



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's version published in: <http://oatao.univ-toulouse.fr/> 25663

**To cite this version:**

Rigal, Julie . *Développement et validation de sondes d'hybridation in situ en fluorescence pour le tracking de précurseurs neuraux dérivés de cellules souches embryonnaires chez le marmouset commun Callithrix Jacchus, petit primate non humain*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse – ENVT, 2019, 122 p.

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

**DEVELOPPEMENT ET VALIDATION DE SONDRES  
D'HYBRIDATION *IN SITU* EN FLUORESCENCE POUR  
LE *TRACKING* DE PRECURSEURS NEURAUUX  
DERIVES DE CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES  
CHEZ LE MARMOuset COMMUN *CALLITHRIX*  
*JACCHUS*, PETIT PRIMATE NON HUMAIN**

---

THESE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

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

*par*

**Julie RIGAL**

Née, le 12 Novembre 1994 à Toulouse (31)

---

**Directeur de thèse : Mme Isabelle RAYMOND**

---

**JURY**

PRESIDENT :

**M Jean-Christophe PAGES**

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

**Mme Isabelle RAYMOND**

Professeure à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

**M Fabrice CONCHOU**

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRES INVITES :

**M Alain PINTON**

Ingénieur de recherche en cytogénétique

**Mme Isabelle LOUBINOUX**

Directrice de recherche à l'INSERM



**Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation  
ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE**

**Directeur par intérim** : Frédéric Bousquet

**PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE**

- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
- M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

**PROFESSEURS 1° CLASSE**

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des aliments d'Origine animale*
- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie Vétérinaire*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootecnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- Mme **HAGEN-PICARD, Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie Médicale Animale et Comparée*

**PROFESSEURS 2° CLASSE**

- Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique, animaux d'élevage*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
- M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*

**PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE**

- Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
- M. **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

**MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE**

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
- M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
- M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
- M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
- Mme **PRIYENKO Nathalie**, *Alimentation*
- M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*

#### MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
- Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- Mme **BOHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
- M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
- M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **DANIELS Hélène**, *Microbiologie-Pathologie infectieuse*
- Mme **DAVID Laure**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- Mme **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
- M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophtalmologie vétérinaire et comparée*
- Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
- Mme **JOURDAN Géraldine**, *Anesthésie - Analgésie*
- Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des Equidés*
- Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
- M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*
- M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
- Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*
- M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction (en disponibilité)*
- Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
- M. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire – Maladies animales réglementées*
- Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

#### ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT CONTRACTUELS

- M. **DIDIMO IMAZAKI Pedro**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- M. **LEYNAUD Vincent**, *Médecine interne*
- Mme **ROBIN Marie-Claire**, *Ophtalmologie*
- M. **TOUITOU Florian**, *Alimentation animale*

#### ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- Mme **BLONDEL Margaux**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- M. **CARTIAUX Benjamin**, *Anatomie-Imagerie médicale*
- M. **COMBARROS-GARCIA Daniel**, *Dermatologie vétérinaire*
- M. **GAIDE Nicolas**, *Histologie, Anatomie Pathologique*
- M. **JOUSSERAND Nicolas**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- M. **LESUEUR Jérémy**, *Gestion de la santé des ruminants – Médecine collective de précision*

**A Monsieur le Professeur Jean-Christophe PAGES,**

Professeur des Universités, Praticien Hospitalier en biologie cellulaire et cytologie à l'Université Paul Sabatier de Toulouse.

*Qui m'a fait l'honneur d'accepter de présider ce jury. Hommages respectueux.*

**A Madame le Professeur Isabelle RAYMOND-LETRON**

Professeur en histologie et anatomie pathologique à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

*Qui m'a fait l'honneur de diriger cette thèse. Pour votre disponibilité et votre bienveillance à mon égard. Sincères remerciements.*

**A Monsieur le Docteur Fabrice CONCHOU**

Maitre de conférence en imagerie médicale à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

*Pour sa participation à ce jury de thèse. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.*

**A Monsieur le Docteur Alain PINTON**

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

*Pour le temps que vous y avez consacré, votre grande disponibilité et vos précieux conseils. Profonde gratitude, sincères remerciements.*

**A Madame le Docteur Isabelle LOUBINOUX**

Directeur de recherche à l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale de Toulouse en plasticité neuromotrice, médecine régénérative et médicaments innovants post-AVC.

*Pour nous avoir confié ce projet. Pour votre étroite collaboration au sein de ma thèse. Profonde gratitude, sincères remerciements.*



# TABLE DES MATIERES

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>11</b>
<b>1. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>15</b>
1.1. INTERET DES CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES EN MEDECINE REGENERATIVE .....	15
1.1.1. <i>Définition</i> .....	15
1.1.2. <i>Etat actuel de la recherche sur les cellules souches embryonnaires</i> .....	16
1.1.3. <i>Cellules souches embryonnaires humaines, point de vue éthique</i> .....	18
1.1.4. <i>Cellules souches embryonnaires chez le marmouset commun (Callithrix jacchus)</i>	
20	
1.2. CONNAISSANCES ACTUELLES SUR LE MECANISME D'ACTION DES CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES .....	21
1.2.1. <i>Propriétés biologiques des cellules souches embryonnaires</i> .....	21
1.2.1.1. Autorenouveauement.....	21
1.2.1.2. Pluripotence .....	23
1.2.2. <i>Modes d'administration des cellules souches embryonnaires</i> .....	24
1.2.2.1. Types d'administrations de cellules souches embryonnaires déjà réalisées	25
1.2.2.2. Mise au point d'un support non biodégradable destiné à l'administration intracrânienne de cellules souches embryonnaires.....	25
1.3. METHODES CONNUES DE SUIVI DES CELLULES SOUCHES .....	27
1.3.1. <i>Marquage in vivo en temps réel</i> .....	27
1.3.1.1. Marquage direct.....	27
1.3.1.1.1. Marquage par des méthodes d'imagerie par résonance magnétique ....	28
1.3.1.1.2. Marquage par tomographie par émission de positons (PET) ou mono-photonique (SPECT) .....	29
1.3.1.1.3. Marquage par fluorescence optique.....	31
1.3.1.2. Marquage indirect.....	33
1.3.1.2.1. Imagerie par bioluminescence .....	34
1.3.1.2.2. Imagerie par résonance magnétique.....	35
1.3.1.2.3. Tomographie par émission de positons ou mono-photonique .....	37
1.3.2. <i>Marquage post mortem</i> .....	38
1.3.2.1. Immunohistochimie.....	38
1.3.2.2. Hybridation <i>in situ</i> .....	39
1.3.2.2.1. Principe de l'hybridation in situ.....	40
1.3.2.2.2. Application de l'hybridation in situ au marquage post mortem des cellules souches	41

1.3.3.	<i>Bilan sur les techniques de marquage</i> .....	42
1.4.	INTERET DES SONDES DIRIGÉES VERS LES CHROMOSOMES SEXUELS .....	44
1.5.	CHOIX DU MARMOuset COMMUN COMME MODELE ANIMAL .....	46
<b>2.</b>	<b>ETUDE EXPERIMENTALE</b> .....	<b>49</b>
2.1.	OBJECTIFS DE L'ETUDE.....	49
2.1.1.	<i>Contexte</i> .....	49
2.1.2.	<i>Buts de l'étude</i> .....	51
2.1.3.	<i>Rappel du principe de réalisation des sondes</i> .....	52
2.2.	MATERIELS ET METHODES .....	53
2.2.1.	<i>Culture cellulaire</i> .....	53
2.2.1.1.	Culture cellulaire à partir de sang total.....	53
2.2.1.1.1.	Prélèvement et mise en culture.....	53
2.2.1.1.2.	Arrêt des cultures et fixation des cellules .....	54
2.2.1.1.3.	Etalement sur lamelles .....	54
2.2.1.2.	Culture cellulaire à partir d'une biopsie cutanée.....	56
2.2.1.2.1.	Prélèvement et mise en culture.....	56
2.2.1.2.2.	Division et récupération des cellules en division .....	57
2.2.1.2.3.	Fixation des cellules .....	57
2.2.1.2.4.	Etalement sur lamelles .....	58
2.2.2.	<i>Réalisation d'un modèle de caryotype du marmouset commun (Callithrix jacchus)</i> 58	
2.2.2.1.	Etalement sur lames .....	58
2.2.2.2.	Coloration .....	58
2.2.2.2.1.	Coloration conventionnelle.....	58
2.2.2.2.2.	Coloration en bandes G.....	59
2.2.2.3.	Capture des métaphases (logiciel CytoVision® LEICA™) .....	60
2.2.2.4.	Sélection des métaphases.....	60
2.2.2.5.	Découpe des métaphases et classement des chromosomes.....	60
2.2.3.	<i>Microdissection</i> .....	61
2.2.3.1.	Préparation des lamelles .....	61
2.2.3.2.	Matériel nécessaire pour la microdissection .....	62
2.2.3.3.	Procédé utilisé .....	62
2.2.4.	<i>Amplification (kit GenomePlex® Single Cell de SIGMA-ALDRICH™)</i> .....	63
2.2.4.1.	Lyse et fragmentation .....	63
2.2.4.2.	Préparation de la banque de gènes ( <i>gene library</i> ) .....	64
2.2.4.3.	Amplification .....	65

2.2.5.	<i>Réamplification (kit Genomeplex® WGA Reamplification de SIGMA-ALDRICH™)</i>	65
2.2.6.	<i>Préparation d'ADN compétiteur (kit Nucléobond® Buffer Set IV de MACHEREY-NAGEL™)</i>	66
2.2.6.1.	Matériel nécessaire	66
2.2.6.2.	Préparation des solutions	66
2.2.6.3.	Lyse des tissus	67
2.2.6.4.	Migration et élution sur colonnes	67
2.2.6.5.	Sonication et dosage par spectrophotométrie	68
2.2.7.	<i>Réalisation des sondes (méthode de FISH)</i>	69
2.2.7.1.	Marquage ADN (kit BioPrime® de INVITROGEN™)	69
2.2.7.2.	Précipitation des sondes	69
2.2.7.3.	Préparation des sondes	70
2.2.8.	<i>Hybridation in situ sur lames cytologiques</i>	70
2.2.8.1.	Préparation des lames cytologiques	70
2.2.8.2.	Hybridation	70
2.2.8.2.1.	Protocole d'hybridation à l'Hybridizer® DAKO™	70
2.2.8.2.2.	Protocole d'hybridation avec pré-étapes de dénaturation	71
2.2.8.3.	Lavages stringents	71
2.2.8.4.	Préparation des anticorps	72
2.2.8.5.	Révélation	72
2.2.8.6.	Observation des lames	73
2.2.9.	<i>Hybridation in situ sur coupes histologiques</i>	73
2.2.9.1.	Préparation des lames	73
2.2.9.1.1.	Réalisation des lames	73
2.2.9.1.2.	Déparaffinage et réhydratation	73
2.2.9.1.3.	Étapes de prétraitement	74
2.2.9.2.	Hybridation à l'Hybridizer® DAKO™	74
2.2.9.3.	Lavages	75
2.2.9.4.	Préparation des anticorps et révélation	75
2.3.	RESULTATS	77
2.3.1.	<i>Cultures cellulaires</i>	77
2.3.2.	<i>Caryotypes</i>	79
2.3.2.1.	Caryotype de l'espèce <i>Callithrix jacchus</i> en coloration conventionnelle	79
2.3.2.2.	Caryotype de l'espèce <i>Callithrix jacchus</i> en coloration en bandes G	80
2.3.2.3.	Caractéristiques des chromosomes sexuels chez <i>Callithrix jacchus</i>	82
2.3.3.	<i>Sondes chromosomiques</i>	83
2.3.3.1.	<i>Rappel du principe de réalisation des sondes</i>	83

2.3.3.2.	<i>Test des sondes sur lames cytologiques</i>	83
2.3.3.2.1.	Premiers résultats	83
2.3.3.2.1.1.	Sonde du chromosome Y	83
2.3.3.2.1.2.	Sonde du chromosome X	84
2.3.3.2.2.	Influence de la nature et de la quantité d'ADN compétiteur	86
2.3.3.2.2.1.	Production d'ADN compétiteur de marmouset commun « maison »	86
2.3.3.2.2.2.	Hybridation des sondes X et Y et influence de l'ADN compétiteur utilisé	87
2.3.3.3.	<i>Test des sondes sur coupes histologiques</i>	90
2.3.3.3.1.	Test des sondes sur coupes histologiques d'intestin grêle	91
2.3.3.3.2.	Test des sondes sur coupes histologiques de testicules	92
2.4.	DISCUSSION	97
2.4.1.	<i>Réalisation du caryotype de marmouset commun (Callithrix jacchus)</i>	97
2.4.1.1.	Type cellulaire utilisé et traitement des cultures	97
2.4.1.2.	Classement des chromosomes	97
2.4.2.	<i>Production de sondes de chromosomes sexuels</i>	98
2.4.2.1.	Type cellulaire utilisé	98
2.4.2.2.	Digestion à la trypsine	99
2.4.2.3.	Nombre de chromosomes récupérés par microdissection	99
2.4.2.4.	Délai entre la microdissection et l'amplification	100
2.4.3.	<i>Influence de l'ADN compétiteur</i>	100
2.4.3.1.	Utilisation d'ADN compétiteur humain « COT »	100
2.4.3.2.	Utilisation d'ADN compétiteur de marmouset « maison »	101
2.4.4.	<i>Hybridation sur lames cytologiques et histologiques</i>	102
2.4.4.1.	Influence de la méthode d'hybridation	102
2.4.4.2.	Importance du pré-traitement des lames histologiques	102
2.4.4.3.	Evaluation de la reproductibilité de la méthode sur lames d'encéphale de marmouset commun	103
	<b>CONCLUSION</b>	<b>105</b>
	<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>107</b>
	<b>ANNEXES</b>	<b>121</b>

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

Tableau 1 : Avantages et inconvénients des différentes techniques de marquage cellulaire (d'après Evilsizor et al., 2015 ; Cen et al., 2016 ; Bonnemaïson, 2017) ....	42
Tableau 2 : Composition des solutions utilisées pour la coloration en bandes G .....	59
Tableau 3 : Cycle d'incubation au <i>thermal cycler</i> pour la préparation de la banque de gènes.....	64
Tableau 4 : Cycles d'incubation au <i>thermal cycler</i> pour l'amplification .....	65
Tableau 5 : Cycles d'incubation au <i>thermal cycler</i> pour la réamplification.....	66
Figure 1 : Répartition des essais cliniques sur les cellules souches embryonnaires par pays (source : <a href="http://www.clinicaltrials.com">www.clinicaltrials.com</a> ) .....	18
Figure 2 : Illustration des deux types de division cellulaire, symétrique et asymétrique (Berika et al., 2014) .....	22
Figure 3 : Aspect microscopique du biomatériau mis au point par Bédurier et al. (Bédurier et al., 2011).....	26
Figure 4 : Réaction chimique catalysée par l'enzyme <i>Firefly luciferase</i> (Fluc) (Kim et al., 2015).....	34
Figure 5 : Schéma illustrant deux techniques d'immunohistochimie (d'après Evilsizor et al., 2015).....	39
Figure 6 : Structure schématique de la molécule d'ADN (source : <a href="http://sequencing-genome.com">sequencing-genome.com</a> ).....	40
Figure 7 : Principe de l'hybridation in situ en fluorescence (d'après un schéma du site internet <a href="http://www.biovisible.com/">http://www.biovisible.com/</a> ) .....	52
Figure 8 : Observation de métaphases après étalement d'un culot cellulaire (grossissement x 100) .....	55
Figure 9 : Image au microscope inversé d'une métaphase au niveau de laquelle l'aiguille de microdissection (à droite) a été approchée (grossissement x 1000) .....	63
Figure 10 : <i>Smear</i> obtenu lors de l'électrophorèse de notre ADN compétiteur de marmouset commun.....	68
Figure 11 : Observation microscopique de l'évolution des cultures cellulaires à partir d'une biopsie cutanée de marmouset commun (x 100) .....	78
Figure 12 : Métaphase d'une cellule de <i>Callithrix jacchus</i> à $2n = 46$ en coloration conventionnelle (grossissement x 1000) .....	79

Figure 13 : Caryotype de l'espèce <i>Callithrix jacchus</i> (individu mâle XY) en coloration conventionnelle (grossissement x 1000) .....	80
Figure 14 : Métaphase d'une cellule de <i>Callithrix jacchus</i> en coloration en bandes G (grossissement x 1000) .....	81
Figure 15 : Caryotype de <i>Callithrix jacchus</i> (sujet mâle XY) en coloration en bandes G (grossissement x 1000) .....	81
Figure 16 : Chromosome Y de marmouset commun en coloration en bandes G (grossissement x 2000) .....	82
Figure 17 : Chromosome X de marmouset commun en coloration en bandes G (grossissement x 2000) .....	82
Figure 18 : Métaphase de cellule de marmouset mâle après hybridation de sonde du chromosome Y (grossissement x1000) .....	84
Figure 19 : Métaphase de cellule de marmouset mâle après hybridation de sonde du chromosome X (grossissement x1000) .....	85
Figure 20 : Métaphase de cellule de marmouset mâle après hybridation de sonde préparée à partir d'ADN compétiteur de marmouset "maison" uniquement (grossissement x1000) .....	87
Figure 21 : Métaphase de cellule de marmouset mâle après hybridation de sondes de X et Y préparées avec 10 µg d'ADN compétiteur de marmouset "maison" (grossissement x1000) .....	88
Figure 22 : Métaphase de cellule de marmouset mâle après hybridation de sondes de X et Y préparées avec 10 µg d'ADN compétiteur de marmouset "maison" et 10 µg d'ADN compétiteur humain « COT » (grossissement x1000) .....	89
Figure 23 : Noyaux interphasiques de cellules de marmouset mâle après hybridation de sondes de X et Y préparées avec 10 µg d'ADN compétiteur de marmouset "maison" et 10 µg d'ADN compétiteur humain « COT » (grossissement x1000) .....	90
Figure 24 : Noyaux de cellules de la sous-muqueuse de l'intestin grêle de marmouset mâle après hybridation de sonde de Y et de X préparées avec 10 µg d'ADN compétiteur de marmouset "maison" et 10 µg d'ADN compétiteur humain « COT » (grossissement x1000) .....	91
Figure 25 : Schémas représentant un testicule en coupe longitudinale (A), une coupe transversale de tube séminifère (B), les types cellulaires retrouvés en coupe transversale de tube séminifère (C), et les étapes de méiose correspondantes (D) (d'après un schéma de l'Université De Boeck, 2007) .....	92

Figure 26 : Schéma simplifié des étapes de méiose ( <i>d'après un dessin original de Michel Hamels</i> ).....	93
Figure 27 : Noyaux de cellules de testicules de marmouset après hybridation de sonde de chromosome Y et de sonde de chromosome X préparées avec 10 µg d'ADN compétiteur de marmouset "maison" et 10 µg d'ADN compétiteur humain « COT » (grossissement x400) .....	94
Figure 28 : Noyaux de cellules de testicule de marmouset après hybridation de sonde de chromosome Y et de sonde de chromosome X préparées avec 10 µg d'ADN compétiteur de marmouset "maison" et 10 µg d'ADN compétiteur humain « COT » (grossissement x1000) .....	95

## TABLE DES ANNEXES

Annexe 1 : Détails et références concernant les produits utilisés dans cette étude	121
--	-----



## LISTE DES ABREVIATIONS

ADN = Acide DésoxyriboNucléique

ARN = Acide RiboNucléique

ATP = Adénosine-TriPhosphate

AVC = Accident Vasculaire Cérébral

BAC = *Bacterial Artificial Chromosome* = chromosome bactérien artificiel

BLI = *BioLuminescence Imaging* = imagerie par bioluminescence

CCNE = Comité Consultatif National d'Éthique

CEST = *Chemical Exchange Saturation Transfer* = transfert de saturation par échange chimique

*Cf.* = *Confer* = se reporter à

CISH = *Chromogenic In Situ Hybridization* = hybridation *in situ* chromogène

ConA = Concanavoline A

CSE = Cellule Souche Embryonnaire

CSED = Cellule Souche Embryonnaire Différenciée

CSEH = Cellule Souche Embryonnaire Humaine

CSEM = Cellule Souche Embryonnaire de Marmouset

CSM = Cellule Souche Mésenchymateuse

DCA = Division Cellulaire Asymétrique

DMLA = Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age

Dr. = Docteur

ENVT = Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

FISH = *Fluorescence In Situ Hybridization* = hybridation *in situ* en fluorescence

FLI = *FLuorescence Imaging* = imagerie par fluorescence

Fluc = *Firefly luciferase*

HSV1-tk = *Herpes Simplex Virus* de type 1-thymidine kinase

IHC = ImmunoHistoChimie

INRA = Institut National de la Recherche Agronomique

INSERM = Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale

IPS = *Induced Pluripotent Stem cell* = cellule souche pluripotente induite

IRM = Imagerie par Résonance Magnétique

NIS = *Sodium Iodide symporter*

PAL = Phosphatase ALcaline

PCR = *Polymerase Chain Reaction* = amplification en chaîne par polymérase

PDMS = *PolyDiMethylsiloxane Substrate*

PET = *Positron Emission Tomography* = tomographie par émission de positons

PKW = *Pokeweed*

PNH = Primate Non Humain

Pr. = Professeur

PSM = Poste de Sécurité Microbiologique

QD = *Quantum Dots* = points quantiques

Réf. = Référence

Rluc = *Renilla luciferase*

RMN = Résonance Magnétique Nucléaire

SAF594 = *Streptavidin, Alexa Fluor® 594*

SPECT = *Single Positron Emission Computed Tomography* = tomographie par émission mono-photonique

SPIO = *SuperParamagnetic Iron Oxide* = oxyde de fer superparamagnétique

SSC = *Saline Sodium Citrate*

TE = Tris HCl-EDTA

ToNIC = *Toulouse NeuroImaging Center*

UMR = Unité Mixte de Recherche

# INTRODUCTION

A l'heure actuelle, la médecine régénérative fournit de nombreuses innovations en matière de thérapeutique. Ce domaine médical consiste à exploiter les multiples possibilités offertes par les cellules souches en vue d'applications thérapeutiques. La médecine régénérative a déjà prouvé son efficacité dans différents domaines, que ce soit en médecine humaine ou vétérinaire. Elle fait pourtant partie des disciplines médicales encore méconnues du grand public. En effet, la médecine régénérative en est à ses débuts et se heurte aujourd'hui à deux principales problématiques : de possibles graves effets secondaires et des controverses éthiques.

Le terme de « médecine régénérative » est utilisé depuis une vingtaine d'années seulement. En 1992, dans un article d'une administration hospitalière américaine, le Dr. Leland Kaiser, parle d'une « nouvelle branche de la médecine qui se développera et tentera de modifier le cours des maladies chroniques et, dans de nombreux cas, régénérera les organismes fatigués et défaillants » (Kaiser, 1992). À la suite de cela, les premiers succès de la médecine régénérative virent le jour en 2008, lorsque le Professeur Paolo Macchiarini, de l'université de Barcelone, effectua une transplantation trachéale réussie chez une patiente souffrant de collapsus bronchique sévère. Le tissu greffé a été produit à partir d'une trachée de donneur humain qui a été colonisée par des cellules épithéliales et des chondrocytes dérivés de cellules souches qui avaient été cultivées à partir de cellules prélevées chez le receveur. Cette greffe a ensuite été utilisée pour remplacer la bronche principale gauche de la patiente (Macchiarini et al., 2008). Depuis, de nouvelles avancées ne cessent d'être accomplies en médecine régénérative.

Les cellules souches en général et, plus particulièrement les cellules souches embryonnaires, sont dotées d'une capacité de multiplication à l'infini (on parle d'autorenouveau) et d'un vaste potentiel de différenciation (notion de pluripotence). Des techniques pointues de prélèvement, de culture et d'amplification sont nécessaires à leur production et à leur utilisation thérapeutique. Le développement de ces techniques est un enjeu majeur actuellement. Des chercheurs japonais ont su par exemple, produire des lignées de précurseurs neuraux dérivés de cellules souches embryonnaires chez le marmouset commun (*Callithrix jacchus*), un petit primate non humain (Sasaki et al., 2005 ; Shimada et al., 2012). Ces cellules ont, par la suite, fourni des résultats très encourageants lors d'un essai sur la récupération

motrice fonctionnelle de rats ayant subi des lésions de la moelle spinale (Iwai et al., 2015). La production de ce type de lignées cellulaires ouvre les portes de nouveaux espoirs thérapeutiques quant à la guérison de lésions que l'on a longtemps considérées comme irréversibles. En effet, il existe encore actuellement un grand nombre de maladies pour lesquelles l'offre thérapeutique est limitée, en particulier dans le domaine des affections neurologiques.

Avec l'augmentation du nombre d'accidents vasculaires cérébraux (AVC) ces dernières années, les instituts tels que l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) avec des unités de recherche telles que ToNIC (*Toulouse NeuroImaging Center*, UMR 1214, Toulouse, France), travaillent sur de nouvelles solutions thérapeutiques. Les chercheurs de l'unité ToNIC ont, entre autres, développé un biomatériau non dégradable capable de favoriser et de guider la différenciation de précurseurs neuraux issus de cellules souches embryonnaires en cellules neurales (Bédier et al., 2011 ; 2012). Ce matériau appelé *PolyDiMethylsiloxane Substrate* (PDMS), a déjà montré des résultats prometteurs chez des souris atteintes de lésions cérébrales (Davoust et al., 2017). L'objectif étant, à terme, de développer des thérapies cellulaires permettant la récupération fonctionnelle motrice de patients humains ayant subi un AVC ou toute autre lésion neurologique.

Dans le but de tester l'innocuité et l'efficacité des thérapies régénératives pour la récupération de lésions cérébrales et neurologiques, le modèle murin a déjà été utilisé à de nombreuses reprises. Ainsi, dans la continuité de ces recherches, l'emploi d'un primate non humain tel que le marmouset commun (*Callithrix jacchus*) s'est imposé. En effet, le marmouset est un animal utilisé assez couramment en neurosciences car il est adapté aux études précliniques de nombreuses thérapies. En outre, il existe des similarités entre les systèmes hématopoïétiques et immunitaires des humains et de ces petits primates, les rendant aptes à être utilisés pour des études de médecine régénérative (Hibino et al., 1999 ; Mansfield, 2003).

Dans le cadre d'un projet mené par le Docteur Isabelle Loubinoux et l'équipe iDREAM (Université Toulouse III Paul Sabatier, INSERM, *Toulouse NeuroImaging Center*, UMR 1214, Toulouse, France), des cellules souches embryonnaires de marmouset commun (fournies par E. Sasaki) prédifférenciées en précurseurs neuraux et associées au biomatériau utilisé par Davoust et al. (Davoust et al., 2017) sont administrées à des marmousets communs atteints de lésions du cortex moteur en vue d'étudier leur

récupération fonctionnelle motrice. Pour pouvoir suivre leur devenir dans le tissu nerveux, la mise en place d'un suivi (*tracking*) cellulaire s'avère nécessaire.

Il existe de nombreux systèmes de *tracking* cellulaire à l'heure actuelle : l'imagerie par résonance magnétique (IRM), la tomographie par émission mono-photonique (SPECT) ou par émission de positons (PET), l'imagerie par fluorescence optique et bioluminescence (FLI et BLI), et d'autres techniques moins courantes. On différencie les méthodes *in vivo* dites « en temps réel » qui peuvent être directes ou indirectes, des méthodes employées *post mortem* sur coupes histologiques. Ces techniques peuvent être utilisées séparément ou conjointement selon l'objectif visé.

Dans cette étude, l'utilisation de sondes chromosomiques hybridées *in situ* a été choisie. La méthode de « FISH » (*Fluorescence In Situ Hybridization*) a, pour ce faire, été employée. Cette technique de marquage des cellules *post mortem* n'entraîne pas de modifications cellulaires du vivant de l'animal. Ceci permet donc de s'affranchir des biais éventuels générés par les techniques de marquage *in vivo* qui peuvent entraîner des modifications du fonctionnement et de la viabilité des cellules marquées. Les sondes produites dans notre étude sont dirigées vers les chromosomes sexuels (X et Y) du noyau cellulaire afin de différencier les précurseurs dérivés de cellules souches embryonnaires mâles exogènes, des cellules de l'individu femelle transplanté. Utiliser des marqueurs cellulaires intrinsèques tels que les chromosomes sexuels, permet d'éviter toute manipulation de la cellule en amont.

Ainsi, l'objet de cette étude est de fabriquer ces sondes d'ADN et de les tester sur des préparations chromosomiques (métaphases et noyaux interphasiques) puis sur des coupes histologiques afin qu'elles puissent être utilisées par la suite comme technologie au service du projet de recherche de l'équipe iDREAM (Université Toulouse III Paul Sabatier, INSERM, *Toulouse NeuroImaging Center*, UMR 1214, Toulouse, France). Cette sonde devra révéler les précurseurs neuraux issus de cellules souches embryonnaires de marmouset mâle administrés au sein du tissu nerveux d'un individu femelle sur une coupe histologique.



# 1. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

## 1.1. Intérêt des cellules souches embryonnaires en médecine régénérative

### 1.1.1. Définition

Le terme « cellule souche » désigne une cellule capable de proliférer indéfiniment par mitoses (notion d'autorenouvellement) et de produire, par un processus de différenciation, des cellules tissulaires spécialisées (notion de multipotence).

On distingue deux types de cellules souches : les cellules souches pluripotentes et les cellules souches multipotentes. Les cellules qui sont dites pluripotentes sont capable de se différencier en tout type cellulaire, d'origine mésodermique, endodermique ou ectodermique. Les deux principaux types de cellules souches pluripotentes étudiés actuellement sont les cellules souches embryonnaires (CSE) et les cellules souches pluripotentes induites (IPS). Les cellules souches dites multipotentes ne sont capables de se différencier qu'en un nombre restreint de lignées cellulaires. Ce sont par exemple les cellules souches mésenchymateuses (CSM).

En 1981, le terme « cellule souche embryonnaire » a été introduit pour la première fois, il permet de distinguer ces cellules pluripotentes dérivées d'embryons, de cellules pluripotentes dérivées de térato-carcinomes embryonnaires (Evans, Kaufman, 1981 ; Martin, 1981). Les CSE sont définies au minimum par un certain nombre de caractéristiques selon Melton et Cowen (Melton, Cowen, 2009) :

- Capacité d'autorenouvellement
- Multipotence voire pluripotence *in vitro* et *in vivo*
- Clonogénicité (capacité d'une cellule à proliférer sur un milieu donné)
- Caryotype normal pour l'espèce
- Possibilité d'être congelées et décongelées

Les CSE sont pluripotentes, c'est-à-dire qu'elles peuvent se différencier en n'importe quelle lignée cellulaire provenant d'un des trois feuillets embryonnaires (mésoderme, endoderme, ectoderme). Le mésoderme donnant notamment les cellules des muscles, du sang, des vaisseaux sanguins, du cœur ; l'endoderme est, lui, à l'origine des cellules du pancréas, du foie, de l'estomac, des poumons, de la vessie et des cellules

germinales ; enfin, l'ectoderme est à l'origine des cellules de l'encéphale, de la moelle spinale, des nerfs, de la peau et des dents. Ainsi, plus de 220 types cellulaires peuvent résulter de la différenciation des CSE.

### 1.1.2. Etat actuel de la recherche sur les cellules souches embryonnaires

Les premières cellules souches embryonnaires humaines (CSEH) dérivées de blastocytes ont été établies en 1998 par J. A. Thomson (Thomson, 1998). Les cellules souches embryonnaires (CSE) sont actuellement largement plébiscitées par la recherche en médecine régénérative pour leur pluripotente et leur capacité d'autorenouveau. Elles ont le potentiel pour être employées comme outil thérapeutique chez des sujets atteints de maladies immunitaires, génétiques, endocriniennes, oculaires voire néoplasiques.

La recherche sur les CSE connaît un essor ces dernières années. En entrant les mots clefs « *embryonic stem cell* » dans le site de publications scientifiques PubMed ([www.pubmed.com](http://www.pubmed.com)), 50113 publications scientifiques s'affichent en 2018 contre 12329 en 2005. Depuis 2005, plus de 2000 publications contenant ces mots clefs paraissent sur le site chaque année. Cela témoigne de l'intérêt que porte le monde de la recherche pour les CSE.

D'après une page du site internet de l'INSERM ([www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/cellules-souches-embryonnaires-humaine](http://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/cellules-souches-embryonnaires-humaine)) : « L'utilisation de cellules souches embryonnaires en thérapie cellulaire a déjà donné lieu à plusieurs essais cliniques. Cette approche consiste à obtenir des cellules spécialisées saines et fonctionnelles à partir de cellules souches embryonnaires, puis à les injecter à un patient pour régénérer un organe ou restaurer sa fonction. Les cellules utilisées dans le cadre de ces essais doivent répondre à des normes strictes de qualité requises pour un usage thérapeutique et être agréées par les autorités de santé. Ces cellules sont dites de "grade clinique".

Une société de biotechnologie américaine (Ocata Therapeutics™) utilise par exemple des CSE humaines différenciées en cellules de la rétine pour lutter contre la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) et des CSEH différenciées en cellules épithéliales pigmentaires de la rétine pour soigner la dystrophie maculaire de Stargardt. Des essais cliniques sont actuellement en cours pour évaluer la sécurité de cette approche et son effet thérapeutique.

De la même manière, le laboratoire I-Stem (unité INSERM 861) travaille sur des CSEH différenciées en kératinocytes pour traiter les ulcères cutanés liés à la drépanocytose.

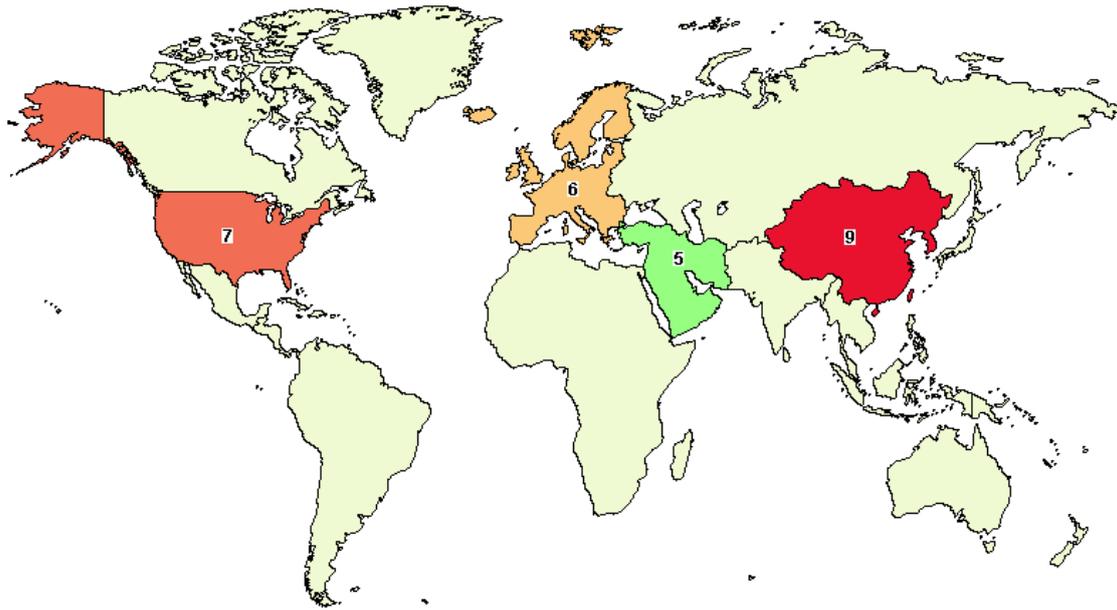
Dans le domaine de la cardiologie, une équipe de l'hôpital européen Georges Pompidou (unité Inserm 970) a pratiqué, en octobre 2014, une greffe de cellules cardiaques dérivées de CSEH, selon un procédé développé par des chercheurs de l'hôpital Saint-Louis (unité Inserm 1160). Dix semaines après, l'état de la patiente, une femme âgée de 68 ans atteinte d'insuffisance cardiaque sévère, s'est nettement amélioré, sans complication apparente.

Une autre maladie ciblée par ce type d'approche : le diabète de type I. Des recherches sont actuellement en cours pour tester l'effet de l'utilisation de cellules de pancréas productrices d'insuline obtenues à partir de CSEH différenciées. L'objectif étant de restaurer la production d'insuline à long terme chez les patients traités. Les résultats précliniques sont encourageants ».

Mais l'INSERM rappelle sur son site internet, qu'il faut rester prudent car actuellement aucun traitement à base de CSEH n'est disponible en routine. En effet, certains pays comme le Mexique, le Panama et l'Inde proposent des thérapies cellulaires extrêmement coûteuses afin de traiter, entre autres, des maladies neuro-dégénératives. Ces approches thérapeutiques ne sont pas encore validées et n'offrent pas les garanties d'efficacité et de sécurité recommandées par les autorités de santé.

D'après le site [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), seuls 27 essais cliniques sur les CSE sont en cours actuellement, parmi eux, 17 concernent des CSE différenciées en cellules de la rétine. Ces essais cliniques se répartissent principalement entre les Etats-Unis, l'Europe et la Chine (*cf.* Figure 1). Ce résultat contraste avec le nombre d'essais cliniques sur les cellules souches mésenchymateuses par exemple, soit 707 essais cliniques dans le monde à l'heure actuelle. Cette différence résulte possiblement des problématiques éthiques et de sécurité qui freinent l'utilisation des CSEH en thérapeutique.

Figure 1 : Répartition des essais cliniques sur les cellules souches embryonnaires par pays (source : [www.clinicaltrials.com](http://www.clinicaltrials.com))



### 1.1.3. Cellules souches embryonnaires humaines, point de vue éthique

Les cellules souches embryonnaires humaines (CSEH) sont produites à partir de la masse cellulaire interne, prélevée sur des embryons entre le cinquième et le septième jour suivant la fécondation (au stade de blastocyte). En pratique, elles proviennent d'embryons humains surnuméraires obtenus par fécondation *in vitro*. Les parents doivent alors signer un consentement pour céder leurs embryons à la recherche. Certains laboratoires détiennent ainsi des lignées cellulaires et les commercialisent pour la recherche.

Les CSEH peuvent poser un problème d'éthique car leur prélèvement nécessite la destruction d'un embryon humain, et donc d'une vie humaine potentielle. En fonction des différences culturelles et religieuses, les avis divergent. Par exemple, selon la religion juive, l'embryon prend vie plus tard au cours du développement, c'est pourquoi elle ne s'oppose pas au prélèvement de CSEH en général. L'Église catholique estime que la vie débute au stade de l'ovule fécondé, elle prend donc position contre le prélèvement de CSEH. D'autres croyances abordent la question différemment : par exemple, les bouddhistes jugent que le bénéfice pouvant découler de ces recherches en termes de santé humaine justifie ce sacrifice. Néanmoins, toutes les cultures s'accordent sur le fait que l'embryon ne peut être instrumentalisé à des fins de

recherche. Il ne peut donc être conçu dans cette seule finalité, mais uniquement dans un but parental.

