pour la sonde du chromosome Y : 100µL de PBT + 1µL d'Anticorps anti-Digoxigénine marqué à la fluorescéine FITC qui sera révélé en vert
- Pour la sonde du chromosome X : 100µL de PBT + 1µL de streptavidine couplée à une molécule fluorescence qui sera révélé en rouge.

Pour révéler les deux sondes sur la même lame il suffit de préparer les anticorps dans le même tube : 100µL de PBT + 1µL d'anticorps anti-DIG + 1µL de streptavidine.

Déposer environ 100µL par lame de solution contenant les anticorps. Mettre une grande lamelle dessus. Déposer ensuite la lame dans une boîte humide pendant 1h.

Retirer la lamelle. Procéder à trois lavages successifs de 5 minutes chacun dans une solution de PBS +Tween qui est un agent détergent.

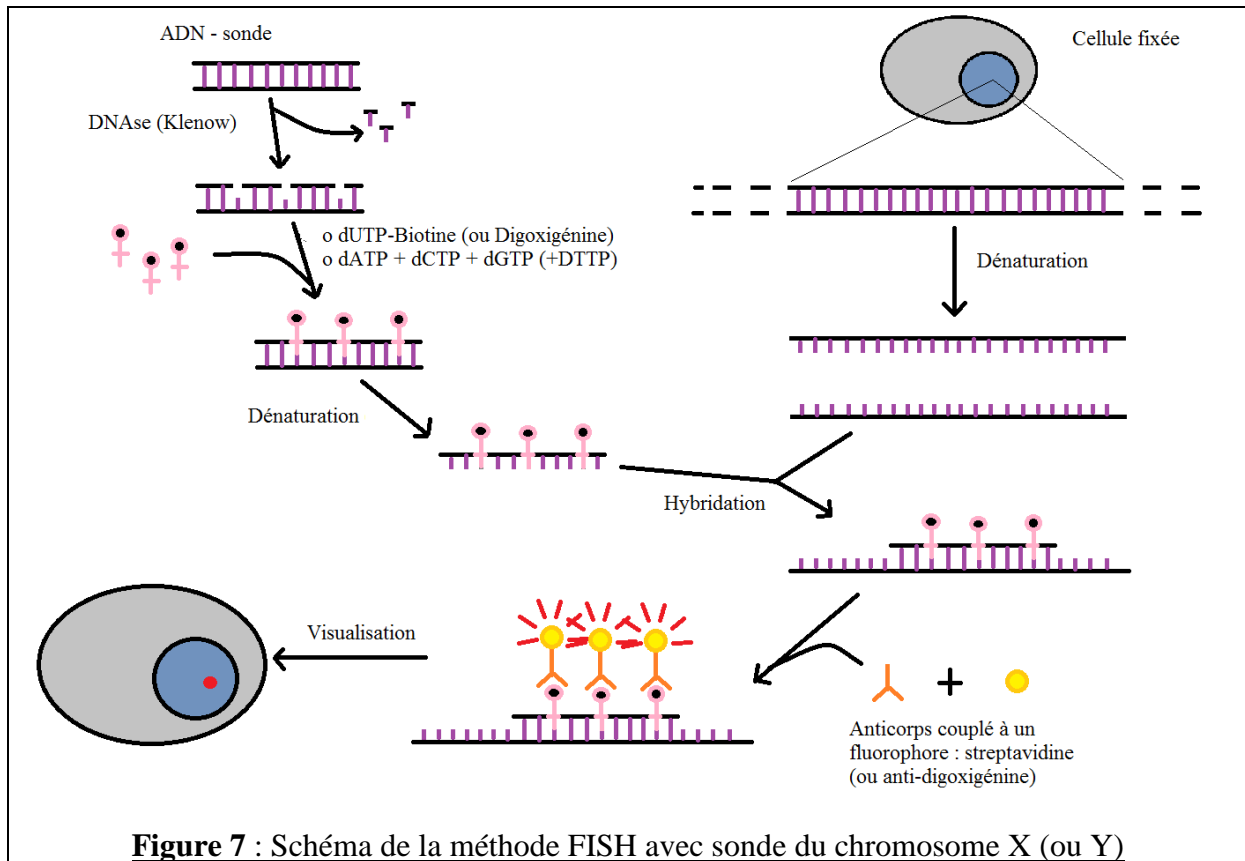
Retirer les lames et ajouter une goutte de Vectashield ® (qui permet de maintenir la fluorescence) avec DAPI (un intercalant d'ADN) qui donne la fluorescence bleue aux chromosomes). Apposer une lamelle.

La visualisation des lames se fait sur un microscope à fluorescence à épifluorescence ImagerZ2 couplé à un système d'analyse d'image Cytovision de Leica.

## 2.2. RESULTATS

### 2.2.1. Réalisation des sondes

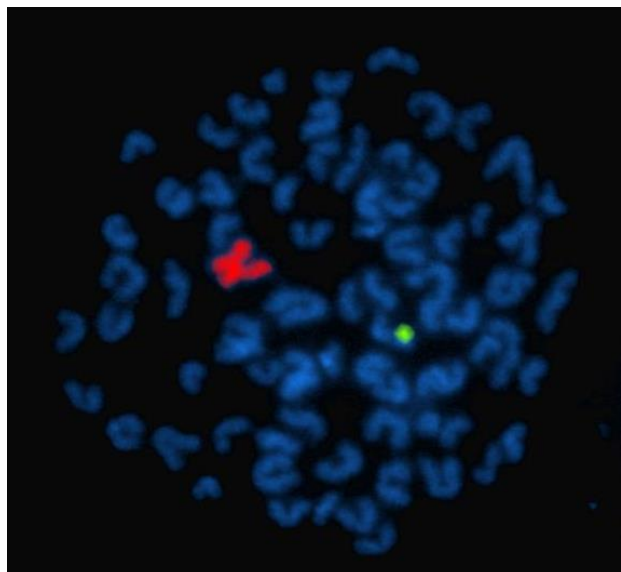
Les sondes ont été créées à partir de la microdissection des chromosomes X et Y de chien. Afin de valider le fonctionnement des sondes, elles ont été hybridées sur une lame cytologique contenant des cellules en métaphases par la méthode FISH (principe rappelé sur le schéma en [Figure 7](#)). Cette méthode permet de visualiser les chromosomes et de vérifier que les sondes des chromosomes X et Y s'hybrident de façon spécifique sur ces chromosomes ([Figure 8](#)).



### **Figure 8 : Métaphase de chien mâle après hybridation des sondes du chromosome X et Y (x1000)**

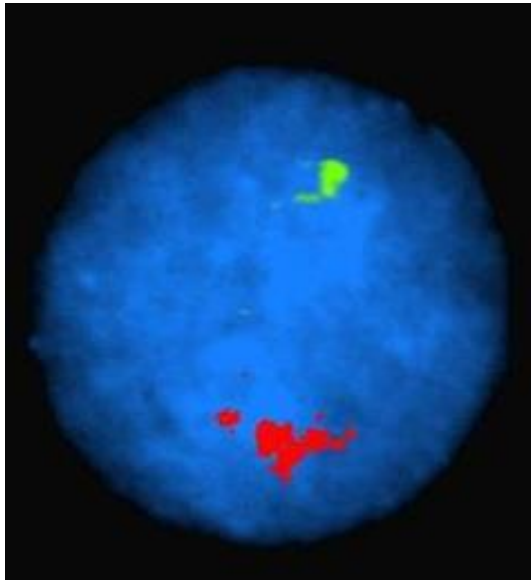
Chromosome X marqué avec la sonde du chromosome X contenant de la biotine révélée par l'Alexa594 (rouge)

Chromosome Y marqué avec la sonde du chromosome Y contenant de la digoxigénine révélée par le FITC (vert)





L'avantage des lames cytologiques utilisées, est qu'en plus des cellules en métaphases, il y avait également des cellules en interphase avec un noyau bien condensé ou à des phases de division cellulaire avec un noyau moins décondensé. Il a également pu être mis en évidence l'efficacité des sondes sur des noyaux avec des chromosomes condensés et pas seulement sur des chromosomes individualisés (**Figure 9**).



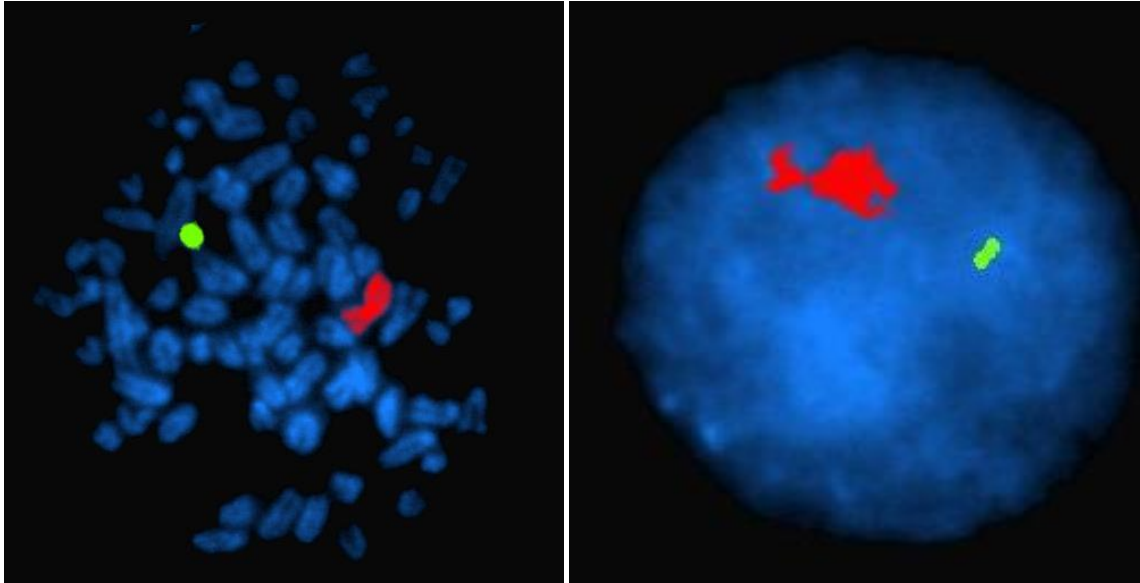
**Figure 9 : Noyau de cellule de chien mâle après hybridation des sondes des chromosomes X et Y (x1000)**

Chromosome X marqué avec la sonde du chromosome X contenant de la biotine révélée par l'Alexa594 (rouge)

Chromosome Y marqué avec la sonde du chromosome Y contenant de la digoxigénine révélée par le FITC (vert)

En visualisation directe au microscope, extrêmement peu de bruit de fond est observé, traduisant de la bonne qualité des sondes créées.

Afin de maximiser la détection du marquage des sondes, le signal a été amplifié avec des anticorps dirigés contre la streptavidine (fluorescence en rouge) et contre l'anticorps anti-digoxigénine (fluorescence en vert). Les résultats obtenus en cytologie sont sensiblement les mêmes avec un signal toutefois plus fort (en visualisation directe) mais aussi l'ajout d'un peu de bruit de fond (**Figure 10**).



**Figure 10 : Images de FISH du marquage des chromosomes sexuels avec les sondes des chromosomes X et Y - signal amplifié (x1000)**

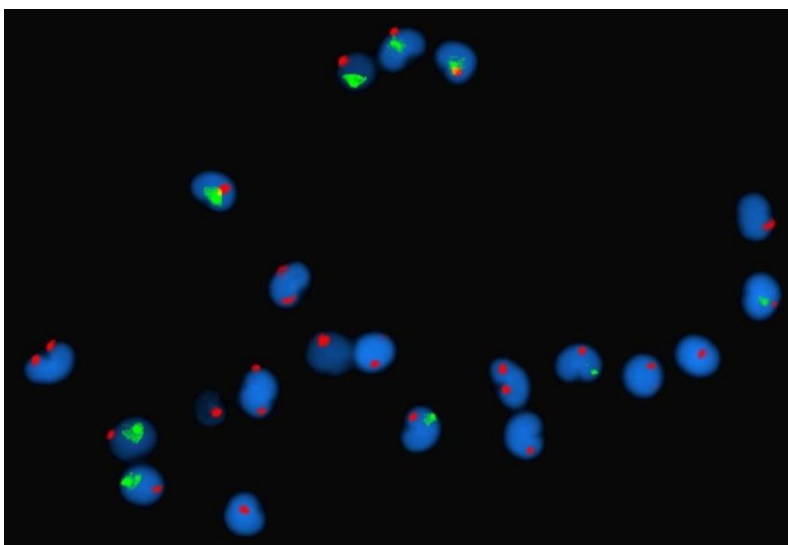
Chromosome X marqué avec la sonde du chromosome X contenant de la biotine révélée avec de la streptavidine- Alexa594 et un anticorps anti-streptavidine couplé au Texas Red (rouge).