Avant 2010, le rapport de la Mission d'Information Parlementaire préconisait le maintien de l'interdiction de la recherche avec dérogations concernant les CSEH. En 2010, dans son avis n°112, le Comité Consultatif National d'Ethique (CCNE) a émis plusieurs recommandations :

- « - un refus de réification de l'embryon humain, et une reconnaissance du respect qui lui est dû en tant que « personne humaine potentielle » ;
- un refus de « donner une définition normative » de l'embryon humain ;
- un respect se manifestant par la nature des conduites prescrites à son égard ;
- une distinction entre les problèmes éthiques et les conduites autorisées en fonction de son état pré-implantatoire, *in vitro*, ou de son développement dans le corps de sa mère ;
- un refus de création d'embryons humains à visée de recherche ;
- une autorisation de la destruction d'embryons humains surnuméraires en cas d'abandon du projet parental et d'absence d'accueil des embryons par d'autres couples ;
- et une autorisation sous conditions, dans ce cadre, de certaines recherches sur l'embryon humain conçu *in vitro* avant sa destruction, et sur des cellules issues d'embryons humains conçus *in vitro* et détruits avant transfert ».

D'après cet avis émis en 2010, le CCNE semble globalement favorable à la recherche sur les CSEH issues d'embryons humains, à condition que ces embryons n'aient pas été conçus à visée de recherche.

En France, depuis la révision de la loi de bioéthique de 2013, la recherche sur les CSEH est autorisée, mais reste très encadrée. Les projets doivent être autorisés par l'Agence de la Biomédecine. Pour ce faire, ils doivent répondre à plusieurs critères relatifs à leur pertinence, à l'éthique, à l'objectif d'apporter des progrès médicaux majeurs, et au fait de ne pouvoir être réalisés en utilisant d'autres types cellulaires.

Chez les mammifères, la législation concernant la recherche sur les CSE est différente. Les embryons dans le dernier tier de gestation sont soumis aux mêmes obligations éthiques que les jeunes et les adultes qui sont dans le champ de la directive 2010/63. Avant le dernier tier de gestation, les embryons sont hors champ de cette directive mais la consultation d'un comité éthique à l'aide d'une saisine est

recommandée. En revanche, si l'embryon est produit *in vivo*, la mère porteuse est pleinement dans le champ de la directive pour tout ce qu'elle peut subir : stimulation ovarienne, prise de sang, anesthésie, laparotomie, césarienne, avortement.

#### 1.1.4. Cellules souches embryonnaires chez le marmouset commun (*Callithrix jacchus*)

*Callithrix jacchus* est une espèce de primate de la famille des Callitrichidae. En captivité, la femelle atteint sa maturité sexuelle à l'âge d'un an environ. Cependant, elle est rarement mise à la reproduction avant l'âge d'un an et demi. La gestation chez le marmouset commun dure entre 143 et 144 jours. Les femelles donnent naissance en moyenne à 3 petits, la taille de la portée peut varier de 1 à 5 (Tardif et al., 2003).

Peu de lignées de cellules souches embryonnaires de marmouset (CSEM) existent actuellement. Elles sont produites principalement au Japon par l'équipe d'Erika Sasaki grâce à des mères porteuses de l'espèce *Callithrix jacchus*. Les blastocytes sont prélevés sept à dix jours après l'ovulation par laparotomie et rinçage (*flush*) des cornes utérines. Le liquide contenant les blastocytes résultant du rinçage est collecté. La masse cellulaire interne est ensuite isolée à partir des blastocytes grâce à des techniques d'immuno-chirurgie (Solter, Knowles, 1975). L'équipe a pu démontrer la pluripotence *in vivo* et *in vitro* des cellules ainsi obtenues. Les principaux types cellulaires observés sont mésodermiques et ectodermiques et, dans une moindre mesure, endodermiques (Sasaki et al., 2005).

Ces cellules ont ensuite pu être différenciées avec succès en cardiomyocytes par Chen et al. (Chen et al., 2008), en cellules germinales par l'équipe de Thomas Müller (Müller et al., 2009), en cellules neurales par l'équipe d'Hiroko Shimada (Shimada et al., 2012) et en cellules endodermiques par Diekmann et al. (Diekmann et al., 2015).

Shimada et son équipe ont mis au point une méthode efficace de différenciation des CSEM de la lignée 40 en cellules neurales. Les types cellulaires obtenus sont principalement des neurones et des astrocytes. En changeant certaines conditions du milieu de différenciation, ils sont aussi parvenus à obtenir des oligodendrocytes. Ce protocole a ensuite été renouvelé *in vivo* (par implantation dans le cerveau de souris). Il a abouti, à nouveau, à une différenciation des CSEM en neurones, astrocytes et oligodendrocytes, ce qui démontre que la différenciation est aussi effective *in vivo* (Shimada et al., 2012).

## 1.2. Connaissances actuelles sur le mécanisme d'action des cellules souches embryonnaires

Issues de l'embryon à un stade très précoce de son développement, les cellules souches embryonnaires (CSE) sont douées de deux facultés importantes : celle de se multiplier à l'infini par mitose (capacité d'autorenouveaulement), et celle de pouvoir donner naissance à toutes les lignées cellulaires de l'organisme (pluripotence). Par conséquent, les CSE présentent un intérêt majeur non seulement en médecine régénérative mais aussi pour l'étude de maladies génétiques et la recherche de traitements.

### 1.2.1. Propriétés biologiques des cellules souches embryonnaires

#### 1.2.1.1. Autorenewement

Les cellules souches embryonnaires (CSE) peuvent être maintenues en culture indéfiniment en gardant leur capacité à se différencier en n'importe quel type cellulaire grâce à des mécanismes d'autorenouveaulement. Il est capital de comprendre le processus responsable du renouvellement du *pool* de CSE pour espérer pouvoir ensuite générer des lignées de cellules souches, les manipuler et les utiliser à des fins thérapeutiques.

Les CSE se renouveaulement en restant pluripotentes dans des conditions de culture particulières. Par exemple, les cellules murines sont maintenues sur une couche de fibroblastes embryonnaires de souris inactivés pour la mitose (« *mitotically inactivated mouse embryonic fibroblasts* », MEFs en anglais) dans un milieu complété à base de cytokines, facteurs de croissance, et médicaments (Huang et al., 2015). Pour cultiver les CSE de marmouset commun (CSEM), Erika Sasaki et son équipe ont utilisé une couche d'alimentation à base de MEFs ainsi qu'un milieu DMEM (Gibco® DMEM *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) complété avec 20% de *Knockout Serum Replacement* (Invitrogen™), de la L-glutamine, des facteurs de croissance, des antibiotiques (pénicilline, streptomycine) et un antimycotique (l'amphotéricine B) (Sasaki et al., 2005).

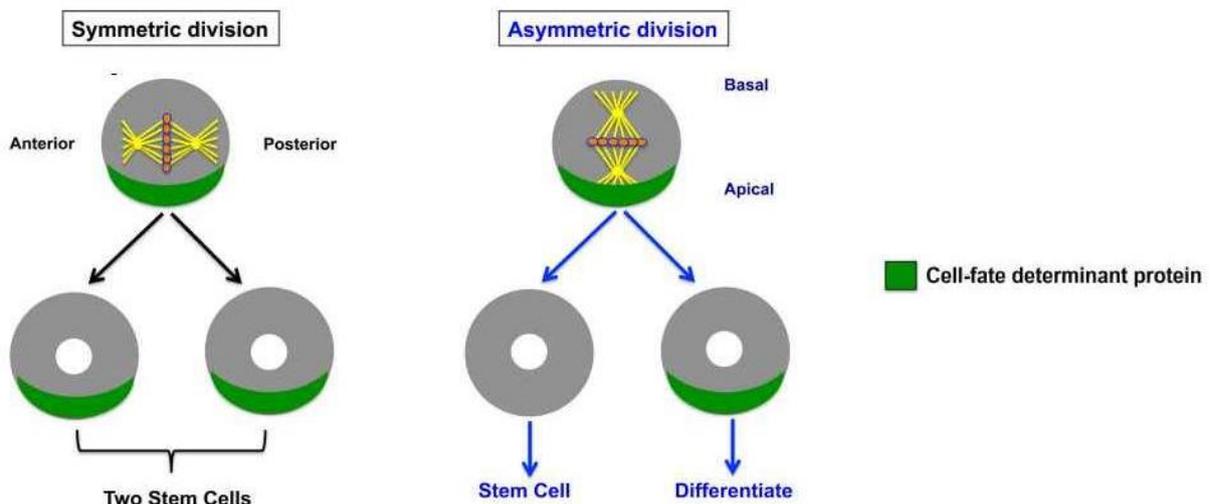
Les CSE peuvent se renouveaulement grâce à des mécanismes de division cellulaire relevant de la mitose. Il existe deux types de division cellulaire : la division symétrique et la division asymétrique. La division symétrique conduit à une prolifération de cellules

filles identiques entre elles et également identiques à la cellule mère. Au contraire, la division cellulaire asymétrique (DCA), capacité propre aux cellules souches, produit deux types de cellules filles : une cellule fille identique à la cellule souche mère, qui sera ensuite capable de se rediviser ; et une cellule fille différenciée en une lignée cellulaire particulière. Les cellules souches peuvent ainsi se diviser selon les deux modalités de division cellulaire, symétrique et asymétrique. La division symétrique mène à l'augmentation du *pool* de cellules souches alors que la DCA entraîne une différenciation d'une des deux cellules filles (cf. Figure 2). La DCA est contrôlée par une combinaison de mécanismes intrinsèques et extrinsèques. Parmi les mécanismes intrinsèques, on trouve la ségrégation préférentielle des déterminants du devenir cellulaire (le déterminant « *Numb* » par exemple). Alors que la communication intercellulaire avec les cellules avoisinantes fait partie des mécanismes extrinsèques contrôlant la DCA (Berika et al., 2014).

Figure 2 : Illustration des deux types de division cellulaire, symétrique et asymétrique (Berika et al., 2014)

*Lors d'une division cellulaire symétrique (schéma de gauche), la zone contenant les déterminants du devenir cellulaire (facteur protéique « *Numb* » par exemple) indiquée en vert est séparée en deux parts égales dans chaque cellules filles. Les cellules filles ainsi obtenues sont deux nouvelles cellules souches identiques à la cellule souche mère.*

*A contrario, lors d'une division cellulaire asymétrique (schéma de droite), une des deux cellules filles hérite de la majorité des déterminants du devenir cellulaire et peut se différencier par la suite alors que l'autre n'hérite que de peu de déterminant ce qui lui permet de conserver sa capacité d'autorenouveaulement.*



L'autorenouveau des cellules souches embryonnaires (CSE) n'est possible que grâce à une haute activité d'une enzyme, la télomérase, une reverse-transcriptase capable d'allonger les télomères. Les télomères sont des répétitions d'ADN présentes au niveau des extrémités chromosomiques, qui assurent la stabilité des chromosomes. La longueur des télomères est diminuée progressivement à chaque division cellulaire. La télomérase permet de réduire considérablement ce phénomène de raccourcissement. Au sein des CSE, la télomérase est activée et maintient la longueur télomérique, assurant une immortalité cellulaire. Lorsque les cellules sont différenciées, le niveau d'activité de la télomérase baisse significativement (Hiyama, Hiyama, 2007).

Au niveau moléculaire, l'avenir de la CSE est contrôlé par les réseaux de régulation de la transcription intracellulaire qui répondent à divers stimuli de signalisation extrinsèques. La capacité d'autorenouveau d'une lignée de CSE est caractérisée par l'expression de plusieurs facteurs de transcription dont c-Myc, Esrrb, Tfcp2l1, YAP, et Pim1/3 (Cartwright et al., 2005 ; Martello et al., 2012 ; Ye et al., 2013 ; Tamm et al., 2011 ; Aksoy et al., 2007). Un facteur de transcription étant une protéine nécessaire à l'initiation ou à la régulation de la transcription d'un gène. Il interagit avec l'ADN et l'ARN-polymérase. En l'absence d'expression de ces facteurs, les CSE perdent leur faculté d'autorenouveau.

#### 1.2.1.2. Pluripotence

Hormis la capacité d'autorenouveau, une propriété remarquable de la cellule souche embryonnaire (CSE) est sa pluripotence. La pluripotence est définie par le fait que les CSE peuvent se différencier en n'importe quelle lignée cellulaire provenant d'un des trois feuillets embryonnaires (mésoderme, endoderme, ectoderme) (*cf.* paragraphe 1.1.1., page 15). Cette propriété intéresse beaucoup le monde de la recherche car elle constitue un espoir dans la régénération de tissus lésés à partir de greffes de CSE. La pluripotence est d'abord conservée « dormante » durant les premiers stades de développement embryonnaires puis se révèle au fur et à mesure des divisions cellulaires pour donner toutes les lignées cellulaires qui constitueront l'organisme adulte.

Comme vu précédemment, lors de la division asymétrique d'une CSE, une cellule fille différenciée est générée (*cf.* paragraphe 1.2.1.1., page 21). Le devenir de la CSE produite est contrôlé par l'intervention d'un grand nombre de mécanismes intrinsèques

et extrinsèques qui ne sont pas tous élucidés à l'heure actuelle. En tout, les CSE peuvent se différencier en plus de 220 types cellulaires.

Au niveau moléculaire, la pluripotence des CSE dépend de l'expression de trois facteurs de transcription fondamentaux : Oct4, Sox2 et Nanog. Différents niveaux d'expression combinés de ces trois facteurs mènent à la différenciation des CSE (Boyer et al., 2005).

Oct4 se lie au motif octamère (5'-ATGCAAAT-3') de l'ADN pour contrôler l'expression d'un certain nombre de gènes impliqués dans la pluripotence. Dans de nombreux cas, il fonctionne en association avec Sox2 (Loh et al., 2006). Oct4 est aussi un des facteurs de transcription utilisé pour générer des cellules souches pluripotentes induites (IPS) chez l'Homme et la souris (Takahashi, Yamanaka, 2006 ; Hamanaka et al., 2011).

Le facteur Sox2 est indispensable au développement embryonnaire car il agit sur la formation de la masse cellulaire interne, l'épiblaste (une couche de cellules embryonnaires dont dérivent les feuilletts ectodermique et mésodermique), le tissu neural et l'ectoderme extra-embryonnaire. Pour preuve, des chercheurs ont tenté d'implanter des embryons dépourvus de facteur Sox2 chez la souris, ceux-ci sont morts immédiatement après leur implantation (Wood, Episkopou, 1999 ; Avilion et al., 2003).

Nanog fonctionne en coordination avec Oct4 et Sox2 pour établir l'identité de la CSE. Chez la souris, le niveau d'expression du facteur Nanog fluctue considérablement durant le développement de l'embryon. Il contribue à l'hétérogénéité et à la différenciation de la population cellulaire (Kalmar et al., 2009 ; MacArthur et al., 2012). Une surexpression du facteur Nanog chez l'embryon entraîne la stabilisation de ses cellules à un stade indifférencié. L'expression de Nanog est donc indispensable au maintien de la pluripotence des CSE (Chambers et al., 2003 ; Mitsui et al., 2003).

### 1.2.2. Modes d'administration des cellules souches embryonnaires

Après avoir saisi les différentes capacités et mécanismes de fonctionnement des cellules souches embryonnaires (CSE), les scientifiques se sont penchés sur leur potentiel thérapeutique. Mais qui dit potentiel thérapeutique, dit modalités et voies d'administration.

### 1.2.2.1. Types d'administrations de cellules souches embryonnaires déjà réalisées

Dans la plupart des essais *in vivo*, les CSE sont administrées de manière allogène (c'est-à-dire qu'elles proviennent d'un individu de la même espèce que le receveur) alors qu'elles sont déjà prédifférenciées en cellules de la lignée voulue. Les chercheurs administrent généralement les cellules souches embryonnaires différenciées (CSED) par voie locale, directement sur le site d'intérêt.

Un seul article japonais datant de juin 2010 relate les résultats d'une administration systémique de CSED chez la souris pour traiter des lésions cérébrales. Cette administration par voie générale aurait permis une réduction de la taille de la lésion 8 jours après l'injection et un accroissement de l'angiogenèse (Nagai et al., 2010).

L'administration des CSED se fait donc actuellement presque exclusivement par voie locale. Ainsi, des chercheurs de l'université du Connecticut aux Etats-Unis ont réalisé des injections intra-thymiques de CSED chez la souris dans le but d'améliorer la régénération des lymphocytes T (Su et al., 2015). Lors d'un essai préclinique sur la sécurité liée à l'administration de CSED pour le traitement de lésions de la moelle épinière, le docteur Catherine A. Priest et son équipe ont injecté des oligodendrocytes dérivés de CSE directement dans la moelle spinale de rats à l'aide d'une seringue Hamilton et d'une aiguille de 32 gauges (Priest et al., 2015). Au Royaume-Uni, une équipe de chercheurs en ophtalmologie a pratiqué des greffes de CSEH différenciées en cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien (RPE) chez douze sujets humains atteints de dystrophie maculaire de Stargardt avancée. Une transplantation chirurgicale sub-rétinienne de cellules souches embryonnaires humaines dérivées en cellules du RPE a été effectuée et les patients ont été placés sous thérapie immunosuppressive durant 13 semaines. Les chercheurs ont pu observer une survie des CSED transplantées mais aucune amélioration clinique significative n'a été démontrée (Mehat et al., 2018).

### 1.2.2.2. Mise au point d'un support non biodégradable destiné à l'administration intracrânienne de cellules souches embryonnaires

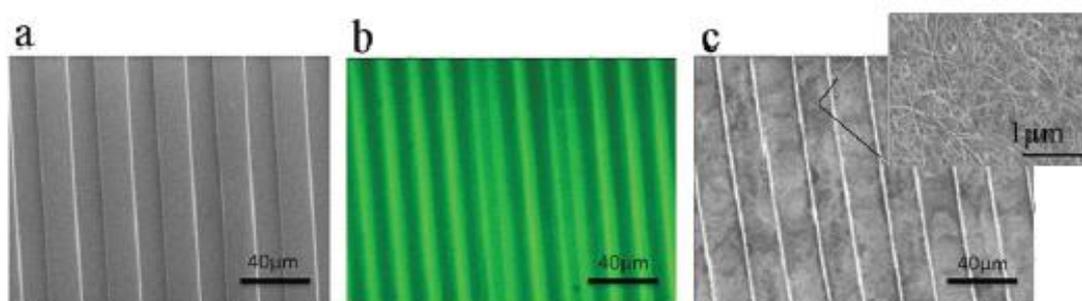
Dans le cadre du projet mené par le Docteur Isabelle Loubinoux et l'équipe iDREAM (Université Toulouse III Paul Sabatier, INSERM, *Toulouse NeuroImaging Center*, UMR 1214, Toulouse, France), des cellules souches embryonnaires de marmouset (CSEM)

différenciées en précurseurs neuraux vont être administrées directement au niveau d'une lésion cérébrale induite reproduisant les conséquences d'un accident vasculaire cérébral (AVC). Afin de guider le développement et la différenciation des précurseurs neuraux en cellules neurales différenciées dans le tissu lésé, elles sont préalablement déposées sur un biomatériau mis au point par l'équipe en 2011 (Bédurier et al., 2011).

Le Dr. Amélie Bédurier, dans le cadre de sa thèse de doctorat, a participé au développement d'un substrat en 2 dimensions non biodégradable constitué de polydiméthylsiloxane (PDMS), une sorte de silicone microstructuré. Il a été montré que ce biomatériau est capable de guider les neurites le long des rainures. Différentes dimensions de rainures ont été testées et il a été établi que la dimension optimale pour allier densité cellulaire, taux de différenciation et alignement des neurites est une largeur de 20  $\mu\text{m}$  (cf. Figure 3). Ce biomatériau, recouvert de nanotubes de carbone, leur a permis d'obtenir des CSE adhérentes d'une densité de  $10^4$  cellules/cm<sup>2</sup> et un ratio de différenciation proche de 100% (Bédurier et al., 2011).

Figure 3 : Aspect microscopique du biomatériau mis au point par Bédurier et al. (Bédurier et al., 2011)

(a) Image en microscopie à balayage de la surface du biomatériau. (b) Image en fluorescence du biomatériau. (c) Image en microscopie à balayage du biomatériau recouvert de nanotubes de carbone (visibles sur l'agrandissement).



En 2015, l'équipe a démontré l'efficacité de leur biomatériau *in vivo*, chez des rats ayant subi une lésion du cortex moteur primaire, provoquant d'importants déficits moteurs. Les animaux implantés avec des cellules souches embryonnaires humaines (CSEH) prédifférenciées en cellules neurales et combinées au PDMS, ont montré une récupération motrice significativement plus rapide et efficace que celle des individus ayant reçu des CSEH prédifférenciées seules, du PDMS seul, ainsi que celle du groupe témoin qui ont subi une intervention factice. L'administration d'implants seuls a montré des résultats similaires à l'absence d'implantation, preuve de l'innocuité du

PDMS même 3 mois après la greffe. Aucun signe d'inflammation ou de cytotoxicité n'ont été observés après implantation du biomatériau. Enfin, cette étude a permis de démontrer que l'administration de cellules souches embryonnaires différenciées (CSED) seules au niveau d'une lésion cérébrale n'est pas suffisante à procurer un effet thérapeutique car le taux de survie des CSED est extrêmement bas dans les jours qui suivent leur implantation (Vaysse et al., 2015).

En 2017, les mécanismes sous-jacents de ce phénomène ont été en partie élucidés. L'équipe de Carole Davoust a montré que la greffe de PDMS combiné aux cellules souches embryonnaires différenciées humaines permet de promouvoir la reconstruction tissulaire et limite l'atrophie hémisphérique ainsi que l'extension des cicatrices gliales (Davoust et al., 2017).

### 1.3. Méthodes connues de suivi des cellules souches

Depuis le début de la recherche sur les cellules souches, les scientifiques ont eu besoin de développer des méthodes de suivi (*tracking* en anglais) de ces cellules dans le but de comprendre leurs mécanismes de fonctionnement, leur distribution et leur devenir dans les organismes receveurs. Tout l'enjeu étant de différencier une cellule souche greffée d'une cellule initialement présente dans le tissu. Il existe, à l'heure actuelle, un grand nombre de méthodes de *tracking* cellulaire par marquage appliquées aux cellules souches. On distingue deux grands types de marquage : le marquage *post mortem* qui permet une grande sensibilité et spécificité et le marquage en temps réel, *in vivo*. Ces deux types de marquage peuvent être utilisés de manière complémentaire au cours d'une étude scientifique.

#### 1.3.1. Marquage *in vivo* en temps réel

Le marquage *in vivo* nécessite d'introduire des marqueurs au sein des cellules qui pourront être révélés en temps réel. L'enjeu étant de ne pas engendrer de modification du fonctionnement de la cellule pour ne pas biaiser les résultats de l'étude. Le marquage en temps réel peut être soit direct, soit indirect.

##### 1.3.1.1. Marquage direct

Le marquage direct consiste à insérer un marqueur directement dans la cellule souche, ou à sa surface. Selon sa nature, il se trouvera soit dans le cytoplasme de la cellule,

soit dans son noyau, soit dans les deux, soit au niveau de la membrane cellulaire. Ce marqueur est mis en place avant l'administration de la cellule chez l'organisme receveur (Gu et al., 2012).

Il existe plusieurs techniques de marquage direct, dans cette partie nous développeront les principales à savoir l'imagerie par résonance magnétique (IRM), la tomographie par émission de positons (PET) ou mono-photonique (SPECT) et l'imagerie par fluorescence optique (FLI).

#### 1.3.1.1.1. *Marquage par des méthodes d'imagerie par résonance magnétique*

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est une technique d'imagerie basée sur l'observation de la résonance magnétique nucléaire (RMN) des atomes d'hydrogène de l'eau (appelés « protons »). Elle repose sur l'enregistrement des changements de propriétés électromagnétiques des atomes d'hydrogène provoqués par des impulsions répétées d'ondes électromagnétiques à une certaine radiofréquence dans un champ magnétique statique. L'intensité du signal observé va donc dépendre de la concentration en eau du tissu, mais aussi du temps de relaxation des spins nucléaires. Le rôle des agents de contraste en IRM est de diminuer ce temps de relaxation afin d'augmenter l'intensité des signaux.

Le gadopentétate de diméglumine a été historiquement le premier agent de contraste IRM approuvé par l'administration américaine des denrées alimentaires et des médicaments (*US Food and Drugs administration, FDA*). C'est aujourd'hui le composé le plus largement utilisé en IRM clinique. En effet, son élimination est rapide et complète par voie urinaire. En 2003, une étude a démontré son efficacité dans le suivi des cellules souches embryonnaires neurales (Rudelius et al., 2003). Toutefois, il est aujourd'hui peu utilisé en *tracking* cellulaire expérimental *in vivo* pour différentes raisons. L'une d'elles étant qu'avec un tel marquage, il y aurait une accumulation de gadopentétate de diméglumine dans l'organisme qui provoquerait, à long terme, une toxicité rénale pouvant se manifester par une fibrose systémique néphrogénique (Thomsen, 2006 ; Varani et al., 2009). Cette méthode permet donc une détection à haute résolution de la localisation des cellules mais n'est pas adaptée aux études à long terme visant à monitorer la viabilité cellulaire (Li et al., 2008).

Le manganèse est également un agent de contraste très utilisé dans les études sur le fonctionnement cérébral. Il est capable de pénétrer dans les cellules à suivre grâce aux transporteurs de calcium et manganèse présents à la surface de celles-ci. C'est un agent de contraste particulièrement favorable pour les suivis de CSE car il permet d'étudier l'activité neuronale, de surveiller les voies neuronales et de détecter les fonctions des cellules greffées. Il présente cependant une toxicité liée à son accumulation dans le cerveau, le rendant incompatible avec le suivi à long terme des patients greffés (Crossgrove, Zheng, 2004 ; Zheng et al., 2017).

Les molécules de la famille des oxydes de fer super-paramagnétiques (en anglais, *superparamagnetic iron oxide*, SPIO) sont d'autres agents de contraste de choix en *tracking* cellulaire expérimental (Bulte, Kraitchman, 2004). En particulier le ferumoxide, commercialisé sous le nom d'Endorem® (Guerbet™) en Europe et Feridex® (Bayer HealthCare Pharmaceuticals Inc.™) aux Etats-Unis, est le seul agent de contraste IRM de qualité pharmaceutique qui est utilisé pour le *tracking* cellulaire expérimental à l'heure actuelle (Bulte, 2009). Il a, par exemple, été utilisé avec succès par Zhu et al. pour marquer des cellules souches embryonnaires neurales et suivre leur survie, leur migration et leur distribution chez un patient présentant un traumatisme cérébral au niveau du lobe temporal gauche (Zhu et al., 2006).

#### 1.3.1.1.2. *Marquage par tomographie par émission de positons (PET) ou mono-photonique (SPECT)*

La tomographie par émission de positons (*positron emission tomography*, PET en anglais) est une technique d'imagerie qui permet de mesurer quantitativement et en trois dimensions l'activité métabolique ou moléculaire de tissus grâce aux émissions produites par les positons issus de traceurs radioactifs administrés au préalable. C'est une procédure peu invasive qui est largement utilisée en *tracking* cellulaire.

Le radiotracteur le plus utilisé est le <sup>18</sup>F-fluorodesoxyglucose (<sup>18</sup>F-FDG) qui permet de suivre le métabolisme du glucose par PET. Les marqueurs 3-(2'-[<sup>18</sup>F]-fluoroethyl)-spiperone (<sup>18</sup>F-FESP) et 9-(4-<sup>18</sup>F-fluoro-3-[hydroxymethyl]butyl) guanine (<sup>18</sup>F-FHBG) sont également disponibles en tant que radiotraceurs (Nguyen et al., 2014). Il existe d'autres radio-nucléotides disponibles selon le type de suivi à réaliser : le <sup>15</sup>O, le <sup>13</sup>N, le <sup>124</sup>I, le <sup>68</sup>Ga et le <sup>64</sup>Cu.

Le temps de demi-vie de chaque marqueur conditionne la durée pendant laquelle ils peuvent être suivis. Cette demi-vie peut aller de quelques minutes pour le  $^{15}\text{O}$  et le  $^{13}\text{N}$ , à 1 à 2 heures pour le  $^{18}\text{F}$  et le  $^{68}\text{Ga}$  et à presque 13 heures pour le  $^{64}\text{Cu}$  (Bose, Mattrey, 2018).

La tomographie par émission mono-photonique (*single positron emission computed tomography*, SPECT en anglais) est une technique assez similaire à la PET, à la différence que le traceur radioactif utilisé émet des rayons gammas. Un des avantages de la SPECT par rapport à la PET est que la gamme de traceurs utilisables en SPECT est beaucoup plus vaste que celle utilisable en PET. On trouve principalement l'oxynate d'indium ( $^{111}\text{In}$ ) et le technicium-99m métastable ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ) (Bose, Mattrey, 2018). Leur temps de demi-vie étant de 2,8 jours pour le  $^{111}\text{In}$ , et de 6 heures pour le  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  (Cen et al., 2016).

Ces deux méthodes d'imagerie par émission peuvent être utilisées dans des essais cliniques pour suivre l'activité de cellules souches greffées. Lang et al. ont par exemple effectué une étude préclinique initiale dans laquelle ils ont monitoré l'évolution de greffes intra-myocardiques de cellules souches embryonnaires (CSE) chez des souris grâce au marqueur  $^{18}\text{F}$ -FDG suivi par PET (Lang et al., 2013). Une étude d'Elhami et al. compare les greffes de cellules souches via différentes méthodes d'administration (injection dans le myocarde, injection dans le ventricule gauche ou injection dans la veine cave caudale) à l'aide de PET et d'IRM avec respectivement des cellules marquées au  $^{18}\text{F}$ -FDG et des cellules marquées au SPIO (Elhami et al., 2013). Sood et collaborateurs ont greffé des cellules souches autologues dérivées de moelle osseuse marquées au  $^{18}\text{F}$ -FDG pour déterminer la meilleure voie d'administration de cellules souches chez des patients atteints de diabète (Sood et al., 2015). Des cellules souches fœtales de rat marquées au  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  ont été greffées puis suivies par SPECT afin d'étudier leur fonction et la perfusion cardiaque chez des sujets ayant subi une lésion du myocarde (Garikipati et al., 2014). L'équipe de Shih-Hsun Cheng a suivi par SPECT des cellules souches neurales conjuguées à du  $^{111}\text{In}$  greffées chez des souris atteintes de glioblastome (Cheng et al., 2016).

La PET permet de détecter des concentrations d'au moins 100nM alors que la détection de signaux par SPECT nécessite des concentrations légèrement plus élevées (Bose, Mattrey, 2018). Ainsi, la PET a l'avantage d'être plus sensible que la SPECT, permettant de détecter des signaux même très faibles (Nguyen et al., 2014).

Mais ces deux méthodes présentent un certain nombre d'inconvénients, comme par exemple la nécessité d'avoir des repères anatomiques pour l'interprétation des images, contrairement à des techniques comme l'IRM. Des équipes ont développé récemment une PET-CT et une SPECT-CT, des méthodes d'imagerie reposant sur le même principe que la PET et la SPECT qui possèdent, en plus, un dispositif de tomodensitométrie intégré. Cet ajout permet une visualisation et une localisation anatomique bien meilleure, facilitant la détection du signal et sa localisation anatomique (Rodriguez-Porcel et al., 2008). Il existe aussi un phénomène de « dilution » du signal résultant du processus de division cellulaire. A chaque division, le signal est réparti entre les cellules filles, à l'origine d'un appauvrissement en marqueurs chez les générations de cellules suivantes. Cet affaiblissement du signal empêche le suivi à long terme des cellules par ces méthodes (Rodriguez-Porcel et al., 2008). En outre, la mise en œuvre de *tracking* par PET ou SPECT nécessite l'utilisation de produits radioactifs dont la manipulation est extrêmement contrôlée. Certaines études se sont penchées sur la radiotoxicité de tels marqueurs pour l'organisme et ont montré que celle-ci dépend du traceur utilisé et de son temps de demi-vie (Zanzonico et al., 2006).

#### 1.3.1.1.3. *Marquage par fluorescence optique*

L'imagerie par fluorescence (FLI) est une méthode d'imagerie optique par marquage direct communément utilisée dans les études précliniques pour évaluer la localisation, la distribution et la fonction des cellules souches. Les cellules à suivre sont dotées préalablement de sondes d'ADN couplées à des molécules fluorescentes, les fluorophores. La FLI repose ainsi sur une transmission de lumière dans le tissu, provoquant l'excitation des fluorophores, l'émission fluorescente peut alors être récupérée et observée. Cette technique offre une grande sensibilité et permet la visualisation et le suivi des cellules souches (Bose, Mattrey, 2018).

Classiquement en FLI les cellules sont marquées avec des fluorophores ou modifiées génétiquement pour exprimer une protéine fluorescente. *In vivo*, les fluorophores sont choisis pour émettre préférentiellement dans des ondes proches de l'infrarouge pour permettre une détection en profondeur du signal dans les tissus (Gavins, Smith, 2015).

Actuellement, les nanoparticules fluorescentes les plus courantes sont les nanoparticules de polystyrène, qui sont distribuées par toutes les grandes sociétés du secteur des sciences de la vie et de la biotechnologie, telles que Sigma-Aldrich™,

Thermo-Fisher™ et Invitrogen™ (Brijmohan et al., 2005 ; Wang et al., 2013). Toutefois, ces nanoparticules souffrent d'une faible incorporation de la coloration dans les cellules et d'une protection insuffisante au sein de l'organisme. Pour éviter ce problème, Duke Scientific™ et Thermo Fisher™ ont développé des nanoparticules de polystyrène colorés en interne (gamme Firefli®), en incorporant le colorant directement dans la matrice du polymère. D'autre part, Sigma-Aldrich™ fournit des nanoparticules de polymère fluorescents de 40 nm constitués d'un polymère similaire au polystyrène, mais présentant une perméabilité à l'oxygène réduite, ce qui se traduit par une photostabilité plus élevée.

L'équipe de Tatyana N. Milovanova a, par exemple, suivi des cellules souches chez la souris grâce à des nanoparticules fluorescentes (Fluorospheres®, Invitrogen™). La FLI a permis d'évaluer le recrutement et la vasculogenèse des cellules souches de la souris dans une greffe sous-cutanée de Matrigel®, un biomatériau se rapprochant de la membrane basale des cellules endothéliales qui est liquide à 0°C et solide à température du corps. L'étude a montré que les cellules souches sont parmi les premières à arriver dans le Matrigel® et à être recrutées en nombre important (Milovanova et al., 2008). Les protéines fluorescentes sont aussi beaucoup utilisées dans le domaine de la cancérologie, pour étudier la formation de tumeurs, qu'elles soient primaires ou métastatiques et leur sensibilité aux thérapies anti-cancéreuses. Des études comme celles de Yamauchi et al., ont employé la FLI pour visualiser la migration de cellules cancéreuses par les vaisseaux sanguins et ainsi suivre la dissémination de métastases dans l'organisme (Yamauchi et al., 2005 ; Hoffman, 2005).

Toutefois, la FLI ne peut être utilisée que chez des organismes de petite taille (souris, rat) ou pour observer des structures superficielles permettant la diffusion et l'absorption de la lumière. Il faut aussi tenir compte du fait que le nombre d'émissions fluorescentes est limité par molécule, ce qui est à l'origine d'un phénomène de décoloration des cellules marquées (Wang et al., 2013)

Une nouvelle classe de sondes de fluorescence, les *Quantum dots* (QDs), a récemment été approuvée pour le marquage et la bio-imagerie de cellules souches *in vitro* et *in vivo*. Ce sont des nanoparticules cristallines colloïdales semi-conductrices inorganiques (Alivisatos, 1996). Leurs caractéristiques électroniques et optiques sont étroitement liées à la taille et à la forme de chaque cristal. En général, les QDs de petite taille ont une longueur d'émission plus courte (Ekimov, Onushcheko, 1981).

Par rapport aux nanoparticules organiques fluorescentes, les QDs offrent des avantages optiques uniques, notamment une bande d'émission plus étroite et une bande d'excitation plus large avec un rendement quantique élevé, une photostabilité accrue et une résistance à la dégradation chimique et métabolique (Medintz et al., 2005). Ces particules sont produites par un grand nombre d'entreprises comme Invitrogen™, Millipore™, eBioscience™, Thermo Fisher™, Sigma-Aldrich™, et Nanoco Technologies™. Elles ont l'inconvénient d'être extrêmement coûteuses car leur procédé de fabrication l'est aussi (150 à 300 dollars le micromole) (Wang et al., 2013).

Les QDs sont utilisés autant dans le *tracking* de cellules souches embryonnaires que de cellules souches mésenchymateuses. Lin et al. ont montré en 2007 que la viabilité, la prolifération et la différenciation de CSE murines ne sont pas affectées par les QDs en les comparant à un groupe témoin non marqué. Cette technique de marquage offre un bon contraste après une simple excitation sur une longueur d'onde. Cette étude démontre la possibilité d'utilisation des QDs dans le suivi *in vivo* de CSE chez la souris (Lin et al., 2007). A la même époque, Barbara J. Muller-Borer et son équipe obtiennent des résultats similaires pour le suivi de CSM *in vitro* chez la souris (Muller-Borer et al., 2007). Cependant, les QDs ne semblent pas pouvoir être transférées aux cellules adjacentes à cause de leur trop grande taille (environ 10 nm) comparé aux GAP jonctions (environ 1 nm) et restent au sein de la cellule initiale (Rosen et al., 2007).

#### 1.3.1.2. Marquage indirect

Un autre type de marquage cellulaire, dit « indirect » consiste à modifier la cellule génétiquement pour qu'elle synthétise une protéine « rapportrice » qui pourra être reconnue par une sonde spécifique ou bien un système d'imagerie. Le gène qui code pour la protéine rapportrice est communément appelé « gène rapporteur » (*reporter gene* en anglais).

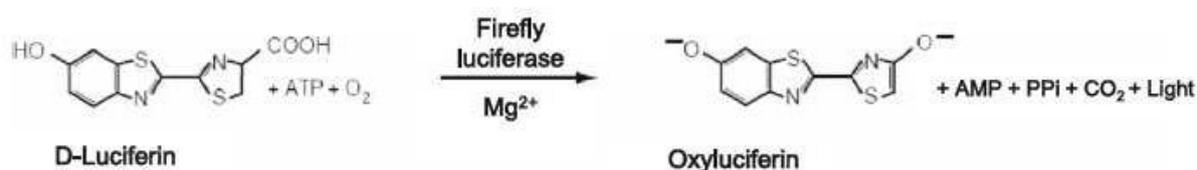
L'avantage principal de cette méthode est qu'elle permet de ne suivre que les cellules vivantes. En effet, une cellule morte n'est pas capable de transcrire et de traduire le gène rapporteur et n'exprime donc pas la protéine rapportrice (Welling et al., 2011 ; Gu et al., 2012). Un autre avantage du marquage indirect par rapport au marquage direct est qu'il n'y a, théoriquement, pas de perte d'intensité du signal au cours des divisions cellulaires car la cellule mère transmet le gène rapporteur à sa descendance (Li et al., 2008). Toutefois, l'imagerie par gène rapporteur nécessite la transfection de

matériel génétique exogène dans les cellules à l'aide de plasmides, de rétrovirus ou de vecteurs viraux, ce qui soulève le problème de la mutagenèse (Cao et al., 2007).

### 1.3.1.2.1. Imagerie par bioluminescence

L'imagerie par bioluminescence (BLI) se base sur une modification génétique des cellules leur permettant de produire un signal fluorescent. La méthode de BLI la plus courante repose sur l'oxydation de la D-luciférine apportée de manière exogène, utilisant du magnésium et de l'adénosine-triphosphate (ATP) comme cofacteurs. Cette oxydation par la cellule génétiquement modifiée produit un signal lumineux (cf. Figure 4 page 34). Cette réaction est catalysée par l'enzyme *Firefly luciferase* (Fluc) qui est codée par le gène luc préalablement incorporé dans le génome des cellules à suivre. Ce gène est présent naturellement chez la luciole nord-américaine (*Photinus pyralis*), duquel il est extrait. L'intérêt de cette méthode est qu'elle permet de suivre la viabilité cellulaire dans l'organisme sur une longue période, c'est-à-dire pendant la durée durant laquelle la D-luciférine est administrée (Gu et al., 2012). Les émissions produites par la luciférase sont dans le domaine du visible principalement avec une longueur d'onde de pointe aux alentours de 560 nm. Cependant leur pénétration tissulaire est limitée à 3 cm, ce qui restreint l'utilisation de la luciférase aux modèles murins et aux petits animaux en général (Sutton et al., 2008).

Figure 4 : Réaction chimique catalysée par l'enzyme *Firefly luciferase* (Fluc) (Kim et al., 2015)



Cette technique d'imagerie a, par exemple, été utilisée dans le *tracking* de cellules souches hématopoïétiques greffées chez des petits animaux (Cao et al., 2004 ; Wang et al., 2003). La BLI a aussi servi à l'évaluation de divers types de cellules souches dans le modèle murin d'infarctus du myocarde (Van der Bogt et al., 2008 ; Swijnenburg et al., 2010). Le suivi cellulaire d'îlots pancréatiques exprimant la luciférase a été réalisé chez des souris pour étudier une thérapie émergente du diabète de type 1 (Fowler et al., 2005 ; Lu et al., 2004). Cependant, cette méthode n'est pas applicable chez l'Homme de par sa mauvaise résolution spatiale, la nécessité d'injecter de fortes doses de D-luciférine pour générer un effet de contraste, et le potentiel

d'immunogénicité de la luciférase produite à partir du gène rapporteur (Rudin et al., 2005).

De la même manière que la *Firefly luciferase*, il existe d'autres enzymes employées en bioluminescence. Parmi elles, la *Renilla luciferase* (Rluc), issue d'une anémone marine, la Pensée de mer (*Renilla reniformis*), catalyse une oxydation du substrat coelenterazine émettant un signal lumineux dont la longueur d'onde est centrée sur 482 nm. L'émission de ce signal dure sur une plus courte période que celle produite avec la Fluc (Lorenz et al., 1991). Bhaumik et al. ont démontré la possibilité d'utiliser la Rluc en BLI comme méthode de suivi cellulaire chez des souris et ont également validé la possibilité de coupler l'imagerie par expression de la Rluc et la Fluc chez le même sujet animal (Bhaumik, Gambhir, 2002). Par ces données, cette stratégie a été utilisée dans diverses études où le suivi de deux populations cellulaires par l'utilisation de deux gènes rapporteurs différents était nécessaire. Toutefois, l'emploi de la Rluc se heurte à des limites : instabilité, faible perméabilité du substrat et bruit de fond élevé causé par un phénomène d'auto-oxydation de la coelenterazine (Luker, Luker, 2008).

La *Gaussia luciferase* et la *Bacterial luciferase* sont d'autres enzymes également capables de catalyser une réaction émettant de la fluorescence. Tout comme la Fluc et la Rluc, elles sont utilisées en *tracking* cellulaire par de nombreux auteurs (Derzelle et al., 2002 ; Maguire et al., 2009 ; Kim et al., 2015).

#### 1.3.1.2.2. *Imagerie par résonance magnétique*

Parmi toutes les possibilités d'utilisation des gènes rapporteurs, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) offre la résolution anatomique et spatiale la plus détaillée pour les tissus mous. Le premier gène rapporteur recourant à l'IRM codait pour une créatine kinase. Cette enzyme permettait de générer de la phosphocréatine détectable par spectroscopie par résonance magnétique dans le foie de rat (Koretsky et al., 1990). Depuis lors, quatre catégories de gènes rapporteurs d'IRM ont émergé : ceux impliquant une accumulation croissante de fer endogène (Genove et al., 2005 ; Liu et al., 2009), ceux permettant l'exploitation d'interactions de surface cellulaire (Tannous et al., 2006) ainsi que l'exploitation de réactions enzymatiques (Bengtsson et al., 2010 ; Alfke et al., 2003) et ceux autorisant le transfert de saturation par échange chimique (Gilad et al., 2007).

Pour la première catégorie, le « gène rapporteur » est typiquement un gène codant pour une métalloprotéine comme la ferritine. Cette protéine est capable de capter une grande quantité du fer et d'en provoquer l'accumulation dans la cellule. La détection du fer se fait alors de manière non-invasive par IRM. Cependant le fer capté produit un signal à long terme qui persiste même après la mort de la cellule. Cette technique ne permet donc pas de détecter la viabilité cellulaire contrairement à un grand nombre de techniques de marquage indirect (Gu et al., 2012). Cette méthode a, par exemple, été utilisée en *tracking* de cellules souches cardiaques porcines greffées chez la souris par Campan et al. (Campan et al., 2011) ainsi que pour le suivi de CSE chez des souris transgéniques (Liu et al., 2009). Ces deux études ont, par ailleurs, montré que cette méthode de suivi cellulaire ne portait pas atteinte à la viabilité des cellules souches et à leur capacité de différenciation.

L'utilisation des interactions à la surface cellulaire montre également un potentiel intéressant en suivi cellulaire. Il existe un gène rapporteur codant pour un peptide biotine-accepteur qui peut être synthétisé grâce la biotine ligase endogène et exprimé à la surface cellulaire. Lorsqu'il est exposé à des sondes marquées par de la streptavidine administrées de manière exogène, la cellule peut être visualisée par IRM (Tannous et al., 2006).

Les gènes rapporteurs basés sur des réactions enzymatiques comprennent les gènes codant pour la  $\beta$ -galactosidase, qui clive le galactose à partir d'agents de contraste spécifiques, et pour la tyrosinase humaine, qui augmente la production de mélanine liant les ions métalliques. La  $\beta$ -galactosidase a, entre autres, été employée pour le suivi *in vivo* de cellules de la moelle osseuse chez la souris (Bengtsson et al., 2010) et une étude a utilisé la tyrosinase humaine pour le *tracking* de cellules cancéreuses dans le cadre du cancer du sein (Alfke et al., 2003).

Une des techniques d'IRM employant les gènes rapporteurs la plus prometteuse est celle reposant sur le transfert de saturation par échange chimique (CEST). Les protons amides dans les polypeptides tels que la poly-L-lysine ont une fréquence de résonance magnétique nucléaire distincte de celle des protons solubles dans l'eau, pouvant être manipulée avec une impulsion de radiofréquence pour perturber la distribution de Boltzmann. Cette perturbation est transférée par échange chimique uniquement aux protons aqueux en équilibre chimique avec les protons échangeables de la protéine rapportrice CEST (Gilad et al., 2007). Le CEST présente de nombreux avantages : le signal n'est détectable que lorsque l'impulsion de radiofréquence est appliquée ; la

propriété biodégradable permet l'innocuité de la protéine rapportrice ; et sa capacité à pouvoir suivre plusieurs localisations anatomiques en utilisant différentes fréquences d'excitation lorsque différents agents de contraste sont utilisés. Pour l'instant, le CEST n'est pas très répandu. Il a été utilisé pour suivre des cellules de gliome de rat *in vivo* (Tannous et al., 2006). Cette technique n'a pas encore été employée pour le *tracking* de cellules souches à notre connaissance.

#### 1.3.1.2.3. Tomographie par émission de positons ou mono-photonique

Dans le cas du marquage indirect par tomographie par émission de positons (PET) ou par tomographie par émission mono-photonique (SPECT), le « gène rapporteur » code pour une enzyme, un transporteur, ou un récepteur cellulaire capable d'intégrer les radiotraceurs substrats administrés de manière exogène. Ces radio-nucléotides sont ensuite révélés par des technologies de PET ou SPECT (Jiang et al., 2011).

Le gène rapporteur le plus connu et le plus largement utilisé pour cette technique d'imagerie est l'*herpes simplex virus type 1 thymidine kinase gene* (HSV1-tk). La thymidine kinase pour laquelle code ce gène est capable de phosphoryler deux grands types de sondes exogènes rapportrices : les dérivés analogues de la pyrimidine (comme le 2'-fluoro-2'-deoxy- $\beta$ -D-arabinofuranosyl-5-iodouracil, abrégé FIAU) et les dérivés de l'acycloguanosine (par exemple la 9-(4-fluoro-3-hydroxy-méthyl-butyl) guanine, abrégée FHBG). Cette réaction permet de suivre les cellules viables mais marque aussi différentes réactions de la thymidine kinase avec de multiples substrats (Pomper et al., 2009 ; Gu et al., 2012).

Ces sondes exogènes rapportrices sont couplées à des isotopes radioactifs tels que l'iode 124 ( $^{124}\text{I}$ ), l'iode 125 ( $^{125}\text{I}$ ) qui émettent des rayons gammas ou le fluor 18 ( $^{18}\text{F}$ ). L'imagerie par SPECT utilisant le  $^{125}\text{I}$ -FIAU a permis de suivre la formation de tératomes chez des souris ayant reçu des greffes de CSE humaines (Pomper et al., 2009). Un suivi par PET employant du  $^{18}\text{F}$ -FHBG a été réalisé pour suivre la distribution et la survie de CSM dans le myocarde chez le porc (Gyöngyösi et al., 2008) ainsi que pour évaluer la migration de CSM vers le stroma tumoral (Hung et al., 2005).

Un autre gène rapporteur, le *sodium iodide symporter* (NIS) qui code pour une protéine transmembranaire responsable de l'absorption d'iode par les cellules thyroïdiennes, peut être utilisé en PET et SPECT. Lorsqu'il est exprimé dans des cellules non

thyroïdiennes par transfection, le NIS permet une imagerie par PET avec l'<sup>124</sup>I et une imagerie par SPECT avec l'<sup>123</sup>I ou le <sup>99m</sup>Tc (Kim et al., 2005 ; Gu et al., 2012). Ce gène a été utilisé *in vivo* pour observer des cellules cardiaques transplantées chez le rat (Terrovitis et al., 2008), ainsi que pour suivre la migration de CSM vers le stroma tumoral en vue d'explorer la possibilité d'une thérapie du cancer du sein (Dwyer et al., 2011).

Les gènes rapporteurs couplés aux radionucléides ont notamment comme avantage leur grande sensibilité et leur capacité à détecter uniquement les cellules vivantes. Ils offrent aussi la possibilité d'utiliser le ganciclovir associé au HSV1-tk pour le recruter en tant que gène suicide pour atténuer les risques de tumorigénicité (Cao et al., 2007). Enfin, le NIS a un double usage en tant qu'outil d'imagerie et outil thérapeutique (Dwyer et al., 2011). Ils ont toutefois l'inconvénient d'engendrer une fuite des radiotraceurs à partir des cellules marquées et de permettre une absorption non spécifique par les tissus normaux (Jiang et al., 2011).

### 1.3.2. Marquage *post mortem*

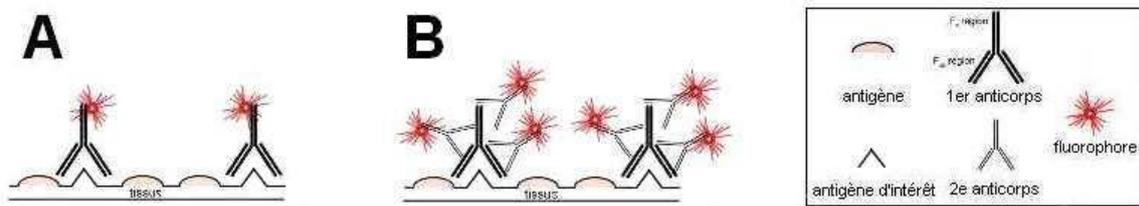
En plus du suivi *in vivo* des cellules, un marquage *post mortem* est également possible. Ces deux approches peuvent être combinées puisqu'elles apportent des informations complémentaires. Ce type de marquage se réalise presque exclusivement sur coupes histologiques. Les deux techniques principales de marquage *post mortem* sont l'immunohistochimie et l'hybridation *in situ*.

#### 1.3.2.1. Immunohistochimie

L'immunohistochimie (IHC) est une méthode permettant de détecter la présence, de localiser, et de connaître l'abondance relative de protéines cibles dans les cellules d'une coupe de tissu. La détection de ces protéines se fait au moyen d'anticorps spécifiques d'antigènes présents dans la protéine ciblée. En 1934, J.R. Marrack, un chercheur considéré comme le pionnier de l'IHC, fut un des premiers à comprendre et à exploiter le fait qu'un anticorps se lie spécifiquement à un antigène et peut ainsi permettre sa localisation dans les tissus biologiques (Marrack, 1934). Le complexe anticorps-antigène peut ensuite être révélé de plusieurs façons : soit l'anticorps est préalablement couplé à une enzyme qui catalyse une réaction de révélation (la peroxydase engendre un signal coloré par exemple), soit il est directement couplé à un fluorophore capable d'émettre un signal fluorescent (*cf.* Figure 5).

Figure 5 : Schéma illustrant deux techniques d'immunohistochimie (d'après Evilsizor et al., 2015)

(A) Technique de fluorescence directe ; (B) Technique de fluorescence indirecte.



Cette méthode de marquage cellulaire *post mortem* est généralement utilisée sur des coupes histologiques congelées et non incluses dans la paraffine. En 2015, Evilsizor a utilisé l'IHC pour marquer les cellules de la microglie et les neurones sur des coupes histologiques de cerveau de rat (Evilsizor et al., 2015). L'IHC est aussi employée en oncologie pour détecter et quantifier les cellules cancéreuses responsables de lymphomes (Zhang et al., 2017 ; Oliveira et al., 2017 ; Raess et al., 2018). Certaines études portant sur la médecine régénérative font appel à l'IHC comme technique de marquage *post mortem*. C'est le cas de l'étude de Rogler et al. en 2017 qui réalise le suivi de cellules souches transplantées dans des foies cirrhotiques en phase terminale par différentes techniques de marquage dont l'immunohistochimie (Rogler et al., 2017).

L'IHC offre l'avantage de toute technique de marquage *post mortem*, c'est-à-dire qu'elle ne modifie pas l'activité des cellules de leur vivant. Elle prend aussi relativement peu de temps à mettre en place et son coût est peu élevé par rapport à d'autres méthodes (IRM et SPECT par exemple). L'IHC offre une sensibilité et une spécificité élevées mais ne permet une visualisation en deux dimensions que d'une petite partie d'une coupe histologique. Enfin, en tant que technique de marquage *post mortem*, elle a l'inconvénient de nécessiter le sacrifice d'un animal.

#### 1.3.2.2. Hybridation *in situ*

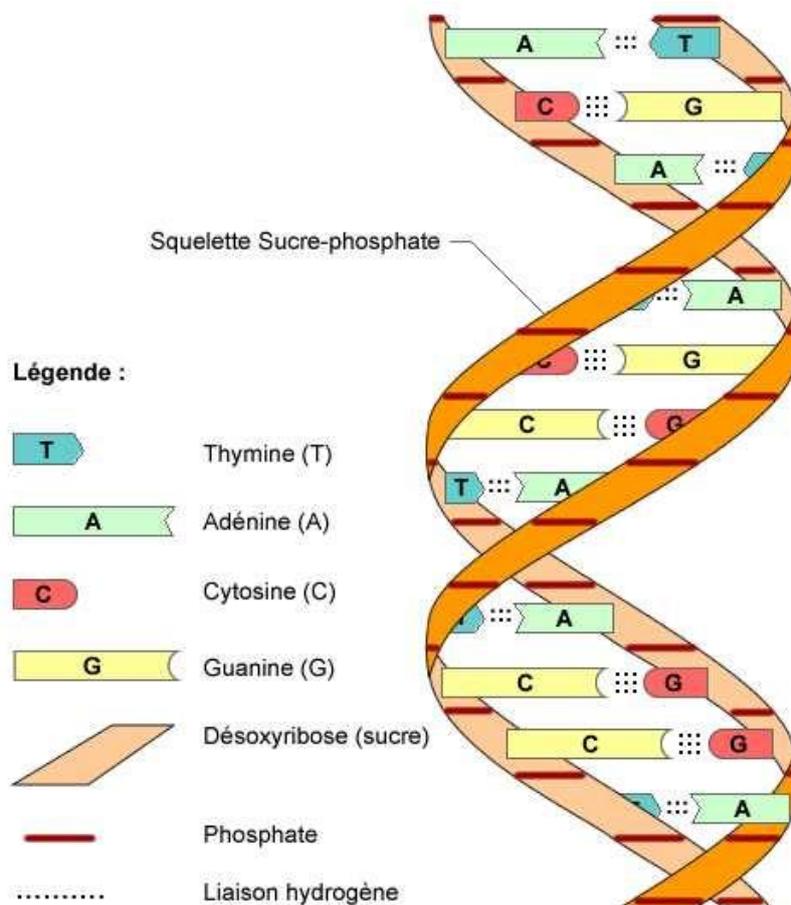
L'hybridation *in situ* (HIS) est une méthode de marquage permettant de localiser, dans le noyau cellulaire, une séquence de nucléotides connue monobrin (ADN ou ARN) sur coupe histologique. Cette technique repose sur le principe de complémentarité des bases azotées entre elles. En effet, la sonde d'hybridation est composée d'une suite de bases inversement complémentaire à la séquence ciblée. Pour être révélée, cette

sonde est marquée. Il existe plusieurs types de marquage : par des isotopes radioactifs (révélation par autoradiographie), par des fluorophores (visualisation par microscopie à fluorescence), ou bien par des enzymes (révélation par réaction avec un substrat).

### 1.3.2.2.1. Principe de l'hybridation *in situ*

L'acide désoxyribonucléique (ADN) est une macromolécule constituée de deux chaînes de nucléotides (brins) complémentaires parallèles enroulées l'une autour de l'autre, formant ainsi une double hélice. Les nucléotides sont reliés entre eux par des liaisons phosphodiesters. Chaque nucléotide est constitué d'un ose (le désoxyribose), d'un groupement phosphate et d'une base nucléique (ou base azotée). Quatre bases azotées peuvent entrer dans la constitution du nucléotide : l'adénine (A), la cytosine (C), la guanine (G) et la thymine (T). Les deux brins s'opposent en respectant rigoureusement l'association A avec T et C avec G, les bases étant reliées entre elles par des liaisons hydrogène, d'où leur complémentarité (cf. Figure 6).

Figure 6 : Structure schématique de la molécule d'ADN (*source : [sequencage-genome.com](http://sequencage-genome.com)*)



La méthode d'hybridation *in situ* repose sur le principe de complémentarité des brins d'ADN et sur ses propriétés chimiques. Une sonde d'ADN est synthétisée à partir d'une séquence ciblée, elle peut ensuite s'hybrider spécifiquement avec le brin d'ADN complémentaire se trouvant à l'intérieur des cellules cibles (dans notre étude, les cellules cibles correspondent aux cellules souches xénotransplantées). L'hybridation est provoquée par un processus de dénaturation-renaturation reposant sur une élévation de température suivie d'un refroidissement rapide. Cette technique s'utilise *post mortem*, sur coupe histologique.

#### 1.3.2.2.2. *Application de l'hybridation in situ au marquage post mortem des cellules souches*

Afin d'être révélées, les sondes d'ADN synthétisées selon les principes décrits en 1.3.2.2.1, doivent être couplées à des marqueurs. Le marquage peut être réalisé avec des isotopes radioactifs, on parle alors de "sondes chaudes" ; elles sont alors couplées à du tritium  $^3\text{H}$ , du phosphore  $^{32}\text{P}$  ou  $^{33}\text{P}$ , ou du soufre  $^{35}\text{S}$ . Mais le plus souvent, il est réalisé avec des produits non radioactifs, ces sondes sont alors dites "froides". Les marqueurs non radioactifs peuvent être fluorescents (technique de FISH directe) ou non-fluorescents avec la biotine, la digoxigénine (permettant de faire de la FISH indirecte) ou certaines enzymes (comme la phosphatase alcaline par exemple). Le mode de révélation varie en fonction de la nature du marquage, autoradiographie en cas de sondes radioactives, microscopie à fluorescence en cas de FISH, streptavidine pour la biotine, anticorps marqués par un enzyme et/ou avec de l'or colloïdal pour la digoxigénine, anticorps ou chromogènes pour les enzymes (technique de CISH).

L'hybridation *in situ* par fluorescence (FISH) permet encore aujourd'hui d'améliorer notre compréhension de l'expression des gènes au sein du génome, en particulier dans le domaine des cellules souches. Le professeur Antti Lignell et son équipe en Californie a réussi à identifier la niche cellulaire des cellules souches de la crête neurale en utilisant la FISH (Lignell et al., 2017). Blackwell et al. ont mis en évidence l'expression de facteurs spécifiques aux cellules souches embryonnaires (Nanog, Oct4 et Sox2) chez 11 patients atteints de granulomes pyogéniques par IHC et HIS (Blackwell et al., 2016). L'équipe de Jang et al. en Corée du Sud a étudié la distribution de marqueurs spécifiques de cellules souches intestinales dans des lésions précancéreuses du rectum-colon en employant des techniques d'HIS (Jang et al., 2016). Barakat et Gribnau ont combiné un marquage ADN et ARN par FISH et ont

ainsi pu étudier l'inactivation du chromosome X dans des CSE de souris (Barakat, Gribnau, 2014).

L'hybridation *in situ* offre donc une bonne sensibilité et une bonne spécificité. Elle permet d'éviter les principaux problèmes rencontrés avec le marquage *ante mortem* (modification de la viabilité cellulaire, modifications génétiques) et permet une haute résolution cellulaire. La FISH autorise par exemple l'analyse des chromosomes sur noyaux interphasiques. De plus, le comptage des grains d'argent sur les autoradiographies permet une étude semi-quantitative. Cependant, elle ne se fait que sur coupes histologiques, offrant seulement une visualisation en deux dimensions d'une petite partie tissulaire et elle ne donne pas d'information structurale. Les manipulations d'HIS prennent plusieurs jours (environ quatre jours pour la FISH) et sont plus coûteuses que l'IHC. Enfin, l'HIS ne permet d'analyser que des cellules xénotransplantées. La xénotransplantation désigne la transplantation d'un greffon où le donneur est d'une espèce biologique différente de celle du receveur.

### 1.3.3. Bilan sur les techniques de marquage

Les nombreuses techniques de marquage cellulaire disponibles à l'heure actuelle présentent toutes des avantages et des inconvénients. Elles peuvent être utilisées séparément ou bien combinées selon les besoins de l'étude. Quant aux essais sur les cellules souches, les chercheurs ne se sont pas encore accordés sur une technique de marquage cellulaire idéale. Dans le Tableau 1, sont résumés les principaux avantages et inconvénients qu'offre chaque technique de marquage présentée précédemment.

Tableau 1 : Avantages et inconvénients des différentes techniques de marquage cellulaire (d'après Evilsizor et al., 2015 ; Cen et al., 2016 ; Bonnemaïson, 2017)

	<b>Technique</b> (exemples de marqueurs)	<b>Avantages</b>	<b>Inconvénients</b>
<b>In vivo direct</b>	<b>IRM</b> (gadopentétate, Mn, SPIO)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Résolution spatiale élevée</li> <li>- Résolution temporelle assez élevée</li> <li>- Résolution en profondeur élevée</li> <li>- Visualisation fonctionnelle et morphologique</li> <li>- Pas d'émission radioactive</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sensibilité faible</li> <li>- Coûteux</li> <li>- Quantification du signal difficile</li> <li>- Pas de discrimination cellule vivante / cellule morte</li> <li>- Pas de suivi à long terme</li> <li>- Dilution du signal au cours du temps</li> </ul>

	<b>PET / SPECT</b> $(^{18}\text{F}, ^{111}\text{I}, ^{99\text{m}}\text{Tc}, ^{64}\text{Cu})$	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Résolution spatiale élevée</li> <li>- Résolution temporelle assez élevée</li> <li>- Résolution en profondeur élevée</li> <li>- Sensibilité élevée</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Très coûteux</li> <li>- Quantification du signal difficile</li> <li>- Pas de discrimination cellule vivante / cellule morte</li> <li>- Pas de repère anatomique</li> <li>- Emissions radioactives</li> <li>- Pas de suivi à long terme</li> <li>- Dilution du signal au cours du temps</li> </ul>
	<b>Fluorescence</b> (fluorophore, QDs)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Résolution temporelle élevée</li> <li>- Sensibilité très élevée</li> <li>- Faible coût</li> <li>- Pas d'émission radioactive</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Résolution spatiale faible</li> <li>- Résolution en profondeur très faible</li> <li>- Quantification du signal difficile</li> <li>- Pas de discrimination cellule vivante / cellule morte</li> <li>- Pas de suivi à long terme</li> <li>- Dilution du signal au cours du temps</li> <li>- Bruit de fond important</li> </ul>
<b>In vivo indirect</b>	<b>Fluorescence / Bioluminescence</b> (FLuc, RLuc)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sensibilité très élevée</li> <li>- Faible coût</li> <li>- Pas d'émission radioactive</li> <li>- Discrimination cellule vivante / cellule morte</li> <li>- Suivi à long terme possible</li> <li>- Pas de dilution du signal au cours du temps</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Résolution spatiale faible</li> <li>- Résolution en profondeur très faible</li> <li>- Quantification du signal difficile</li> <li>- Modifications génétiques de la cellule nécessaires</li> </ul>
	<b>IRM</b> (ferritine)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Résolution spatiale élevée</li> <li>- Résolution temporelle assez élevée</li> <li>- Résolution en profondeur élevée</li> <li>- Visualisation fonctionnelle et morphologique</li> <li>- Pas d'émission radioactive</li> <li>- Discrimination cellule vivante / cellule morte</li> <li>- Pas de dilution du signal au cours du temps</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sensibilité faible</li> <li>- Coûteux</li> <li>- Quantification du signal difficile</li> <li>- Modifications génétiques de la cellule nécessaires</li> </ul>
	<b>PET / SPECT</b> $(\text{HSV1-tk}, ^{18}\text{F}, ^{124}\text{I}, ^{125}\text{I})$	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Résolution spatiale élevée</li> <li>- Résolution temporelle assez élevée</li> <li>- Résolution en profondeur élevée</li> <li>- Sensibilité élevée</li> <li>- Discrimination cellule vivante / cellule morte</li> <li>- Pas de dilution du signal au cours du temps</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Très coûteux</li> <li>- Quantification du signal difficile</li> <li>- Pas de repère anatomique</li> <li>- Emissions radioactives</li> <li>- Modifications génétiques de la cellule nécessaires</li> </ul>

<b>Post mortem</b>	<b>Immunohistochimie</b> (péroxydase, fluorophore)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sensibilité élevée</li> <li>- Spécificité élevée</li> <li>- Résolution cellulaire élevée</li> <li>- Coût faible</li> <li>- Rapidité de mise en œuvre</li> <li>- Pas de modification de la cellule de son vivant</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Visualisation en 2D d'une petite partie d'une coupe histologique</li> <li>- Pas d'information structurelle</li> <li>- Xénotransplantation nécessaire</li> <li>- Sacrifice d'animaux nécessaire</li> </ul>
	<b>Hybridation <i>in situ</i></b> ( <sup>3</sup> H, <sup>33</sup> P, <sup>35</sup> S, biotine, digoxigénine, PAL)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sensibilité élevée</li> <li>- Spécificité élevée</li> <li>- Résolution cellulaire élevée</li> <li>- Quantification du signal possible (grains d'argent)</li> <li>- Pas de modification de la cellule de son vivant</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Coûteux</li> <li>- Long à mettre en œuvre</li> <li>- Visualisation en 2D d'une petite partie d'une coupe histologique</li> <li>- Pas d'information structurelle</li> <li>- Xénotransplantation nécessaire</li> <li>- Sacrifice d'animaux nécessaire</li> </ul>

La résolution spatiale d'une technique d'imagerie permet de déterminer la dimension du plus petit détail observable sur l'image. C'est pourquoi plus celle-ci est élevée, plus l'image rendue est nette. La résolution spatiale est définie par la taille du voxel (un pixel en trois dimensions), elle est exprimée en mm<sup>3</sup>. La résolution temporelle correspond au nombre d'images que la technique permet d'acquérir par seconde.

Soulignons le fait qu'en marquage *post mortem*, aucun traceur ne permet de suivre les cellules souches d'un individu injectées chez ce même individu (autogreffe) sans préalablement avoir recours à des modifications génétiques, structurelles ou fonctionnelles de ces cellules. Cependant, grâce à l'hybridation *in situ*, il est possible de marquer un chromosome d'intérêt au sein de cellules nucléées telles que les cellules souches. C'est pour cela qu'une des techniques de marquage *post mortem* repose sur l'administration de cellules mâles (XY) à un individu femelle (XX) puis sur la révélation du chromosome Y par hybridation *in situ*.

#### 1.4. Intérêt des sondes dirigées vers les chromosomes sexuels

Les sondes d'ADN dirigées vers les chromosomes sexuels X et Y ont, aujourd'hui, de nombreuses utilités en recherche. Ce type de sondes a déjà été produit chez plusieurs espèces dont l'Homme. Certains laboratoires en commercialisent d'ailleurs chez la souris, modèle animal le plus utilisé en recherche. Elles peuvent être employées pour

réaliser le sexage génétique d'un individu ou pour étudier la spermatogénèse. Mais il est aussi possible de les mettre à profit en *tracking* cellulaire. Le principe étant de suivre des cellules mâles (XY) administrées à un individu femelle (XX) en marquant le chromosome Y présent dans leur noyau. Le chromosome Y est alors utilisé comme un marqueur intrinsèque des cellules mâles. Ceci permet d'éviter d'ajouter des marqueurs extrinsèques aux cellules à suivre.

Au Japon, des chercheurs ont mis au point une méthode de sexage du sperme de chien par FISH (OI et al., 2013). La FISH permet aussi le sexage du sperme chez les bovins (Habermann et al., 2005), et il a été fait de même chez le porc, en 2000 par une équipe de chercheurs japonais (Kawarasaki et al., 2000).

En 1984, Guellaen et al. ont utilisé des sondes d'ADN spécifiques du chromosome Y pour démontrer la présence d'un fragment de chromosome Y chez la plupart des individus mâles XX analysés (Guellaen et al., 1984). Cette étude permet d'appuyer la théorie proposée par Ferguson-Smith, selon laquelle l'anomalie chromosomique chez ces individus résulterait d'un échange méiotique anormal entre les chromosomes sexuels paternels (Ferguson-Smith, 1966).

En *tracking* cellulaire, l'équipe de Sung-Yu Lee a employé des sondes dirigées vers le chromosome Y pour suivre des cellules dérivées de la moelle osseuse chez un individu ayant subi une greffe de lobes hépatiques. Grâce à leurs observations, ils ont émis l'hypothèse que les cellules provenant de la moelle osseuse participent à la vasculogénèse ainsi qu'à la régénération hépatique (Lee et al., 2015). Une étude clinique a également été menée à bien chez quatre femmes atteintes d'hépatite chez qui des cellules souches mésenchymateuses (CSM) mâles ont été implantées. Les biopsies hépatiques ont ensuite été analysées par FISH, montrant que les CSM contribuent à la fibrose hépatique (Dalakas et al., 2010).

L'utilisation de sondes spécifiques du chromosome Y en FISH par rapport à d'autres méthodes de marquage permet d'éviter d'opérer des modifications génétiques de la cellule (comme c'est le cas en marquage par gène rapporteur par exemple). En tant que technique de marquage *post mortem*, elle se soustrait aux problèmes de cytotoxicité et n'intervient pas sur le fonctionnement de la cellule de son vivant. Cependant, l'inconvénient de tracer le chromosome Y réside dans le fait qu'il n'est pas possible de suivre des cellules provenant de transplantations autologues ou d'un donneur femelle (Cen et al., 2016).

## 1.5. Choix du marmouset commun comme modèle animal

A buts scientifiques, de nombreuses espèces animales sont utilisées pour les expérimentations. La plus commune étant la souris, on parle de modèle murin. Ce modèle a l'avantage d'être connu par tous les scientifiques, le génome murin a d'ailleurs été entièrement séquencé en 2002 (Mouse Genome Sequencing Consortium et al., 2002). Les laboratoires sont capables de fabriquer en masse des outils pour utiliser ce modèle : des sondes d'ADN et de l'ADN compétiteur par exemple. De plus, les centres de recherche peuvent se procurer facilement des souris présentant certaines caractéristiques intéressantes : des souris *nude* (dont le thymus est absent ou détérioré), des souris albinos (dont la production de mélanine a été bloquée), des « oncosouris » (génétiquement modifiée pour développer plus de tumeurs que la moyenne), des souris *knock out* (dont certains gènes sont inactivés, les prédisposant à l'obésité ou les rendant tolérantes au froid par exemple), et beaucoup d'autres souris permettant de répondre à des problématiques variées. Enfin, les rongeurs de laboratoire ont l'avantage de pouvoir être gardés facilement dans un environnement standardisé pour un coût modéré. Ainsi, le modèle murin est privilégié depuis longtemps dans le monde de la recherche, dont la recherche en médecine régénérative pour l'étude des cellules souches.

Cependant, ce modèle a enregistré un grand nombre d'échecs dans les études portant sur les thérapies en médecine régénérative. En effet, la transition entre le modèle murin et l'Homme est trop radicale et très souvent, les résultats observés chez la souris ne sont pas retrouvés après leur transposition chez l'humain. Certains chercheurs comme John Harding ont donc proposé d'autres modèles animaux plus adaptés à la médecine régénérative comme les lapins, les chiens, les cochons, les moutons, les chèvres, les chevaux et les primates non humains. D'après son étude, chacune de ces espèces peut avoir un intérêt, il faut cependant choisir la plus adaptée selon le domaine étudié : chats, chiens et cochons pour les maladies oculaires ; primates non humains pour les atteintes neuronales ; chiens, cochons et chevaux pour l'étude des affections musculosquelettiques ; chiens, cochons et moutons pour les maladies cardio-vasculaires. Ces animaux ont l'avantage d'avoir une durée de vie longue, permettant d'étendre les études thérapeutiques à long terme. En outre, leurs propriétés physiologiques, comme le fonctionnement de leur système immunitaire, sont plus proches de celles de l'Homme que la souris (Harding et al., 2013).

Le marmouset commun (*Callithrix jacchus*), petite primate non humain (PNH), suscite aujourd'hui un intérêt en tant que modèle animal pour les expérimentations de neurosciences. Ceci est dû en partie, à l'avènement des marmousets transgéniques, qui offrent la possibilité de combiner des manipulations génétiques avec un enregistrement physiologique et une surveillance comportementale pour étudier les systèmes neuronaux. Cette espèce permet, entre autres, d'explorer le contrôle moteur volontaire. Il est possible de modéliser chez le marmouset commun certains dysfonctionnements neurologiques telles que la maladie de Parkinson et les AVC. C'est la raison pour laquelle il est largement plébiscité lors d'essais de thérapie régénératives concernant les affections neuronales (Walker et al., 2017).

Chez le marmouset commun, la production de cellules souches est en plein essor depuis quelques années. Certaines équipes se sont penchées sur la production d'IPS de marmouset (Debowski et al., 2015 ; Mishra et al., 2016). Tandis que d'autres chercheurs ont produit des cellules souches de marmouset (CSEM) avec succès (Thomson et al., 1996 ; Sasaki et al., 2005).

Pour les premières études réalisées sur les cellules souches, les modèles murins étaient en général immunodéprimés par modification génétique, ce qui permettait la transplantation et l'étude *in vivo* de cellules humaines. L'identification des cellules humaines dans les tissus murins emploie des marqueurs spécifiques d'espèce. En revanche, chez le marmouset commun qui est totalement immunocompétent, on ne peut administrer que des cellules souches de même espèce. Il est donc nécessaire de mettre au point de nouveaux outils dédiés à l'identification des cellules transplantées.



## 2. ETUDE EXPERIMENTALE

Notre étude s'inscrit dans le projet de recherche mené par l'équipe iDREAM (INSERM, Université Toulouse III Paul Sabatier, *Toulouse NeuroImaging Center*, UMR 1214, Toulouse, France, Dr. Isabelle Loubinoux). En effet, le Dr. Isabelle Loubinoux a contacté l'unité de recherche GenPhySE (Université de Toulouse, INRA, ENVT, Toulouse, France) par l'intermédiaire du Pr. Isabelle Raymond-Letron, pour créer un outil de recherche qui répondrait à une problématique scientifique précise : pouvoir identifier des précurseurs neuraux issus de cellules souches d'une espèce, implantés chez un sujet de cette même espèce. L'espèce en question étant le marmouset commun (*Callithrix jacchus*).

Cet outil a été réalisé sur la plateforme de cytogénétique de l'ENVT (unité de recherche GenPhySE), sous l'encadrement du Dr. Alain Pinton. Il a mis à disposition son temps, ses connaissances et ses compétences en matière de cytogénétique pour me guider dans la réalisation de sondes chromosomiques par la méthode d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH).

### 2.1. Objectifs de l'étude

#### 2.1.1. Contexte

L'accident vasculaire cérébral (AVC) est la première cause de handicap acquise chez l'Homme adulte, la seconde cause de mortalité dans le monde et la troisième en France. Cette affection est donc une priorité en santé publique. Ainsi en France, de 2010 à 2014, nous avons pu bénéficier d'un « plan national d'actions accidents vasculaires cérébraux » pour favoriser la prévention, la prise en charge des patients, la formation de professionnels et la promotion de la recherche.

L'AVC est dans 80% des cas d'origine ischémique chez l'Homme. C'est-à-dire qu'une artère cérébrale est obstruée, soit par une plaque d'athérosclérose, soit par un caillot sanguin. Dans 20% des cas, il est d'origine hémorragique, par rupture d'un vaisseau sanguin. En France, il y a environ 130 000 nouveaux cas par an chez l'Homme, soit un AVC toutes les quatre minutes. Parmi ces cas, 75% des patients survivent mais une grande majorité souffre ensuite d'atteintes motrices, sensitives, sensorielles et cognitives (Demain, 2015).

En cas d'AVC ischémique, et si la prise en charge est suffisamment rapide (en moins de 4h30), le patient peut bénéficier d'une thrombolyse par injection intraveineuse de thrombolytique, mais cela ne garantit pas l'absence de séquelles neurologiques. Une technique mise au point récemment, la thrombectomie permet de désobstruer mécaniquement les gros vaisseaux. Pour l'heure, il existe donc peu de traitement permettant aux patients de récupérer à la suite d'un AVC. Si les traitements cités précédemment ne fonctionnent pas, seule la rééducation permet aux patients, grâce à la plasticité cérébrale, de retrouver certaines fonctions. Il y a donc aujourd'hui une nécessité de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Pour cela, la réalisation d'études précliniques est obligatoire en amont d'essais chez l'Homme.