Chromosome Y marqué avec la sonde du chromosome Y contenant de la digoxigénine révélée avec un anticorps anti-digoxigénine-FITC (produite chez la souris) et un anticorps anti-souris couplé au FITC (vert).

Métaphase (à gauche) et cellule interphasique (à droite).

### 2.2.2. Test des sondes sur mélanges de cellules mâles et femelles

Afin de montrer que nos sondes arrivent à discriminer des cellules mâles de cellules femelles, elles ont été testées sur lames cytologiques contenant un mélange de cellules sanguines mâles et femelles (**Figure 11**).

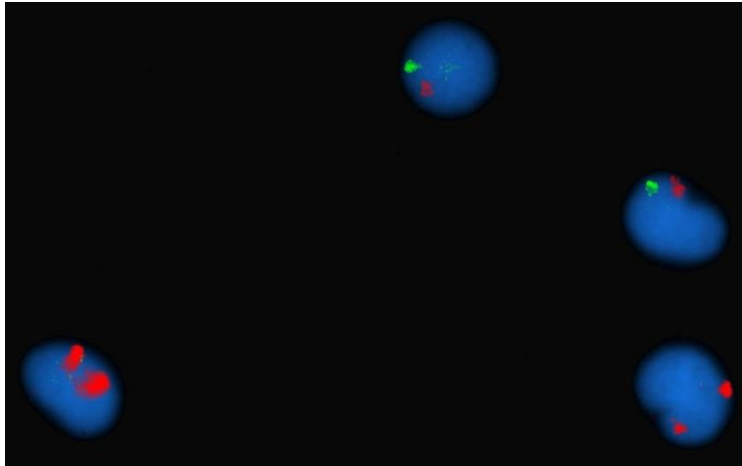


**Figure 11 : Images de FISH sur mélange de cellules sanguines canines avec sondes des chromosomes X et Y (x400)**

Les cellules femelles (XX) présentent deux signaux rouges). Les cellules mâles (XY) présentent un signal rouge (sonde du chromosome X) et un signal vert (sonde du chromosome Y).

En visualisation directe, les cellules qui semblent présenter un seul signal rouge, en présentent souvent deux : parfois superposés, parfois un signal est plus faible que ceux autour et la capture photo qui ne le prend donc pas en compte.

Il a donc été décidé d'amplifier les signaux avec des anticorps dirigés contre la streptavidine (rouge) et contre les anticorps anti-digoxigénine (vert) afin de limiter ces effets observés sans amplification (**Figure 12**).



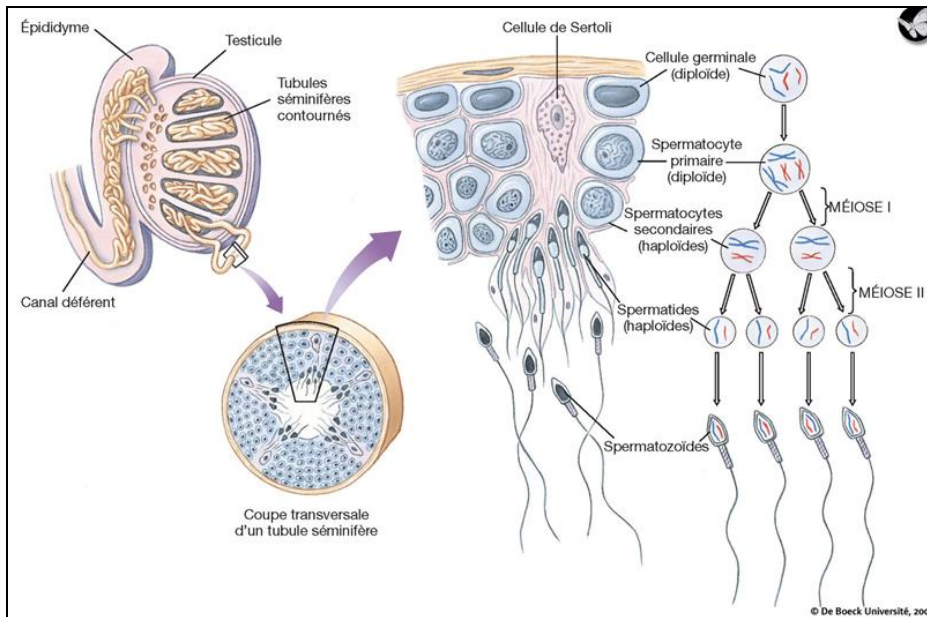
**Figure 12 : Images de FISH sur mélanges de cellules canines mâle et femelle avec sondes des chromosomes X et Y et après amplification du signal (x1000)**

Les cellules femelles (XX) présentent deux signaux rouges Les cellules mâles (XY) présentent un signal rouge et un signal vert

La détection des différentes cellules apparait bien meilleure, le signal est plus fort en visualisation directe. Le bruit de fond est toutefois un peu plus présent sans pour autant gêner l'interprétation.

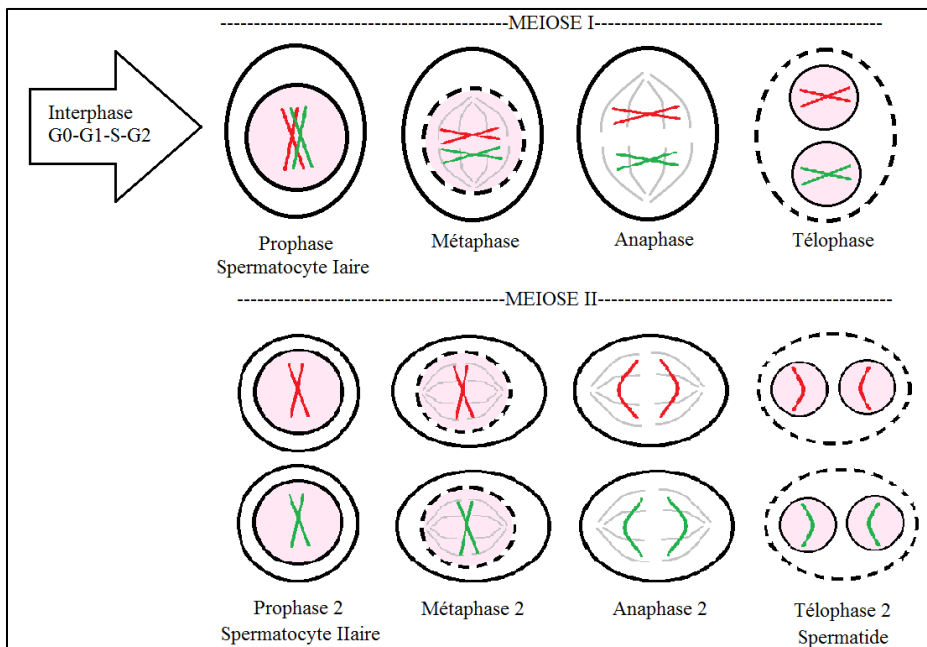
### 2.2.3. Test des sondes sur coupes histologiques

Le tissu testiculaire a été choisi car il contient plusieurs types de cellules à des stades de division différents grâce à des méioses réalisées en permanence (rappel des étapes de la méiose : **Figure 14**). Il y a donc des cellules avec des noyaux où les chromosomes sont plus ou moins condensés, certaines sont diploïdes, d'autres haploïdes (**Figure 13**). En théorie avec les sondes créées il est possible de distinguer les spermatocytes primaires diploïdes (signaux rouge et vert) des spermatocytes secondaires, spermatides ou spermatozoïdes qui sont haploïdes (signal rouge OU signal vert seul).



**Figure 13 :**  
**Schéma des**  
**différentes**  
**cellules visibles**  
**en coupe**  
**histologique**  
**transversale de**  
**testicule**

D'après de Boeck  
 University, 2007



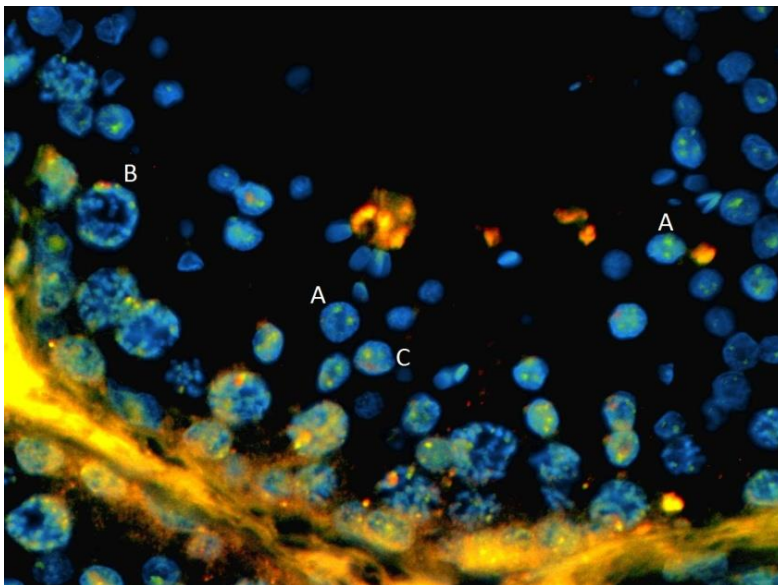
**Figure 14 :**  
**Schéma des**  
**étapes de la**  
**méiose**

Pour que les sondes puissent pénétrer dans les noyaux des cellules, il faut que le tissu soit digéré au préalable, c'est le rôle de la pepsine dans notre protocole. Cependant, ce temps de digestion par la pepsine est à définir pour chaque tissu.

➤ Temps de pepsine de 2 minutes à 37°C

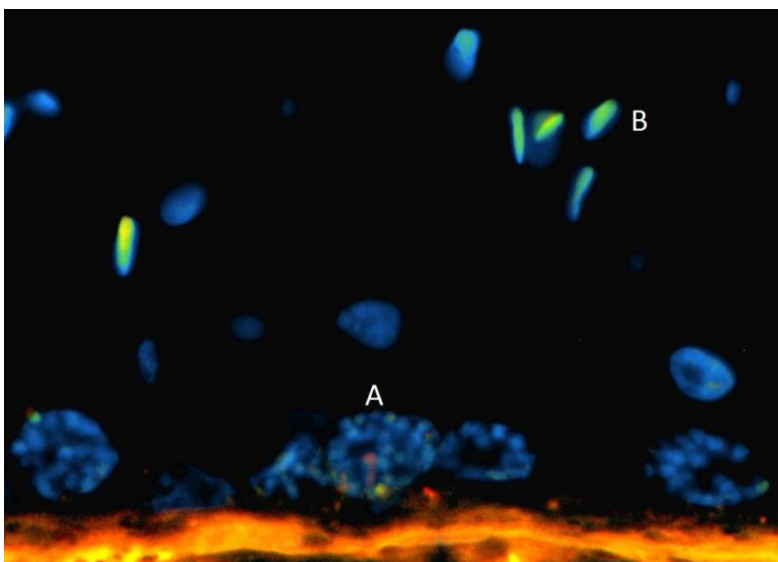
Comme le montrent les photos ci-dessous (**Figure 15**, **Figure 16**, **Figure 17**), les sondes du chromosome X et du chromosome Y de chien créées, ont la possibilité de marquer les chromosomes sexuels dans une coupe de tissu testiculaire fixées au formol et incluses en paraffine.

Cependant, après 2 minutes de pepsine, le tissu ne semble pas assez digéré car il y a encore beaucoup d'auto-fluorescence tissulaire et de bruit de fond. De plus en visualisation directe au microscope, peu de zones sont marquées par les sondes et toutes les cellules dans une zone d'intérêt ne sont pas marquées par les sondes.



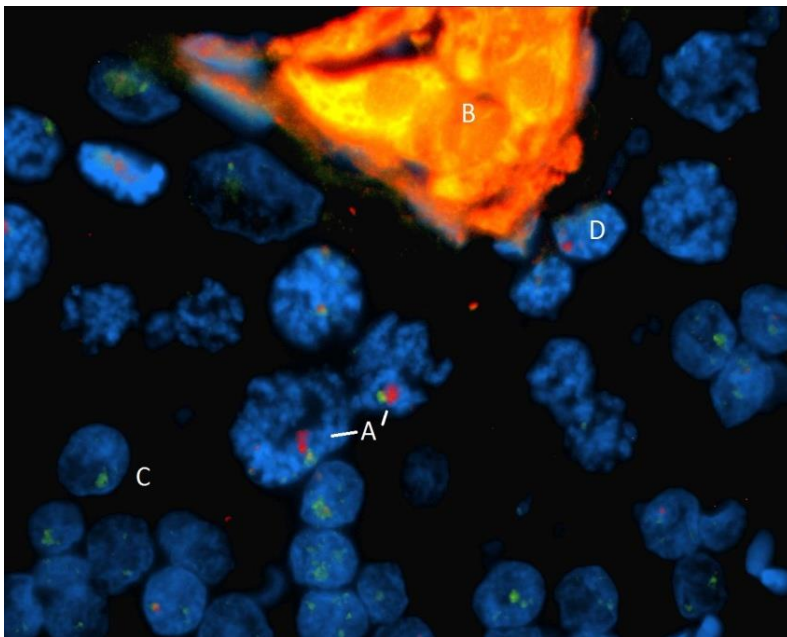
**Figure 15 : Sondes hybridées sur coupe histologique de testicule de chien après 2 min de pepsine (x400)**

A : 2 signaux verts (chromosome Y) : possible cellule en anaphase II. B : signal rouge (X) et signal vert (Y) avec chromosomes décondensés : possible cellule en début de méiose I. C : signal rouge (X) et signal vert (Y) distinct dans une petite cellule à noyau décondensé : possible cellule en fin de méiose I.



**Figure 16 : Sondes hybridées sur coupe histologique testiculaire de chien après 2 min de pepsine (x1000)**

A : 1 signal rouge (X) et un signal vert (Y) bien distincts avec chromosomes décondensés : possible cellule en anaphase I. B : 1 signal vert (Y) avec chromosomes très condensés : possible cellule en fin de métaphase II (spermatide)

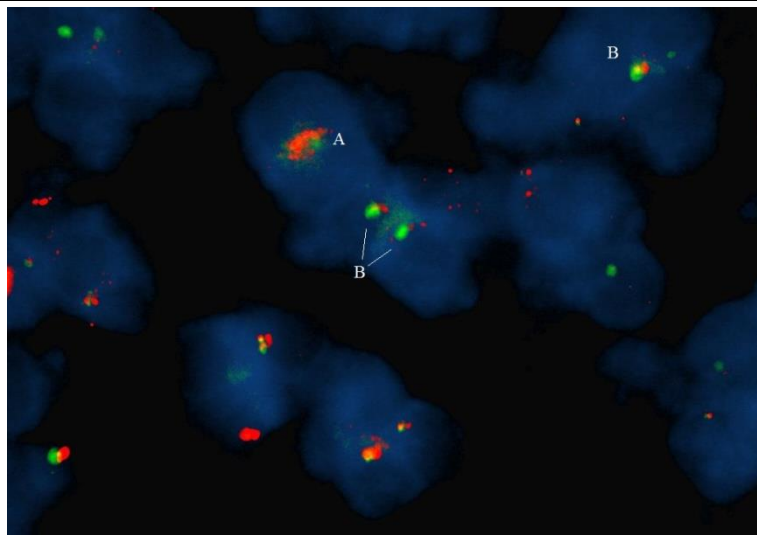


**Figure 17 : Sondes hybridées sur coupe histologique de testicule de chien après 2 min de pepsine et amplification des signaux (x1000)**

A : 1 signal rouge (X) et un signal vert (Y) bien distincts avec chromosomes décondensés : possible cellule en méiose I. B : auto fluorescence tissulaire et bruit de fond. C : 1 signal vert (Y) : possible cellule en méiose II. D : 1 signal rouge (X) : possible cellule en méiose II.

➤ Temps de pepsine de 4 minutes à 37°C

Les photos ci-dessous (**Figure 18**) montrent que les sondes du chromosome X et du chromosome Y de chien sont encore capables de s'hybrider aux chromosomes des cellules composant le tissu testiculaire après 4 minutes de traitement à la pepsine. En visualisation directe au microscope, les signaux sont plus forts, il y a un peu moins de bruit de fond même si ce dernier est encore très présent. Il semble également y avoir plus de plages marquées, ce qui conforte l'idée qu'il faut encore digérer un peu plus les tissus avant hybridation.

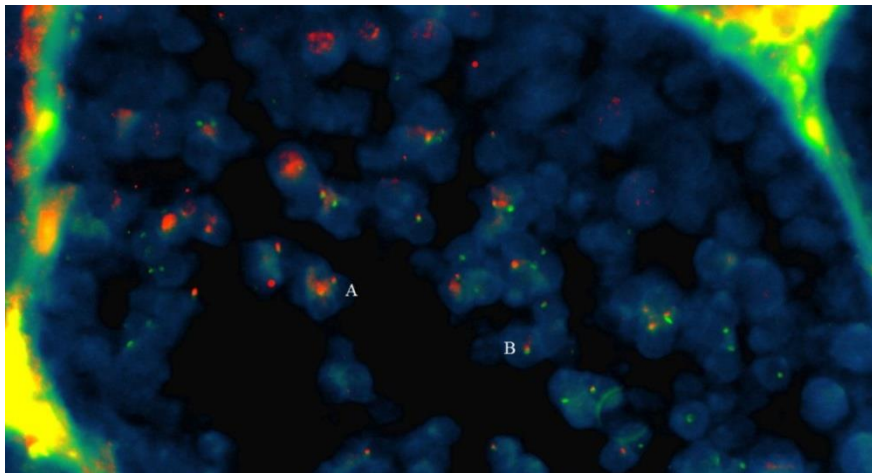


**Figure 18 : Sondes hybridées sur coupe testiculaire de chien après 4 min de pepsine**

A : signal rouge (X) et signal vert (Y) « flou », chromatine condensée : possible cellule en fin d'interphase ou début de prophase I

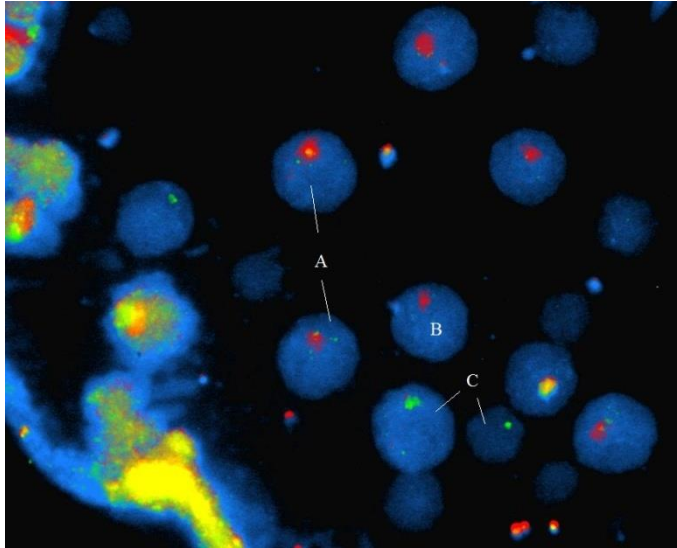
B : mêmes signaux mais bien distincts tout en restant « collés » : possible cellule en prophase I

(x1000 ci-contre et x400 ci-dessous)



➤ Temps de pepsine de 15 minutes à 37°C

Après 15 minutes de digestion à la pepsine, les sondes s'hybrident dans un plus grand nombre de noyaux (**Figure 19**). Les signaux sont bien plus forts en visualisation directe. Le bruit de fond est moins important, seule persiste l'auto-fluorescence des tissus. Certains noyaux où les chromosomes sont très condensés demeurent imperméables à l'hybridation des sondes.



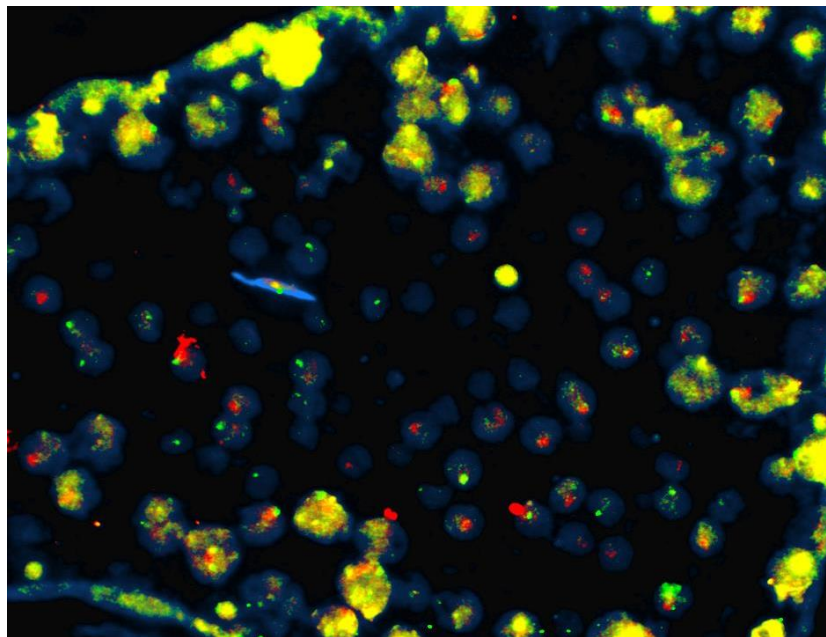
**Figure 19 : Sondes hybridées sur coupe histologique de testicule après 15 min de pepsine**

A : Signal vert (Y) et rouge (X) superposés : possible cellule en prophase I de méiose.

B : Signal rouge seul (X) : possible cellule en prophase II de méiose contenant le chromosome X.

C : Signal vert (Y) : possible cellule en prophase II de méiose contenant le chromosome Y.

(x1000 ci-contre – x400 ci-dessous)





## 2.3. DISCUSSION

La médecine régénérative acquiert de plus en plus d'importance dans le domaine médical de nos jours. Le nombre croissant d'études précliniques et cliniques révèle l'immense potentiel des cellules souches dans le domaine de la thérapie cellulaire. Elles sont nécessaires à l'obtention d'une autorisation de mise sur le marché pour un médicament destiné à l'Homme. En effet, les études précliniques sur modèles animaux sont indispensables à la compréhension de l'effet thérapeutique des cellules souches, de leurs interactions avec le reste de l'organisme, de leur biodistribution et de leur toxicité éventuelle à plus ou moins long terme. Le « tracking cellulaire » prend alors une place critique dans le domaine de la recherche sur les cellules souches.

Plusieurs méthodes de « tracking cellulaire » ont été développées ces dernières années. Certaines méthodes permettent une visualisation des cellules souches de manière non invasive au sein de l'organisme par notamment des méthodes d'imagerie. D'autres, plus sensibles et plus spécifiques permettent l'étude de ces cellules *ex-vivo*. Toutes ces méthodes présentent des avantages et des inconvénients. Elles ne sont pas à opposer mais sont plutôt complémentaires dans le type d'informations qu'elles apportent.

L'objectif de cette étude était notamment de créer une sonde dirigée contre le chromosome sexuel Y de chien. Cette sonde permettant *in-fine* de localiser une cellule souche mâle « XY » de chien transplantée chez une chienne (femelle « XX ») sur coupe histologique (*ex-vivo*). Les étapes pour en arriver là sont nombreuses. Nous avons essayé de déterminer les différentes étapes pour créer une sonde (ici chez le chien, mais pouvant s'appliquer à n'importe quelle espèce), ainsi que les étapes de traitement de coupes histologiques permettant un marquage adéquat des cellules souches.

### ➤ Création des sondes :

#### Type de culture cellulaire :

Lors de notre étude nous avons réalisé deux types de cultures cellulaires : à partir de tissu cutané et à partir de sang.

Nous avons commencé par la culture de fibroblastes à partir de tissu cutané. En effet la culture de fibroblaste est une des premières cultures cellulaire qui a été utilisée en recherche et les conditions de cultures sont bien connues. Ce type de culture permet de récupérer un grand nombre de cellules en division car elles accrochent moins au fond de la boîte de culture et se détachent alors plus facilement que les autres cellules.