De nombreux modèles animaux ont permis de tester de nouvelles thérapies potentiellement transférables à l'Homme. Malheureusement, jusqu'à maintenant, peu de transferts chez l'Homme ont été concluants malgré de bons résultats chez l'animal. Le modèle le plus souvent employé est le modèle murin mais les comités d'experts mettent en cause le trop grand éloignement phylogénétique entre les rongeurs et l'Homme. Ils suggèrent donc l'utilisation d'animaux plus proches de l'Homme comme les primates non humains. Les recommandations conseillent aux chercheurs de démontrer l'efficacité et la non-toxicité d'une thérapie sur deux espèces animales différentes avant de pouvoir réaliser un essai clinique chez l'Homme (Fisher et al., 2009). L'utilisation de grands primates (chimpanzés, macaques ou babouins) est possible mais soulève d'importantes problématiques éthiques ainsi que des limites d'ordre pratique comme l'accessibilité à ces espèces, les conditions d'hébergement et les difficultés de manipulation. Ainsi, les primates non humains comme le marmouset commun sont préférés car leur modèle représente un bon compromis entre les grands primates et les rongeurs (Demain, 2015).

En 2015, l'équipe iDREAM a démontré, *in vivo*, la récupération fonctionnelle après une lésion cérébrale chez le rat grâce à une greffe de cellules souches neurales implémentées sur des prothèses micro-structurées de PDMS (Vaysse et al., 2015). En 2017, les mécanismes sous-jacents de cette réussite ont été en partie élucidés (Davoust et al., 2017). Les chercheurs de l'équipe iDREAM souhaitent aujourd'hui transférer ce savoir-faire chez une espèce de primate non humain, le marmouset commun, en vue de développer, à terme, une thérapie de récupération des AVC chez l'Homme.

Une lésion focale ciblant le cortex moteur primaire (responsable de l'exécution des mouvements volontaires) est réalisée chirurgicalement chez des sujets adultes en bonne santé de l'espèce *Callithrix jacchus*. Elle permet de mimer une atteinte ischémique de cette zone, principale manifestation des AVC. Certains marmousets ayant subi la lésion seront ensuite greffés avec un implant en PDMS combiné aux précurseurs neuronaux dérivés de cellules souches. Puis, un suivi longitudinal ainsi qu'une évaluation de l'évolution de la lésion cérébrale, des déficits moteurs et des récupérations spontanées, sera mis en place. Grâce à des marqueurs quantitatifs de récupération (force de préhension de la patte par exemple) et un suivi anatomo-fonctionnel par IRM, les effets de la thérapie testée peuvent être objectivés.

L'idéal pour l'équipe iDREAM serait de coupler ce suivi à une étude *post mortem* du devenir des précurseurs neuronaux issus de cellules souches ainsi implantés. Pour cela, un *tracking* des cellules souches différenciées de marmouset sur coupes histologiques de tissu cérébral doit être mis en place. C'est dans la réalisation d'un outil permettant ce suivi cellulaire *post mortem* que nous intervenons.

#### 2.1.2. Buts de l'étude

Notre objectif est de fabriquer une sonde d'ADN spécifique du chromosome Y et une sonde d'ADN spécifique du chromosome X chez le marmouset commun. Pour ce faire, des techniques de microdissection chromosomique, d'amplification et de marquage de FISH (hybridation *in situ* en fluorescence) ont été employées.

Le but ultime est de créer un outil permettant de suivre l'évolution de précurseurs neuronaux issus de cellules souches mâles implantés chez une femelle marmouset. Or, les cellules souches contiennent des chromosomes sexuels, les cellules souches mâles sont donc XY et les cellules souches femelles XX. En créant une sonde spécifique du chromosome Y, nous avons conçu, par extension, une sonde spécifique des cellules mâles. Cette sonde est donc spécifique des précurseurs neuronaux issus de cellules souches de marmouset (CSM) dans notre étude. La sonde spécifique du chromosome X sert de témoin, en effet, elle permet de vérifier que l'absence de « signal Y » ne résulte pas d'un défaut d'hybridation.

Une étude similaire chez le chien avait été réalisée en 2017 par le Dr. Charlotte Bonnemaïson, sur la plateforme de cytogénétique de l'ENVT, sous la supervision du Dr. Alain Pinton, dans le cadre de sa thèse d'exercice vétérinaire (Bonnemaïson,

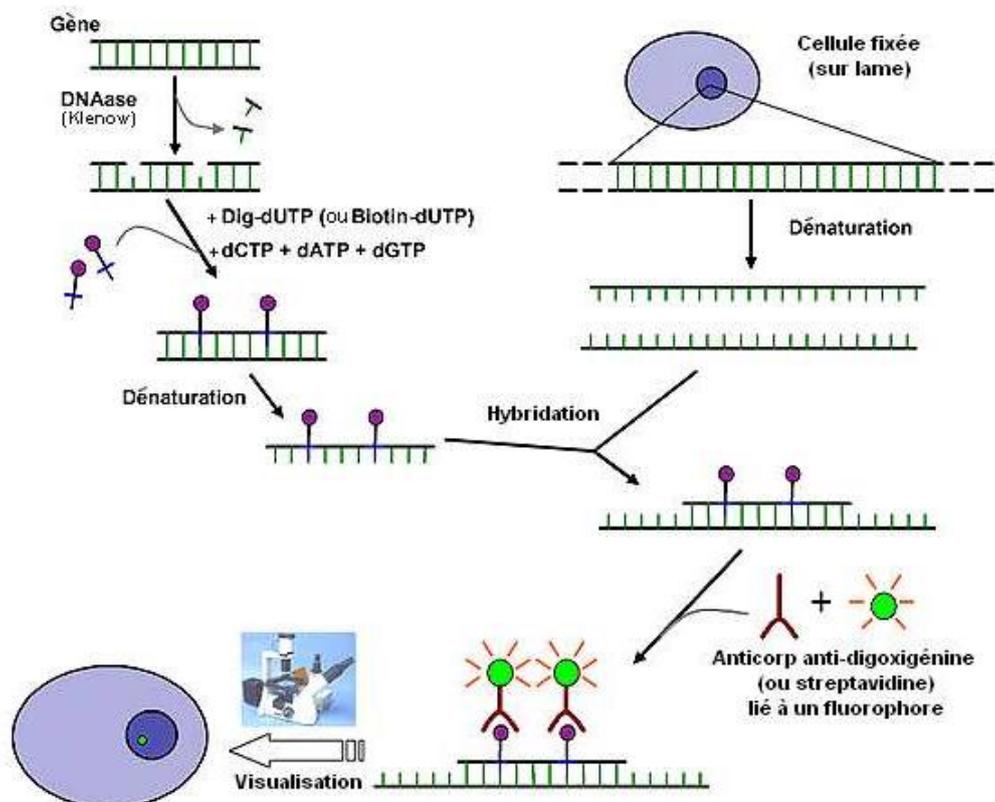
2017). Par analogie, une grande partie de notre protocole expérimental s'inspire de son travail.

Tous les produits et réactifs utilisés dans cette étude ainsi que leurs références ont été listés dans l'Annexe 1.

### 2.1.3. Rappel du principe de réalisation des sondes

L'hybridation *in situ* est une technique qui permet la localisation d'une séquence de nucléotides connus monobrin (ARN ou ADN) dans des cellules isolées ou organisées en tissu (sur coupe histologique). Cette localisation est rendue possible grâce à une sonde de nucléotides complémentaires de la séquence recherchée. La sonde est marquée afin de pouvoir être visualisée grâce à des isotopes radioactifs, des haptènes, des enzymes ou des produits fluorescents (méthode FISH). Le schéma Figure 7 illustre le principe de l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH). Figure 7 illustre le principe de l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH).

Figure 7 : Principe de l'hybridation *in situ* en fluorescence (d'après un schéma du site internet <http://www.biovisible.com/>)



## 2.2. Matériels et méthodes

### 2.2.1. Culture cellulaire

Afin de réaliser les sondes de chromosomes sexuels, nous devons d'abord cultiver des cellules de marmouset commun pour en récupérer le matériel génétique. La réalisation de lames en cytogénétique nécessite l'obtention de cellules en métaphase de mitose, phase durant laquelle les chromosomes sont condensés et individualisés.

Les échantillons de peau et de sang de marmouset nous ont aimablement été fournis par le Dr. Isabelle Loubinoux et sa doctorante Alice Le Fric, de l'unité ToNIC. Ceux-ci ont été prélevés sur des marmousets communs de leur animalerie expérimentale.

#### 2.2.1.1. Culture cellulaire à partir de sang total

Dans notre étude, la culture cellulaire à partir de sang total vise à obtenir un grand nombre de leucocytes, en particulier des lymphocytes en métaphase de mitose, pour pouvoir ensuite étaler leur matériel génétique sur lame ou lamelle.

##### 2.2.1.1.1. *Prélèvement et mise en culture*

Le sang a été prélevé à l'aide de cathéters à la veine céphalique, à raison d'1 mL par animal sur deux marmousets mâles puis récolté dans deux tubes héparinés.

Une culture cellulaire par animal a été réalisée de la manière décrite ci-dessous. Dans un tube Falcon® de 50 mL, 10 mL de milieu RPMI sont introduits, ainsi qu'une goutte d'héparine et un agent mitogène induisant notamment la prolifération des lymphocytes.

Deux agents mitogènes sont disponibles, la concanavaline A (ConA) et le pokeweed (PKW). Pour les cultures cellulaires sanguines chez le chien par exemple, le Pokeweed est plus efficace, mais nous ne savions pas lequel fonctionnait le mieux chez le marmouset. Il a donc été décidé de faire deux tubes Falcon® par animal : un avec 300 µL de concanavaline A (préparée à une concentration de 1 mg/µL) et l'autre avec 100 µL de pokeweed (à 0,25 mg/µL). Après étalement sur lame, les cellules provenant de la culture avec la concanavaline A étaient plus nombreuses mais celles de la culture avec le pokeweed donnaient des chromosomes plus faciles à distinguer et mieux étalés. Nous avons donc préféré le pokeweed pour les cultures de cellules sanguines (cette conclusion est relative à notre appréciation et à notre expérience personnelle).

Enfin, environ 20 gouttes de sang hépariné de marmouset commun ont été ajoutées à chaque tube. Finalement, 4 tubes de culture ont été obtenus : sang individu 1 + ConA ; sang individu 1 + PKW ; sang individu 2 + ConA ; sang individu 2 + PKW.

Ce mélange est ensuite homogénéisé puis placé à l'étuve à 37°C pendant 72h.

#### 2.2.1.1.2. Arrêt des cultures et fixation des cellules

Les tubes sont retirés de l'étuve après 72 heures et 100 µL d'une solution de colchicine (préparée à une concentration de 0,38 mg/µL) sont ajoutés dans chaque tube. La colchicine est une toxine extraite du colchique (*Colchicum*) qui bloque le fuseau achromatique, empêchant la séparation des chromatides lors de la mitose.

Les échantillons sont ensuite placés à l'étuve à 37°C pendant 2 heures. A leur sortie de l'étuve, les tubes sont centrifugés à 1600 t/min pendant 10 min, puis le surnageant est retiré par aspiration à la pipette.

Un choc hypotonique est réalisé en ajoutant une solution de sérum de veau fœtal dilué à 1/6<sup>ème</sup> avec de l'eau distillée. Les tubes sont alors remis à l'étuve à 37°C pendant 20 min.

Du fixateur est préparé préalablement en ajoutant 1 volume d'acide acétique 100% pour 3 volumes d'éthanol 100%. A la sortie de l'étuve, environ 5 gouttes de fixateur sont ajoutées et les tubes sont mis à centrifuger à 1800 tours/min pendant 10 minutes. Le surnageant est à nouveau retiré par aspiration.

A l'aide d'un vortex, le culot obtenu est remis en suspension dans 20 mL de fixateur. Le tube est ensuite centrifugé à 1800 tours/min pendant 10 minutes et le surnageant est retiré par aspiration à la pipette. Cette opération est répétée une seconde fois.

#### 2.2.1.1.3. Etalement sur lamelles

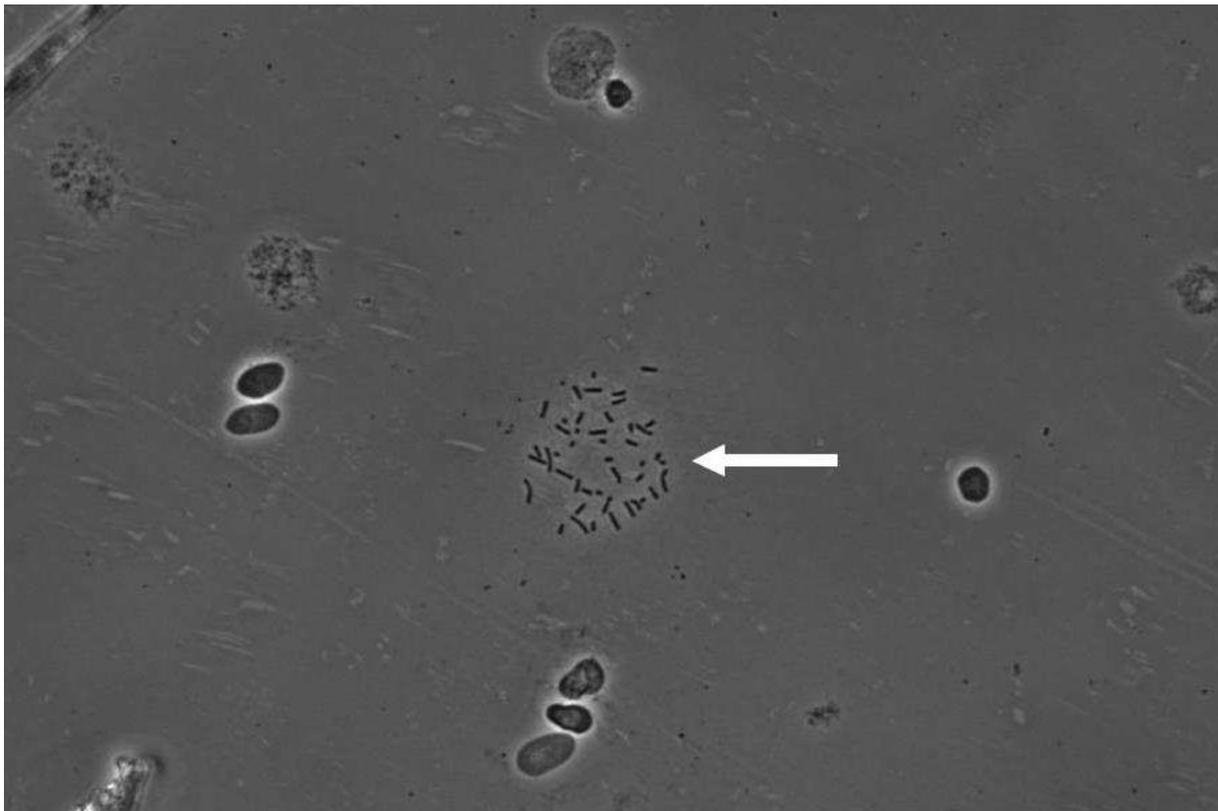
Des lamelles de verre rectangulaires doivent préalablement être placées dans un tube contenant de l'eau distillée et être conservées à 4°C. Il est important que toutes les bulles d'air emprisonnées entre les lamelles disparaissent, cela peut nécessiter une durée de stockage à 4°C de plusieurs semaines.

Après l'étape de fixation (2.2.1.1.2), un culot cellulaire est obtenu. Il est alors remis en suspension à l'aide d'une pipette pasteur.

Une lamelle conservée dans de l'eau distillée à 4°C est retirée délicatement du tube à l'aide d'une pince. L'excédent d'eau est enlevé par capillarité sur du papier absorbant. Une goutte du culot est déposée sur le tiers supérieur de la lamelle et étalée en soufflant légèrement vers le bas. Par convention interne sur la plateforme, le bord supérieur gauche est cassé pour pouvoir repérer le côté de l'étalement. La lamelle est mise à sécher sur un portoir métallique.

La qualité des lamelles est vérifiée au microscope à contraste de phases selon plusieurs critères : la richesse en métaphases, l'étalement des métaphases (distance entre les chromosomes d'une même métaphase), la quantité d'éléments non désirés. Ces critères sont évalués qualitativement en faisant appel à l'expérience de l'observateur. La Figure 8 ci-dessous est un exemple de résultat exploitable d'étalement de culot cellulaire.

Figure 8 : Observation de métaphases après étalement d'un culot cellulaire (grossissement x 100)



*La flèche blanche montre une métaphase correctement étalée.*

Le stockage des lamelles obtenues se fait ensuite dans de l'éthanol 100% à -20°C.

### 2.2.1.2. Culture cellulaire à partir d'une biopsie cutanée

La culture cellulaire à partir de tissu cutané nous permet d'obtenir des fibroblastes en métaphase de mitose. Les fibroblastes sont des cellules plus fragiles que les leucocytes mais ce type de culture permet, en théorie, d'obtenir plus de cellules en métaphase de mitose qu'avec une culture de sang par exemple.

#### 2.2.1.2.1. Prélèvement et mise en culture

La biopsie cutanée a été réalisée dans les locaux de l'INSERM à Toulouse par le Dr. Isabelle Loubinoux et Alice Le Fric. Un morceau de peau de 1 cm de diamètre a été prélevé à l'aide d'un *punch* à biopsie sous anesthésie générale chez un marmouset mâle. Les conditions de stérilité ont été respectées pour éviter toute contamination de la culture cellulaire devant être réalisée ensuite.

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

Des boîtes de culture (CORNING® Flask 25 cm<sup>2</sup>) sont préparées en déposant environ 1 mL de milieu de culture n°1 (Gibco® DMEM *Dulbecco's Modified Eagle Medium F-12 Nutrient Mixture (Ham)* + 10% de sérum de veau foetal + 1% d'antibiotiques et antimycotiques). Le milieu est réparti sur le fond de la boîte puis l'excédent est retiré par aspiration à la pipette.

La biopsie cutanée est détaillée en de nombreux morceaux d'environ 1 mm de diamètre (explants). Une dizaine de morceaux est déposée au fond de la boîte à l'aide d'une pipette pasteur en prenant garde à bien les séparer les uns des autres. Les boîtes sont placées verticalement pendant environ 10 minutes pour assurer l'adhérence des explants au fond de la boîte. Un millilitre de milieu est ensuite ajouté dans chaque boîte et elles sont placées horizontalement dans une étuve à 37°C pendant 2 jours minimum.

Après deux jours, il faut vérifier qu'il n'y ait pas de contamination de la culture qui se traduirait par un changement de couleur du milieu ou l'apparition de moisissures. La croissance des fibroblastes à partir des explants est observée à l'aide d'un microscope inversé. Le milieu est ensuite renouvelé en aspirant l'ancien milieu à l'aide d'une pipette et en ajoutant 1 mL de milieu n°1 neuf. Les boîtes sont ensuite replacées horizontalement à l'étuve à 37°C pendant 2 jours minimum.

Le milieu est ainsi renouvelé deux fois par semaine, en contrôlant à chaque fois l'absence de contamination et la présence quantitative des fibroblastes autour des morceaux de peau.

Après 8 jours environ, un grand nombre de fibroblastes (cellules fusiformes) sont visibles autour des explants (plus de 10 par champ) ainsi que des cellules épithéliales (cellules cubiques). Les cellules épithéliales ne sont pas utiles pour notre étude car elles s'étalent mal sur lame. Le milieu a donc été rendu plus sélectif aux fibroblastes par enrichissement progressif en milieu n°2 (DMEM seul, sans F-12 Nutriment Mixture). Ce milieu est ainsi renouvelé deux fois par semaine pendant 15 jours environ.

#### *2.2.1.2.2. Division et récupération des cellules en division*

Lorsque les boîtes sont uniformément pourvues de fibroblastes, les morceaux de peau sont retirés et remis en culture dans de nouvelles boîtes selon le même protocole que précédemment.

Les anciennes boîtes contenant le tapis de fibroblastes sont lavées avec 5 mL de PBS (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*®), puis l'excédent est retiré par aspiration. Deux millilitres d'Accutase® solution sont ensuite ajoutés dans la boîte. Le mélange est laissé à agir quelques minutes en observant le décollement des cellules au microscope inversé. Il faut ensuite « taper » sur les boîtes pour décoller les cellules. Enfin, le liquide obtenu est récupéré à l'aide d'une pipette et placé dans un tube Falcon® de 15 mL.

Les tubes sont ensuite centrifugés 5 min à 500 G et le surnageant est retiré par aspiration.

Un choc hypotonique est réalisé avec un ajout d'environ 10 mL d'une solution de sérum de veau foetal dilué à 1/6<sup>ème</sup> par tube. Cette solution doit être préalablement réchauffée à 37°C. Les tubes sont ensuite placés au bain-marie à 37°C pendant 20 minutes.

#### *2.2.1.2.3. Fixation des cellules*

Une préfixation est réalisée en ajoutant quelques gouttes de fixateur dans chaque tube. Une deuxième centrifugation de 5 minutes à 500 G est réalisée puis le surnageant est retiré par aspiration.

Un ajout d'une dizaine de millilitres de fixateur dans chaque tube tout en décollant le culot cellulaire à l'aide d'un vortex est réalisé. Une nouvelle centrifugation de 5 minutes à 500 G est réalisée puis le surnageant est retiré par aspiration.

#### 2.2.1.2.4. *Étalement sur lamelles*

L'étalement sur lamelles se fait suivant le même protocole que celui décrit au paragraphe 2.2.1.1.3 page 54. Les lamelles sont ensuite conservées à -20°C dans de l'éthanol absolu.

### 2.2.2. Réalisation d'un modèle de caryotype du marmouset commun (*Callithrix jacchus*)

Pour préparer l'étape de microdissection chromosomique, il était indispensable de savoir reconnaître le chromosome X et le chromosome Y du marmouset commun. Dans ce but, des caryotypes de l'espèce ont été réalisés en coloration conventionnelle puis en bandes G.

#### 2.2.2.1. Étalement sur lames

Les lames destinées à la réalisation du caryotype de marmouset commun ont été préparées suivant le protocole décrit dans la partie 2.2.1.1.3 page 54.

#### 2.2.2.2. Coloration

Afin de pouvoir exploiter les lames en caryotype, une coloration préalable est nécessaire. Les lames sont colorées en coloration conventionnelle ou bien en coloration en bandes G selon ce que l'on recherche.

##### 2.2.2.2.1. *Coloration conventionnelle*

Les lames sont plongées dans une solution de coloration à 5% de Giemsa R (préparée en ajoutant 10 mL de Giemsa R solution® dans 200 mL d'eau déminéralisée stérile) pendant 12 minutes puis rincées sous un filet d'eau du robinet. Elles sont mises à sécher sur un portoir métallique.

La coloration conventionnelle permet de colorer uniformément les chromosomes pour pouvoir les compter et les classer selon leur taille relative et la position de leur centromère.

#### 2.2.2.2.2. Coloration en bandes G

Deux solutions tampons sont préalablement préparées pour pouvoir fabriquer une solution de trypsine et du colorant. Les quantités et les produits utilisés sont répertoriés dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Composition des solutions utilisées pour la coloration en bandes G

Nom de la solution	Composition
Tampon phosphate disodique à 0,1 M	17,9 g de phosphate disodique 250 mL d'eau distillée
Tampon acide citrique à 0,2 M	5,25 g d'acide citrique 250 mL d'eau distillée
Trypsine	0,3 g de trypsine 300 mL de PBS 18 gouttes de tampon acide citrique à 0,2 M
Colorant	180 mL d'eau 12 mL de Giemsa 6 mL de méthanol 6 mL de tampon acide citrique à 0,2 M Amener à pH 6,8 avec du tampon phosphate disodique à 0,1 M

Les lames sont plongées 1 min 15 s dans la solution de trypsine puis rincées dans du PBS et placées 8 minutes dans le colorant. Elles sont ensuite rincées sous un filet d'eau du robinet.

Le passage dans la solution de trypsine entraîne une digestion enzymatique des protéines, faisant apparaître le *banding* chromosomique. Le colorant permet de révéler les bandes G qui correspondent aux zones d'ADN les plus riches en bases adénine et thymine.

La coloration en bandes G permet de distinguer des bandes claires et des bandes foncées sur les chromosomes pour pouvoir les compter et les classer selon leur taille relative, la position de leur centromère et leur *banding* chromosomique (motif de bandes claires et foncées).

### 2.2.2.3. Capture des métaphases (logiciel CytoVision® LEICA™)

Les lames colorées sont identifiées puis placées sous un microscope à contraste de phase. Le microscope à contraste de phase est un microscope optique qui transforme en niveaux de contraste les différences d'indices de réfraction entre deux structures, lesquelles se traduisent en différences de phase pour les ondes lumineuses les traversant. Il permet ainsi de visualiser des structures transparentes quand leur indice de réfraction diffère de celui de leur voisinage.

Une goutte d'huile à immersion est déposée sur la lame. Les métaphases sont repérées à l'objectif x40 puis capturées à l'objectif x100 à l'aide de la fonction de capture du logiciel CytoVision® de LEICA™.

La capture des métaphases peut aussi être automatisée grâce à un automate adapté au microscope. Cet automate scanne les lames pour en repérer les métaphases puis les capture automatiquement à l'objectif x100.

### 2.2.2.4. Sélection des métaphases

Sur une lame, plus de 50 images peuvent être capturées. Il est donc nécessaire de sélectionner celles qui sont exploitables en caryotype. Pour cela, on commence par supprimer les images qui ne correspondent pas à des métaphases. En effet, il est assez fréquent en capture semi-automatique, que le logiciel capture des structures qui ne sont pas des métaphases exploitables (noyaux interphasiques, impuretés liées à des contaminations, par exemple).

Ensuite, chaque image est inspectée et classée selon la forme et la taille des chromosomes, la netteté de leur marquage et la façon dont ils sont étalés. Pour réaliser un modèle de caryotype, on recherche une métaphase complète (pas de chromosome manquant), des chromosomes d'assez grande taille avec un marquage complet et net. Il est préférable que les chromosomes soient assez éloignés les uns des autres pour éviter erreurs liées aux croisements.

### 2.2.2.5. Découpe des métaphases et classement des chromosomes

Une fois que les métaphases de meilleure qualité ont été sélectionnées, les outils de traitement d'image proposés par le logiciel CytoVision® sont utilisés pour individualiser chaque chromosome. Chez le marmouset commun (*Callithrix Jacchus*), comme chez

l'Homme, on dénombre  $2n = 46$  chromosomes soit 22 paires d'autosomes et 2 chromosomes sexuels (gonosomes). De manière physiologique, les mâles sont XY et les femelles sont XX. Une fois chaque chromosome défini et individualisé, le logiciel permet de les placer sur une trame de caryotype.

Le chromosome métaphasique est constitué de deux chromatides sœurs réunies par un centromère dont la position définit les bras courts (bras p) et les bras longs (bras q). L'indice centromérique (donné par  $p/p+q$ ) permet de distinguer les chromosomes métacentriques, submétacentriques et acrocentriques. Les chromosomes métacentriques ont un bras court et un bras long dont la taille est presque identique. A la différence des chromosomes submétacentriques, pour lesquels la taille du bras court est nettement inférieure à celle du bras long. Les chromosomes acrocentriques eux, ont un centromère très distal, les bras courts sont alors très réduits.

Ces chromosomes sont ensuite classés suivant un caryotype standard en respectant un ordre de taille décroissant (la paire de chromosome 1 est de plus grande taille que la paire numéro 2 et ainsi de suite). Ils sont appairés grâce à leur marquage en bande (s'ils sont colorés en bande G) et leur indice centromérique. Les chromosomes sexuels sont placés en fin de caryotype par convention.

### 2.2.3. Microdissection

Afin d'obtenir les séquences d'ADN des chromosomes sexuels nécessaires pour notre étude, nous avons pratiqué des manipulations de microdissection chromosomique. Celle-ci consiste à extraire un seul chromosome choisi d'une métaphase pour ne récupérer que son ADN, et à répéter cette opération de la manière la plus spécifique possible.

#### 2.2.3.1. Préparation des lamelles

Pour microdisséquer les chromosomes sexuels de marmouset commun, nous devons d'abord étaler des cellules préalablement choquées et fixées sur des lamelles suivant le protocole décrit en 2.2.1.1.2 et 2.2.1.1.3 (page 54). Les lamelles sont ensuite stockées à  $-20^{\circ}\text{C}$  dans de l'éthanol absolu durant la nuit.

Le lendemain, une digestion à la trypsine de 45 s à 1 min 15 s est réalisée de manière à dénaturer suffisamment les chromosomes pour que le *banding* apparaisse, sans altérer la qualité de l'ADN récupéré ensuite. Un rinçage des lamelles au PBS stérile

est réalisé puis elles sont placées 1 min 15 s dans le colorant Giemsa (*cf.* les compositions Tableau 2 page 59). Elles sont ensuite rincées dans de l'eau stérile et déposées à sécher sur un portoir métallique.

#### 2.2.3.2. Matériel nécessaire pour la microdissection

Avant de commencer la microdissection, des microtubes Safelock Eppendorff® de 0,2 mL sont préparés avec 9 µL d'eau pour préparation injectable stérile dans chaque. Ces tubes serviront à récupérer les chromosomes disséqués, il en faut donc un pour les chromosomes X et un pour les chromosomes Y.

Un microscope inversé Axiovert 25® ZEISS™ équipé d'un bras de micromanipulation a été employé pour l'étape de microdissection.

Une aiguille à microdissection est fabriquée à l'aide d'un appareil spécifique, le PC-10 Puller® de NARISHIGE™ à partir de tiges de verre adaptées. Elle est ensuite fixée sur le bras de micromanipulation.

#### 2.2.3.3. Procédé utilisé

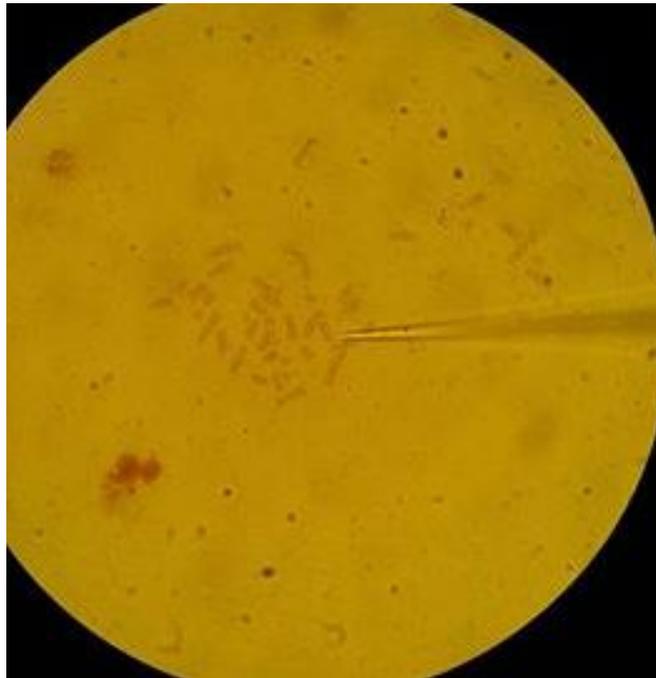
La lamelle à microdisséquer, préparée selon le protocole décrit au paragraphe 2.2.3.1, est placée sur la platine du microscope inversé. La mise au point est faite sur une cellule en métaphase à l'objectif x10 puis x100 en ajoutant de l'huile à immersion. Le chromosome voulu (X ou Y) est repéré visuellement et une goutte d'eau pour préparation injectable est ajoutée sur la zone à la micropipette.

L'aiguille est approchée lentement de la zone sans toucher le reste de la lame pour ne pas l'abîmer (*cf.* Figure 9). Enfin, l'aiguille est désolidarisée du bras de micromanipulation et la pointe est cassée dans le microtube préparé préalablement. Au minimum 10 copies de chromosomes X et 15 de chromosomes Y sont ainsi microdisséqués avant d'être amplifiées.

Figure 9). Ensuite, le chromosome ciblé est décollé doucement avec l'aiguille à l'aide du micromanipulateur. Il adhère alors légèrement à l'aiguille et peut être extrait de la lame en remontant l'aiguille avec le micromanipulateur.

Enfin, l'aiguille est désolidarisée du bras de micromanipulation et la pointe est cassée dans le microtube préparé préalablement. Au minimum 10 copies de chromosomes X et 15 de chromosomes Y sont ainsi microdisséquées avant d'être amplifiées.

Figure 9 : Image au microscope inversé d'une métaphase au niveau de laquelle l'aiguille de microdissection (à droite) a été approchée (grossissement x 1000)



#### 2.2.4. Amplification (kit GenomePlex® Single Cell de SIGMA-ALDRICH™)

Afin d'amplifier l'ADN récupéré lors de la microdissection, nous avons utilisé le kit GenomePlex® Single Cell de SIGMA-ALDRICH™. Le protocole indiqué dans les instructions du kit a été suivi à l'identique.

##### 2.2.4.1. Lyse et fragmentation

A la fin de l'étape de microdissection, au minimum 15 copies du chromosome Y et 10 copies du chromosome X ont été isolées dans deux microtubes PCR contenant 9 µL d'eau pour préparation injectable.

Le *Lysis and Fragmentation Buffer* a été préparé en ajoutant 2 µL de *Proteinase K solution* dans 32 µL de *10x Single Cell Lysis and Fragmentation Buffer*. Le mélange

est homogénéisé par tapotements du tube puis centrifugé quelques secondes à 1200 tours/minutes.

Dans chaque microtube contenant les échantillons d'ADN, 1  $\mu$ L de *Lysis and Fragmentation Buffer* fraîchement préparé est ajouté. Puis, une goutte d'huile minérale est ajoutée pour éviter l'évaporation de la préparation lors des étapes d'amplification par PCR. Les microtubes sont à nouveau homogénéisés par tapotement puis centrifugés rapidement afin de distinguer les deux phases.

Les tubes contenant un volume total de 10  $\mu$ L, sont ensuite placés dans le *thermal cycler* (2720 Thermal Cycler applied Biosystems® de Life Technologiesinc™) à 50°C pendant 1 heure puis chauffés à 99°C pendant exactement 4 minutes. A la fin du cycle, les microtubes sont immédiatement refroidis sur glace.

#### 2.2.4.2. Préparation de la banque de gènes (*gene library*)

À la suite de l'étape de lyse et fragmentation, 2  $\mu$ L de *1x Single Cell Library Preparation Buffer* sont ajoutés à chaque échantillon. Puis 1  $\mu$ L de *Library Stabilization Solution* est ajouté dans chaque microtube. Le mélange est homogénéisé par tapotement du tube et centrifugé rapidement.

Les microtubes contenant un volume total de 13  $\mu$ L de préparation chacun, sont placés dans le *thermal cycler* à 95°C pendant 2 minutes. Les échantillons sont ensuite refroidis sur glace puis consolidés par une rapide centrifugation et replacés sur glace.

Dans chaque tube, 1  $\mu$ L de *Library Preparation Enzyme* est rajouté, puis les tubes sont homogénéisés par tapotement et centrifugés brièvement.

Les échantillons, d'un volume total de 14  $\mu$ L chacun, sont alors placés dans le *thermal cycler* et incubés selon le cycle d'incubation présenté Tableau 3.

Tableau 3 : Cycle d'incubation au *thermal cycler* pour la préparation de la banque de gènes

Nombre de cycles	Température	Temps
1	16°C	20 minutes
	24°C	20 minutes
	37°C	20 minutes
	75°C	5 minutes
	4°C	<i>hold</i>

Les microtubes sont ensuite retirés du *thermal cycler* et centrifugés brièvement. Les échantillons doivent alors être amplifiés immédiatement ou stockés à -20 °C pendant 3 jours. Nous avons choisi de les amplifier directement après cette étape.

#### 2.2.4.3. Amplification

L'étape d'amplification débute par un ajout de 7,5 µL de *10x Amplification Master Mix*, 48,5 µL de *Water, Molecular Biology Reagent* et 5,0 µL de *WGA DNA Polymerase* dans chaque microtube. Les échantillons sont ensuite mélangés par tapotement et centrifugés brièvement. Le volume total contenu dans chaque tube est alors de 75 µL.

Ils sont ensuite placés dans le *thermal cycler* selon les cycles thermiques décrits Tableau 4.

Tableau 4 : Cycles d'incubation au *thermal cycler* pour l'amplification

Nombre de cycles	Température	Temps
1	95°C	3 minutes
25	94°C	30 secondes
	65°C	5 minutes
	4°C	<i>hold</i>

Après le cyclage thermique, les échantillons sont stockés à -20°C en attente de la fabrication des sondes.

#### 2.2.5. Réamplification (kit Genomeplex® WGA Reamplification de SIGMA-ALDRICH™)

Afin de pouvoir réaliser un grand nombre de sondes, il peut être nécessaire de réamplifier l'ADN des chromosomes X et Y préalablement amplifié (*cf.* partie 2.2.4, page 63).

Pour ce faire, nous avons utilisé le kit Genomeplex® WGA Reamplification de SIGMA-ALDRICH™ (réf. WGA3-50RXN). Dix microlitres d'ADN amplifié sont pipetés et placés dans des microtubes à PCR.

Une solution d'amplification est préparée en ajoutant 49,5 µL d'eau distillée, 7,5 µL de *10x Amplification Master mix*, 3,0 µL de *10 mM dNTP mix* et 5,0 µL de *WGA DNA*

*Polymerase*. Cette solution est ensuite ajoutée aux 10 µL d'ADN amplifié. Le tout est mélangé au vortex et centrifugé brièvement.

Des cycles thermiques sont ensuite réalisés comme décrit dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Cycles d'incubation au *thermal cycler* pour la réamplification

Nombre de cycles	Température	Temps
1	95°C	3 minutes
14	94°C	15 secondes
	65°C	5 minutes
	4°C	<i>hold</i>

Les échantillons peuvent ensuite être stockés à -20°C en attendant leur exploitation.

#### 2.2.6. Préparation d'ADN compétiteur (kit Nucléobond® Buffer Set IV de MACHERY-NAGEL™)

L'ADN compétiteur est de l'ADN génomique dont le rôle est de s'hybrider sur les régions non spécifiques (séquences répétées). En FISH, l'ajout d'ADN compétiteur permet d'éliminer les hybridations non spécifiques (« bruit de fond »).

##### 2.2.6.1. Matériel nécessaire

Pour pouvoir extraire de l'ADN compétiteur, nous avons récupéré deux foies et deux rates entiers de marmouset commun provenant de deux animaux euthanasiés pour les besoins d'une autre étude. Ces tissus ont été placés dans des tubes puis congelés pour leur conservation.

De l'ADN compétiteur a ensuite été extrait à partir de ces échantillons grâce au kit Nucléobond® Buffer Set IV de MACHERY-NAGEL™ (référence catalogue : 740546). Le protocole ci-dessous s'inspire donc largement de la notice d'instructions du kit.

##### 2.2.6.2. Préparation des solutions

Du *Buffer G2* est préparé en ajoutant 1 mL de *Buffer G2* à l'ampoule de *RNase A*. Le tout est mélangé au vortex puis transféré dans la bouteille de *Buffer G2*. Le contenu

de la bouteille est ensuite homogénéisé en la secouant légèrement puis celle-ci peut être stockée à 4°C pendant au moins 6 mois.