La culture à partir de sang permet d'obtenir des métaphases à partir des cellules nucléées du sang (globules blancs). Ce type de culture est bien plus rapide : 72h au lieu de 3 semaines pour la culture de fibroblastes. Elle permet finalement de récupérer un nombre de cellules en métaphase suffisant pour la microdissection.

Dans l'objectif de réaliser des microdissections de chromosomes, les deux types de culture peuvent être utilisés. Cependant, la culture de sang a été préférée dans notre étude pour sa rapidité de réalisation par rapport à la culture de fibroblastes.

Il faut noter qu'au cours de la création des sondes, nous nous sommes heurtés à de nombreux échecs. Les premières tentatives de création de sonde ont été réalisées avec les fibroblastes mais n'ont pas donné de résultats. Cependant, nous avons très bien réussi à micro-disséquer les chromosomes à partir des cellules fibroblastiques. L'échec ne semble donc pas venir du type de culture cellulaire.

#### Microdissection et nombre de copies de chromosomes :

La microdissection des chromosomes est assez fastidieuse. Un paramètre à évaluer est le temps de digestion par la trypsine du cytoplasme des cellules. En effet si ce temps est trop court, les chromosomes seront difficilement détachables, au contraire s'il est trop long, les chromosomes seront facilement détachables mais seront eux aussi dégradés et donc moins bien reconnaissables. Il faut donc trouver un compromis entre facilité de microdissection et dégradation trop importante des chromosomes. Nous avons évalué ce temps à 30 secondes pour les lames cytologiques de leucocytes de chiens. Il est conseillé de faire plusieurs essais : sans trypsine, 15s de trypsine, 30s de trypsine, 45s de trypsine...

Nous avons pu remarquer, aux cours des nombreux essais pour créer les sondes, qu'il fallait plus de copies du chromosome Y pour que l'amplification par PCR fonctionne après. Globalement nous avons conclu qu'il fallait au minimum une dizaine de copies du chromosome X et une quinzaine de copies du chromosome Y pour respectivement réaliser les sondes du chromosome X et du chromosome Y de chien.

Cette différence de nombre de copie peut s'expliquer à plusieurs niveaux. Premièrement, la microdissection du chromosome Y est bien plus difficile que celle du chromosome X car c'est le plus petit chromosome du chien. Il est donc difficile de s'assurer que le chromosome Y s'accroche bien à l'aiguille de microdissection et qu'il n'est pas reparti dans l'eau présente sur la lamelle au moment du retrait de l'aiguille. Deuxièmement, le chromosome Y étant très petit, la quantité d'ADN est par conséquent plus faible. Ainsi augmenter le nombre de copies, permet d'augmenter la quantité d'ADN et de faciliter l'amplification par PCR qui va suivre.

#### Temps microdissection – amplification :

Le temps entre la microdissection des chromosomes et le début de l'amplification par PCR semble être un temps critique pour la réussite de la création des sondes.

Nous avons pendant longtemps microdisséqué sur plusieurs jours (entre 2 et 4 jours) puis amplifié par PCR après. A chaque fois, ça n'a donné aucun résultat. Le seul résultat positif a été obtenu en microdisséquant sur la matinée et en amplifiant l'après-midi de la même journée. Il paraît donc indispensable de microdisséquer et amplifier dans la même journée.

➤ **Prétraitement des lames histologiques :**

Temps de digestion par la pepsine :

Le temps de digestion des tissus par la pepsine est un temps indispensable à définir. C'est lui qui va déterminer l'accessibilité des sondes jusqu'à leur cible.

Nous avons testé trois temps différents 2 minutes, 4 minutes et 15 minutes pour des coupes histologiques de testicule.

Plus le temps de digestion est important, plus le nombre de noyaux marqués semble important et le bruit de fond réduit. Cependant, ce temps est à définir pour chaque tissu étudié, il n'existe pas de « standards ».

➤ **Technique d'hybridation :**

Nous avons utilisé deux techniques différentes d'hybridation. Une première technique avec des étapes préalables de dénaturation puis à l'étuve à 37°C. Une deuxième technique où tout se fait dans l'Hybridizer (DAKO®).

Pour les lames cytologiques, nous n'avons pas remarqué de différence entre les deux méthodes. Le seul avantage de l'hybridation avec l'Hybridizer DAKO ® est qu'elle se fait en moins d'étapes, et est donc plus facile.

Pour les lames histologiques, une étude avait noté une dégradation des tissus trop importante avec l'Hybridizer DAKO ® à cause des plaques chauffantes (Noiret 2016). Au cours de notre étude, cette dégradation potentielle des tissus n'a pas été retrouvée. L'Hybridizer DAKO® a alors été préféré pour l'hybridation sur coupe histologique pour les mêmes raisons que les coupes cytologiques (moins d'étapes).

➤ **Marquage des lames histologiques :**

Le marquage sur lame cytologique a donné des résultats satisfaisants en termes de sensibilité et spécificité.

Le marquage sur lame histologique a donné de bons résultats. Cependant, ce système n'est pas encore assez sensible et spécifique pour détecter une cellule souche au sein d'un tissu. En effet, le marquage est très bon sur certaines zones, mais certaines cellules ne sont pas marquées par les sondes. Nous avons réussi à améliorer l'hybridation en augmentant le temps de digestion par la pepsine, mais le système n'est toujours pas assez sensible et spécifique.

Pour aller plus loin, il serait intéressant d'essayer de :

- modifier le prétraitement des lames histologiques (ex : augmenter encore les temps de digestion par la pepsine)
- concentrer les sondes
- mettre plus de sonde sur une lame
- modifier les temps de dénaturation / hybridation

### 3. CONCLUSION

Dans ce travail expérimental réalisé sur le site de l'ENVT, en collaboration étroite avec la plateforme de cytogénétique (Dr. A Piton) et l'unité de recherche STROMALab (Dr. I. Raymond-Letron), nous avons réalisé des sondes dirigées contre les chromosomes sexuels X et Y du chien afin de pouvoir identifier des cellules nucléées issues de chiens mâle ou de chien femelle transplantées dans les tissus de congénères de sexe opposé.

Après avoir produit ces sondes à partir de matériel nucléaire de cellules canines (aimablement fournies par le Pr. M. Franc), nous avons démontré l'efficacité de nos sondes d'hybridation in situ, sur lames cytologiques mêlant des cellules issues des 2 sexes dans un premier temps puis sur lames histologiques fixées au formol et incluses en paraffine, représentant le matériel d'utilisation ciblée des sondes.

Comme exposé plus haut dans le corps de notre manuscrit, la validation de cette technique de marquage s'inscrit dans le développement de méthodes de « tracking » de matériel de thérapie cellulaire dans les tissus de destination. Ces outils sont d'importance critique pour l'étude du rôle, des mécanismes d'action et du devenir des cellules souches mésenchymateuses en médecine régénérative utilisant le modèle animal canin. Ils vont permettre de détecter le devenir des cellules souches mésenchymateuses thérapeutiques de chien donneur mâle injectées chez une chienne receveuse.

Ce travail démontre la volonté d'intégrer la médecine régénérative aux méthodes thérapeutiques vétérinaires modernes et constitue également une avancée dans la recherche sur les CSM en tant que thérapie cellulaire innovante en médecine humaine.

## BIBLIOGRAPHIE (logiciel ZOTERO)

ADONAI, Nora, NGUYEN, Khoi N., WALSH, Joseph, IYER, M., TOYOKUNI, Tatsushi, PHELPS, Michael E., MCCARTHY, Timothy, MCCARTHY, Deborah W. et GAMBHIR, Sanjiv Sam, 2002. Ex vivo cell labeling with  $^{64}\text{Cu}$ -pyruvaldehyde-bis(N4-methylthiosemicarbazone) for imaging cell trafficking in mice with positron-emission tomography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 5 mars 2002. Vol. 99, n° 5, pp. 3030-3035.

AHRENS, Eric T. et ZHONG, Jia, 2013. In vivo MRI cell tracking using perfluorocarbon probes and fluorine-19 detection. *NMR in Biomedicine*. juillet 2013. Vol. 26, n° 7, pp. 860-871.

ALLARD, Justine, LI, Ké, LOPEZ, Xavier Moles, BLANCHARD, Stéphane, BARBOT, Paul, RORIVE, Sandrine, DECAESTECKER, Christine, POCHET, Roland, BOHL, Delphine, LEPORE, Angelo C, SALMON, Isabelle et NICAISE, Charles, 2014. Immunohistochemical toolkit for tracking and quantifying xenotransplanted human stem cells. *Regenerative Medicine*. juillet 2014. Vol. 9, n° 4, pp. 437-452.

AURICH, H., SGODDA, M., KALTWASSER, P., VETTER, M., WEISE, A., LIEHR, T., BRULPORT, M., HENGSTLER, J. G., DOLLINGER, M. M., FLEIG, W. E. et CHRIST, B., 2009. Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from human adipose tissue in vitro promotes hepatic integration in vivo. *Gut*. avril 2009. Vol. 58, n° 4, pp. 570-581.

AUST, L., DEVLIN, B., FOSTER, S. J., HALVORSEN, Y. D. C., HICOK, K., DU LANEY, T., SEN, A., WILLINGMYRE, G. D. et GIMBLE, J. M., 2004. Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. *Cytotherapy*. 2004. Vol. 6, n° 1, pp. 7-14.

BAER, Patrick C, 2014. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: An update on their phenotype in vivo and in vitro. *World Journal of Stem Cells*. 2014. Vol. 6, n° 3, pp. 256.

BAILEY, Alexander M., LAWRENCE, Michael B., SHANG, Hulan, KATZ, Adam J. et PEIRCE, Shayn M., 2009. Agent-Based Model of Therapeutic Adipose-Derived Stromal Cell Trafficking during Ischemia Predicts Ability To Roll on P-Selectin. *PLoS Computational Biology*. 27 février 2009. Vol. 5, n° 2, pp. e1000294.

BAJEK, Anna, GURTOWSKA, Natalia, OLKOWSKA, Joanna, KAZMIERSKI, Lukasz, MAJ, Malgorzata et DREWA, Tomasz, 2016. Adipose-Derived Stem Cells as a Tool in Cell-Based Therapies. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 13 mai 2016.

BENGEL, Frank M., SCHACHINGER, Volker et DIMMELER, Stefanie, 2005. Cell-based therapies and imaging in cardiology. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. décembre 2005. Vol. 32 Suppl 2, pp. S404-416.

BIBLE, Ellen, DELL'ACQUA, Flavio, SOLANKY, Bhavana, BALDUCCI, Anthony, CRAPO, Peter, BADYLAK, Stephen F., AHRENS, Eric T. et MODO, Michel, 2012. Non-invasive imaging of transplanted human neural stem cells and ECM scaffold remodeling in the stroke-damaged rat brain by  $^{19}\text{F}$ - and diffusion-MRI. *Biomaterials*. avril 2012. Vol. 33, n° 10, pp. 2858-2871.

BOEHM-STURM, Philipp, MENGLER, Luam, WECKER, Stefan, HOEHN, Mathias et KALLUR, Thérèse, 2011. In Vivo Tracking of Human Neural Stem Cells with  $^{19}\text{F}$  Magnetic Resonance Imaging. *PLoS ONE*. 28 décembre 2011. Vol. 6, n° 12.