La solution de *Proteinase K* est ensuite élaborée en ajoutant 2,5 mL de *Proteinase Buffer PB* à la fiole de protéinase K lyophilisée. Cette préparation peut ensuite être conservée à -20°C pendant au moins 6 mois.

#### 2.2.6.3. Lyse des tissus

La première étape est de détailler les tissus de foie et rate en plusieurs échantillons de 400 mg chacun. Chaque échantillon est ensuite placé dans un tube avec 10 mL de *Buffer G2*. Pour favoriser la lyse et les homogénéiser, les échantillons sont pilés au mortier.

Chaque homogénat est transféré dans un tube Falcon® de 50 mL dans lequel 450 µL de *Proteinase K solution* (à 20 mg/mL) sont ajoutés. Le tout est mélangé au vortex pendant au moins 30 secondes jusqu'à obtenir un mélange le plus homogène possible.

Les échantillons sont ensuite placés à incuber à 50°C pendant au moins 2 heures (en général de 3 à 4 heures). Toutes les heures, ils sont homogénéisés à l'aide d'un mortier.

#### 2.2.6.4. Migration et élution sur colonnes

Il faut commencer par équilibrer les colonnes en faisant migrer 5 mL de *Buffer N2* dans chaque colonne vide. Les échantillons sont ensuite retirés de l'incubateur et 10 mL de *Buffer N2* sont ajoutés. Chaque tube est mélangé au vortex à vitesse maximale durant 15 secondes. L'homogénat est ensuite chargé dans les colonnes en respectant la répartition d'un tube par colonne. Puis, il migre à travers la résine par gravité (cela peut prendre de 1 minute à 1 heure).

Chaque colonne est ensuite lavée 3 fois avec 8 mL de *Buffer N3*. Une fois que les 3 x 8 mL sont passés par gravité, l'ADN génomique est élué avec 8 mL de *Buffer N5*.

Enfin, l'éluat est précipité en ajoutant 5,6 mL d'isopropanol. Chaque échantillon est mélangé et placé à incuber durant 60 minutes à température ambiante. Les tubes sont ensuite centrifugés à 15 000 tours par minute pendant 25 minutes. Le surnageant est retiré complètement par retournement puis à la micropipette.

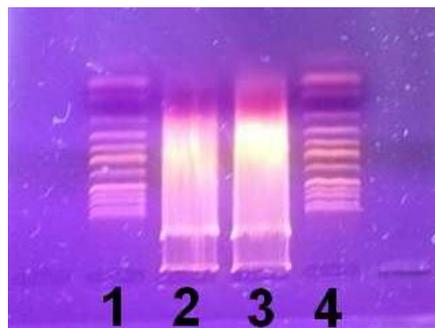
Les culots d'ADN obtenus sont séchés à l'aide d'une cloche à vide durant 30 minutes. Une fois les culots complètement secs, ils sont repris dans 15 µL de Tris HCl-EDTA (TE) à pH = 8, 1x concentré. Le tout est remis en suspension et les échantillons sont réunis en un seul tube.

#### 2.2.6.5. Sonication et dosage par spectrophotométrie

L'ADN obtenu précédemment est ensuite fragmenté par sonication, un procédé d'agitation des particules par l'énergie ultrasonore permettant de découper l'ADN en petits fragments. Il faut ensuite vérifier que les fragments sont de suffisamment petite taille en réalisant une électrophorèse. Le résultat obtenu doit être sous forme de *smear* (trainée colorée non discontinue), cf. Figure 10.

Figure 10 : Smear obtenu lors de l'électrophorèse de notre ADN compétiteur de marmouset commun

*Les témoins se trouvent aux extrémités 1 et 4 et nos deux échantillons sont en position 2 et 3.*



Un fois la qualité de la fragmentation vérifiée, il est nécessaire de connaître la concentration en ADN et la pureté de nos échantillons. L'ADN est dosé par spectrophotométrie à l'aide du spectromètre GeneQuant® Pro RNA/DNA Calculator de Biotech™. La concentration après sonication est de 583 ng/µL avec des ratios 260/280 et 230/280 supérieurs à 1,8, signifiant que notre ADN compétiteur de marmouset n'est pas contaminé par des protéines, des phénols ou d'autres contaminants.

## 2.2.7. Réalisation des sondes (méthode de FISH)

### 2.2.7.1. Marquage ADN (kit BioPrime® de INVITROGEN™)

Le marquage de l'ADN préalablement amplifié (protocole énoncé en 2.2.4) a été réalisé en utilisant le kit BioPrime® DNA Labelling System de INVITROGEN™ by Life technologies™ (référence catalogue : 18094011).

Le kit prévoit une concentration d'ADN à marquer d'environ 50 ng/μL (ou 1 μg si l'ADN est non purifié). Or, nous ne connaissons pas la concentration en ADN de notre échantillon, c'est pourquoi la quantité d'ADN utilisée est de 8 μL contre les 1 μL préconisés par la notice du kit.

Aux 8 μL d'ADN obtenus après amplification (partie 2.2.4, page 63), sont ajoutés 20 μL de *Primers 2,5X* et 12,5 μL d'*H<sub>2</sub>O B Braun*. Le mélange est homogénéisé par tapotement et est brièvement centrifugé.

Il est placé à 100°C pendant 5 minutes pour une étape de dénaturation. Les tubes doivent être munis d'un bouchon anti-pression. La dénaturation est ensuite stoppée en plaçant les échantillons sur glace.

Ensuite, 5 μL de *dNTP 10X* (contenant des bases azotées adénine, guanine, cytosine et quelques bases thymine – hors kit) ainsi que 3,5 μL d'UTP marqués à la biotine pour les sondes de chromosomes X et 3,5 μL d'UTP marqués à la digoxigénine pour celles des chromosomes Y (hors kit) sont ajoutés aux tubes. Enfin, 1 μL d'enzyme *Klenow* est ajouté dans chaque tube. Les échantillons sont mélangés par tapotement du fond du tube puis centrifugés rapidement.

Les tubes sont placés pour incubation au bain marie à 37°C pendant au moins 2 heures. Lorsqu'ils sont retirés du bain-marie, 5 μL de *Stop Buffer* sont ajoutés dans chaque tube pour un volume total de 55 μL chacun.

### 2.2.7.2. Précipitation des sondes

A la fin de l'étape de marquage, les tubes sont centrifugés brièvement. Sont alors ajoutés 15 μL d'ADN de saumon, de l'ADN compétiteur préparé selon le protocole décrit en 2.2.6 (quantité variable), 3,95 μL de NaCl et 1 mL d'éthanol 100%. Les échantillons sont mélangés par retournement trois fois. Après l'ajout d'éthanol absolu, un précipité blanc se forme au sein des tubes, signe que la sonde a précipité.

Les tubes sont alors placés à -20°C pendant une nuit (ou 3 heures à -80°C).

#### 2.2.7.3. Préparation des sondes

Les tubes issus de l'étape de précipitation des sondes sont centrifugés à 4°C à 13 000 tours/minutes pendant 30 minutes.

Le surnageant est éliminé par retournement, puis 1 mL d'éthanol 70% à -20°C est ajouté. Le culot est décollé à l'aide d'un vortex.

Ensuite, les tubes sont centrifugés à 4°C à 13 000 tours/minutes pendant 10 minutes. Puis le surnageant est éliminé par retournement et 1 mL d'éthanol 70% à -20°C est ajouté. Cette étape est répétée encore une fois pour procéder au lavage des culots.

Une micropipette p20 est utilisée pour retirer le maximum d'éthanol restant dans les tubes. Les culots sont ensuite mis à sécher 8 minutes sous une cloche à vide.

Après cette étape de séchage des culots, ceux-ci sont remis en suspension avec 15 µL d'une solution d'hybridation (solution à 50% de formaldéhyde). Les tubes sont placés au bain-marie à 37°C pendant au minimum 4 heures, en mélangeant au vortex toutes les heures. A l'issue de ces 4 heures, les échantillons peuvent être conservés à -20°C.

#### 2.2.8. Hybridation *in situ* sur lames cytologiques

Les sondes sont maintenant prêtes à être hybridées. Le protocole ci-dessous décrit les étapes d'hybridation sur lames cytologiques.

##### 2.2.8.1. Préparation des lames cytologiques

Les lames cytologiques destinées à l'hybridation sont préparées suivant le protocole décrit en 2.2.1.1.3 (page 54), à partir de cultures cellulaires décrites en 2.2.1 (page 53). Aucune coloration préalable n'est réalisée sur les lames destinées à l'hybridation.

##### 2.2.8.2. Hybridation

###### 2.2.8.2.1. Protocole d'hybridation à l'Hybridizer® DAKO™

Les sondes (10 µL de chaque) sont déposées de chaque côté de la lame cytologique (sondes X à gauche et Y à droite par exemple). Une lamelle carrée (22 x 22 mm) est

déposée sur chaque goutte correspondant à une sonde. Les deux lamelles sont ensuite scellées à l'aide de colle Elmer's Rubber Cement®. Il est important que le tour des deux lamelles soit scellé à la lame pour éviter l'évaporation lors de l'hybridation.

La lame est ensuite déposée dans l'Hybridizer® DAKO™ et traitée selon un programme prédéfini : 8 minutes à 75°C puis 24 heures à 37°C.

#### *2.2.8.2.2. Protocole d'hybridation avec pré-étapes de dénaturation*

La méthode d'hybridation à l'Hybridizer® est peu fastidieuse mais elle est connue pour générer du « bruit de fond » (hybridation des sondes sur des zones non désirées). Nous avons donc testé en parallèle un protocole classique d'hybridation en trois temps : dénaturation de la lame, dénaturation de la sonde puis hybridation.

Une solution de formamide est préparée en ajoutant 10 mL de solution de SSC 20X à 70 mL de formamide (agent dénaturant) et 20 mL d'eau distillée. Le pH obtenu est élevé (environ 9) et doit être abaissé jusqu'à 7 grâce à un ajout de quelques gouttes d'acide chlorhydrique pur contrôlé à l'aide d'un pH-mètre. Les lames sont placées dans des bacs en porcelaine contenant la solution de SSC 20X + formamide pendant 2 minutes à 72°C. Les lames sont ensuite déshydratées en les trempant 2 minutes successivement dans des bains d'éthanol à 70°, 90° et 100° à -20°C. Elles sont enfin séchées avec un sèche-cheveux réglé sur le mode « air froid ».

Les sondes sont d'abord remises en suspension à l'aide d'une micropipette puis placées 10 minutes à 100°C (étape de dénaturation). Après ces 10 minutes, elles sont mises sur glace pendant 5 minutes puis rapidement centrifugées. Elles sont placées à incuber à 37°C pendant 45 minutes.

Quinze microlitres de sonde ainsi dénaturée sont déposés sur la lame cytologique préalablement dénaturée. Une lamelle de verre (22 x 22 mm) est ensuite déposée puis scellée à la lame avec de la colle (Elmer's Rubber Cement®). La lame est ensuite placée à l'étuve à 37°C durant la nuit dans une cassette humide.

#### *2.2.8.3. Lavages stringents*

Le lendemain de l'hybridation, les lamelles sont retirées une par une. La colle est enlevée à l'aide d'une lame de scalpel à usage unique.

La lame est d'abord plongée dans une solution de *saline sodium citrate* deux fois concentrée (SSC 2X) pour stabiliser la sonde grâce à cette solution chargée positivement (l'ADN étant chargé négativement).

Un deuxième lavage est réalisé en plongeant la lame dans une solution de SSC 0,4X à 72°C pendant 4 minutes.

Enfin, la lame est placée dans du PBT (= PBS + BSA) à température ambiante.

#### 2.2.8.4. Préparation des anticorps

Les anticorps pour la révélation sont préparés à une concentration de 1% :

- 1 µL de streptavidine Alexa Fluor® 594 (SAF 594, signal fluorescent rouge) dans 100 µL de PBT pour la sonde du chromosome X
- 1 µL d'anticorps anti-digoxigénine marqués à la fluorescéine (FITC, signal fluorescent vert) dans 100 µL de PBT pour la sonde du chromosome Y

Le mélange est ensuite homogénéisé au vortex puis centrifugé brièvement.

#### 2.2.8.5. Révélation

La lame est retirée du PBT dont l'excédent est éliminé par capillarité sur du papier absorbant. Environ 100 µL d'anticorps sont déposés sur toute la lame. Une lamelle rectangulaire (24 x 60 mm) y est ensuite placée.

La lame est alors mise dans une boîte fermée humide à 37°C pendant 1 heure.

Lorsqu'une heure s'est écoulée, la lamelle est retirée. La lame est alors lavée trois fois successivement dans du PBS + Tween (à une concentration de 2 µL/mL) pendant 6 minutes avec une agitation constante permise par un agitateur orbital. Le Tween est un agent détergent.

Ensuite, une goutte de *Vectashield with DAPI*® est déposée sur la lame. Le *Vectashield* est une solution permettant de préserver la fluorescence et le DAPI est un agent intercalant de l'ADN donnant une coloration fluorescente bleue. Enfin, une lamelle rectangulaire (24 x 60 mm) est déposée sur la lame qui devra être conservée à l'abri de la lumière.

#### 2.2.8.6. Observation des lames

La visualisation des lames se fait à l'aide d'un microscope à épifluorescence ImagerZ2® couplé à un système d'analyse d'image Cytovision® développé par LEICA™.

Ce microscope émet des ondes lumineuses permettant de différencier la fluorescence rouge, verte et bleue mais aussi de les réunir sur la même image. Par convention, nous avons marqué les chromosomes X à la biotine (fluorescence rouge) et les chromosomes Y à la digoxigénine (fluorescence verte). Le reste du matériel génétique est marqué au DAPI (fluorescence bleue).

#### 2.2.9. Hybridation *in situ* sur coupes histologiques

Après avoir testé les sondes de chromosomes sexuels de marmouset sur lames cytologiques, nous les avons hybridées sur des lames histologiques. En effet, le but de l'étude est d'utiliser nos sondes sur des coupes de tissus.

Les tissus utilisés ont été prélevés *post mortem* sur deux marmousets mâles. Le foie, l'intestin grêle, les testicules et de la peau ont été inclus en blocs de paraffine.

##### 2.2.9.1. Préparation des lames

###### 2.2.9.1.1. Réalisation des lames

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

Les blocs tissulaires sont ensuite coupés à 4 µm d'épaisseur au microtome. Les coupes de 4 µm sont placées sur des lames de verre depuis un bain-marie puis séchées à l'air libre. Le tout est enfin placé à l'étuve à 40°C.

Cette étape permet de conserver les lames histologiques pendant plusieurs mois.

###### 2.2.9.1.2. Déparaffinage et réhydratation

Pour pouvoir être hybridées, les lames doivent d'abord être dépourvues de paraffine et réhydratées.

Afin de retirer la paraffine des tissus, les lames sont plongées dans du toluène pendant 5 minutes, 3 fois consécutives.

Les coupes sont ensuite réhydratées grâce à des bains successifs : alcool à 96% deux fois 2 minutes en renouvelant le bain, alcool à 70% deux fois 2 minutes, en renouvelant le bain, puis SSC 2X pendant 2 minutes.

#### 2.2.9.1.3. Etapes de prétraitement

Le kit Histology FISH Accessory Kit® de DAKO™ (réf. catalogue K4799) a été utilisé pour traiter les lames histologiques avant hybridation. Le protocole présenté est inspiré du guide d'utilisation du kit à l'exception de quelques modifications apportées suite à de précédentes études réalisées avec ce kit (Noiret, 2015 ; Bonnemaïson, 2017).

Les lames sont d'abord plongées dans la *Pre-Treatment Solution* préalablement diluée et chauffée à 95°C au bain-marie, pendant 10 minutes. La cuve contenant les lames est ensuite placée à refroidir à température ambiante durant 15 minutes.

Un fois refroidies, les lames sont lavées dans une cuve contenant du *Wash Buffer* pendant 3 minutes à température ambiante. Cette étape est renouvelée une fois en changeant le *Wash Buffer*.

Les lames sont ensuite posées sur l'Hybridizer DAKO™ réglé à 37°C. Quelques gouttes de pepsine prête à l'emploi froide (4°C) du kit sont déposées sur les échantillons. Le temps d'incubation peut être variable, de 2 à 15 minutes à 37°C selon la nature du tissu, sa fixation et l'épaisseur de la coupe.

La pepsine est d'abord éliminée en tapotant les lames. Celles-ci sont ensuite lavées dans avec du *Wash Buffer* deux fois 3 minutes en renouvelant le bain à chaque fois.

#### 2.2.9.2. Hybridation à l'Hybridizer® DAKO™

Les lames histologiques ayant subi les étapes de prétraitement décrites en 2.2.9.1.3 sont d'abord déshydratées dans une série de bains d'alcool 70%, 90% puis 100%, 2 minutes dans chaque bain. Puis sont laissées à sécher à l'air libre.

Lorsque la lame est complètement sèche, la sonde est placée sur la coupe histologique à hauteur de 15 µL de sonde par lame. Une lamelle est alors apposée sur chaque lame et scellée à la colle (Elmer's Rubber Cement®).

Les lames sont ensuite placées dans l'Hybridizer DAKO™ et traitées selon un programme prédéfini : 8 minutes à 75°C puis 24h à 37°C.

### 2.2.9.3. Lavages

Les lamelles sont d'abord retirées. Les lames sont ensuite plongées dans une solution de SSC 2X à température ambiante. Une solution de SSC 0,4X est portée à une température de 72°C au bain-marie. Une fois la température atteinte, les lames sont plongées dans cette solution pendant 3 minutes puis récupérées dans une solution de PBT à température ambiante.

### 2.2.9.4. Préparation des anticorps et révélation

La préparation des anticorps, la révélation et l'observation des lames se fait de la même manière que pour les lames cytologiques (*cf.* 2.2.8.4, 2.2.8.5, 2.2.8.6 page 72).



## 2.3. Résultats

### 2.3.1. Cultures cellulaires

Les cultures cellulaires réalisées à partir d'échantillon de sang et de peau de marmouset commun nous ont permis de récolter les cellules nécessaires à la réalisation de notre étude.

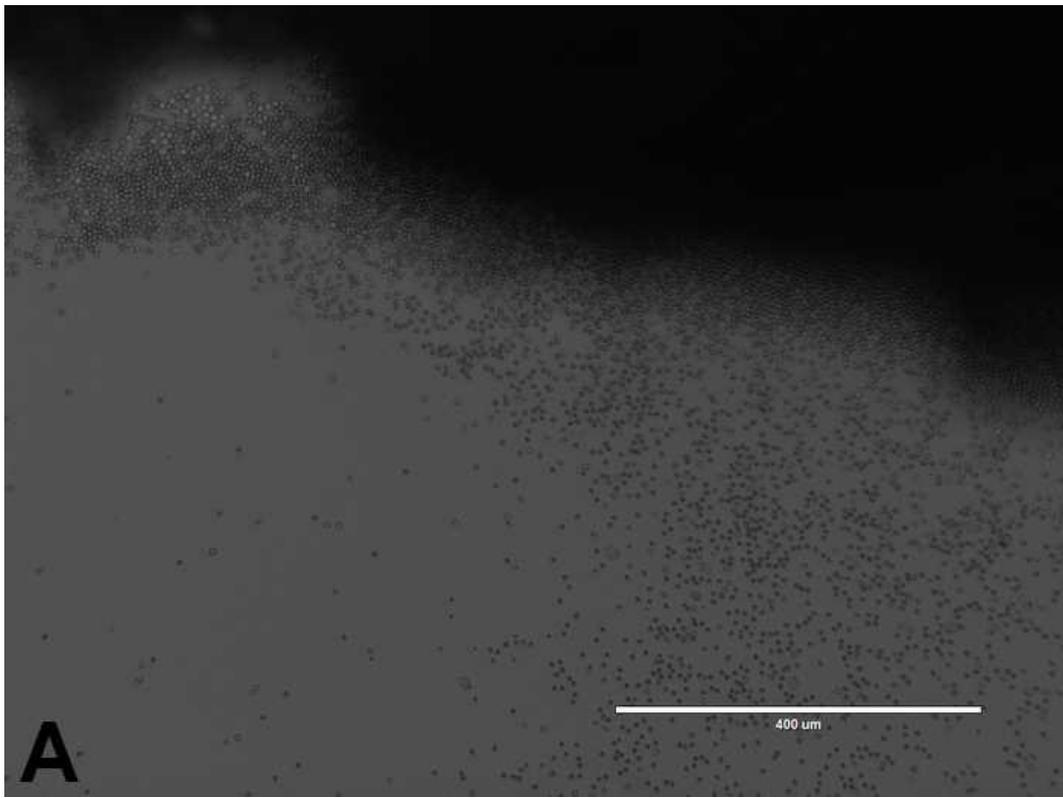
Les cultures de fibroblastes à partir d'échantillons cutanés nécessitent environ 3 semaines avant de pouvoir être exploitées. Chaque jour, les cultures cellulaires sont observées au microscope.

Immédiatement après la mise en culture des explants, des globules rouges peuvent être observés à leur périphérie.

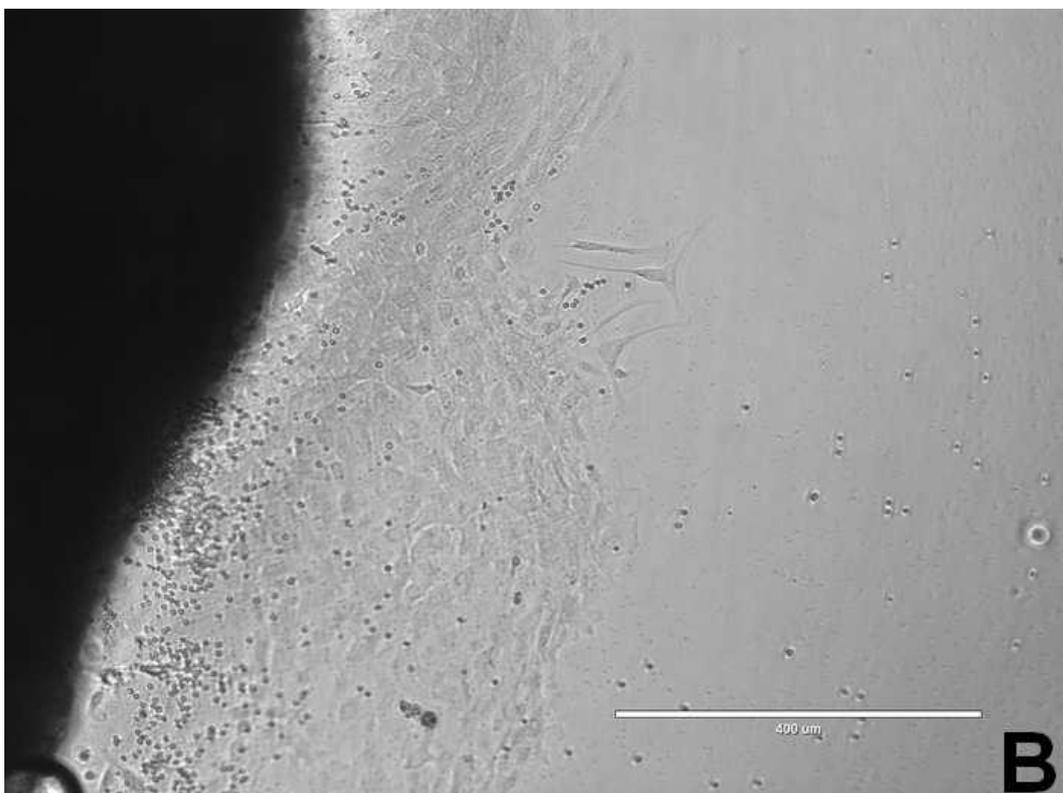
Après quelques jours, un grand nombre de fibroblastes (cellules fusiformes) sont visibles autour des explants ainsi que des cellules épithéliales (cellules cubiques). Les fibroblastes sont ensuite sélectionnés car ils fournissent les chromosomes nécessaires aux caryotypes et à la réalisation de sondes chromosomiques (*cf.* 78Figure 11 A. et B.).

Figure 11 : Observation microscopique de l'évolution des cultures cellulaires à partir d'une biopsie cutanée de marmouset commun (x 100)

*A. Observation des explants après 2 jours de culture, seules des hématies sont visibles*



*B. Observation des explants après 4 jours de culture, des fibroblastes sont visibles*



## 2.3.2. Caryotypes

### 2.3.2.1. Caryotype de l'espèce *Callithrix jacchus* en coloration conventionnelle

Le marmouset commun (*Callithrix jacchus*) possède sept paires de chromosomes métacentriques : ce sont les paires 1, 2, 6, 8, 12, 21 et 22.

Cette espèce possède huit paires de chromosomes submétacentriques : ce sont les paires 3, 4, 5, 7, 9, 10, 11 et 13.

On trouve aussi sept paires de chromosomes acrocentriques : ce sont les paires 14, 15, 16, 17, 18, 19 et 20.

Enfin, on observe que le chromosome sexuel X est métacentrique, de taille intermédiaire entre les chromosomes 6 et 12. Le chromosome Y est le plus petit du caryotype et est acrocentrique.

Finalement, on obtient un caryotype à  $2n = 46$  chromosomes (cf. Figure 12 et Figure 13)

Figure 12 : Métaphase d'une cellule de *Callithrix jacchus* à  $2n = 46$  en coloration conventionnelle (grossissement x 1000)

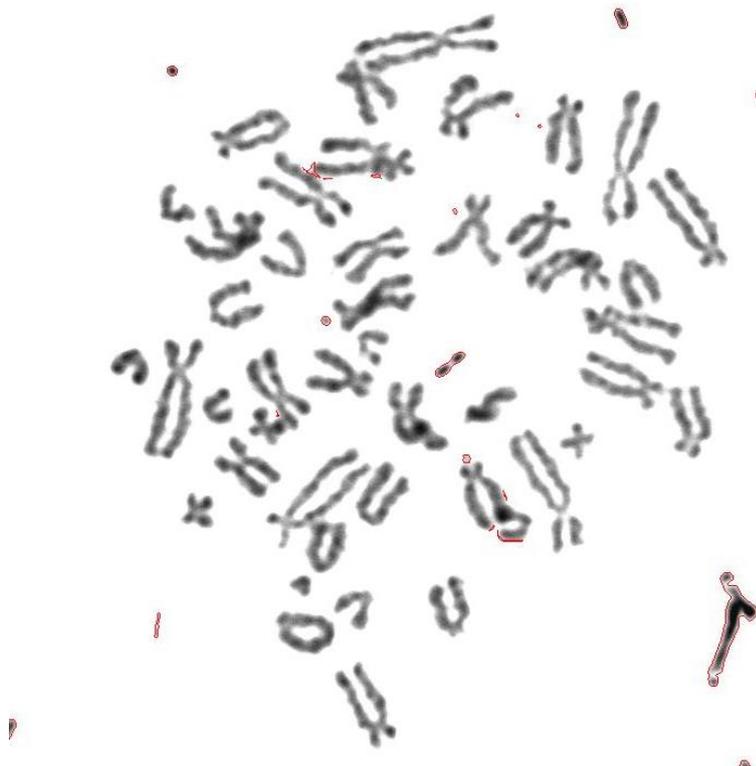
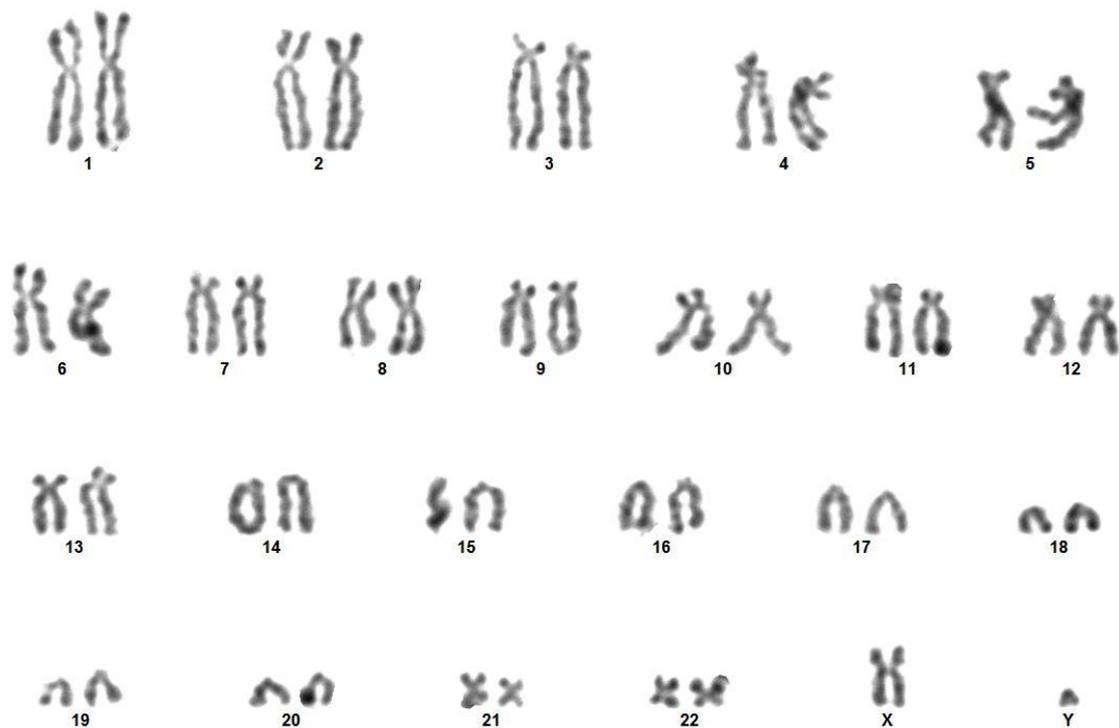


Figure 13 : Caryotype de l'espèce *Callithrix jacchus* (individu mâle XY) en coloration conventionnelle (grossissement x 1000)



Ce caryotype a été obtenu à partir de la métaphase en Figure 12.

#### 2.3.2.2. Caryotype de l'espèce *Callithrix jacchus* en coloration en bandes G

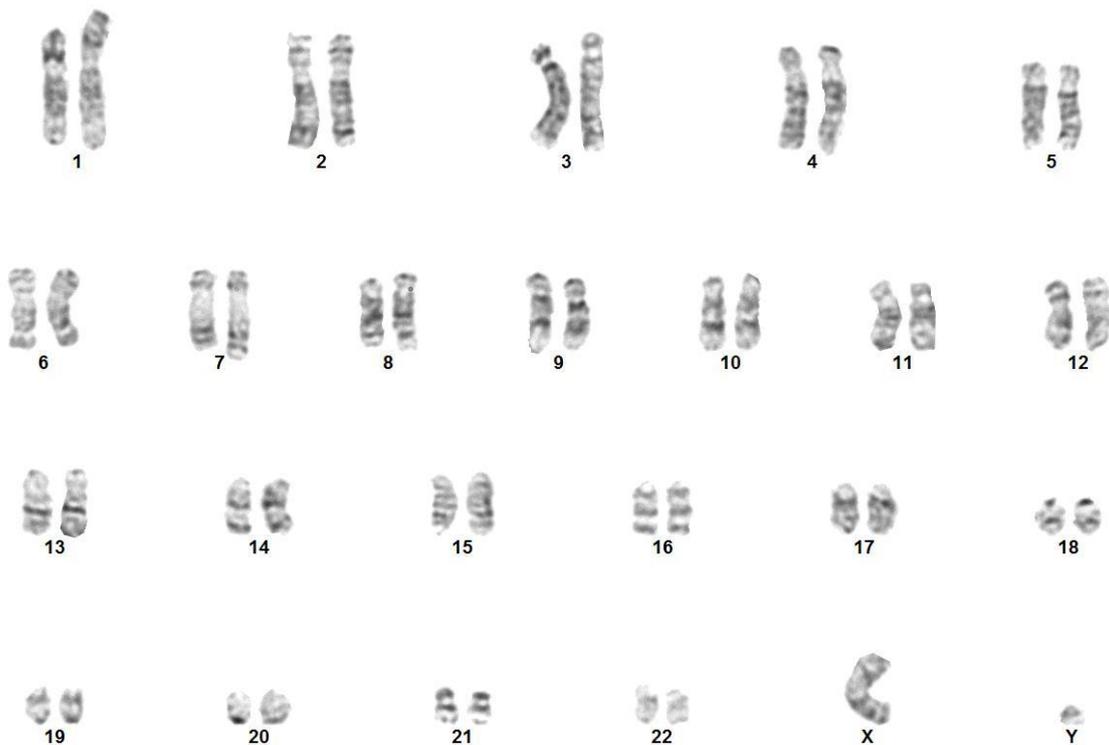
En coloration en bandes G, les centromères apparaissent en général gris clair. On réalise les mêmes observations que celles décrites paragraphe 2.3.2.1, avec la présence de sept paires de chromosomes métacentriques, huit paires de chromosomes submétacentriques, sept paires de chromosomes acrocentriques et une paire de chromosomes sexuels (*cf.* Figure 14 et Figure 15).

Le *banding* obtenu par coloration en bandes G permet d'appairer les chromosomes par leur marquage en plus des critères de taille et d'indice centromérique.

Figure 14 : Métaphase d'une cellule de *Callithrix jacchus* en coloration en bandes G (grossissement x 1000)



Figure 15 : Caryotype de *Callithrix jacchus* (sujet mâle XY) en coloration en bandes G (grossissement x 1000)



### 2.3.2.3. Caractéristiques des chromosomes sexuels chez *Callithrix jacchus*

La réalisation des caryotypes présentés dans les paragraphes 2.3.2.1 et 2.3.2.2 avait pour principal but d'observer les caractéristiques des chromosomes sexuels du marmouset commun. L'objectif étant de savoir les différencier pour pouvoir réaliser l'étape de microdissection le plus spécifiquement possible.

Dans le cas du chromosome Y, la reconnaissance est assez aisée. En effet, ce chromosome est le plus petit de la métaphase lorsqu'elle est complète, comme c'est le cas dans beaucoup d'autres espèces. Il est acrocentrique et de couleur globalement assez claire avec une à deux bandes grises plus ou moins marquées (cf. Figure 16)

Figure 16 : Chromosome Y de marmouset commun en coloration en bandes G (grossissement x 2000)



La reconnaissance du chromosome X est plus difficile que celle du chromosome Y étant donné que c'est un chromosome métacentrique de taille intermédiaire entre les paires de chromosomes 6 et 12. Au sein d'une métaphase, il peut donc être confondu avec les autres paires de chromosomes métacentriques de cette taille. Au niveau de son marquage, il est de couleur globalement assez claire avec deux bandes noires fines bien délimitées de part et d'autre du centromère. Parfois, on peut voir apparaître une troisième bande noire sur le dernier tiers du bras q (cf. Figure 17). La confusion avec les paires 6 et 12 est possible car leur marquage est assez similaire. La différenciation se fait sur la netteté des bandes et la taille relative.

Figure 17 : Chromosome X de marmouset commun en coloration en bandes G (grossissement x 2000)



### 2.3.3. Sondes chromosomiques

#### 2.3.3.1. Rappel du principe de réalisation des sondes

Des sondes de chromosomes X et Y de marmouset commun ont été fabriquées selon le protocole décrit paragraphe 2.2.7. Elles ont ensuite été hybridées et révélées selon une méthode d'hybridation *in situ* par fluorescence (FISH), dont le principe est résumé sur la Figure 7, page 52.

#### 2.3.3.2. Test des sondes sur lames cytologiques

##### 2.3.3.2.1. Premiers résultats

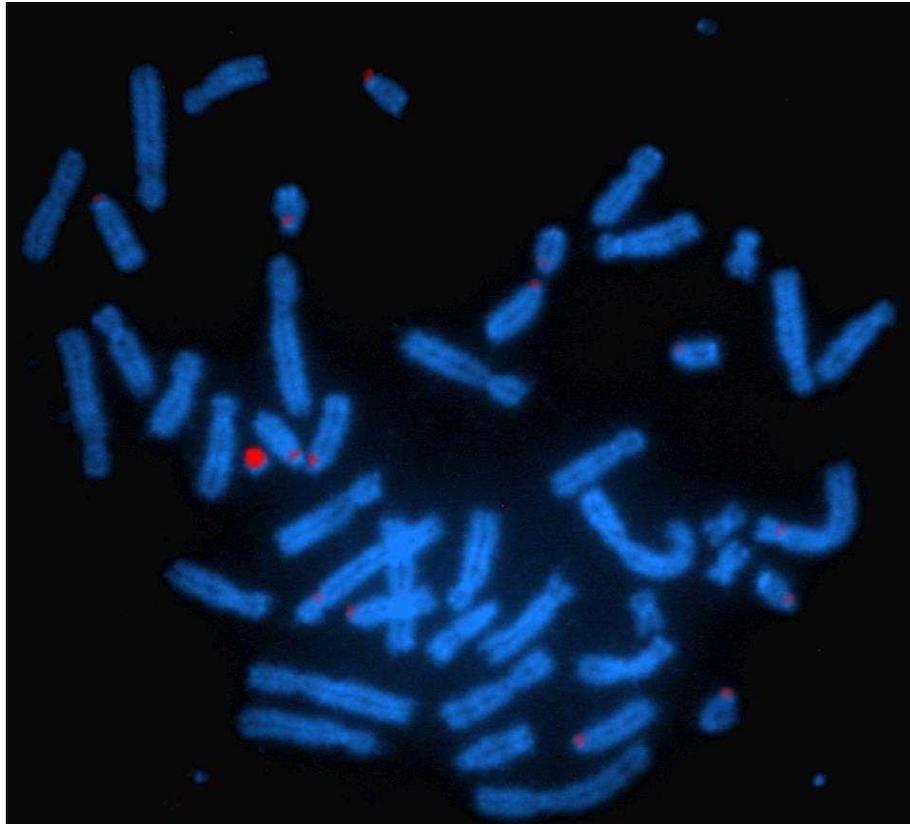
La première étape après la fabrication des sondes chromosomiques a été de les tester sur des étalements de cellules (lymphocytes ou fibroblastes) cultivées préalablement sur notre plateforme. Le but étant de vérifier la spécificité des sondes aux chromosomes sexuels en observant des signaux fluorescents.

##### 2.3.3.2.1.1. Sonde du chromosome Y

Après microdissection du chromosome Y, nous avons obtenu une sonde que nous avons ensuite testée sur des métaphases de cellules de marmouset mâle (*cf.* Figure 18). L'ADN compétiteur utilisé est un compétiteur humain « COT » commercialisé par SIGMA-ALDRICH™, 15 µg par sonde.

Figure 18 : Métaphase de cellule de marmouset mâle après hybridation de sonde du chromosome Y (grossissement x1000)

*Le chromosome Y est marqué par notre sonde de chromosome Y couplée à de la biotine puis révélée par la « Streptavidin, Alexa Fluor® 594 » (SAF594), un fluorochrome rouge.*



On remarque que le signal rouge de la sonde du chromosome Y est très fort et recouvre presque tout le chromosome, ce qui signe une bonne spécificité de notre sonde.

Cependant, certains signaux parasites sont présents sur les centromères d'autres chromosomes. Ceci constitue un « bruit de fond » qui peut être diminué par un ajustement de l'ADN compétiteur.