- BONIG, H., 2006. Hierarchy of molecular-pathway usage in bone marrow homing and its shift by cytokines. *Blood*. 1 janvier 2006. Vol. 107, n° 1, pp. 79-86.
- BOS, Clemens, DELMAS, Yahsou, DESMOULIÈRE, Alexis, SOLANILLA, Anne, HAUGER, Olivier, GROSSET, Christophe, DUBUS, Isabelle, IVANOVIC, Zoran, ROSENBAUM, Jean, CHARBORD, Pierre, COMBE, Christian, BULTE, Jeff W. M., MOONEN, Chrit T. W., RIPOCHE, Jean et GRENIER, Nicolas, 2004. In Vivo MR Imaging of Intravascularly Injected Magnetically Labeled Mesenchymal Stem Cells in Rat Kidney and Liver. *Radiology*. décembre 2004. Vol. 233, n° 3, pp. 781-789.
- BOURIN, Philippe, BUNNELL, Bruce A., CASTEILLA, Louis, DOMINICI, Massimo, KATZ, Adam J., MARCH, Keith L., REDL, Heinz, RUBIN, J. Peter, YOSHIMURA, Kotaro et GIMBLE, Jeffrey M., 2013. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy*. juin 2013. Vol. 15, n° 6, pp. 641-648.
- BUSCHMANN, Johanna, GAO, Shuping, HÄRTER, Luc, HEMMI, Sonja, WELTI, Manfred, WERNER, Clement M. L., CALCAGNI, Maurizio, CINELLI, Paolo et WANNER, Guido A., 2013. Yield and proliferation rate of adipose-derived stromal cells as a function of age, body mass index and harvest site—increasing the yield by use of adherent and supernatant fractions? *Cytotherapy*. septembre 2013. Vol. 15, n° 9, pp. 1098-1105.
- CAPLAN, Arnold I., 1991. Mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research*. 1991. Vol. 9, n° 5, pp. 641–650.
- CARR, H. M., SMYTH, J. V., ROONEY, O. B., DODD, P. D., SHARMA, H. et WALKER, M. G., 1995. Limitations of in-vitro labeling of endothelial cells with indium-111 oxine. *Cell Transplantation*. juin 1995. Vol. 4, n° 3, pp. 291-296.
- CASTEILLA, Louis, 2011. Adipose-derived stromal cells: Their identity and uses in clinical trials, an update. *World Journal of Stem Cells*. 2011. Vol. 3, n° 4, pp. 25.
- CEN, Panpan, CHEN, Jiajia, HU, Chenxia, FAN, Linxiao, WANG, Jie et LI, Lanjuan, 2016. Noninvasive in-vivo tracing and imaging of transplanted stem cells for liver regeneration. *Stem Cell Research & Therapy*. 23 septembre 2016. Vol. 7.
- CHEN, Ian Y., GREVE, Joan M., GHEYSENS, Olivier, WILLMANN, Jürgen K., RODRIGUEZ-PORCEL, Martin, CHU, Pauline, SHEIKH, Ahmad Y., FARANESH, Anthony Z., PAULMURUGAN, Ramasamy, YANG, Phillip C., WU, Joseph C. et GAMBHIR, Sanjiv S., 2009. Comparison of Optical Bioluminescence Reporter Gene and Superparamagnetic Iron Oxide MR Contrast Agent as Cell Markers for Noninvasive Imaging of Cardiac Cell Transplantation. *Molecular imaging and biology : MIB : the official publication of the Academy of Molecular Imaging*. 2009. Vol. 11, n° 3, pp. 178-187.
- CHOUDHERY, Mahmood Saba, BADOWSKI, Michael, MUISE, Angela et HARRIS, David T., 2013. Comparison of human mesenchymal stem cells derived from adipose and cord tissue. *Cytotherapy*. mars 2013. Vol. 15, n° 3, pp. 330-343.
- CONTAG, Christopher H, JENKINS, Darlene, CONTAG, Pamela R et NEGRIN, Robert S, 2000. Use of Reporter Genes for Optical Measurements of Neoplastic Disease In vivo. *Neoplasia (New York, N. Y.)*. janvier 2000. Vol. 2, n° 1-2, pp. 41-52.
- CONTAG, Christopher H., 2007. In vivo pathology: seeing with molecular specificity and cellular resolution in the living body. *Annual Review of Pathology*. 2007. Vol. 2, pp. 277-305.
- DALAKAS, Evangelos, NEWSOME, Philip N., BOYLE, Shelagh, BROWN, Rachael,

PRYDE, Anne, MCCALL, Shonna, HAYES, Peter C., BICKMORE, Wendy A., HARRISON, David J. et PLEVRIS, John N., 2010. Bone marrow stem cells contribute to alcohol liver fibrosis in humans. *Stem Cells and Development*. septembre 2010. Vol. 19, n° 9, pp. 1417-1425.

DE UGARTE, Daniel A., MORIZONO, Kouki, ELBARBARY, Amir, ALFONSO, Zeni, ZUK, Patricia A., ZHU, Min, DRAGOO, Jason L., ASHJIAN, Peter, THOMAS, Bert, BENHAIM, Prosper, CHEN, Irvin, FRASER, John et HEDRICK, Marc H., 2003. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells, Tissues, Organs*. 2003. Vol. 174, n° 3, pp. 101-109.

DOMINICI, M., LE BLANC, K., MUELLER, I., SLAPER-CORTENBACH, I., MARINI, F.C, KRAUSE, D.S., DEANS, R.J., KEATING, A., PROCKOP, D.J. et HORWITZ, E.M., 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006. Vol. 8, n° 4, pp. 315-317.

DU, Guojia, LIU, Yao, DANG, Muren, ZHU, Guohua, SU, Riqing, FAN, Yandong, TAN, Zeming, WANG, Li Xin et FANG, Jiasheng, 2014. Comparison of administration routes for adipose-derived stem cells in the treatment of middle cerebral artery occlusion in rats. *Acta Histochemica*. juillet 2014. Vol. 116, n° 6, pp. 1075-1084.

FANDEL, Thomas M., ALBERSEN, Maarten, LIN, Guiting, QIU, Xuefeng, NING, Hongxiu, BANIE, Lia, LUE, Tom F. et LIN, Ching-Shwun, 2012. Recruitment of Intracavernously Injected Adipose-Derived Stem Cells to the Major Pelvic Ganglion Improves Erectile Function in a Rat Model of Cavernous Nerve Injury. *European Urology*. janvier 2012. Vol. 61, n° 1, pp. 201-210.

FRIEDENSTEIN, A. J., PETRAKOVA, K. V., KUROLESOVA, A. I. et FROLOVA, G. P., 1968. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic

and hematopoietic tissues. *Transplantation*. mars 1968. Vol. 6, n° 2, pp. 230-247.

FU, Yingli et KRAITCHMAN, Dara L, 2010. Stem cell labeling for noninvasive delivery and tracking in cardiovascular regenerative therapy. *Expert review of cardiovascular therapy*. août 2010. Vol. 8, n° 8, pp. 1149-1160.

GAMBHIR, 2009. Molecular imaging of stem cells. *StemBook*. 2009.

GILAD, Assaf A, MCMAHON, Michael T, WALCZAK, Piotr, WINNARD, Paul T, RAMAN, Venu, VAN LAARHOVEN, Hanneke W M, SKOGLUND, Cynthia M, BULTE, Jeff W M et VAN ZIJL, Peter C M, 2007. Artificial reporter gene providing MRI contrast based on proton exchange. *Nature Biotechnology*. février 2007. Vol. 25, n° 2, pp. 217-219.

GIMBLE, Jeffrey M, BUNNELL, Bruce A et GUILAK, Farshid, 2012. Human adipose-derived cells: an update on the transition to clinical translation. *Regenerative Medicine*. mars 2012. Vol. 7, n° 2, pp. 225-235.

GIMBLE, Jeffrey M., GRAYSON, Warren, GUILAK, Farshid, LOPEZ, Mandi J. et VUNJAK-NOVAKOVIC, Gordana, 2011. Adipose tissue as a stem cell source for musculo-skeletal regeneration. *Frontiers in bioscience (Scholar edition)*. 2011. Vol. 3, pp. 69.

GIR, Phanette, ONI, Georgette, BROWN, Spencer A., MOJALLAL, Ali et ROHRICH, Rod J., 2012. Human Adipose Stem Cells: Current Clinical Applications. *Plastic and Reconstructive Surgery*. juin 2012. Vol. 129, n° 6, pp. 1277-1290.

GONZALEZ-REY, E., GONZALEZ, M. A., VARELA, N., O'VALLE, F., HERNANDEZ-CORTES, P., RICO, L., BÜSCHER, D. et DELGADO, M., 2010. Human adipose-derived mesenchymal stem cells reduce inflammatory and T cell responses and induce regulatory T cells in vitro in rheumatoid arthritis. *Annals of the*

*Rheumatic Diseases*. janvier 2010.  
Vol. 69, n° 1, pp. 241-248.

GU, Eugene, CHEN, Wen-Yi, GU, Jay,  
BURRIDGE, Paul et WU, Joseph C., 2012.  
Molecular Imaging of Stem Cells: Tracking  
Survival, Biodistribution, Tumorigenicity,  
and Immunogenicity. *Theranostics*. 2012.  
Vol. 2, n° 4, pp. 335-345.

GYÖNGYÖSI, Mariann, BLANCO,  
Jeronimo, MARIAN, Teréz, TRÓN, Lajos,  
PETNEHÁZY, Örs, PETRASI, Zsolt,  
HEMETSBERGER, Rayyan,  
RODRIGUEZ, Julio, FONT, Gusztáv,  
PAVO, Imre J., KERTÉSZ, István,  
BALKAY, László, PAVO, Noemi, POSA,  
Aniko, EMRI, Miklos, GALUSKA, László,  
KRAITCHMAN, Dara L., WOJTA, Johann,  
HUBER, Kurt et GLOGAR, Dietmar, 2008.  
Serial Noninvasive In Vivo Positron  
Emission Tomographic Tracking of  
Percutaneously Intramyocardially Injected  
Autologous Porcine Mesenchymal Stem  
Cells Modified for Transgene Reporter  
Gene Expression. *Circulation*.  
*Cardiovascular imaging*. septembre 2008.  
Vol. 1, n° 2, pp. 94-103.

HAN, Jinah, KOH, Young Jun, MOON,  
Hye Rin, RYOO, Hyun Gee, CHO, Chung-  
Hyun, KIM, Injune et KOH, Gou Young,  
2010. Adipose tissue is an extramedullary  
reservoir for functional hematopoietic stem  
and progenitor cells. *Blood*. 4 février 2010.  
Vol. 115, n° 5, pp. 957-964.

HARDING, John, ROBERTS, R Michael et  
MIROCHNITCHENKO, Oleg, 2013. Large  
animal models for stem cell therapy. *Stem  
Cell Research & Therapy*. 28 mars 2013.  
Vol. 4, n° 2, pp. 23.

HARVEY, A. R., SYMONS, N. A.,  
POLLETT, M. A., BROOKER, G. J. et  
BARTLETT, P. F., 1997. Fate of adult  
neural precursors grafted to adult cortex  
monitored with a Y-chromosome marker.  
*Neuroreport*. 22 décembre 1997. Vol. 8,  
n° 18, pp. 3939-3943.

HESLOP, James A., HAMMOND, Thomas  
G., SANTERAMO, Ilaria, TORT PIELLA,  
Agnès, HOPP, Isabel, ZHOU, Jing, BATY,  
Roua, GRAZIANO, Enrique I., PROTO

MARCO, Bernabé, CARON, Alexis,  
SKÖLD, Patrik, ANDREWS, Peter W.,  
BAXTER, Melissa A., HAY, David C.,  
HAMDAM, Junnat, SHARPE, Michaela E.,  
PATEL, Sara, JONES, David R.,  
REINHARDT, Jens, DANEN, Erik H.J.,  
BEN-DAVID, Uri, STACEY, Glyn,  
BJÖRQUIST, Petter, PINER, Jacqueline,  
MILLS, John, ROWE, Cliff, PELLEGRINI,  
Giovanni, SETHU, Swaminathan,  
ANTOINE, Daniel J., CROSS, Michael J.,  
MURRAY, Patricia, WILLIAMS, Dominic  
P., KITTERINGHAM, Neil R., GOLDRING,  
Chris E.P. et PARK, B. Kevin, 2015.  
Concise Review: Workshop Review:  
Understanding and Assessing the Risks of  
Stem Cell-Based Therapies. *Stem Cells  
Translational Medicine*. avril 2015. Vol. 4,  
n° 4, pp. 389-400.

HONG, Seok Jong, JIA, Sheng-Xian, XIE,  
Ping, XU, Wei, LEUNG, Kai P., MUSTOE,  
Thomas A. et GALIANO, Robert D., 2013.  
Topically Delivered Adipose Derived Stem  
Cells Show an Activated-Fibroblast  
Phenotype and Enhance Granulation  
Tissue Formation in Skin Wounds. *PLoS  
ONE*. 31 janvier 2013. Vol. 8, n° 1,  
pp. e55640.

HSIEH, Chia-Hung, CHEN, Fu-Du,  
WANG, Hsin-Eill, HWANG, Jeng-Jong,  
CHANG, Chi-Wei, LEE, Yi-Jang,  
GELOVANI, Juri G. et LIU, Ren-Shyan,  
2008. Generation of destabilized herpes  
simplex virus type 1 thymidine kinase as  
transcription reporter for PET reporter  
systems in molecular genetic imaging.  
*Journal of Nuclear Medicine: Official  
Publication, Society of Nuclear Medicine*.  
janvier 2008. Vol. 49, n° 1, pp. 142-150.