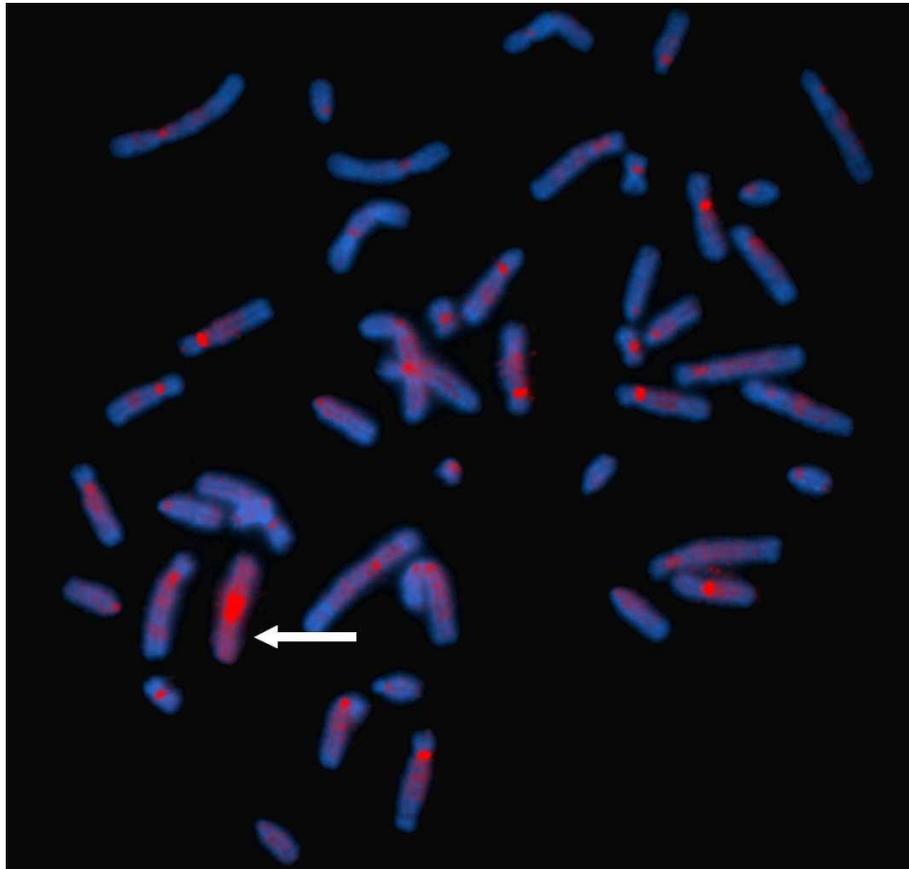
2.3.3.2.1.2. *Sonde du chromosome X*

Après microdissection du chromosome X, nous avons obtenu une sonde que nous avons ensuite testée sur des métaphases de cellules de marmouset mâle (cf. Figure 19

Figure 19). L'ADN compétiteur utilisé est un compétiteur humain « COT » commercialisé par SIGMA-ALDRICH™, 15 µg par sonde.

Figure 19 : Métaphase de cellule de marmouset mâle après hybridation de sonde du chromosome X (grossissement x1000)

*Le chromosome X est marqué par la sonde du chromosome X couplée à de la biotine puis révélée par la « Streptavidin, Alexa Fluor® 594 » (SAF594), un fluorochrome rouge.*



On remarque que le signal rouge de la sonde du chromosome X (indiqué par une flèche blanche) est assez fort et recouvre totalement le chromosome, en étant plus important au niveau du centromère. Cependant, il y a là aussi des signaux centromériques parasites sur d'autres chromosomes, qui semblent d'ailleurs plus importants que pour la sonde du chromosome Y. Bien que nos sondes de chromosome X et Y semblent spécifiques, un ajustement de l'ADN compétiteur est nécessaire pour tenter de diminuer les hybridations non spécifiques observées.

## 2.3.3.2.2. Influence de la nature et de la quantité d'ADN compétiteur

### 2.3.3.2.2.1. *Production d'ADN compétiteur de marmouset commun « maison »*

Pour rappel, l'ADN compétiteur est de l'ADN génomique dont le rôle est de s'hybrider sur les régions non spécifiques (séquences répétées). En FISH, l'ajout d'ADN compétiteur permet de réduire le « bruit de fond » (c'est-à-dire les hybridations non spécifiques).

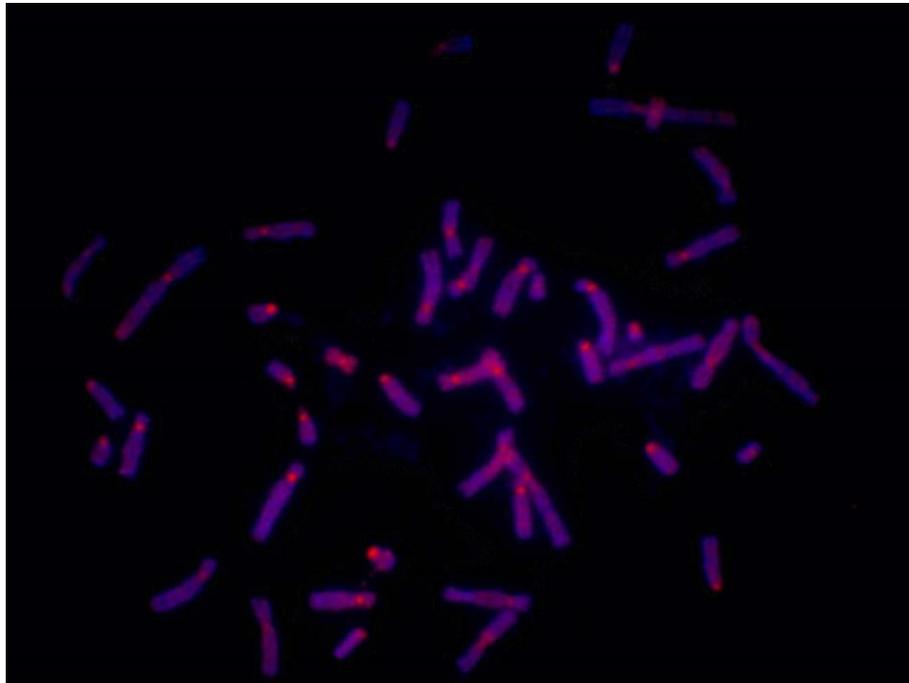
Au départ, nous n'avions à notre disposition qu'un ADN compétiteur humain du commerce (« COT ») pour la réalisation des sondes. Nous avons d'abord supposé que, bien que l'Homme et le marmouset commun soient assez éloignés phylogénétiquement, les séquences répétées de leur génome peuvent être similaires entre ces deux espèces. Aux vues des premiers résultats (*cf.* paragraphe 2.3.3.2.1), cette hypothèse est en partie correcte mais il subsiste néanmoins un bruit de fond, en particulier au niveau des centromères.

Nous avons donc produit 1,5 mL d'ADN compétiteur de marmouset (*cf.* paragraphe 2.2.6) à partir de foie et de rate. La concentration en ADN obtenue, mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre est de 583 ng/ $\mu$ L avec des ratios 260/280 et 230/280 supérieurs à 1,8, signifiant que notre ADN compétiteur n'est pas contaminé par des protéines, des phénols ou d'autres contaminants.

Pour s'assurer de sa qualité, une sonde FISH a été préparée à partir de cet ADN compétiteur « maison ». Nous avons ensuite hybridé cette sonde de compétiteur sur une lame cytologique de marmouset, révélée par la SAF594 (rouge), *cf.* Figure 20.

Figure 20 : Métaphase de cellule de marmouset mâle après hybridation de sonde préparée à partir d'ADN compétiteur de marmouset "maison" uniquement (grossissement x1000)

*La sonde d'ADN compétiteur « maison » est couplée à de la biotine puis révélée par la « Streptavidin, Alexa Fluor® 594 » (SAF594), un fluorochrome rouge.*



En visualisation directe au microscope à fluorescence, on remarque que la sonde s'hybride de manière non spécifique sur tous les chromosomes de la métaphase. De plus, elle s'hybride préférentiellement au niveau centromérique, ce qui est cohérent car ces zones contiennent beaucoup de séquences répétées. Ce résultat traduit la bonne qualité de l'ADN compétiteur de marmouset commun que nous avons produit.

#### *2.3.3.2.2. Hybridation des sondes X et Y et influence de l'ADN compétiteur utilisé*

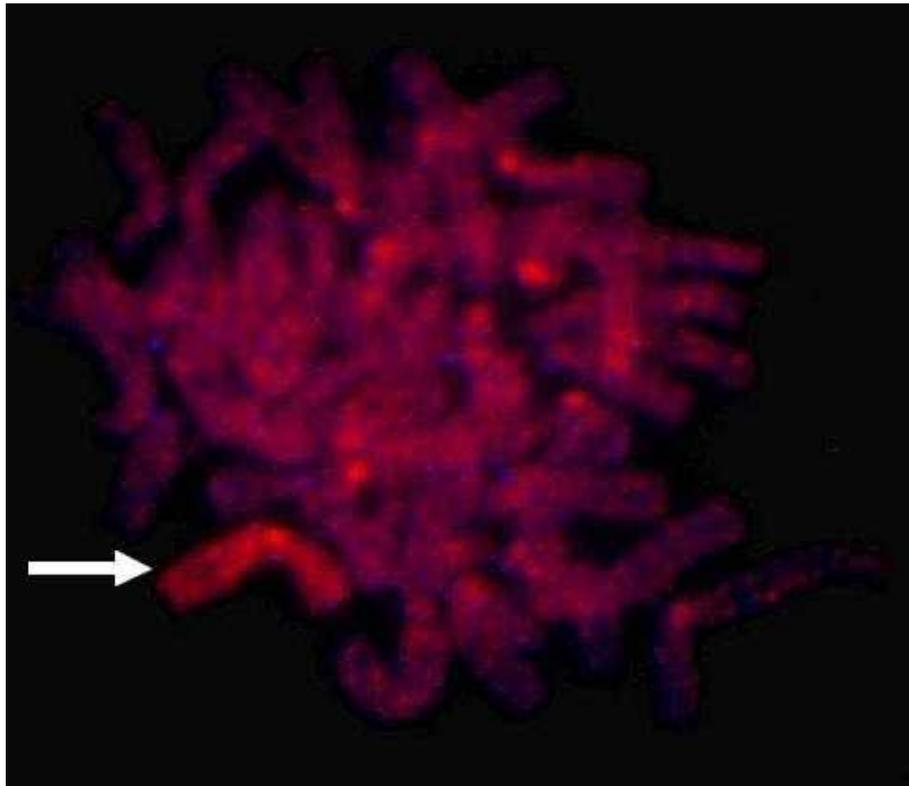
Après avoir produit et testé notre propre ADN compétiteur de marmouset, nous l'avons utilisé pour la fabrication de sondes de chromosomes X et Y.

Nous avons commencé par hybrider nos sondes avec 15 µg d'ADN compétiteur de marmouset, par analogie avec la quantité utilisée d'ADN compétiteur humain « COT ». Ce test a conduit à une disparition totale des signaux émis par les sondes après hybridation sur lame. Nous en avons déduit que la quantité d'ADN compétiteur de marmouset utilisée (15 µg) était trop importante.

Nous avons ensuite testé les sondes avec 10 µg d'ADN compétiteur de marmouset et avons observé une présence importante de bruit de fond (cf. Figure 21).

Figure 21 : Métaphase de cellule de marmouset mâle après hybridation de sondes de X et Y préparées avec 10 µg d'ADN compétiteur de marmouset "maison" (grossissement x1000)

*Le chromosome X et le chromosome Y sont marqués par les sondes des chromosomes X et Y couplées à de la biotine puis révélées par la « Streptavidin, Alexa Fluor® 594 » (SAF594), un fluorochrome rouge.*



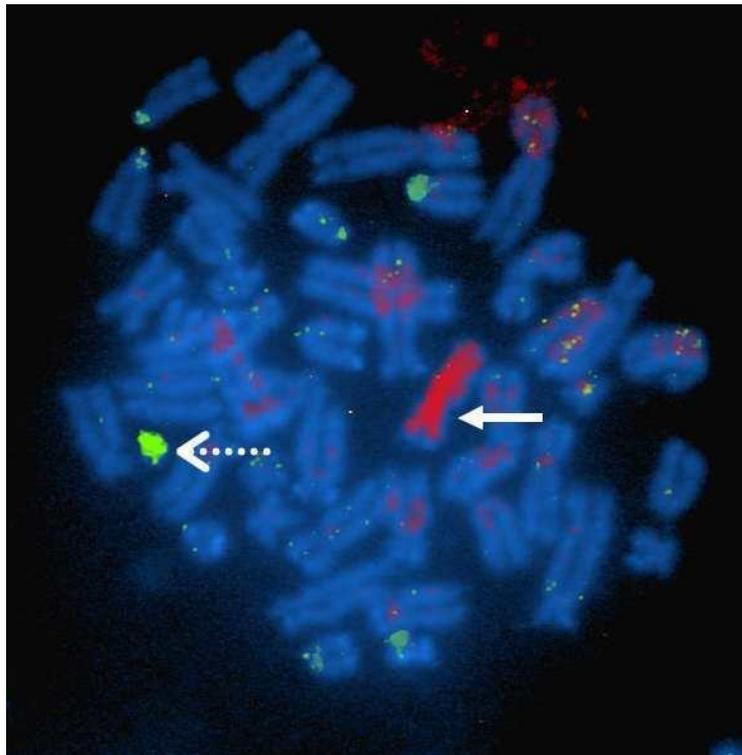
On remarque que le chromosome X (indiqué par une flèche blanche) est bien visible mais le bruit de fond (en rouge) présent sur les autres chromosomes masque complètement le signal de la sonde du chromosome Y. Ce bruit de fond important peut être le signe que la quantité d'ADN compétiteur utilisée (10 µg) est trop faible.

Après ces deux premiers essais infructueux, nous avons ensuite essayé de mélanger de l'ADN compétiteur humain (noté H) et de l'ADN compétiteur de marmouset commun « maison » (noté M). Avec une quantité de 10 µg d'H et 10 µg d'M pour une même sonde, nous sommes arrivés à limiter le bruit de fond tout en conservant les signaux émis par les sondes des chromosomes X et Y (cf. Figure 22).

Figure 22 : Métaphase de cellule de marmouset mâle après hybridation de sondes de X et Y préparées avec 10 µg d'ADN compétiteur de marmouset "maison" et 10 µg d'ADN compétiteur humain « COT » (grossissement x1000)

*Le chromosome X est marqué par la sonde de chromosome X couplée à de la biotine puis révélée par la « Streptavidin, Alexa Fluor® 594 » (SAF594), un fluorochrome rouge (flèche blanche pleine).*

*Le chromosome Y est marqué par la sonde de chromosome Y couplée à de la digoxigénine révélée par la fluorescéine (FITC), un fluorochrome vert (flèche blanche en pointillés).*



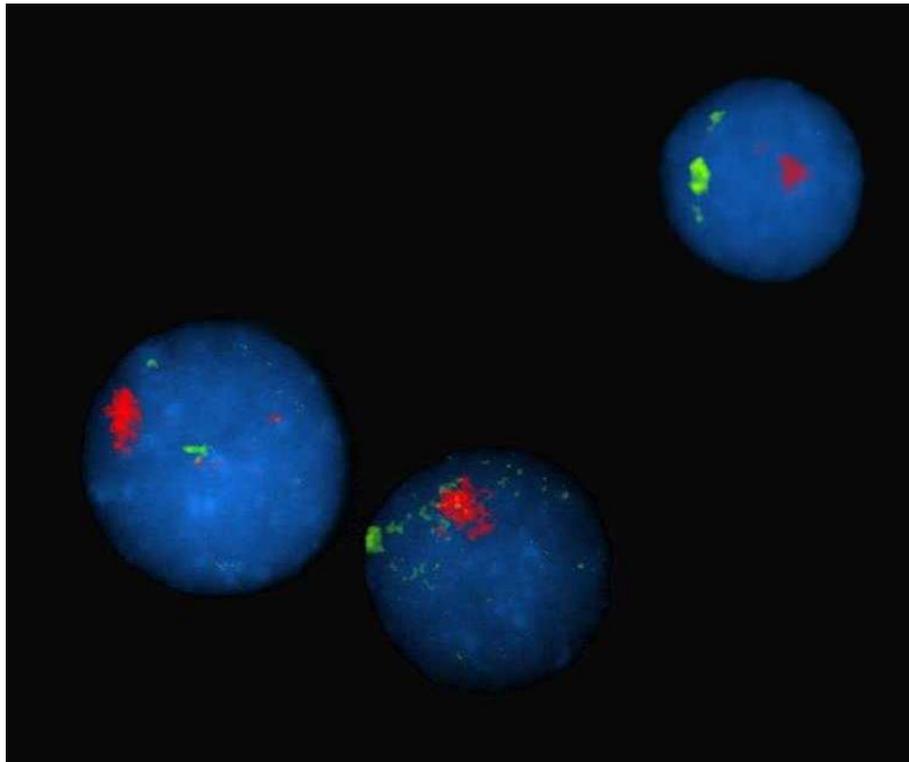
Avec ce mélange de compétiteur (10 µg d'H + 10 µg d'M), on observe un marquage du chromosome X et du chromosome Y spécifique avec un bruit de fond limité mais qui reste tout de même présent.

Nous avons aussi pu observer des signaux ponctuels uniques sur des noyaux interphasiques, marquant la présence du chromosome X et du chromosome Y dans ces cellules (cf. Figure 23). Cette observation permettra, en pratique, de discriminer les cellules mâles XY (un signal rouge, un signal vert) des cellules femelles XX (deux signaux rouges).

Figure 23 : Noyaux interphasiques de cellules de marmouset mâle après hybridation de sondes de X et Y préparées avec 10 µg d'ADN compétiteur de marmouset "maison" et 10 µg d'ADN compétiteur humain « COT » (grossissement x1000)

*La sonde de chromosomes X est couplée à de la biotine puis révélée par la « Streptavidin, Alexa Fluor® 594 » (SAF594), un fluorochrome rouge.*

*La sonde de chromosome Y est couplée à de la digoxigénine révélée par la fluorescéine (FITC), un fluorochrome vert.*



En observant ces noyaux interphasiques, on distingue bien deux signaux ponctuels, un rouge et un vert, signant la présence du chromosome X et du chromosome Y. Le bruit de fond reste présent mais ne gêne pas la lecture des résultats

#### 2.3.3.3. Test des sondes sur coupes histologiques

Des hybridations de sondes de chromosomes X et Y ont été réalisées selon le protocole décrit au paragraphe 2.2.9. Différentes coupes d'organes ont été testées : coupe de peau, d'intestin grêle, de foie et de testicules de marmouset commun mâle. Finalement, par commodité de lecture, seuls les coupes d'intestin grêle et de testicules ont été retenues.

### 2.3.3.3.1. Test des sondes sur coupes histologiques d'intestin grêle

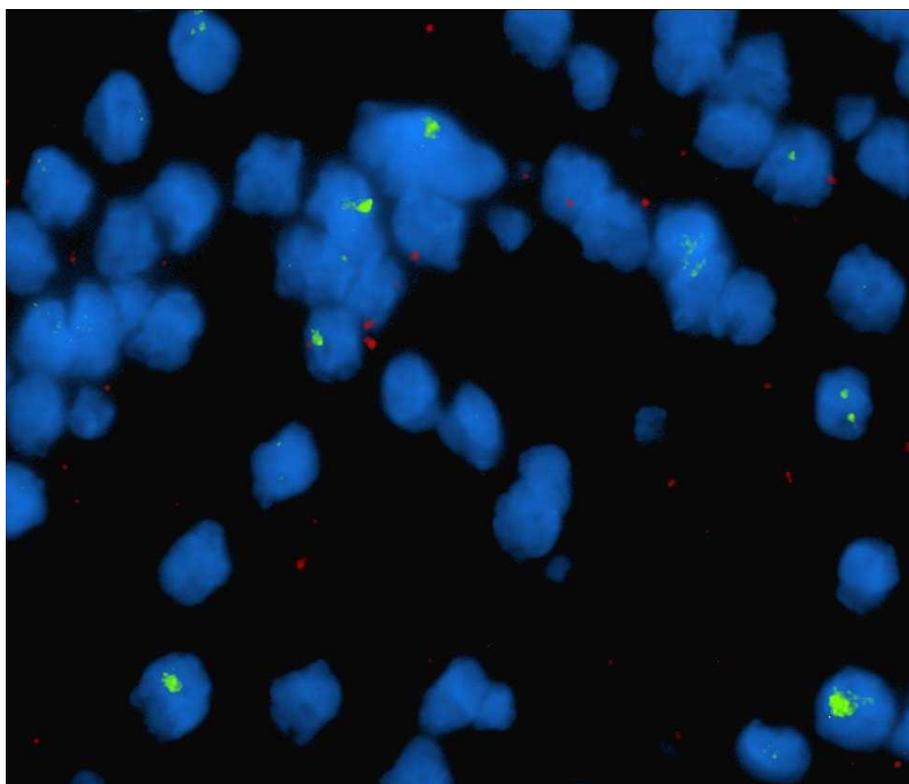
Lors de la phase de pré-traitement des lames (*cf.* paragraphe 2.2.9.1.3, page 74), une digestion enzymatique à la pepsine est à réaliser par le manipulateur. La durée pendant laquelle la pepsine est laissée à agir peut varier entre 2 et 15 minutes selon la nature du tissu, sa fixation, et l'épaisseur de la coupe. Pour nos premiers essais, nous avons décidé empiriquement de commencer par un temps de digestion à la pepsine de 6 minutes (*cf.* Figure 24).

Figure 24 : Noyaux de cellules de la sous-muqueuse de l'intestin grêle de marmouset mâle après hybridation de sonde de Y et de X préparées avec 10 µg d'ADN compétiteur de marmouset "maison" et 10 µg d'ADN compétiteur humain « COT » (grossissement x1000)

*La sonde de chromosome Y est couplée à de la digoxigénine révélée par la fluorescéine (FITC), un fluorochrome vert.*

*La sonde de chromosomes X est couplée à de la biotine puis révélée par la « Streptavidin, Alexa Fluor® 594 » (SAF594), un fluorochrome rouge.*

*Le temps de digestion à la pepsine est de 6 minutes pour cette lame.*



Sur cette vue microscopique de cellules de la sous-muqueuse d'intestin grêle, on observe des signaux ponctuels verts uniques dans plusieurs noyaux cellulaires. Cela traduit une hybridation spécifique de la sonde du chromosome Y. Cependant, tous ces

noyaux cellulaires ne sont pas marqués alors que le chromosome Y se trouve dans tous les noyaux cellulaires. Ceci vient essentiellement du fait que la coupe ne passe pas par toute l'épaisseur du noyau cellulaire.

De plus, on n'observe pas de signaux rouges à l'intérieur des cellules, seules quelques hybridations non spécifiques apparaissent par endroits. Cela traduit une absence d'hybridation spécifique de la sonde du chromosome X sur cette coupe histologique. Ceci peut provenir d'une digestion enzymatique à la pepsine insuffisante ou bien d'un défaut d'hybridation.

### 2.3.3.3.2. Test des sondes sur coupes histologiques de testicules

Pour tester nos sondes de chromosomes X et Y, nous avons choisi de les hybrider sur des coupes histologiques de testicules. En effet, selon les différentes étapes de division cellulaire observable dans les tubes séminifères de testicules, on peut normalement voir apparaître différents marquages. Ces étapes de divisions sont rappelées en Figure 25 et Figure 26.

Figure 25 : Schémas représentant un testicule en coupe longitudinale (A), une coupe transversale de tube séminifère (B), les types cellulaires retrouvés en coupe transversale de tube séminifère (C), et les étapes de méiose correspondantes (D) (d'après un schéma de l'Université De Boeck, 2007)

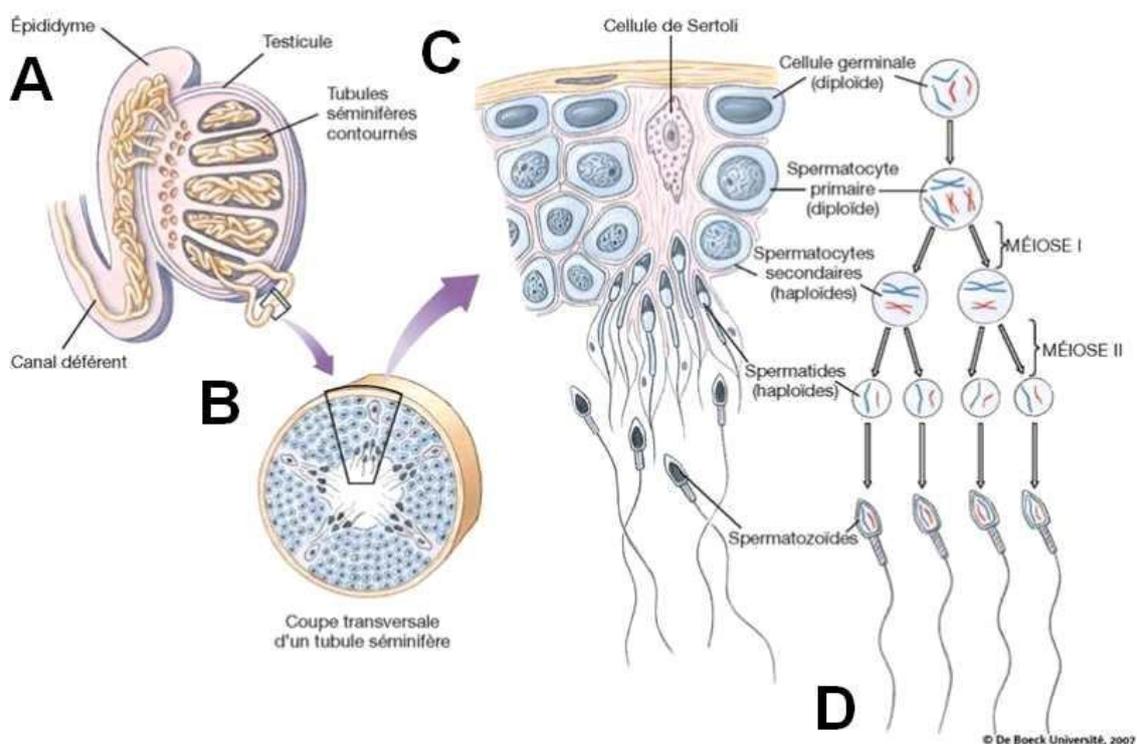
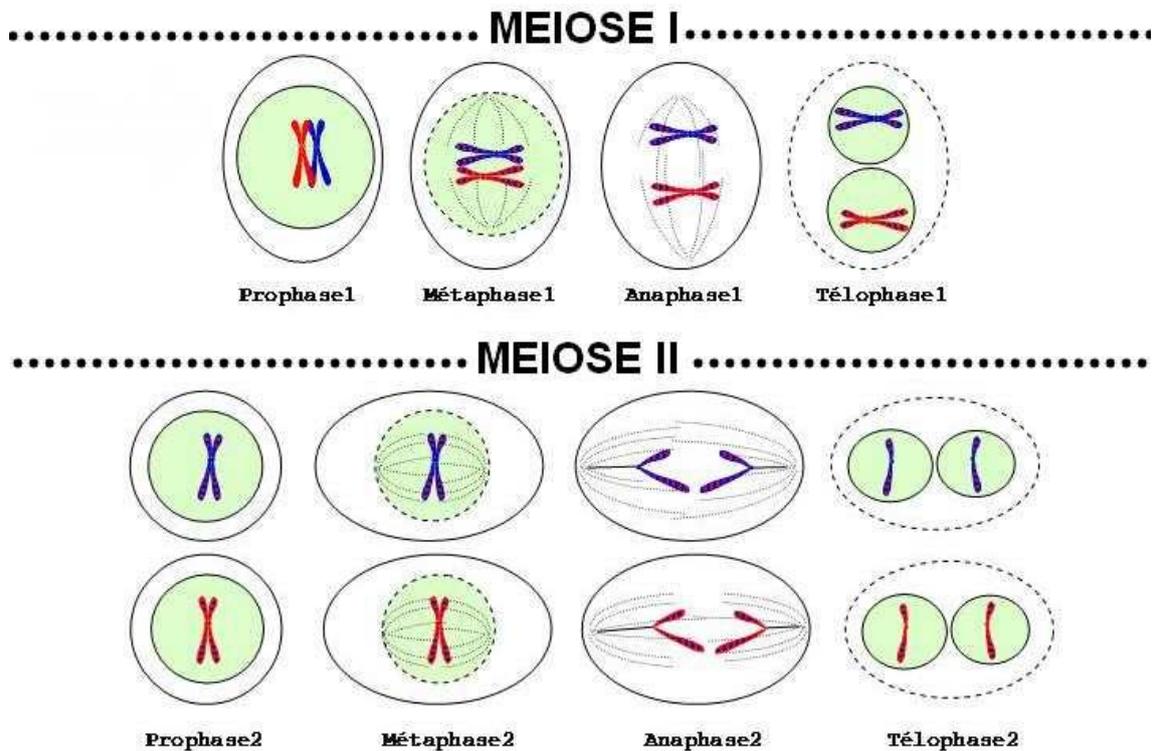


Figure 26 : Schéma simplifié des étapes de méiose (d'après un dessin original de Michel Hamels)



D'après la Figure 25 et la Figure 26, nous devrions pouvoir observer 4 types de marquage sur des coupes histologiques de testicules :

- Des cellules germinales XY (un signal rouge et un signal vert) dont les signaux seront bien distincts,
- Des spermatocytes primaires XY (un signal rouge et un signal vert) dont les signaux seront colocalisés car il y a appariement des chromosomes sexuels en prophase I de méiose,
- Des spermatocytes secondaires X ou Y (un signal rouge ou un signal vert), dont le signal sera le même que pour les spermatides X ou Y (un signal rouge ou un signal vert),
- Des spermatocytes secondaires X ou Y en anaphase II de méiose (deux signaux rouges ou deux signaux verts).

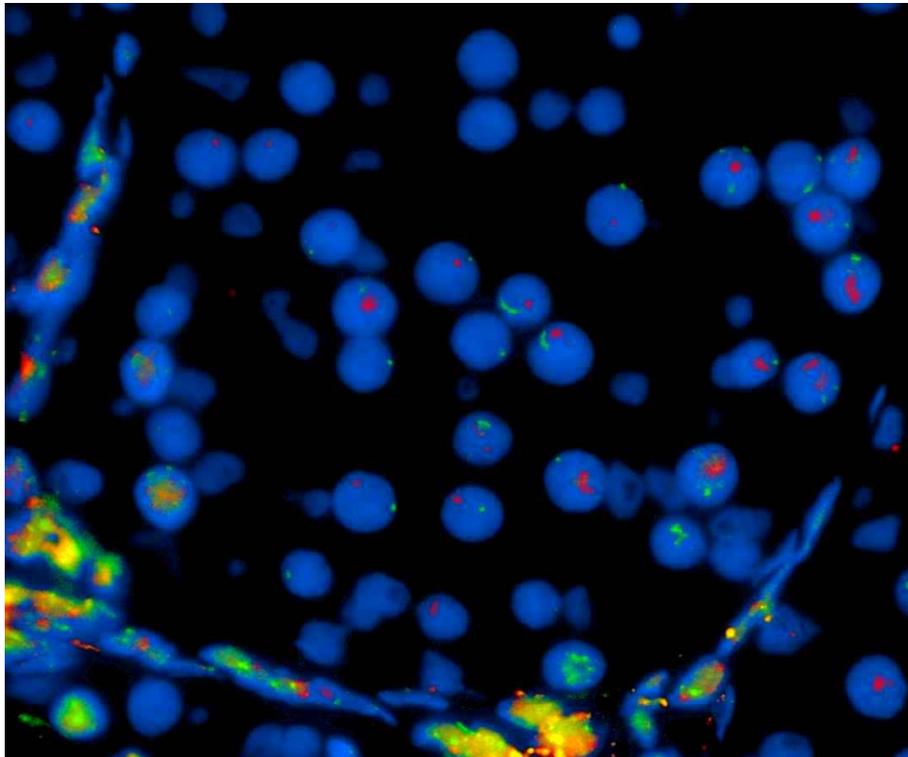
En pratique nous avons pu observer certains de ces marquages après avoir hybridé nos sondes de chromosomes X et Y sur coupes histologiques de testicules de marmouset (cf. Figure 27 et Figure 28).

Le temps de digestion enzymatique choisi pour le traitement de ces coupes est de 15 minutes. En effet, il a été augmenté par rapport aux coupes d'intestin grêle après avoir observé des défauts d'hybridation (*cf.* paragraphe 2.3.3.3.1).

Figure 27 : Noyaux de cellules de testicules de marmouset après hybridation de sonde de chromosome Y et de sonde de chromosome X préparées avec 10 µg d'ADN compétiteur de marmouset "maison" et 10 µg d'ADN compétiteur humain « COT » (grossissement x400)

*La sonde de chromosomes X est couplée à de la biotine puis révélée par la « Streptavidin, Alexa Fluor® 594 » (SAF594), un fluorochrome rouge.*

*La sonde de chromosome Y est couplée à de la digoxigénine révélée par la fluorescéine (FITC), un fluorochrome vert.*



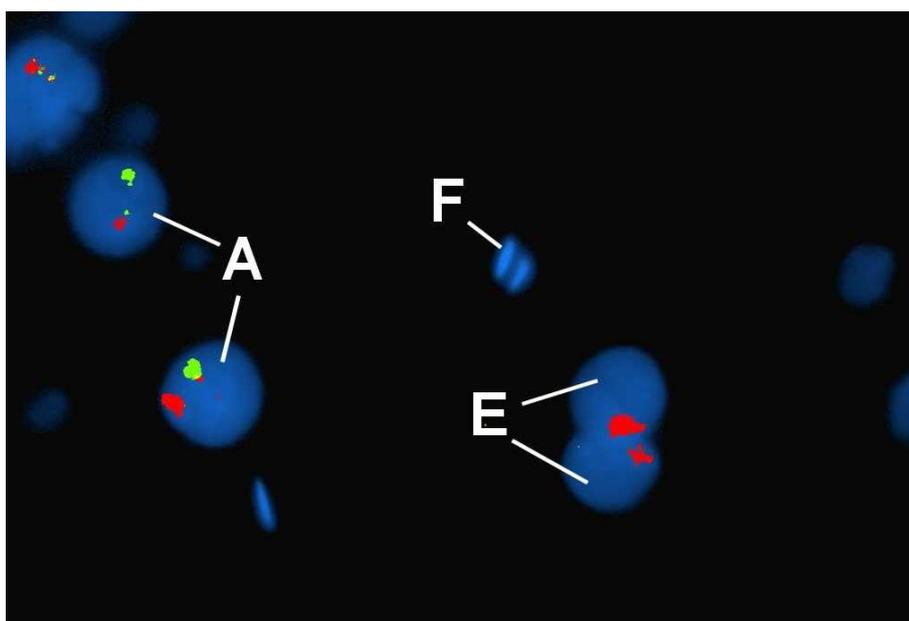
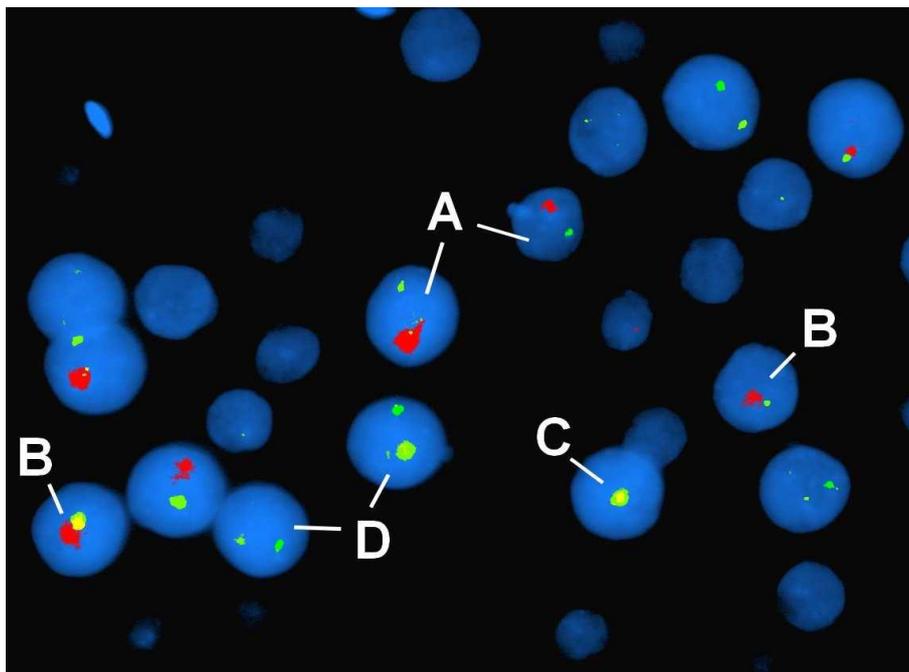
Sur cette vue globale d'une coupe de testicule, on remarque que la majorité des noyaux cellulaires (en bleu) présentent un signal X (rouge) et un signal Y (vert) unique et ponctuel. Une auto-fluorescence inévitable subsiste au niveau de la matrice interstitielle (mélange de signaux rouges et verts non spécifiques).

Figure 28 : Noyaux de cellules de testicule de marmouset après hybridation de sonde de chromosome Y et de sonde de chromosome X préparées avec 10 µg d'ADN compétiteur de marmouset "maison" et 10 µg d'ADN compétiteur humain « COT » (grossissement x1000)

*La sonde de chromosomes X est couplée à de la biotine puis révélée par la « Streptavidin, Alexa Fluor® 594 » (SAF594), un fluorochrome rouge.*

*La sonde de chromosome Y est couplée à de la digoxigénine révélée par la fluorescéine (FITC), un fluorochrome vert.*

*Le temps de digestion à la pepsine est de 15 minutes pour cette lame.*



La Figure 28 montre certaines cellules sur lesquelles nous avons pu observer des marquages qui pourraient correspondre à celui de : cellules germinales XY (A), spermatocytes primaires XY dont les signaux sont colocalisés (B), spermatocyte Y ou spermatide Y (C), spermatocytes secondaires Y en anaphase II de méiose (D), et spermatides X (E). Enfin, soulignons le fait que certains noyaux cellulaires dont les chromosomes sont très condensés (noyaux de spermatozoïdes notés F par exemple) demeurent imperméables à l'hybridation des sondes.

Notre travail a donc fourni un caryotype de l'espèce *Callithrix jacchus*. L'intérêt d'avoir produit ce caryotype sur notre plateforme est de pouvoir se familiariser avec pour le maîtriser afin de réussir l'étape de microdissection chromosomique. En effet, la microdissection des chromosomes sexuels chez le marmouset commun est une étape délicate et nécessite une reconnaissance pointue de ceux-ci pour que la dissection soit la plus spécifique possible. Plus la dissection chromosomique est spécifique, plus les sondes d'ADN le seront, ce qui détermine la qualité du produit final.

Notre étude a ainsi permis de fabriquer des sondes chromosomiques dirigées vers les chromosomes X et Y de marmouset commun ce qui, à notre connaissance, n'avait jamais été réalisé auparavant. Les tests menés sur des coupes histologiques sont encourageants car ils montrent des hybridations spécifiques au sein de noyaux cellulaires. Mais les nombreuses hybridations non spécifiques sont problématiques. En effet, le bruit de fond qu'elles produisent empêche la lecture claire des résultats. Il sera donc nécessaire de retravailler nos sondes et leur préparation afin qu'elles puissent être exploitées comme outil de recherche.