KANG, Joo Hyun, LEE, Dong Soo,  
PAENG, Jin Chul, LEE, Jae Sung, KIM,  
Yun Hui, LEE, Yong Jin, HWANG, Do  
Won, JEONG, Jae Min, LIM, Sang Moo,  
CHUNG, June-Key et LEE, Myung Chul,  
2005. Development of a sodium/iodide  
symporter (NIS)-transgenic mouse for  
imaging of cardiomyocyte-specific reporter  
gene expression. *Journal of Nuclear  
Medicine: Official Publication, Society of  
Nuclear Medicine*. mars 2005. Vol. 46,  
n° 3, pp. 479-483.



- KANG, Won Jun, KANG, Hyun-Jae, KIM, Hyo-Soo, CHUNG, June-Key, LEE, Myung Chul et LEE, Dong Soo, 2006. Tissue distribution of 18F-FDG-labeled peripheral hematopoietic stem cells after intracoronary administration in patients with myocardial infarction. *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine*. août 2006. Vol. 47, n° 8, pp. 1295-1301.
- KARP, Jeffrey M. et LENG TEO, Grace Sock, 2009. Mesenchymal Stem Cell Homing: The Devil Is in the Details. *Cell Stem Cell*. mars 2009. Vol. 4, n° 3, pp. 206-216.
- KATAYAMA, Y., 2003. PSGL-1 participates in E-selectin-mediated progenitor homing to bone marrow: evidence for cooperation between E-selectin ligands and 4 integrin. *Blood*. 15 septembre 2003. Vol. 102, n° 6, pp. 2060-2067.
- KATO, Taigo, OKUMI, Masayoshi, TANEMURA, Masahiro, YAZAWA, Koji, KAKUTA, Yoichi, YAMANAKA, Kazuaki, TSUTAHARA, Koichi, DOKI, Yuichiro, MORI, Masaki, TAKAHARA, Shiro et NONOMURA, Norio, 2014. Adipose tissue-derived stem cells suppress acute cellular rejection by TSG-6 and CD44 interaction in rat kidney transplantation. *Transplantation*. 15 août 2014. Vol. 98, n° 3, pp. 277-284.
- KATZ, Adam J., THOLPADY, Ashok, THOLPADY, Sunil S., SHANG, Hulan et OGLE, Roy C., 2005. Cell Surface and Transcriptional Characterization of Human Adipose-Derived Adherent Stromal (hADAS) Cells. *Stem Cells*. mars 2005. Vol. 23, n° 3, pp. 412-423.
- KILROY, Gail E., FOSTER, Sandra J., WU, Xiyang, RUIZ, Joseph, SHERWOOD, Sonya, HEIFETZ, Aaron, LUDLOW, John W., STRICKER, Dawn M., POTINY, Suma, GREEN, Patrick, HALVORSEN, Yuan-Di C., CHEATHAM, Bentley, STORMS, Robert W. et GIMBLE, Jeffrey M., 2007. Cytokine profile of human adipose-derived stem cells: expression of angiogenic, hematopoietic, and pro-inflammatory factors. *Journal of Cellular Physiology*. septembre 2007. Vol. 212, n° 3, pp. 702-709.
- KIM, Yun Hui, LEE, Dong Soo, KANG, Joo Hyun, LEE, Young Jin, CHUNG, June-Key, ROH, Jae-Kyu, KIM, Seung Up et LEE, Myung Chul, 2005. Reversing the silencing of reporter sodium/iodide symporter transgene for stem cell tracking. *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine*. février 2005. Vol. 46, n° 2, pp. 305-311.
- KRAITCHMAN, Dara L. et BULTE, Jeff W.M., 2009. In Vivo Imaging of Stem Cells and Beta Cells Using Direct Cell Labeling and Reporter Gene Methods. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. juillet 2009. Vol. 29, n° 7, pp. 1025-1030.
- KRAITCHMAN, Dara L., TATSUMI, Mitsuki, GILSON, Wesley D., ISHIMORI, Takayoshi, KEDZIOREK, Dorota, WALCZAK, Piotr, PAUL SEGARS, W., CHEN, Hunter H., FRITZGES, Danielle, IZBUDAK, Izlem, YOUNG, Randell G., MARCELINO, Michelle, PITTENGER, Mark F., SOLAIYAPPAN, Meiyappan, BOSTON, Raymond C., TSUI, Benjamin M.W., WAHL, Richard L. et BULTE, Jeff W.M., 2005. Dynamic Imaging of Allogeneic Mesenchymal Stem Cells Trafficking to Myocardial Infarction. *Circulation*. 6 septembre 2005. Vol. 112, n° 10, pp. 1451-1461.
- LAPIDOT, T., 2005. How do stem cells find their way home? *Blood*. 15 septembre 2005. Vol. 106, n° 6, pp. 1901-1910.
- LE BLANC, K., TAMMIK, L., SUNDBERG, B., HAYNESWORTH, S. E. et RINGDEN, O., 2003. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scandinavian journal of immunology*. 2003. Vol. 57, n° 1, pp. 11-20.
- LI, Zongjin, SUZUKI, Yoriyasu, HUANG, Mei, CAO, Feng, XIE, Xiaoyan, CONNOLLY, Andrew J., YANG, Phillip C. et WU, Joseph C., 2008. Comparison of

Reporter Gene and Iron Particle Labeling for Tracking Fate of Human Embryonic Stem Cells and Differentiated Endothelial Cells in Living Subjects. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. avril 2008. Vol. 26, n° 4, pp. 864-873.

LIN, G., QIU, X., FANDEL, T., BANIE, L., WANG, G., LUE, T. F. et LIN, C.-S., 2011. Tracking intracavernously injected adipose-derived stem cells to bone marrow. *International Journal of Impotence Research*. novembre 2011. Vol. 23, n° 6, pp. 268-275.

LIN, Guiting, GARCIA, Maurice, NING, Hongxiu, BANIE, Lia, GUO, Ying-Lu, LUE, Tom F. et LIN, Ching-Shwun, 2008. Defining Stem and Progenitor Cells within Adipose Tissue. *Stem Cells and Development*. 2 juillet 2008. Vol. 17, n° 6, pp. 1053-1063.

LIN, Shuan, XIE, Xiaoyan, PATEL, Manishkumar R, YANG, Yao-Hung, LI, Zongjin, CAO, Feng, GHEYSENS, Oliver, ZHANG, Yan, GAMBHIR, Sanjiv S, RAO, Jiang Hong et WU, Joseph C, 2007. Quantum dot imaging for embryonic stem cells. *BMC Biotechnology*. 9 octobre 2007. Vol. 7, pp. 67.

LOCKE, Michelle, FEISST, Vaughan et MEIDINGER, Sarah, 2015. From bench to bedside: use of human adipose-derived stem cells. *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications*. novembre 2015. pp. 149.

LOCKE, Michelle, WINDSOR, John et DUNBAR, P. Rod, 2009. Human adipose-derived stem cells: isolation, characterization and applications in surgery. *ANZ Journal of Surgery*. avril 2009. Vol. 79, n° 4, pp. 235-244.

MACLAREN, D. C., GAMBHIR, S. S., SATYAMURTHY, N., BARRIO, J. R., SHARFSTEIN, S., TOYOKUNI, T., WU, L., BERK, A. J., CHERRY, S. R., PHELPS, M. E. et HERSCHMAN, H. R., 1999. Repetitive, non-invasive imaging of the dopamine D2 receptor as a reporter gene in living animals. *Gene Therapy*. mai 1999. Vol. 6, n° 5, pp. 785-791.

MASSOUD, Tarik F. et GAMBHIR, Sanjiv S., 2003. Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light. *Genes & Development*. 1 mars 2003. Vol. 17, n° 5, pp. 545-580.

MAUMUS, Marie, GUÉRIT, David, TOUPET, Karine, JORGENSEN, Christian et NOËL, Danièle, 2011. Mesenchymal stem cell-based therapies in regenerative medicine: applications in rheumatology. *Stem cell research & therapy*. 2011. Vol. 2, n° 2, pp. 1.

MCCOLGAN, Peter, SHARMA, Pankaj et BENTLEY, Paul, 2011. Stem cell tracking in human trials: a meta-regression. *Stem Cell Reviews*. novembre 2011. Vol. 7, n° 4, pp. 1031-1040.

MITCHELL, James B., MCINTOSH, Kevin, ZVONIC, Sanjin, GARRETT, Sara, FLOYD, Z. Elizabeth, KLOSTER, Amy, DI HALVORSEN, Yuan, STORMS, Robert W., GOH, Brian, KILROY, Gail, WU, Xiyang et GIMBLE, Jeffrey M., 2006. Immunophenotype of Human Adipose-Derived Cells: Temporal Changes in Stromal-Associated and Stem Cell-Associated Markers. *Stem Cells*. février 2006. Vol. 24, n° 2, pp. 376-385.

MIZUNO-KAMIYA, Masako, 2013. Mechanisms of the immunosuppressive effects of mouse adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells on mouse alloreactively stimulated spleen cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 6 novembre 2013.

MULLER-BORER, Barbara J, COLLINS, Maria C, GUNST, Philip R, CASCIO, Wayne E et KYPSON, Alan P, 2007. Quantum dot labeling of mesenchymal stem cells. *Journal of Nanobiotechnology*. 7 novembre 2007. Vol. 5, pp. 9.

MUSCHLER, George F., NAKAMOTO, Chizu et GRIFFITH, Linda G., 2004. Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. *J Bone Joint Surg Am*. 2004. Vol. 86, n° 7, pp. 1541-1558.

NGUYEN, Patricia K., NAG, Divya et WU, Joseph C., 2010. Methods to Assess Stem Cell Lineage, Fate and Function. *Advanced drug delivery reviews*. 30 septembre 2010. Vol. 62, n° 12, pp. 1175-1186.

NOIRET, Aude, 2016. *Contribution à l'identification des cellules souches mésenchymateuses humaines d'origine adipeuse dans les tissus murins*. Thèse de doctorat vétérinaire. Toulouse : Université Paul Sabatier.

OI, Maya, YAMADA, Keisuke, HAYAKAWA, Hiroyuki et SUZUKI, Hiroshi, 2013. Sexing of Dog Sperm by Fluorescence In Situ Hybridization. *The Journal of Reproduction and Development*. février 2013. Vol. 59, n° 1, pp. 92-96.

PAPAYANNOPOULOU, Thalia, PRIESTLEY, Gregory V., NAKAMOTO, Betty, ZAFIROPOULOS, Vivian et SCOTT, Linda M., 2001. Molecular pathways in bone marrow homing: dominant role of  $\alpha 4\beta 1$  over  $\beta 2$ -integrins and selectins. *Blood*. 2001. Vol. 98, n° 8, pp. 2403–2411.

PARTLOW, Kathryn C., CHEN, Junjie, BRANT, Jason A., NEUBAUER, Anne M., MEYERROSE, Todd E., CREER, Michael H., NOLTA, Jan A., CARUTHERS, Shelton D., LANZA, Gregory M. et WICKLINE, Samuel A., 2007. 19F magnetic resonance imaging for stem/progenitor cell tracking with multiple unique perfluorocarbon nanobeacons. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. juin 2007. Vol. 21, n° 8, pp. 1647-1654.

PATEL, Shyam A., SHERMAN, Lauren, MUNOZ, Jessian et RAMESHWAR, Pranela, 2008. Immunological properties of mesenchymal stem cells and clinical implications. *Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis*. février 2008. Vol. 56, n° 1, pp. 1-8.

PEI, Zhijun, LAN, Xiaoli, CHENG, Zhen, QIN, Chunxia, XIA, Xiaotian, YUAN, Hui, DING, Zhiling et ZHANG, Yongxue, 2014. Multimodality Molecular Imaging to Monitor

Transplanted Stem Cells for the Treatment of Ischemic Heart Disease. *PLoS ONE*. 7 mars 2014. Vol. 9, n° 3.

POTOCNIK, Alexandre J., BRAKEBUSCH, Cord et FÄSSLER, Reinhard, 2000. Fetal and Adult Hematopoietic Stem Cells Require  $\beta 1$  Integrin Function for Colonizing Fetal Liver, Spleen, and Bone Marrow. *Immunity*. 1 juin 2000. Vol. 12, n° 6, pp. 653-663.

PROCKOP, Darwin J. et OLSON, Scott D., 2007. Clinical trials with adult stem/progenitor cells for tissue repair: let's not overlook some essential precautions. *Blood*. 2007. Vol. 109, n° 8, pp. 3147–3151.

QUIMBY, Jessica M., WEBB, Tracy L., RANDALL, Elissa, MAROLF, Angela, VALDES-MARTINEZ, Alex et DOW, Steve W., 2016. Assessment of intravenous adipose-derived allogeneic mesenchymal stem cells for the treatment of feline chronic kidney disease: a randomized, placebo-controlled clinical trial in eight cats. *Journal of feline medicine and surgery*. 2016. Vol. 18, n° 2, pp. 165–171.

RODRIGUEZ-PORCEL, Martin, GHEYSENS, Olivier, CHEN, Ian Y., WU, Joseph C. et GAMBHIR, Sanjiv Sam, 2005. Image-guided cardiac cell delivery using high-resolution small-animal ultrasound. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*. décembre 2005. Vol. 12, n° 6, pp. 1142-1147.

ROSE, Robert A., JIANG, Huijie, WANG, Xinghua, HELKE, Simone, TSOPORIS, James N., GONG, Nanling, KEATING, Stephanie C.J., PARKER, Thomas G., BACKX, Peter H. et KEATING, Armand, 2008. Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells Express Cardiac-Specific Markers, Retain the Stromal Phenotype, and Do Not Become Functional Cardiomyocytes In Vitro. *Stem Cells*. novembre 2008. Vol. 26, n° 11, pp. 2884-2892.

ROSEN, Amy B., KELLY, Damon J., SCHULDT, Adam J. T., LU, Jia, POTAPOVA, Irina A., DORONIN, Sergey V., ROBICHAUD, Kyle J., ROBINSON, Richard B., ROSEN, Michael R., BRINK, Peter R., GAUDETTE, Glenn R. et COHEN, Ira S., 2007. Finding Fluorescent Needles in the Cardiac Haystack: Tracking Human Mesenchymal Stem Cells Labeled with Quantum Dots for Quantitative In Vivo Three-Dimensional Fluorescence Analysis. *STEM CELLS*. 1 août 2007. Vol. 25, n° 8, pp. 2128-2138.

ROTA, Marcello, KAJSTURA, Jan, HOSODA, Toru, BEARZI, Claudia, VITALE, Serena, ESPOSITO, Grazia, IAFFALDANO, Grazia, PADIN-IRUEGAS, M. Elena, GONZALEZ, Arantxa, RIZZI, Roberto, SMALL, Narissa, MURASKI, John, ALVAREZ, Roberto, CHEN, Xiongwen, URBANEK, Konrad, BOLLI, Roberto, HOUSER, Steven R., LERI, Annarosa, SUSSMAN, Mark A. et ANVERSA, Piero, 2007. Bone marrow cells adopt the cardiomyogenic fate in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 6 novembre 2007. Vol. 104, n° 45, pp. 17783-17788.

SADAT, Sanga, GEHMERT, Sebastian, SONG, Yao-Hua, YEN, Yasheng, BAI, Xiaowen, GAISER, Sebastian, KLEIN, Helmut et ALT, Eckhard, 2007. The cardioprotective effect of mesenchymal stem cells is mediated by IGF-I and VEGF. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 23 novembre 2007. Vol. 363, n° 3, pp. 674-679.

SALGADO, António J. Braga Osório Gomes, REIS, Rul L. Gonçalves, SOUSA, Nuno Jorge Carvalho et GIMBLE, Jeffrey M., 2010. Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine. *Current Stem Cell Research & Therapy*. juin 2010. Vol. 5, n° 2, pp. 103-110.

SCHNEIDER, Marlon R., WOLF, Eckhard, BRAUN, Joachim, KOLB, Hans-Jochem et ADLER, Heiko, 2008. Canine embryo-derived stem cells and models for human

diseases. *Human Molecular Genetics*. 15 avril 2008. Vol. 17, n° R1, pp. R42-R47.

SCREVEN, Rudell, KENYON, Elizabeth, MYERS, Michael J., YANCY, Haile F., SKASKO, Mark, BOXER, Lynne, BIGLEY, Elmer C., BORJESSON, Dori L. et ZHU, Min, 2014. Immunophenotype and gene expression profile of mesenchymal stem cells derived from canine adipose tissue and bone marrow. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. septembre 2014. Vol. 161, n° 1-2, pp. 21-31.

SENSEBÉ, Luc et FLEURY-CAPPELLESSO, Sandrine, 2013. Biodistribution of Mesenchymal Stem/Stromal Cells in a Preclinical Setting. *Stem Cells International*. 2013. Vol. 2013, pp. 1 à 5.

SHAH, K., JACOBS, A., BREAKEFIELD, X. O. et WEISSLEDER, R., 2004. Molecular imaging of gene therapy for cancer. *Gene Therapy*. août 2004. Vol. 11, n° 15, pp. 1175-1187.

SLOTKIN, Jonathan R., CHAKRABARTI, Lina, DAI, Hai Ning, CARNEY, Rosalind S.E., HIRATA, Tsutomu, BREGMAN, Barbara S., GALLICANO, G. Ian, CORBIN, Joshua G. et HAYDAR, Tarik F., 2007. In Vivo Quantum Dot Labeling of Mammalian Stem and Progenitor Cells. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*. décembre 2007. Vol. 236, n° 12, pp. 3393-3401.

STARKEY, Mike P., SCASE, Timothy J., MELLERSH, Cathryn S. et MURPHY, Sue, 2005. Dogs really are man's best friend—Canine genomics has applications in veterinary and human medicine! *Briefings in Functional Genomics & Proteomics*. 1 juillet 2005. Vol. 4, n° 2, pp. 112-128.

STERODIMAS, Aris, DE FARIA, Jose, NICARETTA, Beatriz et PITANGUY, Ivo, 2010. Tissue engineering with adipose-derived stem cells (ADSCs): current and future applications. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery: JPRAS*. novembre 2010. Vol. 63, n° 11, pp. 1886-1892.

SUTTON, Elizabeth J., HENNING, Tobias D., PICHLER, Bernd J., BREMER, Christoph et DALDRUP-LINK, Heike E., 2008. Cell tracking with optical imaging. *European Radiology*. octobre 2008. Vol. 18, n° 10, pp. 2021-2032.

TAGUCHI, Takahiro, AKIMARU, Kunihiro, HIRAI, Hirohisa, HIRAI, Yuriko, MWENDA, Jason M. et YURI, Kazunari, 2003. A probe generated by chromosome microdissection, useful for analyzing Y chromosome evolution in Old World monkeys. *Chromosome Research: An International Journal on the Molecular, Supramolecular and Evolutionary Aspects of Chromosome Biology*. 2003. Vol. 11, n° 2, pp. 147-152.

TROTMAN, Winifred, BECKETT, Travis, GONCZ, Kaarin K., BEATTY, Barbara G. et WEISS, Daniel J., 2004. Dual Y chromosome painting and in situ cell-specific immunofluorescence staining in lung tissue: an improved method of identifying donor marrow cells in lung following bone marrow transplantation. *Histochemistry and Cell Biology*. janvier 2004. Vol. 121, n° 1, pp. 73-79.

UTSUNOMIYA, Tohru, SHIMADA, Mitsuo, IMURA, Satoru, MORINE, Yuji, IKEMOTO, Tetsuya, MORI, Hiroki, HANAOKA, Jun, IWAHASHI, Shuichi, SAITO, Yu et IWAGURO, Hideki, 2010. Human adipose-derived stem cells: Potential clinical applications in surgery. *Surgery Today*. 30 décembre 2010. Vol. 41, n° 1, pp. 18-23.

WALZ, A., SCHMUTZ, P., MUELLER, C. et SCHNYDER-CANDRIAN, S., 1997. Regulation and function of the CXC chemokine ENA-78 in monocytes and its role in disease. *Journal of Leukocyte Biology*. novembre 1997. Vol. 62, n° 5, pp. 604-611.

WU, Joseph C., CHEN, Ian Y., SUNDARESAN, Gobalakrishnan, MIN, Jung-Joon, DE, Abhijit, QIAO, Jian-Hua, FISHBEIN, Michael C. et GAMBHIR, Sanjiv S., 2003. Molecular Imaging of Cardiac Cell Transplantation in Living Animals Using Optical Bioluminescence and Positron Emission Tomography.

*Circulation*. 16 septembre 2003. Vol. 108, n° 11, pp. 1302-1305.

WU, Joseph C., SPIN, Joshua M., CAO, Feng, LIN, Shuan, XIE, Xiaoyan, GHEYSENS, Olivier, CHEN, Ian Y., SHEIKH, Ahmad Y., ROBBINS, Robert C., TSALENKO, Anya, GAMBHIR, Sanjiv S. et QUERTERMOUS, Tom, 2006. Transcriptional profiling of reporter genes used for molecular imaging of embryonic stem cell transplantation. *Physiological Genomics*. 13 mars 2006. Vol. 25, n° 1, pp. 29-38.

WU, Joseph C., TSENG, Jeffrey R. et GAMBHIR, Sanjiv S., 2004. Molecular imaging of cardiovascular gene products. *Journal of Nuclear Cardiology: Official Publication of the American Society of Nuclear Cardiology*. août 2004. Vol. 11, n° 4, pp. 491-505.

WU, S.-C., CHEN, C.-H., CHANG, J.-K., FU, Y.-C., WANG, C.-K., ESWARAMOORTHY, R., LIN, Y.-S., WANG, Y.-H., LIN, S.-Y., WANG, G.-J. et HO, M.-L., 2013. Hyaluronan initiates chondrogenesis mainly via CD44 in human adipose-derived stem cells. *Journal of Applied Physiology*. 1 juin 2013. Vol. 114, n° 11, pp. 1610-1618.

XIA, Xiujin, RASMUSSEN, Terri, ALVAREZ, Xavier, TAGUCHI, Takahiro, LI, Marilyn et LA RUSSA, Vincent F., 2007. Fluorescence In Situ Hybridization Using an Old World Monkey Y Chromosome—specific Probe Combined With Immunofluorescence Staining on Rhesus Monkey Tissues. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2007. Vol. 55, n° 11, pp. 1115–1121.

YAMAMOTO, Tokunori, GOTOH, Momokazu, KATO, Masashi, MAJIMA, Tsuyoshi, TORIYAMA, Kazuhiro, KAMEI, Yuzuru, IWAGURO, Hideki, MATSUKAWA, Yoshihisa et FUNAHASHI, Yasuhito, 2012. Periurethral injection of autologous adipose-derived regenerative cells for the treatment of male stress urinary incontinence: Report of three initial cases: Cell therapy for stress incontinence. *International Journal of*

*Urology*. juillet 2012. Vol. 19, n° 7, pp. 652-659.

YAÑEZ, Rosa, LAMANA, María Luisa, GARCÍA-CASTRO, Javier, COLMENERO, Isabel, RAMÍREZ, Manuel et BUEREN, Juan A., 2006. Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Have In Vivo Immunosuppressive Properties Applicable for the Control of the Graft-Versus-Host Disease. *Stem Cells*. novembre 2006. Vol. 24, n° 11, pp. 2582-2591.

YANG, Jing, HIRATA, Takako, CROCE, Kevin, MERRILL-SKOLOFF, Glenn, TCHERNYCHEV, Boris, WILLIAMS, Eric, FLAUMENHAFT, Robert, FURIE, Barbara C. et FURIE, Bruce, 1999. Targeted gene disruption demonstrates that P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is required for P-selectin-mediated but not E-selectin-mediated neutrophil rolling and migration. *The Journal of experimental medicine*. 1999. Vol. 190, n° 12, pp. 1769–1782.

ZANNETTINO, A.c.w., PATON, S., ARTHUR, A., KHOR, F., ITESCU, S., GIMBLE, J.m. et GRONTHOS, S., 2008. Multipotential human adipose-derived stromal stem cells exhibit a perivascular phenotype in vitro and in vivo. *Journal of Cellular Physiology*. 1 février 2008. Vol. 214, n° 2, pp. 413-421.