## 2.4. Discussion

L'objectif principal de cette étude était de créer une sonde d'ADN dirigée vers le chromosome sexuel Y du marmouset commun (*Callithrix jacchus*) en FISH (*fluorescence in situ hybridization*). Cette sonde devait permettre de localiser une cellule souche mâle « XY » de marmouset préalablement administrée chez une femelle marmouset « XX » sur des coupes histologiques d'encéphale ayant reçu une greffe de matériel PDMS.

Pour atteindre cet objectif, les étapes à réaliser ont été nombreuses et nous avons rencontré certaines difficultés développées dans cette partie. Des pistes pour améliorer le protocole employé sont aussi proposées.

### 2.4.1. Réalisation du caryotype de marmouset commun (*Callithrix jacchus*)

#### 2.4.1.1. Type cellulaire utilisé et traitement des cultures

Afin d'obtenir des cellules en métaphase de mitose pour la réalisation du caryotype de marmouset commun, nous avons cultivé et traité des leucocytes provenant d'un prélèvement sanguin de marmouset. Ce type cellulaire est utilisé en routine par la plateforme de cytogénétique de l'ENVT pour réaliser des diagnostics d'anomalies génétiques chez le porc et le bovin par exemple.

Pour le traitement des échantillons de sang, deux agents mitogènes étaient disponibles, la concanavaline A (ConA) et le *pokeweed* (PKW). Après étalement sur lame, les cellules provenant de la culture avec la ConA étaient plus nombreuses, mais celles provenant de la culture avec le PKW donnaient des chromosomes plus faciles à distinguer et plus faciles à étaler. Nous avons donc choisi de privilégier le Pokeweed pour nos cultures de cellules sanguines de marmouset commun.

Il aurait également été possible d'utiliser des fibroblastes cultivés à partir d'échantillons de peau pour réaliser le caryotype du marmouset commun.

#### 2.4.1.2. Classement des chromosomes

Comme nous n'avons que très peu de modèles existants de caryotype de marmouset commun, nous avons classé les chromosomes selon une méthode de caryotype standard. Les chromosomes ont été classés par paire, en respectant un ordre de taille décroissante. Ils ont été appairés en fonction de leur marquage en bande et de leur

indice centromérique. Les chromosomes sexuels ont été placés en fin de caryotype par convention.

Notre version du caryotype de *Callithrix jacchus* n'est pas universelle et l'ordre dans lequel nous avons classé les chromosomes peut être contesté. Cependant, cela n'entrave en rien la possibilité de reconnaître les chromosomes sexuels X et Y.

## 2.4.2. Production de sondes de chromosomes sexuels

### 2.4.2.1. Type cellulaire utilisé

Pour produire des sondes à partir de chromosomes sexuels de marmouset commun, nous avons besoin de cellules en métaphase de mitose. Pour les obtenir, deux types de cultures cellulaires ont été réalisés : des cultures à partir de tissu cutané et des cultures à partir de sang.

Les cultures de fibroblastes à partir de prélèvements cutanés *ante* et *post mortem* présentent l'avantage de produire un grand nombre de cellules en division et de permettre une congélation pour une conservation en vue d'une utilisation ultérieure. Cependant, cette technique de culture est assez fastidieuse à mettre en place (matériel spécifique nécessaire, milieux de culture, manipulation sous PSM) et elle nécessite un certain délai (3 semaines minimum) avant de pouvoir obtenir un nombre suffisant de cellules en division. Pour réaliser le prélèvement cutané *ante-mortem*, une anesthésie générale est obligatoire et des soins locaux sur la plaie de biopsie sont ensuite nécessaires.

Les cultures de leucocytes à partir de sang sont plus aisées à réaliser et surtout plus rapides (72 heures environ). Toutefois, le nombre de cellules en division est plus faible qu'avec les cultures de fibroblastes, mais surtout ces cellules ne peuvent pas être conservées ni réutilisées pour de nouvelles cultures. Enfin, le prélèvement sanguin chez le marmouset est très fastidieux du fait de la petite taille de cet animal (250 g environ) et il nécessite de toutes façons une anesthésie générale (la contention nécessaire génère trop de stress pour l'animal).

Ainsi, les prélèvements cutanés étant plus faciles à réaliser et permettant de récupérer plus de cellules en division sur le long terme, nous avons préféré opter pour la culture de fibroblastes en vue de la production des sondes d'ADN.

#### 2.4.2.2. Digestion à la trypsine

Après avoir étalé les cellules en division sur lamelles en vue d'une microdissection, une digestion à la trypsine puis une coloration au Giemsa sont réalisées (cf. paragraphe 2.2.2.2.2, page 59). Plonger les lamelles dans une solution de trypsine permet de digérer le cytoplasme cellulaire et de faire une digestion enzymatique nécessaire à l'apparition d'un *banding* chromosomique. Si la digestion à la trypsine est insuffisante, les chromosomes seront « englués » dans une grande quantité de cytoplasme et seront très difficiles à détacher par microdissection. Si la digestion à la trypsine est trop importante, les chromosomes seront faciles à récupérer mais ils seront potentiellement trop dégradés et mèneront à des sondes chromosomiques de mauvaise qualité. Enfin, la digestion à la trypsine doit être suffisante pour laisser apparaître le *banding* chromosomique qui doit être correct pour nous permettre de reconnaître le chromosome X.

Ainsi, en faisant varier le temps de digestion à la trypsine, il faut trouver un compromis permettant de faire apparaître un *banding* chromosomique suffisant à la reconnaissance des chromosomes sexuels, tout en conservant la qualité du matériel génétique qui servira ensuite à fabriquer nos sondes. En été, lorsque la température ambiante du laboratoire était aux alentours de 25°C, un temps de trypsine de 45 secondes était suffisant. En revanche, en hiver, lorsque la température du laboratoire était d'environ 20°C, un temps de trypsine de 1 minutes et 15 secondes était nécessaire pour obtenir des lamelles permettant la microdissection chromosomique. La température ambiante est donc un facteur à prendre en compte pour la détermination du temps de digestion à la trypsine.

#### 2.4.2.3. Nombre de chromosomes récupérés par microdissection

Après avoir réalisé plusieurs microdissections, nous avons remarqué qu'il était préférable de collecter au moins 10 copies de chromosomes X et minimum 15 copies de chromosomes Y pour pouvoir les amplifier ensuite selon le protocole énoncé en 2.2.4. La nécessité de récupérer plus de chromosomes Y que de X vient probablement du fait que le chromosome Y est plus petit et adhère donc moins à l'aiguille de microdissection (perte possible lors de la remontée de l'aiguille). De plus, le chromosome Y étant petit, il faut donc en collecter un plus grand nombre pour que la quantité d'ADN soit suffisante et que l'amplification soit efficace par la suite.

#### 2.4.2.4. Délai entre la microdissection et l'amplification

Comme d'autres ont pu le constater avant nous (Bonnemaison, 2017), le temps qui s'écoule entre la récupération des chromosomes par microdissection et le début de l'amplification PCR est un facteur critique pour la réussite des sondes d'ADN.

En effet, au cours des premiers essais de création des sondes, nous laissions s'écouler une nuit entre la microdissection et l'amplification. Les sondes qui en résultaient étaient de mauvaise qualité : signal faible, peu spécifique. Pour les tentatives suivantes, la microdissection était faite le matin et l'amplification l'après-midi. Cette méthode a permis d'obtenir des sondes de meilleure qualité, présentées dans ce manuscrit.

#### 2.4.3. Influence de l'ADN compétiteur

##### 2.4.3.1. Utilisation d'ADN compétiteur humain « COT »

Aujourd'hui, il n'existe pas d'ADN compétiteur de marmouset commun commercialisé en routine. C'est la raison pour laquelle nous avons d'abord commencé par produire nos sondes avec de l'ADN compétiteur humain « COT » (ROCHE™). Mais après avoir testé plusieurs quantités d'ADN compétiteur humain, les résultats étaient assez mitigés.

La quantité de 15 µg d'ADN compétiteur humain a conduit à des sondes de chromosome Y dont l'intensité du signal était satisfaisante mais quelques hybridations non spécifiques persistaient, au niveau des centromères des autres chromosomes par exemple. En augmentant la quantité d'ADN compétiteur humain, nous perdions totalement de signal de la sonde, aucun juste-milieu n'a pu être trouvé.

Pour la sonde de X, l'utilisation de 15 µg d'ADN compétiteur humain a laissé apparaître un trop grand nombre d'hybridations non spécifiques, noyant le signal de notre sonde dans un bruit de fond important. En utilisant plus de 15 µg d'ADN compétiteur humain, le signal de la sonde de X disparaissait totalement.

Une quantité de 15 µg d'ADN compétiteur humain aurait donc pu être utilisée pour la sonde d'Y mais ne convenait pas à la sonde de X. Or, il est nécessaire de préparer nos deux sondes dans les mêmes conditions de compétiteur car elles sont ensuite destinées à être mélangées pour pouvoir être hybridées en même temps sur une lame.

#### 2.4.3.2. Utilisation d'ADN compétiteur de marmouset « maison »

Après les échecs observés lors de l'utilisation d'ADN compétiteur humain, l'utilisation d'ADN compétiteur de marmouset s'est imposée. Or, il est possible de commander la production d'ADN compétiteur de marmouset par un laboratoire spécialisé mais cela représente un coût très important (de l'ordre de 100€ le milligramme) que nous ne pouvions pas assumer pour notre étude. Nous avons donc décidé de produire nous-même cet ADN compétiteur de marmouset avec le kit Nucléobond® Buffer Set IV de MACHEREY-NAGEL™.

Sa production a été fastidieuse et nous n'étions pas parfaitement équipés pour la réaliser. En effet, certaines étapes du protocole telles que l'homogénéisation des tissus à l'Ultra Turrax® (ICA™) et la centrifugation des échantillons à 4°C ont été réalisées par des méthodes alternatives car nous n'avions pas le matériel nécessaire. La sonication de l'ADN a été faite à l'extérieur, dans un laboratoire de l'INRA.

Même si nous avons fait certains tests pour estimer la qualité de notre ADN compétiteur « maison », celle-ci n'est pas totalement satisfaisante. En effet, en hybridant nos sondes d'ADN avec ce compétiteur, nous avons obtenu des résultats variables, qui n'étaient pas toujours reproductibles au fil des manipulations. En utilisant 10 µg d'ADN compétiteur de marmouset, nous avons produit des sondes dont le signal était satisfaisant mais les hybridations non-spécifiques au niveau des centromères persistaient. En augmentant cette quantité d'ADN compétiteur de marmouset le signal disparaissait totalement.

Pour trouver une solution à ce problème, nous avons mélangé les deux ADN compétiteurs. Le but était de faire disparaître les hybridations centromériques non spécifiques qui posaient un problème lors de la lecture des signaux sur noyaux interphasiques. Le mélange de 10 µg d'ADN compétiteur de marmouset et de 10 µg d'ADN compétiteur humain a donné les résultats les plus satisfaisants en termes d'intensité du signal et de réduction des hybridations non spécifiques. Cependant, comme on peut le constater sur la Figure 22 page 89, malgré l'utilisation de ce mélange d'ADN compétiteurs, des hybridations non spécifiques persistent. Nous en sommes donc venus à remettre en cause la qualité de notre ADN compétiteur « maison » ainsi que la spécificité de nos sondes de départ (en particulier la sonde d'Y).

Pour pallier ces problèmes de spécificité, il aurait fallu recommencer les manipulations à partir de la microdissection et utiliser un ADN compétiteur de marmouset du

commerce produit spécialement pour cette étude. Cela permettrait de juger si le problème provient des sondes de départ ou de l'ADN compétiteur de marmouset « maison ». Il serait également envisageable de produire les sondes à partir de chromosomes bactériens artificiels (BAC). Ceci permettrait de s'affranchir de l'étape de microdissection chromosomique qui est longue et fastidieuse à mettre en œuvre et qui peut apporter des défauts de spécificité.

#### 2.4.4. Hybridation sur lames cytologiques et histologiques

##### 2.4.4.1. Influence de la méthode d'hybridation

Deux méthodes d'hybridation peuvent être utilisées pour notre étude : l'hybridation à l'Hybridizer® DAKO™ et l'hybridation classique, avec pré-étapes de dénaturation. En théorie, l'hybridation à l'Hybridizer® DAKO™ entraîne l'apparition d'un bruit de fond plus important que l'hybridation classique.

Pour notre étude, nous avons essayé les deux méthodes et n'avons pas remarqué de telle différence. L'hybridation à l'Hybridizer® DAKO™ a donc été préférée par commodité. En effet, elle nécessite moins d'étapes de manipulation que l'hybridation classique.

##### 2.4.4.2. Importance du pré-traitement des lames histologiques

Nous avons testé deux durées de digestion enzymatique à la pepsine lors du pré-traitement des lames histologiques : 6 et 15 minutes. Pour l'intestin grêle, un temps de pepsine de 6 minutes a conduit à une absence d'hybridation spécifique de la sonde de X et un défaut d'hybridation de la sonde de Y sur certaines cellules (*cf.* Figure 24 page 91).

C'est la raison pour laquelle nous avons décidé d'augmenter le temps de digestion à la pepsine à 15 minutes pour le pré-traitement des lames de testicules. Ce temps de pepsine s'est avéré satisfaisant, car une grande partie de la lame histologique présentait des signes d'hybridation de nos sondes (*cf.* Figure 27 page 94). En revanche, un certain nombre de noyaux cellulaires présentaient plus de deux signaux de Y (verts), ce qui n'est pas possible en réalité. Cette présence de signaux surnuméraires peut donc traduire l'intervention d'hybridations non spécifiques produisant des signaux importants. Cette conclusion remet en question l'interprétabilité des signaux observés lors de nos essais.

Pour améliorer ce protocole, il pourrait être intéressant de tester des sondes préparées avec de l'ADN compétiteur de marmouset du commerce. Nous espérons que cela limiterait les hybridations non spécifiques.

#### 2.4.4.3. Evaluation de la reproductibilité de la méthode sur lames d'encéphale de marmouset commun

Pour finir, il est question de savoir si la méthode que nous avons développée peut-être reproduite sur lames histologiques d'encéphale de marmouset, ce qui constitue le but de notre étude.

Les sondes que nous avons produites peuvent s'hybrider sur n'importe quelle cellule de marmouset, à condition qu'elle ait au préalable été préparée pour cela (disposition sur une lame, fixation, digestion à la pepsine). L'hybridation peut se faire à l'Hybridizer® DAKO™ ou bien de manière classique, avec pré-étapes de dénaturation. Enfin, la visualisation des signaux nécessitera une source de lumière fluorescente.

D'après les informations que nous a fourni le Dr. Isabelle Loubinoux, les coupes d'encéphale qui seront réalisées à la fin du protocole de l'équipe iDREAM seront d'une épaisseur de 30 µm. Or, les tests que nous avons réalisés ont été fait sur des coupes histologiques de 4 µm d'épaisseur, soit 7,5 fois moins épaisses. Une adaptation de notre protocole va donc être indispensable si l'on veut que les sondes puissent atteindre les noyaux cellulaires pour une épaisseur de 30 µm.

Pour ce faire, plusieurs solutions sont envisagées et il pourra être nécessaire de les associer :

- Augmenter la concentration des sondes pour s'adapter à la plus grande quantité de tissu à marquer,
- Recouper les coupes initiales de 30 µm en coupes plus fines sans dégrader l'organisation histologique de départ,
- Augmenter le temps de digestion enzymatique à la pepsine,
- Changer de méthode de visualisation, en utilisant un microcosme confocal chromatique par exemple.

Ainsi, la majeure partie des difficultés rencontrées lors de la fabrication de nos sondes provient de la rareté des outils de biologie moléculaire disponibles chez le marmouset commun. En effet, ces outils sont rarement commercialisés ou bien leur coût est très élevé, ce qui a rendu nos manipulations assez compliquées.



# CONCLUSION

L'intérêt grandissant du monde de la recherche pour les thérapies régénératives à partir de cellules souches démontre les espoirs thérapeutiques immenses que représentent ces cellules dans l'avenir de la médecine. Bien que les cellules souches mésenchymateuses soient aujourd'hui préférées du fait de leur facilité de prélèvement, d'administration et de leur innocuité relative, les cellules souches embryonnaires présentent un réel intérêt et leur potentiel reste encore à exploiter. L'espoir qu'elles puissent, un jour, permettre de régénérer des tissus détruits ou de traiter des affections chroniques jusque-là considérées comme irréversibles, anime la communauté scientifique.

Ainsi, à ce jour, des études précliniques sont en cours dans différents pays afin de comprendre le fonctionnement de ces cellules, leur interaction avec l'organisme et l'origine de leurs effets thérapeutiques. Pour ce faire, l'emploi du modèle animal tel que le modèle murin ou le modèle marmouset est un passage obligé. Avant d'être transférées chez l'Homme, les thérapies cellulaires doivent prouver leur efficacité ainsi que leur innocuité à court et long terme. Pour cela, il est nécessaire de suivre les cellules souches embryonnaires dans les organismes greffés : leur viabilité, leur distribution, leurs actions et leur devenir. Ainsi, les techniques de *tracking* cellulaire s'imposent pour ce genre d'études.

Il existe un grand nombre de techniques de suivi cellulaire, *in vivo* et *ex vivo*. Elles sont toujours couplées à des principes de révélation, soit par imagerie médicale (IRM, PECT, SPECT par exemple), soit par visualisation directe (immunohistochimie, fluorescence, bioluminescence). Ces différents procédés apportent des informations complémentaires, ils ne sont donc pas à opposer. Cependant, parmi les méthodes de *tracking* cellulaire existantes, celles n'intervenant pas intrinsèquement dans la cellule de son vivant sont souvent préférées pour les études sur les cellules souches. C'est le cas de l'hybridation *in situ* par fluorescence (FISH).

Dans ce travail expérimental réalisé sur la plateforme de cytogénétique de l'ENVT, en collaboration étroite avec le Dr. Alain Pinton et l'unité de recherche STROMALab (Pr. Isabelle Raymond-Letron), nous avons produit des sondes dirigées vers les chromosomes sexuels X et Y du marmouset commun (*Callithrix jacchus*) afin d'identifier des précurseurs neuraux issus de cellules souches embryonnaires mâles

administrés chez des individus femelles de la même espèce par FISH. Ces sondes ont été fabriquées pour répondre à un besoin de *tracking* cellulaire d'une équipe de chercheurs de l'INSERM (iDREAM, Toulouse, Dr. Isabelle Loubinoux) qui travaille en ce moment sur une thérapie régénérative à base de cellules souches embryonnaires visant la récupération fonctionnelle motrice après un accident vasculaire cérébral.

Comme exposé dans ce manuscrit, les sondes produites nécessitent des ajustements mais elles constituent une pierre à l'édifice de la recherche sur les outils et techniques de stimulations cérébrales promouvant la plasticité cérébrale post-lésionnelle.

## BIBLIOGRAPHIE

- AKSOY, Irène, SAKABEDOYAN, Caline, BOURILLOT, Pierre-Yves, MALASHICHEVA, Anna B., MANCIP, Jimmy, KNOBLAUCH, Kenneth, AFANASSIEFF, Marielle et SAVATIER, Pierre, 2007. Self-renewal of murine embryonic stem cells is supported by the serine/threonine kinases Pim-1 and Pim-3. In : *Stem Cells (Dayton, Ohio)*. décembre 2007. Vol. 25, n° 12, p. 2996-3004.
- ALFKE, Heiko, STÖPPLER, Hubert, NOCKEN, Frank, HEVERHAGEN, Johannes T., KLEB, Beate, CZUBAYKO, Frank et KLOSE, Klaus Jochen, 2003. In vitro MR imaging of regulated gene expression. In : *Radiology*. août 2003. Vol. 228, n° 2, p. 488-492.
- ALIVISATOS, A. P., 1996. Semiconductor Clusters, Nanocrystals, and Quantum Dots. In : *Science*. 16 février 1996. Vol. 271, n° 5251, p. 933-937.
- AVILION, Ariel A., NICOLIS, Silvia K., PEVNY, Larysa H., PEREZ, Lidia, VIVIAN, Nigel et LOVELL-BADGE, Robin, 2003. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. In : *Genes & Development*. 1 janvier 2003. Vol. 17, n° 1, p. 126-140.
- BARAKAT, Tahsin Stefan et GRIBNAU, Joost, 2014. Combined DNA-RNA Fluorescent In situ Hybridization (FISH) to Study X Chromosome Inactivation in Differentiated Female Mouse Embryonic Stem Cells. In : *Journal of Visualized Experiments : JoVE*. 14 juin 2014. n° 88.
- BÉDUE, Amélie, VAYSSE, Laurence, FLAHAUT, Emmanuel, SEICHEPINE, Florent, LOUBINOUX, Isabelle et VIEU, Christophe, 2011. Multi-scale engineering for neuronal cell growth and differentiation. In : *Microelectronic Engineering*. août 2011. Vol. 88, n° 8, p. 1668-1671.
- BÉDUE, Amélie, VIEU, Christophe, ARNAUDUC, Florent, SOL, Jean-Christophe, LOUBINOUX, Isabelle et VAYSSE, Laurence, 2012. Engineering of adult human neural stem cells differentiation through surface micropatterning. In : *Biomaterials*. janvier 2012. Vol. 33, n° 2, p. 504-514. DOI 10.1016/j.biomaterials.2011.09.073.
- BENGTSSON, Niclas E., BROWN, Gary, SCOTT, Edward W. et WALTER, Glenn A., 2010. lacZ as a genetic reporter for real-time MRI. In : *Magnetic Resonance in Medicine*. mars 2010. Vol. 63, n° 3, p. 745-753.
- BERIKA, Mohamed, ELGAYYAR, Marwa E. et EL-HASHASH, Ahmed H. K., 2014. Asymmetric cell division of stem cells in the lung and other systems. In : *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 31 juillet 2014. Vol. 2.
- BHAUMIK, S. et GAMBHIR, S. S., 2002. Optical imaging of Renilla luciferase reporter gene expression in living mice. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 8 janvier 2002. Vol. 99, n° 1, p. 377-382.
- BLACKWELL, Max G., ITINTEANG, Tinte, CHIBNALL, Alice M., DAVIS, Paul F. et TAN, Swee T., 2016. Expression of embryonic stem cell markers in pyogenic granuloma. In : *Journal of Cutaneous Pathology*. décembre 2016. Vol. 43, n° 12, p. 1096-1101.
- BONNEMAISON, Charlotte, 2017. *Développement et validation de sondes d'hybridation in-situ pour le tracking des cellules souches mésenchymateuses*

*canines dérivées du tissu adipeux*. S.l. : s.n.

BOSE, Rajendran J. C. et MATTREY, Robert F., 2018. Accomplishments and challenges in stem cell imaging in vivo. In : *Drug Discovery Today*. 17 octobre 2018.

BOYER, Laurie A., LEE, Tong Ihn, COLE, Megan F., JOHNSTONE, Sarah E., LEVINE, Stuart S., ZUCKER, Jacob P., GUENTHER, Matthew G., KUMAR, Roshan M., MURRAY, Heather L., JENNER, Richard G., GIFFORD, David K., MELTON, Douglas A., JAENISCH, Rudolf et YOUNG, Richard A., 2005. Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells. In : *Cell*. 23 septembre 2005. Vol. 122, n° 6, p. 947-956.

BRIJMOHAN, Smita B., SWIER, Steven, WEISS, R. A. et SHAW, Montgomery T., 2005. Synthesis and Characterization of Cross-linked Sulfonated Polystyrene Nanoparticles. In : *Industrial & Engineering Chemistry Research*. octobre 2005. Vol. 44, n° 21, p. 8039-8045.

BULTE, Jeff W. M., 2009. In Vivo MRI Cell Tracking: Clinical Studies. In : *AJR. American journal of roentgenology*. août 2009. Vol. 193, n° 2, p. 314-325.

BULTE, Jeff W. M. et KRAITCHMAN, Dara L., 2004. Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging. In : *NMR in biomedicine*. novembre 2004. Vol. 17, n° 7, p. 484-499.

CAMPAN, Manuela, LIONETTI, Vincenzo, AQUARO, Giovanni D., FORINI, Francesca, MATTEUCCI, Marco, VANNUCCI, Laura, CHIUPPESI, Flavia, DI CRISTOFANO, Claudio, FAGGIONI, Michela, MAIOLI, Margherita, BARILE, Lucio, MESSINA, Elisa, LOMBARDI, Massimo, PUCCI, Angela, PISTELLO, Mauro et RECCHIA, Fabio A., 2011. Ferritin as a

reporter gene for in vivo tracking of stem cells by 1.5-T cardiac MRI in a rat model of myocardial infarction. In : *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. juin 2011. Vol. 300, n° 6, p. H2238-2250.

CAO, Feng, DRUKKER, Micha, LIN, Shuan, SHEIKH, Ahmad Y., XIE, Xiaoyan, LI, Zongjin, CONNOLLY, Andrew J., WEISSMAN, Irving L. et WU, Joseph C., 2007. Molecular imaging of embryonic stem cell misbehavior and suicide gene ablation. In : *Cloning and Stem Cells*. 2007. Vol. 9, n° 1, p. 107-117.

CAO, Yu-An, WAGERS, Amy J., BEILHACK, Andreas, DUSICH, Joan, BACHMANN, Michael H., NEGRIN, Robert S., WEISSMAN, Irving L. et CONTAG, Christopher H., 2004. Shifting foci of hematopoiesis during reconstitution from single stem cells. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 6 janvier 2004. Vol. 101, n° 1, p. 221-226.

CARTWRIGHT, Peter, MCLEAN, Cameron, SHEPPARD, Allan, RIVETT, Duane, JONES, Karen et DALTON, Stephen, 2005. LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. In : *Development (Cambridge, England)*. mars 2005. Vol. 132, n° 5, p. 885-896.

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. In : *Stem Cell Research & Therapy*. 23 septembre 2016. Vol. 7.

CHAMBERS, Ian, COLBY, Douglas, ROBERTSON, Morag, NICHOLS, Jennifer, LEE, Sonia, TWEEDIE, Susan et SMITH, Austin, 2003. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in

embryonic stem cells. In : *Cell*. 30 mai 2003. Vol. 113, n° 5, p. 643-655.

CHEN, Hao, HATTORI, Fumiyuki, MURATA, Mitsushige, LI, Weizhen, YUASA, Shinsuke, ONIZUKA, Takeshi, SHIMOJI, Kenichiro, OHNO, Yohei, SASAKI, Erika, KIMURA, Kensuke, HAKUNO, Daihiko, SANNO, Motoaki, MAKINO, Shinji, OGAWA, Satoshi et FUKUDA, Keiichi, 2008. Common marmoset embryonic stem cell can differentiate into cardiomyocytes. In : *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 9 mai 2008. Vol. 369, n° 3, p. 801-806.

CHENG, Shih-Hsun, YU, Dou, TSAI, Hsiu-Ming, MORSHED, Ramin A., KANOJIA, Deepak, LO, Leu-Wei, LEONI, Lara, GOVIND, Yureve, ZHANG, Lingjiao, ABOODY, Karen S., LESNIAK, Maciej S., CHEN, Chin-Tu et BALYASNIKOVA, Irina V., 2016. Dynamic In Vivo SPECT Imaging of Neural Stem Cells Functionalized with Radiolabeled Nanoparticles for Tracking of Glioblastoma. In : *Journal of Nuclear Medicine*. 2 janvier 2016. Vol. 57, n° 2, p. 279-284.

CROSSGROVE, Janelle et ZHENG, Wei, 2004. Manganese toxicity upon overexposure. In : *NMR in biomedicine*. décembre 2004. Vol. 17, n° 8, p. 544-553.

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. In : *Stem Cells and Development*. septembre 2010. Vol. 19, n° 9, p. 1417-1425.

DAVOUST, Carole, PLAS, Benjamin, BÉDUE, Amélie, DEMAÏN, Boris, SALABERT, Anne-Sophie, SOL, Jean

Christophe, VIEU, Christophe, VAYSSE, Laurence et LOUBINOUX, Isabelle, 2017. Regenerative potential of primary adult human neural stem cells on micropatterned bio-implants boosts motor recovery. In : *Stem Cell Research & Therapy*. décembre 2017. Vol. 8, n° 1.

DEBOWSKI, Katharina, WARTHEMANN, Rita, LENTES, Jana, SALINAS-RIESTER, Gabriela, DRESSEL, Ralf, LANGENSTROTH, Daniel, GROMOLL, Jörg, SASAKI, Erika et BEHR, Rüdiger, 2015. Non-viral generation of marmoset monkey iPS cells by a six-factor-in-one-vector approach. In : *PloS One*. 2015. Vol. 10, n° 3.

DEMAÏN, Boris, 2015. *Preuve de concept d'une stratégie thérapeutique avec des neuro-implants microstructurés dans un nouveau modèle de lésion cérébrale focale chez le marmouset*. phd. S.I. : Université de Toulouse, Université Toulouse III - Paul Sabatier.

DERZELLE, Sylviane, DUCHAUD, Eric, KUNST, Frank, DANCHIN, Antoine et BERTIN, Philippe, 2002. Identification, characterization, and regulation of a cluster of genes involved in carbapenem biosynthesis in *Photobacterium luminescens*. In : *Applied and Environmental Microbiology*. août 2002. Vol. 68, n° 8, p. 3780-3789.

DIEKMANN, Ulf, NAUJOK, Ortwin, BLASCZYK, Rainer et MÜLLER, Thomas, 2015. Embryonic stem cells of the non-human primate *Callithrix jacchus* can be differentiated into definitive endoderm by Activin-A but not IDE-1/2. In : *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. avril 2015. Vol. 9, n° 4, p. 473-479.

DWYER, Roisin M., RYAN, James, HAVELIN, Ronan J., MORRIS, John C.,

MILLER, Brian W., LIU, Zhonglin, FLAVIN, Richard, O'FLATHARTA, Cathal, FOLEY, Mark J., BARRETT, Harrison H., MURPHY, J. Mary, BARRY, Frank P., O'BRIEN, Timothy et KERIN, Michael J., 2011. Mesenchymal Stem Cell-mediated delivery of the sodium iodide symporter supports radionuclide imaging and treatment of breast cancer. In : *Stem Cells (Dayton, Ohio)*. juillet 2011. Vol. 29, n° 7, p. 1149-1157.

EKIMOV, Al. et ONUSHCHEHKO, Alexey, 1981. Quantum Size Effect in Three-Dimensional Microscopic Semiconductor Crystals. In : *ZhETF Pis ma Redaktsiiu*. 31 août 1981. Vol. 34, p. 363.

ELHAMI, Esmat, DIETZ, Bryson, XIANG, Bo, DENG, Jixian, WANG, Fei, CHI, Chao, GOERTZEN, Andrew L., MZENGEZA, Shadreck, FREED, Darren, ARORA, Rakesh C. et TIAN, Ganghong, 2013. Assessment of three techniques for delivering stem cells to the heart using PET and MR imaging. In : *EJNMMI Research*. 28 octobre 2013. Vol. 3, n° 1, p. 72.

EVANS, M. J. et KAUFMAN, M. H., 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. In : *Nature*. juillet 1981. Vol. 292, n° 5819, p. 154-156.

EVILSIZOR, Megan N., RAY-JONES, Helen F., LIFSHITZ, Jonathan et ZIEBELL, Jenna, 2015. Primer for Immunohistochemistry on Cryosectioned Rat Brain Tissue: Example Staining for Microglia and Neurons. In : *Journal of Visualized Experiments: JoVE*. 12 mai 2015. n° 99.

FERGUSON-SMITH, M. A., 1966. X-Y chromosomal interchange in the aetiology of true hermaphroditism and of XX Klinefelter's syndrome. In :

*Lancet (London, England)*. 27 août 1966. Vol. 2, n° 7461, p. 475-476.

FISHER, Marc, FEUERSTEIN, Giora, HOWELLS, David W., HURN, Patricia D., KENT, Thomas A., SAVITZ, Sean I., LO, Eng H. et STAIR GROUP, 2009. Update of the stroke therapy academic industry roundtable preclinical recommendations. In : *Stroke*. juin 2009. Vol. 40, n° 6, p. 2244-2250. DOI 10.1161/STROKEAHA.108.541128.

FOWLER, Michael, VIROSTKO, John, CHEN, Zhongyi, POFFENBERGER, Greg, RADHIKA, Aramandla, BRISSOVA, Marcela, SHIOTA, Masakazu, NICHOLSON, Wendell E., SHI, Yubin, HIRSHBERG, Boaz, HARLAN, David M., JANSEN, E. Duco et POWERS, Alvin C., 2005. Assessment of pancreatic islet mass after islet transplantation using in vivo bioluminescence imaging. In : *Transplantation*. 15 avril 2005. Vol. 79, n° 7, p. 768-776.

GARIKIPATI, Venkata Naga Srikanth, JADHAV, Sachin, PAL, Lily, PRAKASH, Prem, DIKSHIT, Madhu et NITYANAND, Soniya, 2014. Mesenchymal Stem Cells from Fetal Heart Attenuate Myocardial Injury after Infarction: An In Vivo Serial Pinhole Gated SPECT-CT Study in Rats. In : *PLOS ONE*. 27 juin 2014. Vol. 9, n° 6.

GAVINS, Felicity NE et SMITH, Helen K, 2015. Cell Tracking Technologies for Acute Ischemic Brain Injury. In : *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 1 juillet 2015. Vol. 35, n° 7, p. 1090-1099.

GENOVE, Guillem, DEMARCO, Ulrike, XU, Hongyan, GOINS, William F. et AHRENS, Eric T., 2005. A new transgene reporter for in vivo magnetic resonance imaging. In : *Nature Medicine*. avril 2005. Vol. 11, n° 4, p. 450-454.

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. In : *Nature Biotechnology*. février 2007. Vol. 25, n° 2, p. 217-219.

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. In : *Theranostics*. 1 avril 2012. Vol. 2, n° 4, p. 335-345.

GUELLAEN, G., CASANOVA, M., BISHOP, C., GELDWERTH, D., ANDRE, G., FELLOUS, M. et WEISSENBACH, J., 1984. Human XX males with Y single-copy DNA fragments. In : *Nature*. 12 janvier 1984. Vol. 307, n° 5947, p. 172-173.

GYÖNGYÖSI, Mariann, BLANCO, Jeronimo, MARIAN, Teréz, TRÓN, Lajos, PETNEHÁZY, Ors, 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. In : *Circulation. Cardiovascular Imaging*. septembre 2008. Vol. 1, n° 2, p. 94-103.

HABERMANN, F. A., WINTER, A., OLSAKER, I., REICHERT, P. et FRIES, R., 2005. Validation of sperm sexing in the cattle (*Bos taurus*) by dual colour fluorescence in situ hybridization. In :

*Journal of Animal Breeding and Genetics = Zeitschrift Fur Tierzucht Und Zuchtungsbiologie*. avril 2005. Vol. 122 Suppl 1, p. 22-27.

HAMANAKA, Sanae, YAMAGUCHI, Tomoyuki, KOBAYASHI, Toshihiro, KATO-ITOH, Megumi, YAMAZAKI, Satoshi, SATO, Hideyuki, UMINO, Ayumi, WAKIYAMA, Yukiko, ARAI, Mami, SANBO, Makoto, HIRABAYASHI, Masumi et NAKAUCHI, Hiromitsu, 2011. Generation of germline-competent rat induced pluripotent stem cells. In : *PLoS One*. 2011. Vol. 6, n° 7.

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

HIBINO, Hitoshi, TANI, Kenzaburo, IKEBUCHI, Kenji, WU, Ming-Shiuan, SUGIYAMA, Hajime, NAKAZAKI, Yukoh, TANABE, Tsuyoshi, TAKAHASHI, Satoshi, TOJO, Arinobu, SUZUKI, Shuzo, TANIOKA, Yoshikuni, SUGIMOTO, Yoshikazu, NAKAHATA, Tatsutoshi et ASANO, Shigetaka, 1999. The Common Marmoset as a Target Preclinical Primate Model for Cytokine and Gene Therapy Studies. In : *Blood*. 1 mai 1999. Vol. 93, n° 9, p. 2839.

HIYAMA, E et HIYAMA, K, 2007. Telomere and telomerase in stem cells. In : *British Journal of Cancer*. 10 avril 2007. Vol. 96, n° 7, p. 1020-1024.

HOFFMAN, Robert M., 2005. The multiple uses of fluorescent proteins to visualize cancer in vivo. In : *Nature Reviews Cancer*. octobre 2005. Vol. 5, n° 10, p. 796-806.

HUANG, Guanyi, YE, Shoudong, ZHOU, Xingliang, LIU, Dahai et YING, Qi-Long, 2015. Molecular basis of embryonic stem cell self-renewal: from signaling pathways to pluripotency

network. In : *Cellular and molecular life sciences: CMLS*. mai 2015. Vol. 72, n° 9, p. 1741-1757.

HUNG, Shih-Chieh, DENG, Win-Ping, YANG, Wen K., LIU, Ren-Shyan, LEE, Chien-Chih, SU, Tzu-Chi, LIN, Rue-Jen, YANG, Den-Mei, CHANG, Chi-Wei, CHEN, Wei-Hong, WEI, Hon-Jian et GELOVANI, Juri G., 2005. Mesenchymal stem cell targeting of microscopic tumors and tumor stroma development monitored by noninvasive in vivo positron emission tomography imaging. In : *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. 1 novembre 2005. Vol. 11, n° 21, p. 7749-7756.

IWAI, Hiroki, SHIMADA, Hiroko, NISHIMURA, Soraya, KOBAYASHI, Yoshiomi, ITAKURA, Go, HORI, Keiko, HIKISHIMA, Keigo, EBISE, Hayao, NEGISHI, Naoko, SHIBATA, Shinsuke, HABU, Sonoko, TOYAMA, Yoshiaki, NAKAMURA, Masaya et OKANO, Hideyuki, 2015. Allogeneic Neural Stem/Progenitor Cells Derived From Embryonic Stem Cells Promote Functional Recovery After Transplantation Into Injured Spinal Cord of Nonhuman Primates: ESC-NS/PCs Promote Recovery in Primate SCI Models. In : *STEM CELLS Translational Medicine*. juillet 2015. Vol. 4, n° 7, p. 708-719. DOI 10.5966/sctm.2014-0215.

JANG, Bo Gun, KIM, Hye Sung, KIM, Kyung Ju, RHEE, Ye-Young, KIM, Woo Ho et KANG, Gyeong Hoon, 2016. Distribution of intestinal stem cell markers in colorectal precancerous lesions. In : *Histopathology*. mars 2016. Vol. 68, n° 4, p. 567-577.

JIANG, Han, CHENG, Zhen, TIAN, Mei et ZHANG, Hong, 2011. In vivo imaging of embryonic stem cell therapy. In : *European Journal of Nuclear Medicine*

*and Molecular Imaging*. 1 avril 2011. Vol. 38, n° 4, p. 774-784.

KAISER, L. R., 1992. The future of multihospital systems. In : *Topics in Health Care Financing*. 1992. Vol. 18, n° 4, p. 32-45.