ZANZONICO, Pat, KOEHNE, Guenther, GALLARDO, Humilidat F., DOUBROVIN, Mikhail, DOUBROVINA, Ekaterina, FINN, Ronald, BLASBERG, Ronald G., RIVIERE, Isabelle, O'REILLY, Richard J., SADELAIN, Michel et LARSON, Steven M., 2006. [131I]FIAU labeling of genetically transduced, tumor-reactive lymphocytes: cell-level dosimetry and dose-dependent toxicity. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. septembre 2006. Vol. 33, n° 9, pp. 988-997.

ZHANG, Haiyang, NING, Hongxiu, BANIE, Lia, WANG, Guifang, LIN, Guiting, LUE, Tom F. et LIN, Ching-Shwun, 2010.

Adipose tissue-derived stem cells secrete CXCL5 cytokine with chemoattractant and angiogenic properties. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. novembre 2010. Vol. 402, n° 3, pp. 560-564.

ZHANG, Haiyang, QIU, Xuefeng, SHINDEL, Alan W., NING, Hongxiu, FERRETTI, Ludovic, JIN, Xunbo, LIN, Guiting, LIN, Ching-Shwun et LUE, Tom F., 2012. Adipose Tissue-Derived Stem Cells Ameliorate Diabetic Bladder Dysfunction in a Type II Diabetic Rat Model. *Stem Cells and Development*. 10 juin 2012. Vol. 21, n° 9, pp. 1391-1400.

ZHANG, Wendy Y., EBERT, Antje D., NARULA, Jagat et WU, Joseph C., 2011. Imaging Cardiac Stem Cell Therapy: Translations to Human Clinical Studies. *Journal of Cardiovascular Translational Research*. 3 mai 2011. Vol. 4, n° 4, pp. 514-522.

ZHAO, Yong et ZHANG, Haiyang, 2016. Update on the mechanisms of homing of adipose tissue-derived stem cells. *Cytotherapy*. juillet 2016. Vol. 18, n° 7, pp. 816-827.

ZHU, Jianhong, ZHOU, Liangfu et XINGWU, FengGe, 2006. Tracking neural stem cells in patients with brain trauma. *The New England Journal of Medicine*. 30 novembre 2006. Vol. 355, n° 22, pp. 2376-2378.

ZUK, P. A., ZHU, M., MIZUNO, H., HUANG, J., FUTRELL, J. W., KATZ, A. J., BENHAIM, P., LORENZ, H. P. et HEDRICK, M. H., 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering*. avril 2001. Vol. 7, n° 2, pp. 211-228.

ZUK, Patricia, 2013. Adipose-Derived Stem Cells in Tissue Regeneration: A Review. *ISRN Stem Cells*. 2013. Vol. 2013, pp. 1-35.



## ANNEXES

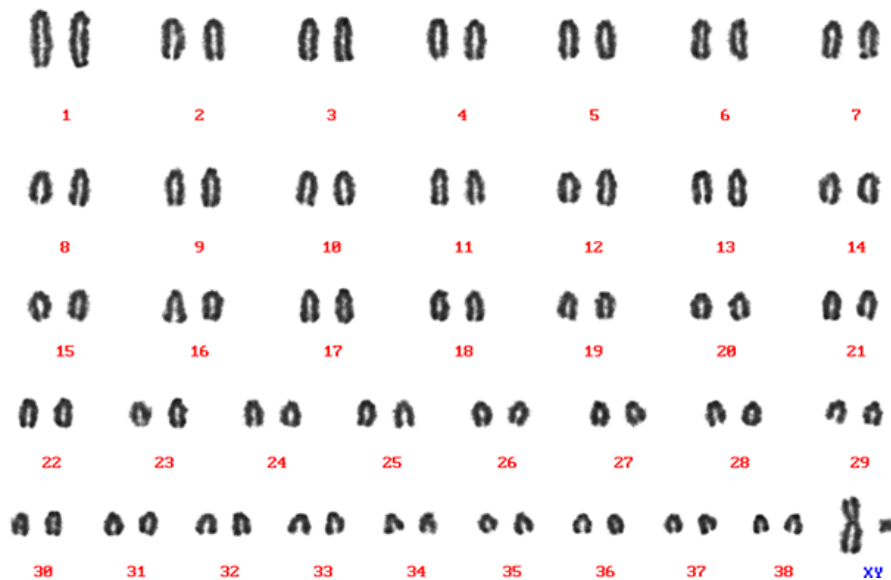
### Annexe 1 : Détails des produits utilisés dans notre étude

Produit	Nom / Composition	Référence
ADN compétiteur	Canine Hybloc DNA 1µg/µL : repetitive sequence fraction of genomic DNA from male canine spleen	APPLIED GENETICS LABORATORIES (REF. DHB Canine Hybloc DNA)
ADN de saumon	ADN de sperme de saumon soniqué (UltraPure™ Salmon Sperm DNA Solution)	INVITROGEN (REF. 15 632011)
Anticorps anti-digoxigénine	Monoclonal Anti-Digoxin-FITC antibody produced in mouse clone DI-22 purified immunoglobulin, buffered aqueous solution.	SIGMA (REF. F3523)
Biotine	Biotin-16-dUTP	ROCHE (REF. 11228953 ou 11 093 070 910 50nmol;50µL)
BSA	Albumin bovine serum, fraction V, ≥96%	SIGMA (REF. A9647 50g)
Choc hypotonique	Sérum de veau nouveau-né dilué au 1/6 dans de l'eau distillée	DUTSCHER (REF. S0750-100 100ML)
Digoxigénine	Digoxigenin-dUTP, alkali-stable	ENZO (REF. ENZ-NUC113-0025 25nmol;1mM)
dNTP 10X	bases A, G, C et un peu T	
Formamide		SIGMA (REF. F9037)
Milieu culture n°1	DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (1X) [+] 1g/L D-Glucose [+] L-Glutamine [+] Pyruvate	GIBCO (REF.31885-023 500ML)
Milieu de culture n°2	F-12 Nut Mix (Ham) (1X) [+]L-Glutamine  + 100mL sérum fœtal de veau  + 6mL Antibiotique/ Antimycotique 100X	GIBCO (REF.21765-029 500ML)  PAN BIOTECH ( REF. 3301 - P100709) GIBCO (REF. 15240 - 096 20ML)
Milieu RPMI	RPMI Medium 1640 (1X) + GlutaMAX™ -I [+] 25mM HEPES	GIBCO (REF 72400 - 021 500ML)
PBS	DPBS 1X : Dulbecco's Phosphate Buffered Saline [-] CaCl2 [-]MgCl2	GIBCO (REF. 14190-094 500ML)
Primers 2,5 X pour PCR	séquence amorce CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG	EUROBIO (oligonucléotide référence 8018201367-000100)
Solution de "PBT"	Flacon de 500mL de DPBS 1x + 500µL de Tween 20 + 0,75g de BSA (Bovine Serum Albumin)	Cf. PBS, Tween 20 et BSA
Solution de "Tween"	Flacon de 500mL de DPBS 1x + 500µL de Tween 20	Cf. PBS, Tween 20
Solution de colchicine	15mg de colchicine + 40mL d'eau stérile	SIGMA (REF. C-9754 1G)
Solution de Pokeweed	5mg de Pokeweed (Lectin from Phytolacca americana) + 20mL d'eau stérile	SIGMA (REF. L8777 5MG)



Solution SSC 0,4X	UltraPure™ 20X SSC BUFFER diluée 50 fois	
Solution SSC 2X	UltraPure™ 20X SSC BUFFER diluée 10 fois	
Streptavidine	Streptavidin, Alexa Fluor® 594.	LIFE TECHNOLOGIES (REF. S32356)
Trypsine	TRYPsin 1 : 250	PAN™ BIOTECH GmbH (REF.P10-025100P 100g)
Tween 20	Polyéthylène glucol sorbitan monolaurate, polyoxyéthylènesorbitan monolaurate	SIGMA (REF.P1379 500ML)
UltraPure™ 20X SSC BUFFER	3.0 M NaCl, 0.3M Sodium Citrate, pH 7.0 +/- 0.1 (20X concentrate)	INVITROGEN (REF.15557-036)
Vectashield	Vectashield with DAPI	VECTOR LABORATORIES (REF.H-1200)
Solution d'hybridation	Contient de la formamide	SIGMA (H7782 6ML)

**Annexe 2 : Caryotype de chien :**



**AGREMENT SCIENTIFIQUE**

**En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire**

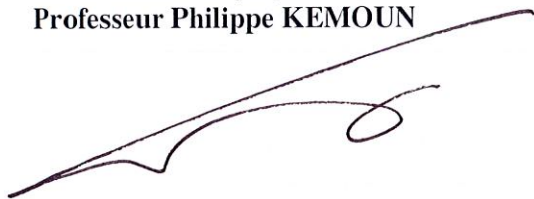
Je soussignée, isabelle RAYMOND-LETRON, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **Charlotte BONNEMAISON** intitulée « **Développement et validation de sondes d'hybridation *in situ* pour le tracking des cellules souches mésenchymateuses canines dérivées du tissu adipeux.** » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 8 novembre 2016  
Docteur Isabelle RAYMOND-LETRON  
Maître de Conférences  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Vu :  
La Directrice de l'Ecole Nationale  
Vétérinaire de Toulouse  
Isabelle CHMITELIN



Vu :  
Le Président du jury :  
Professeur Philippe KEMOUN



Melle Charlotte BONNEMAISON  
a été admis(e) sur concours en : 2011  
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 25/06/2015  
a validé son année d'approfondissement le : 03/11/2016  
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.



Vu et autorisation de l'impression :  
Président de l'Université  
Paul Sabatier  
Monsieur Jean-Pierre VINEL  
Le Président de l'Université Paul Sabatier  
par délégation,  
La Vice-Présidente de la CFVU  
  
Régine ANDRE-OBRECHT





Nom : BONNEMAISON

Prénom : Charlotte

**Développement et validation de sondes d'hybridation *in-situ* pour le tracking des cellules souches mésenchymateuses canines dérivées du tissu adipeux**

**RESUME** :

Les thérapies innovantes, utilisant des cellules souches mésenchymateuses d'origine adipeuse (ASC), offrent des espoirs thérapeutiques très prometteurs en médecine régénérative. Cette étude commence par une présentation des ASC et de leurs mécanismes d'action. Nous exposons également les méthodes actuelles de tracking de ces cellules et l'intérêt du modèle canin dans la recherche sur les ASC. Dans une seconde partie expérimentale nous décrivons la mise en place de deux sondes d'hybridation *in-situ* s'appariant aux chromosomes sexuels de chien, comme méthode de tracking de cellules canine mâle ou femelle. Cette méthode de tracking est validée sur lame cytologique et coupes histologiques tissulaires fixées au formol et incluses en paraffine. Cette technique de tracking s'inscrit dans un projet de suivi d'ASC au sein de l'espèce canine. En effet, une ASC est une cellule nucléée. Elle possède donc l'ensemble des chromosomes de l'organisme dont elle provient. Il est donc possible de différencier sur la base des chromosomes sexuels, une cellule souche provenant d'un mâle, de celle provenant d'une femelle. Cette technique permet alors de suivre au sein d'un organisme, des ASC provenant d'une même espèce mais de sexe différent.

**MOTS CLES** :

Cellule souche mésenchymateuse d'origine adipeuse ; Hybridation *in-situ* ; FISH ; Médecine régénérative ; Modèle canin ; Sonde du chromosome Y ; Sonde du chromosome X ; Sonde chromosomique

**Development and validation of *in situ* hybridization probes for tracking canines adipose derived stem cells**

**ABSTRACT** :

Innovative therapies, using adipose derived stem cells (ASC), offer promising therapeutic hopes in regenerative medicine. This study begins with a presentation of ASC and their mechanisms of action. We also expose the current methods of tracking these cells and the interest of the dog model in research on the ASC. In a second experimental part, we describe the implementation of both *in-situ* hybridization probes mating dog sex chromosomes as tracking method of male or female canine cell. This tracking method is validated on cytology and histological tissues sections fixed with formalin and embedded in paraffin. This tracking technique is part an ASC monitoring project within the canine species. Indeed, an ASC is e nucleated cell. It thus possesses all the chromosomes of the organism from which it comes. Therefore, it is possible to differentiate, on the basis of sex chromosomes, a stem cell from a male of one from a female. Then, this technique makes it possible to follow within an organism, ASCs coming from the same species but of different sex.

**KEY WORDS** :

Adipose derived stem cells ; *In situ* hybridization ; FISH ; Regenerative medicine ; Canine model ; Probe of chromosome Y ; Probe of chromosome X ; Chromosomal probe