KALMAR, Tibor, LIM, Chea, HAYWARD, Penelope, MUÑOZ-DESCALZO, Silvia, NICHOLS, Jennifer, GARCIA-OJALVO, Jordi et MARTINEZ ARIAS, Alfonso, 2009. Regulated fluctuations in nanog expression mediate cell fate decisions in embryonic stem cells. In : *PLoS biology*. juillet 2009. Vol. 7, n° 7.

KAWARASAKI, T., MATSUMOTO, K., CHIKYU, M., ITAGAKI, Y. et HORIUCHI, A., 2000. Sexing of porcine embryo by in situ hybridization using chromosome Y- and 1-specific DNA probes. In : *Theriogenology*. 15 avril 2000. Vol. 53, n° 7, p. 1501-1509.

KIM, Jung Eun, KALIMUTHU, Senthilkumar et AHN, Byeong-Cheol, 2015. In Vivo Cell Tracking with Bioluminescence Imaging. In : *Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. mars 2015. Vol. 49, n° 1, p. 3-10.

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. In : *Journal of Nuclear Medicine*. 2 janvier 2005. Vol. 46, n° 2, p. 305-311.

KORETSKY, A P, BROSNAN, M J, CHEN, L H, CHEN, J D et VAN DYKE, T, 1990. NMR detection of creatine kinase expressed in liver of transgenic mice: determination of free ADP levels. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. avril 1990. Vol. 87, n° 8, p. 3112-3116.

LANG, Cajetan, LEHNER, Sebastian, TODICA, Andrei, BOENING, Guido, FRANZ, Wolfgang-Michael, BARTENSTEIN, Peter, HACKER, Marcus et DAVID, Robert, 2013. Positron emission tomography based in-vivo imaging of early phase stem cell retention after intramyocardial delivery in the mouse model. In : *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 1 octobre 2013. Vol. 40, n° 11, p. 1730-1738.

LEE, Sung-Gyu, MOON, Sung-Hwan, KIM, Hee-Je, LEE, Ji Yoon, PARK, Soon-Jung, CHUNG, Hyung-Min, HA, Tae-Yong, SONG, Gi-Won, JUNG, Dong-Hwan, PARK, Hojong, KWON, Tae-Won et CHO, Yong-Pil, 2015. Bone marrow-derived progenitor cells in de novo liver regeneration in liver transplant. In : *Liver Transplantation: Official Publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. septembre 2015. Vol. 21, n° 9, p. 1186-1194.

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. In : *Stem cells (Dayton, Ohio)*. avril 2008. Vol. 26, n° 4, p. 864-873.

LIGNELL, Antti, KEROSUO, Laura, STREICHAN, Sebastian J., CAI, Long et BRONNER, Marianne E., 2017. Identification of a neural crest stem cell niche by Spatial Genomic Analysis. In : *Nature Communications*. 28 2017. Vol. 8, n° 1, p. 1830.

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. In : *BMC Biotechnology*. 9 octobre 2007. Vol. 7, p. 67.

LIU, Jun, CHENG, Eric C. H., LONG, Robert C., YANG, Shang-Hsun, WANG, Liya, CHENG, Pei-Hsun, YANG, Jinjing, WU, Dong, MAO, Hui et CHAN, Anthony W. S., 2009. Noninvasive monitoring of embryonic stem cells in vivo with MRI transgene reporter. In : *Tissue Engineering. Part C, Methods*. décembre 2009. Vol. 15, n° 4, p. 739-747.

LOH, Yui-Han, WU, Qiang, CHEW, Joon-Lin, VEGA, Vinsensius B., ZHANG, Weiwei, CHEN, Xi, BOURQUE, Guillaume, GEORGE, Joshy, LEONG, Bernard, LIU, Jun, WONG, Kee-Yew, SUNG, Ken W., LEE, Charlie W. H., ZHAO, Xiao-Dong, CHIU, Kuo-Ping, LIPOVICH, Leonard, KUZNETSOV, Vladimir A., ROBSON, Paul, STANTON, Lawrence W., WEI, Chia-Lin, RUAN, Yijun, LIM, Bing et NG, Huck-Hui, 2006. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. In : *Nature Genetics*. avril 2006. Vol. 38, n° 4, p. 431-440.

LORENZ, W W, MCCANN, R O, LONGIARU, M et CORMIER, M J, 1991. Isolation and expression of a cDNA encoding Renilla reniformis luciferase. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 15 mai 1991. Vol. 88, n° 10, p. 4438-4442.

LU, Yuxin, DANG, Hoa, MIDDLETON, Blake, ZHANG, Zesong, WASHBURN, Lorraine, CAMPBELL-THOMPSON, Martha, ATKINSON, Mark A., GAMBHIR, Sanjiv Sam, TIAN, Jide et KAUFMAN, Daniel L., 2004. Bioluminescent monitoring of islet graft survival after transplantation. In : *Molecular Therapy: The Journal of the*

*American Society of Gene Therapy*. mars 2004. Vol. 9, n° 3, p. 428-435.

LUKER, Kathryn E. et LUKER, Gary D., 2008. Applications of bioluminescence imaging to antiviral research and therapy: multiple luciferase enzymes and quantitation. In : *Antiviral Research*. juin 2008. Vol. 78, n° 3, p. 179-187.

MACARTHUR, Ben D., SEVILLA, Ana, LENZ, Michel, MÜLLER, Franz-Josef, SCHULDT, Bernhard M., SCHUPPERT, Andreas A., RIDDEN, Sonya J., STUMPF, Patrick S., FIDALGO, Miguel, MA'AYAN, Avi, WANG, Jianlong et LEMISCHKA, Ihor R., 2012. Nanog-dependent feedback loops regulate murine embryonic stem cell heterogeneity. In : *Nature Cell Biology*. novembre 2012. Vol. 14, n° 11, p. 1139-1147.

MACCHIARINI, Paolo, JUNGEBLUTH, Philipp, GO, Tetsuhiko, ASNAGHI, M. Adelaide, REES, Louisa E., COGAN, Tristan A., DODSON, Amanda, MARTORELL, Jaume, BELLINI, Silvia, PARNIGOTTO, Pier Paolo, DICKINSON, Sally C., HOLLANDER, Anthony P., MANTERO, Sara, CONCONI, Maria Teresa et BIRCHALL, Martin A., 2008. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. In : *The Lancet*. 13 décembre 2008. Vol. 372, n° 9655, p. 2023-2030.

MAGUIRE, Casey A., DELIOLANIS, Nikolaos C., PIKE, Lisa, NIERS, Johanna M., TJON-KON-FAT, Lee-Ann, SENA-ESTEVEZ, Miguel et TANNOUS, Bakhos A., 2009. Gaussia luciferase variant for high-throughput functional screening applications. In : *Analytical Chemistry*. 15 août 2009. Vol. 81, n° 16, p. 7102-7106.

MANSFIELD, Keith, 2003. Marmoset models commonly used in biomedical research. In : *Comparative Medicine*. août 2003. Vol. 53, n° 4, p. 383-392.

MARRACK, John Richardson, 1934. Chemistry of Antigens and Antibodies. In : *Nature*. 22 septembre 1934. Vol. 134, p. 468.

MARTELLO, Graziano, SUGIMOTO, Toshimi, DIAMANTI, Evangelia, JOSHI, Anagha, HANNAH, Rebecca, OHTSUKA, Satoshi, GÖTTGENS, Berthold, NIWA, Hitoshi et SMITH, Austin, 2012. Esrrb is a pivotal target of the Gsk3/Tcf3 axis regulating embryonic stem cell self-renewal. In : *Cell Stem Cell*. 5 octobre 2012. Vol. 11, n° 4, p. 491-504.

MARTIN, G. R., 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1 décembre 1981. Vol. 78, n° 12, p. 7634-7638.

MEDINTZ, Igor L., UYEDA, H. Tetsuo, GOLDMAN, Ellen R. et MATTOUSSI, Hedi, 2005. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. In : *Nature Materials*. juin 2005. Vol. 4, n° 6, p. 435-446.

MEHAT, Manjit S., SUNDARAM, Venki, RIPAMONTI, Caterina, ROBSON, Anthony G., SMITH, Alexander J., BOROOAH, Shyamanga, ROBINSON, Martha, ROSENTHAL, Adam N., INNES, William, WELEBER, Richard G., LEE, Richard W.J., CROSSLAND, Michael, RUBIN, Gary S., DHILLON, Baljean, STEEL, David H.W., ANGLADE, Eddy, LANZA, Robert P., ALI, Robin R., MICHAELIDES, Michel et BAINBRIDGE, James W.B., 2018. Transplantation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelial Cells in Macular Degeneration. In : *Ophthalmology*. novembre 2018. Vol. 125, n° 11, p. 1765-1775.

MELTON, Douglas A. et COWEN, Chad, 2009. "Stemness": Definitions,

Criteria, and Standards. In : LANZA, Robert, GEARHART, John, HOGAN, Brigid, MELTON, Douglas, PEDERSEN, Roger, THOMAS, E. Donnal, THOMSON, James et WILMUT, Ian (éd.), *Essentials of Stem Cell Biology (Second Edition)*. San Diego : Academic Press.

MILOVANNOVA, Tatyana N., BHOPALE, Veena M., SOROKINA, Elena M., MOORE, Jonni S., HUNT, Thomas K., HAUER-JENSEN, Martin, VELAZQUEZ, Omaidia C. et THOM, Stephen R., 2008. Lactate Stimulates Vasculogenic Stem Cells via the Thioredoxin System and Engages an Autocrine Activation Loop Involving Hypoxia-Inducible Factor 1. In : *Molecular and Cellular Biology*. octobre 2008. Vol. 28, n° 20, p. 6248-6261.

MISHRA, Anuja, QIU, Zhifang, FARNSWORTH, Steven L., HEMMI, Jacob J., LI, Miao, PICKERING, Alexander V. et HORNSBY, Peter J., 2016. Induced Pluripotent Stem Cells from Nonhuman Primates. In : *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*. 2016. Vol. 1357, p. 183-193.

MITSUI, Kaoru, TOKUZAWA, Yoshimi, ITOH, Hiroaki, SEGAWA, Kohichi, MURAKAMI, Mirei, TAKAHASHI, Kazutoshi, MARUYAMA, Masayoshi, MAEDA, Mitsuyo et YAMANAKA, Shinya, 2003. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. In : *Cell*. 30 mai 2003. Vol. 113, n° 5, p. 631-642.

MOUSE GENOME SEQUENCING CONSORTIUM, WATERSTON, Robert H., LINDBLAD-TOH, Kerstin, BIRNEY, Ewan, ROGERS, Jane, ABRIL, Josep F., AGARWAL, Pankaj, AGARWALA, Richa, AINSCOUGH, Rachel, ALEXANDERSSON, Marina, AN, Peter, ANTONARAKIS, Stylianos E., ATTWOOD, John, BAERTSCH, Robert, BAILEY, Jonathon, BARLOW,

Karen, BECK, Stephan, BERRY, Eric, BIRREN, Bruce, BLOOM, Toby, BORK, Peer, BOTCHERBY, Marc, BRAY, Nicolas, BRENT, Michael R., BROWN, Daniel G., BROWN, Stephen D., BULT, Carol, BURTON, John, BUTLER, Jonathan, CAMPBELL, Robert D., CARNINCI, Piero, CAWLEY, Simon, CHIAROMONTE, Francesca, CHINWALLA, Asif T., CHURCH, Deanna M., CLAMP, Michele, CLEE, Christopher, COLLINS, Francis S., COOK, Lisa L., COPLEY, Richard R., COULSON, Alan, COURONNE, Olivier, CUFF, James, CURWEN, Val, CUTTS, Tim, DALY, Mark, DAVID, Robert, DAVIES, Joy, DELEHAUNTY, Kimberly D., DERI, Justin, DERMITZAKIS, Emmanouil T., DEWEY, Colin, DICKENS, Nicholas J., DIEKHANS, Mark, DODGE, Sheila, DUBCHAK, Inna, DUNN, Diane M., EDDY, Sean R., ELNITSKI, Laura, EMES, Richard D., ESWARA, Pallavi, EYRAS, Eduardo, FELSENFELD, Adam, FEWELL, Ginger A., FLICEK, Paul, FOLEY, Karen, FRANKEL, Wayne N., FULTON, Lucinda A., FULTON, Robert S., FUREY, Terrence S., GAGE, Diane, GIBBS, Richard A., GLUSMAN, Gustavo, GNERRE, Sante, GOLDMAN, Nick, GOODSTADT, Leo, GRAFHAM, Darren, GRAVES, Tina A., GREEN, Eric D., GREGORY, Simon, GUIGÓ, Roderic, GUYER, Mark, HARDISON, Ross C., HAUSSLER, David, HAYASHIZAKI, Yoshihide, HILLIER, LaDeana W., HINRICHS, Angela, HLAVINA, Wratko, HOLZER, Timothy, HSU, Fan, HUA, Axin, HUBBARD, Tim, HUNT, Adrienne, JACKSON, Ian, JAFFE, David B., JOHNSON, L. Steven, JONES, Matthew, JONES, Thomas A., JOY, Ann, KAMAL, Michael, KARLSSON, Elinor K., KAROLCHIK, Donna, KASPRZYK, Arkadiusz, KAWAI, Jun, KEIBLER, Evan, KELLS, Cristyn, KENT, W. James, KIRBY, Andrew, KOLBE, Diana L., KORF, Ian, KUCHERLAPATI, Raju S., KULBOKAS, Edward J., KULP, David, LANDERS, Tom, LEGER, J. P.,

- LEONARD, Steven, LETUNIC, Ivica, LEVINE, Rosie, LI, Jia, LI, Ming, LLOYD, Christine, LUCAS, Susan, MA, Bin, MAGLOTT, Donna R., MARDIS, Elaine R., MATTHEWS, Lucy, MAUCELI, Evan, MAYER, John H., MCCARTHY, Megan, MCCOMBIE, W. Richard, MCLAREN, Stuart, MCLAY, Kirsten, MCPHERSON, John D., MELDRIM, Jim, MEREDITH, Beverley, MESIROV, Jill P., MILLER, Webb, MINER, Tracie L., MONGIN, Emmanuel, MONTGOMERY, Kate T., MORGAN, Michael, MOTT, Richard, MULLIKIN, James C., MUZNY, Donna M., NASH, William E., NELSON, Joanne O., NHAN, Michael N., NICOL, Robert, NING, Zemin, NUSBAUM, Chad, O'CONNOR, Michael J., OKAZAKI, Yasushi, OLIVER, Karen, OVERTON-LARTY, Emma, PACHTER, Lior, PARRA, Genís, PEPIN, Kymberlie H., PETERSON, Jane, PEVZNER, Pavel, PLUMB, Robert, POHL, Craig S., POLIAKOV, Alex, PONCE, Tracy C., PONTING, Chris P., POTTER, Simon, QUAIL, Michael, REYMOND, Alexandre, ROE, Bruce A., ROSKIN, Krishna M., RUBIN, Edward M., RUST, Alistair G., SANTOS, Ralph, SAPOJNIKOV, Victor, SCHULTZ, Brian, SCHULTZ, Jörg, SCHWARTZ, Matthias S., SCHWARTZ, Scott, SCOTT, Carol, SEAMAN, Steven, SEARLE, Steve, SHARPE, Ted, SHERIDAN, Andrew, SHOWNKEEN, Ratna, SIMS, Sarah, SINGER, Jonathan B., SLATER, Guy, SMIT, Arian, SMITH, Douglas R., SPENCER, Brian, STABENAU, Arne, STANGE-THOMANN, Nicole, SUGNET, Charles, SUYAMA, Mikita, TESLER, Glenn, THOMPSON, Johanna, TORRENTS, David, TREVASKIS, Evanne, TROMP, John, UCLA, Catherine, URETA-VIDAL, Abel, VINSON, Jade P., VON NIEDERHAUSERN, Andrew C., WADE, Claire M., WALL, Melanie, WEBER, Ryan J., WEISS, Robert B., WENDL, Michael C., WEST, Anthony P., WETTERSTRAND, Kris, WHEELER, Raymond, WHELAN, Simon, WIERZBOWSKI, Jamey, WILLEY, David, WILLIAMS, Sophie, WILSON, Richard K., WINTER, Eitan, WORLEY, Kim C., WYMAN, Dudley, YANG, Shan, YANG, Shiao-Pyng, ZDOBNOV, Evgeny M., ZODY, Michael C. et LANDER, Eric S., 2002. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. In : *Nature*. 5 décembre 2002. Vol. 420, n° 6915, p. 520-562.
- MÜLLER, Thomas, FLEISCHMANN, Gesine, EILDERMANN, Katja, MÄTZRENSING, Kerstin, HORN, Peter A., SASAKI, Erika et BEHR, Rüdiger, 2009. A novel embryonic stem cell line derived from the common marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) exhibiting germ cell-like characteristics. In : *Human Reproduction*. 1 juin 2009. Vol. 24, n° 6, p. 1359-1372.
- 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. In : *Journal of Nanobiotechnology*. 7 novembre 2007. Vol. 5, p. 9.
- NAGAI, Nobuo, KAWAO, Naoyuki, OKADA, Kiyotaka, OKUMOTO, Katsumi, TERAMURA, Takeshi, UESHIMA, Shigeru, UMEMURA, Kazuo et MATSUO, Osamu, 2010. Systemic transplantation of embryonic stem cells accelerates brain lesion decrease and angiogenesis. In : *Neuroreport*. 2 juin 2010. Vol. 21, n° 8, p. 575-579.
- NGUYEN, Patricia K., RIEGLER, Johannes et WU, Joseph C., 2014. Stem Cell Imaging: From Bench to Bedside. In : *Cell Stem Cell*. 3 avril 2014. Vol. 14, n° 4, p. 431-444.
- NOIRET, Aude, 2015. *Contribution à l'identification des cellules souches mésenchymateuses humaines*

*d'origine adipeuse dans les tissus murins.* other. S.l. : s.n.

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

OLIVEIRA, Cristiano Claudino, MACIEL-GUERRA, Helena, KUCKO, Luan, HIRAMA, Eric Jun, BRILHANTE, Américo Delgado, QUEVEDO, Francisco Carlos, DA CUNHA, Isabela Werneck, SOARES, Fernando Augusto, NIERO-MELO, Ligia, DOS REIS, Patrícia Pintor et DOMINGUES, Maria Aparecida Custodio, 2017. Double-hit lymphomas: clinical, morphological, immunohistochemical and cytogenetic study in a series of Brazilian patients with high-grade non-Hodgkin lymphoma. In : *Diagnostic Pathology*. 7 janvier 2017. Vol. 12, n° 1, p. 3.

POMPER, Martin G, HAMMOND, Holly, YU, Xiaobing, YE, Zhaohui, FOSS, Catherine A, LIN, Doris D, FOX, James J et CHENG, Linzhao, 2009. Serial imaging of human embryonic stem-cell engraftment and teratoma formation in live mouse models. In : *Cell research*. mars 2009. Vol. 19, n° 3, p. 370-379.

PRIEST, Catherine A, MANLEY, Nathan C, DENHAM, Jerrod, WIRTH, Edward D et LEBKOWSKI, Jane S, 2015. Preclinical safety of human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitors supporting clinical trials in spinal cord injury. In : *Regenerative Medicine*. 8 septembre 2015. Vol. 10, n° 8, p. 939-958.

RAESS, Philipp W., MOORE, Stephen R., CASCIO, Michael J., DUNLAP, Jennifer, FAN, Guang, GATTER, Ken, OLSON, Susan B. et BRAZIEL, Rita M., 2018. MYC immunohistochemical and

cytogenetic analysis are required for identification of clinically relevant aggressive B cell lymphoma subtypes. In : *Leukemia & Lymphoma*. 2018. Vol. 59, n° 6, p. 1391-1398.

RODRIGUEZ-PORCEL, Martin, WU, Joseph C. et GAMBHIR, Sanjiv Sam, 2008. Molecular imaging of stem cells. In : *StemBook*. Cambridge (MA) : Harvard Stem Cell Institute.

ROGLER, Charles E., BEBAWEE, Remon, MATARLO, Joe, LOCKER, Joseph, PATTAMANUCH, Nicole, GUPTA, Sanjeev et ROGLER, Leslie E., 2017. Triple Staining Including FOXA2 Identifies Stem Cell Lineages Undergoing Hepatic and Biliary Differentiation in Cirrhotic Human Liver. In : *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*. 2017. Vol. 65, n° 1, p. 33-46.

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. In : *Stem Cells (Dayton, Ohio)*. août 2007. Vol. 25, n° 8, p. 2128-2138. DOI 10.1634/stemcells.2006-0722.

RUDELIUS, Martina, DALDRUP-LINK, Heike E., HEINZMANN, Ulrich, PIONTEK, Guido, SETTLES, Marcus, LINK, Thomas M. et SCHLEGEL, Jürgen, 2003. Highly efficient paramagnetic labelling of embryonic and neuronal stem cells. In : *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 1 juillet 2003. Vol. 30, n° 7, p. 1038-1044.

RUDIN, Markus, RAUSCH, Martin et STOECKLI, Markus, 2005. Molecular imaging in drug discovery and development: potential and limitations of nonnuclear methods. In : *Molecular imaging and biology: MIB: the official publication of the Academy of Molecular Imaging*. février 2005. Vol. 7, n° 1, p. 5-13.

SASAKI, Erika, HANAZAWA, Kisaburo, KURITA, Ryo, AKATSUKA, Akira, YOSHIZAKI, Takahito, ISHII, Hajime, TANIOKA, Yoshikuni, OHNISHI, Yasuyuki, SUEMIZU, Hiroshi, SUGAWARA, Ayako, TAMAOKI, Norikazu, IZAWA, Kiyoko, NAKAZAKI, Yukoh, HAMADA, Hiromi, SUEMORI, Hirofumi, ASANO, Shigetaka, NAKATSUJI, Norio, OKANO, Hideyuki et TANI, Kenzaburo, 2005. Establishment of Novel Embryonic Stem Cell Lines Derived from the Common Marmoset (*Callithrix jacchus*). In : *Stem Cells*. octobre 2005. Vol. 23, n° 9, p. 1304-1313.

SHIMADA, Hiroko, OKADA, Yohei, IBATA, Keiji, EBISE, Hayao, OTA, Shin-ichi, TOMIOKA, Ikuo, NOMURA, Toshihiro, MAEDA, Takuji, KOHDA, Kazuhisa, YUZAKI, Michisuke, SASAKI, Erika, NAKAMURA, Masaya et OKANO, Hideyuki, 2012. Efficient Derivation of Multipotent Neural Stem/Progenitor Cells from Non-Human Primate Embryonic Stem Cells. In : HASHIMOTO, Kenji (éd.), *PLoS ONE*. 14 novembre 2012. Vol. 7, n° 11.

SOLTER, D et KNOWLES, B B, 1975. Immunology of mouse blastocyst. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. décembre 1975. Vol. 72, n° 12, p. 5099-5102.

SOOD, Vikas, MITTAL, Bhagwant R., BHANSALI, Anil, SINGH, Baljinder, KHANDELWAL, Niranjana, MARWAHA, Neelam et JAIN, Ashish, 2015. Biodistribution of <sup>18</sup>F-FDG-Labeled

Autologous Bone Marrow-Derived Stem Cells in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus: Exploring Targeted and Intravenous Routes of Delivery. In : *Clinical Nuclear Medicine*. septembre 2015. Vol. 40, n° 9, p. 697.

SU, Min, SONG, Yinhong, HE, Zhixu, HU, Rong, ROOD, Debra et LAI, Laijun, 2015. Administration of embryonic stem cell-derived thymic epithelial progenitors expressing MOG induces antigen-specific tolerance and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. In : *Journal of Autoimmunity*. 1 avril 2015. Vol. 58, p. 36-47.

SUTTON, Elizabeth J., HENNING, Tobias D., PICHLER, Bernd J., BREMER, Christoph et DALDRUP-LINK, Heike E., 2008. Cell tracking with optical imaging. In : *European Radiology*. 1 octobre 2008. Vol. 18, n° 10, p. 2021-2032.

SWIJNENBURG, Rutger-Jan, GOVAERT, Johannes A., VAN DER BOGT, Koen E. A., PEARL, Jeremy I., HUANG, Mei, STEIN, William, HOYT, Grant, VOGEL, Hannes, CONTAG, Christopher H., ROBBINS, Robert C. et WU, Joseph C., 2010. Timing of bone marrow cell delivery has minimal effects on cell viability and cardiac recovery after myocardial infarction. In : *Circulation. Cardiovascular Imaging*. janvier 2010. Vol. 3, n° 1, p. 77-85.

TAKAHASHI, Kazutoshi et YAMANAKA, Shinya, 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. In : *Cell*. 25 août 2006. Vol. 126, n° 4, p. 663-676.

TAMM, Christoffer, BÖWER, Nathalie et ANNERÉN, Cecilia, 2011. Regulation of mouse embryonic stem cell self-renewal by a Yes-YAP-TEAD2 signaling pathway downstream of LIF.

In : *Journal of Cell Science*. 1 avril 2011. Vol. 124, n° Pt 7, p. 1136-1144.

TANNOUS, Bakhos A., GRIMM, Jan, PERRY, Katherine F., CHEN, John W., WEISSLEDER, Ralph et BREAKFIELD, Xandra O., 2006. Metabolic biotinylation of cell surface receptors for in vivo imaging. In : *Nature Methods*. mai 2006. Vol. 3, n° 5, p. 391-396.

TARDIF, Suzette D., SMUCNY, Darlene A., ABBOTT, David H., MANSFIELD, Keith, SCHULTZ-DARKEN, Nancy et YAMAMOTO, Maria Emilia, 2003. Reproduction in captive common marmosets (*Callithrix jacchus*). In : *Comparative Medicine*. août 2003. Vol. 53, n° 4, p. 364-368.

TERROVITIS, John, KWOK, Keng Fai, LAUTAMÄKI, Riikka, ENGLÉS, James M., BARTH, Andreas S., KIZANA, Eddy, MIAKE, Junichiro, LEPOO, Michelle K., FOX, James, SEIDEL, Jurgen, POMPER, Martin, WAHL, Richard L., TSUI, Benjamin, BENDEL, Frank, MARBÁN, Eduardo et ABRAHAM, M. Roselle, 2008. Ectopic expression of the sodium-iodide symporter enables imaging of transplanted cardiac stem cells in vivo by single-photon emission computed tomography or positron emission tomography. In : *Journal of the American College of Cardiology*. 11 novembre 2008. Vol. 52, n° 20, p. 1652-1660.

THOMSEN, Henrik S., 2006. Nephrogenic systemic fibrosis: a serious late adverse reaction to gadodiamide. In : *European Radiology*. décembre 2006. Vol. 16, n° 12, p. 2619-2621.

THOMSON, J. A., 1998. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. In : *Science*. 6 novembre 1998. Vol. 282, n° 5391, p. 1145-1147.

THOMSON, J. A., KALISHMAN, J., GOLOS, T. G., DURNING, M., HARRIS, C. P. et HEARN, J. P., 1996. Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) blastocysts. In : *Biology of Reproduction*. août 1996. Vol. 55, n° 2, p. 254-259.

VAN DER BOGT, Koen E.A., SHEIKH, Ahmad Y., SCHREPFER, Sonja, HOYT, Grant, CAO, Feng, RANSOHOFF, Katie, SWIJNENBURG, Rutger-Jan, PEARL, Jeremy, FISCHBEIN, Michael, CONTAG, Christopher H., ROBBINS, Robert C. et WU, Joseph C., 2008. Comparison of Different Adult Stem Cell Types for Treatment of Myocardial Ischemia. In : *Circulation*. 30 septembre 2008. Vol. 118, n° 14 0, p. S121-S129.

VARANI, James, DASILVA, Marissa, WARNER, Roscoe L., DEMING, Monica O'brien, BARRON, Adam G., JOHNSON, Kent J. et SWARTZ, Richard D., 2009. Effects of Gadolinium-based Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents on Human Skin in Organ Culture and Human Skin Fibroblasts. In : *Investigative Radiology*. 1 février 2009. Vol. 44, n° 2, p. 74-81.

VAYSSE, L., BEDUER, A., SOL, J.C., VIEU, C. et LOUBINOUX, I., 2015. Micropatterned bioimplant with guided neuronal cells to promote tissue reconstruction and improve functional recovery after primary motor cortex insult. In : *Biomaterials*. juillet 2015. Vol. 58, p. 46-53.

WALKER, Jeff, MACLEAN, Jason et HATSOPOULOS, Nicholas G., 2017. The marmoset as a model system for studying voluntary motor control. In : *Developmental Neurobiology*. 2017. Vol. 77, n° 3, p. 273-285.

WANG, Xiuli, ROSOL, Michael, GE, Shundi, PETERSON, Denise,

MCNAMARA, George, POLLACK, Harvey, KOHN, Donald B., NELSON, Marvin D. et CROOKS, Gay M., 2003. Dynamic tracking of human hematopoietic stem cell engraftment using in vivo bioluminescence imaging. In : *Blood*. 15 novembre 2003. Vol. 102, n° 10, p. 3478-3482.

WANG, Yaqi, XU, Chenjie et OW, Hooisweng, 2013. Commercial Nanoparticles for Stem Cell Labeling and Tracking. In : *Theranostics*. 2013. Vol. 3, n° 8, p. 544-560.

WELLING, Mick M., DUIJVESTIEN, Marjolijn, SIGNORE, Alberto et VAN DER WEERD, Louise, 2011. In vivo biodistribution of stem cells using molecular nuclear medicine imaging. In : *Journal of Cellular Physiology*. juin 2011. Vol. 226, n° 6, p. 1444-1452.

WOOD, H. B. et EPISKOPOU, V., 1999. Comparative expression of the mouse Sox1, Sox2 and Sox3 genes from pre-gastrulation to early somite stages. In : *Mechanisms of Development*. août 1999. Vol. 86, n° 1-2, p. 197-201.

YAMAUCHI, Kensuke, YANG, Meng, JIANG, Ping, YAMAMOTO, Norio, XU, Mingxu, AMOH, Yasuyuki, TSUJI, Kazuhiko, BOUVET, Michael, TSUCHIYA, Hiroyuki, TOMITA, Katsuro, MOOSSA, A. R. et HOFFMAN, Robert M., 2005. Real-time in vivo dual-color imaging of intracapillary cancer cell and nucleus deformation and migration. In : *Cancer Research*. 15 mai 2005. Vol. 65, n° 10, p. 4246-4252.

YE, Shoudong, LI, Ping, TONG, Chang et YING, Qi-Long, 2013. Embryonic stem cell self-renewal pathways converge on the transcription factor Tfcp2l1. In : *The EMBO journal*. 2 octobre 2013. Vol. 32, n° 19, p. 2548-2560.

ZANZONICO, Pat, KOEHNE, Guenther, GALLARDO, Humilidad F., DOUBROVIN, Mikhail, DOUBROVINA, Ekaterina, FINN, Ronald, BLASBERG, Ronald G., RIVIERE, Isabelle, O'REILLY, Richard J., SADELAIN, Michel et LARSON, Steven M., 2006. [<sup>131</sup>I]FIAU labeling of genetically transduced, tumor-reactive lymphocytes: cell-level dosimetry and dose-dependent toxicity. In : *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 11 août 2006. Vol. 33, n° 9, p. 988-997.

ZHANG, Shanxiang, SUN, Jihong, FANG, Yanan, NASSIRI, Mehdi, LIU, Lanting, ZHOU, Jiehao, STOHLER, Ryan, CHOI, Haki et VANCE, Gail H., 2017. Signet-ring cell lymphoma: clinicopathologic, immunohistochemical, and fluorescence in situ hybridization studies of 7 cases. In : *Annals of Diagnostic Pathology*. février 2017. Vol. 26, p. 38-42.

ZHENG, Yongtao, HUANG, Jiongwei, ZHU, Tongming, LI, Ronggang, WANG, Zhifu, MA, Fukai et ZHU, Jianhong, 2017. Stem Cell Tracking Technologies for Neurological Regenerative Medicine Purposes. In : *Stem Cells International*. 2017. Vol. 2017.

ZHU, J., ZHOU, L. et XINGWU, F., 2006. Tracking neural stem cells in patients with brain trauma. In : *The New England journal of medicine*. novembre 2006. Vol. 355, n° 22, p. 2376-2378.

# ANNEXES

## Annexe 1 : Détails et références concernant les produits utilisés dans cette étude

Nom du produit	Composition	Référence
Accutase	Dulbecco's PBS + EDTA + Phenol Red	SIGMA (réf. A6964, 100 mL)
ADN Saumon	ADN de sperme de saumon soniqué (UltraPure™ Salmon Sperm DNA Solution)	INVITROGEN (réf. 15632011)
Biotine	Biotin-16-dUTP	ROCHE (réf. 11228953 ou 11 093 070 910, 50nmol ; 50 µL)
BSA	Albumin bovine serum, fraction V, ≥96 %	SIGMA (réf. A9647, 50 g)
Choc hypotonique 1/6 <sup>ème</sup>	Sérum de veau foetal dilué au 1/6 <sup>ème</sup> avec de l'eau distillée	DUTSCHER (réf. S1810, 500 mL)
Colchicine	15 mg de colchicine + 40 mL d'eau stérile	SIGMA (réf. C9754, 1 g)
Concanavaline A	10 mg de Concanavaline A (Lectin from <i>Canavalia ensiformis</i> ) + 10 mL d'eau stérile	SIGMA (réf. 61760, 100 mg)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium F12 Nutriment Mixture (Ham)	GIBCO (réf. 31331-028, 500 mL)
dNTP 10X	Bases A, G, C et quelques T	Fabrication « maison »
FITC	Monoclonal anti-digoxin-FITC	SIGMA (réf. F3523)
Fixateur	1 volume d'acide acétique 100% dans 3 volumes d'éthanol 100%	Fabrication « maison »
Formamide	Formamide déionisée	EUROBIO (réf. GHY FOR 00-01)
Giemsa R	Giemsa R en solution	RAL DIAGNOSTICS (réf. 320310)
COT Human DNA	ADN humain issu de placenta, enrichi en séquence répétées	ROCHE (réf. 11581074001)
Milieu RPMI	RPMI Medium 1640 (1X) + GlutaMAX™ -I [+] 25mM HEPES	GIBCO (réf. 72400 – 021, 500 mL)
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline; [-] CaCl2 [-] MgCl2	GIBCO (réf. 14190-094, 500 mL)
Primers 2,5X	Séquence amorce CCGACTCGAGNNNNNATGTGG	EUROBIO (oligonucléotide réf. 8018201367-000100)
Pokeweed	5 mg de Pokeweed (Lectin from <i>Phytolacca americana</i> ) + 20 mL d'eau stérile	SIGMA (réf. L8777, 5 mg)
SSC 0,4X	UltraPure™ 20X SSC BUFFER diluée 50 fois	INVITROGEN (réf. 15557036, 4 L)
SSC 2X	UltraPure™ 20X SSC BUFFER diluée 10 fois	INVITROGEN (réf. 15557036, 4 L)

SAF 594	Streptavidin, Alexa Fluor® 594	LIFE TECHNOLOGIES (réf. S32356)
Tris HCl – EDTA 1X	Sodium Chloride-Tris-EDTA BUFFER 10X dilué 10 fois	FISHER (réf. BP2475, 100 mL)
Trypsine	TRYPSIN 1 : 250	PAN™ BIOTECH GmbH (réf. P10-025100P, 100g)
Tween	Polyéthylène glucol sorbitan monolaurate, Polyoxyéthylènesorbitan monolaurate	SIGMA (réf. P1379, 500 mL)
Vectashield with DAPI	Vectashield et DAPI	VECTOR LABORATORIES (réf. H-1200)

**AGREMENT SCIENTIFIQUE**

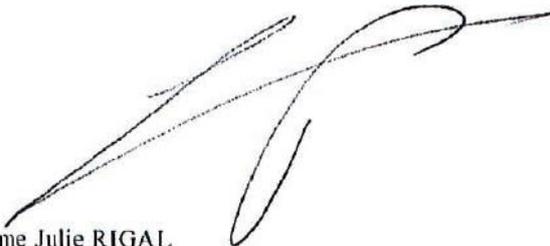
**En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire**

Je soussignée, Isabelle RAYMOND, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **Julie RIGAL** intitulée « Développement et validation de sondes d'hybridation *in situ* en fluorescence pour le *tracking* de précurseurs neuraux dérivés de cellules souches embryonnaires chez le marmouset commun *Callithrix Jacchus*, petit primate non humain » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 19/09/2019  
Professeure Isabelle RAYMOND  
Enseignant-chercheur  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



Vu :  
Le Président du jury :  
Professeur Jean-Christophe PAGES



Mme Julie RIGAL  
a été admis(e) sur concours en : 2014  
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 18/07/2018  
a validé son année d'approfondissement le : 16/07/2019  
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

Vu :  
Le Directeur par intérim de l'Ecole  
Nationale Vétérinaire de Toulouse  
Frédéric BOUSQUET


Vu et autorisation de l'impression :  
Présidente de l'Université Paul Sabatier  
Madame Régine ANDRE-OBRECHT



Nom : Rigal

Prénom : Julie

**Développement et validation de sondes d'hybridation *in situ* en fluorescence pour le *tracking* de précurseurs neuraux dérivés de cellules souches embryonnaires chez le marmouset commun (*Callithrix jacchus*), petit primate non humain**

**RESUME**

La médecine régénérative est source de grandes innovations thérapeutiques à l'heure actuelle. L'utilisation de cellules souches comme outil thérapeutique nécessite cependant une validation expérimentale préalable. Notre étude débute par une présentation des cellules souches existantes et de leurs applications médicales, en particulier pour les cellules souches embryonnaires. Nous y développons également les méthodes de suivi cellulaire disponibles et l'intérêt du modèle marmouset dans la recherche. Dans un deuxième temps, nous décrivons la fabrication de sondes d'ADN destinées à marquer les chromosomes X et Y de marmouset commun (*Callithrix jacchus*). Ces sondes sont ensuite validées comme outil de suivi cellulaire sur coupes histologiques. Après ajustement du protocole, ces sondes permettront de différencier des cellules mâles et femelles au sein d'un même organisme. Ainsi, si des cellules souches mâles (XY) sont greffées chez un individu femelle (XX), notre méthode de suivi cellulaire permet de détecter les cellules souches présentes dans du tissu prélevé et préparé en lames histologiques.

Mots clés :

Médecine régénérative, cellules souches, cellules souches embryonnaires, *tracking* cellulaire, hybridation *in situ*, FISH, modèle marmouset, sonde chromosomique

**Development and validation of fluorescence in situ hybridization probes for tracking neural precursors derived from common marmoset embryonic stem cells**

Regenerative medicine is a source of great therapeutic innovations now. The use of stem cells as a therapeutic tool, however, requires prior experimental validation. Our study begins with a presentation of existing stem cells and their medical applications, especially for embryonic stem cells. We also develop available cell tracking methods and the interest of the marmoset model in research. In a second step, we describe the fabrication of DNA probes to mark the marmoset (*Callithrix jacchus*) X and Y chromosomes. These probes are then validated as a cell monitoring tool on histological sections. After adjustment of the protocol, these probes will make it possible to differentiate male and female cells within the same organism. Thus, if male stem cells (XY) are grafted to a female individual (XX), our cell tracking method can detect stem cells present in tissue taken and prepared in histological slides.

Keywords:

Regenerative medicine, stem cells, embryonic stem cells, cell tracking, in situ hybridization, FISH, marmoset model, chromosomal probe