




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/27323>

Van Lierde, Fabien . *Marquage histologique du chromosome Y chez le marmouset commun (Callithrix jacchus), petit primate non humain. Mise au point d'une sonde d'hybridation in situ en fluorescence pour le suivi tissulaire de greffes de cellules à potentiel neurogénique.* Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse – ENVT, 2020, 93 p.

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

MARQUAGE HISTOLOGIQUE DU CHROMOSOME Y CHEZ LE MARMOuset COMMUN (*CALLITHRIX JACCHUS*), PETIT PRIMATE NON HUMAIN. MISE AU POINT D'UNE SONDE D'HYBRIDATION IN SITU EN FLUORESCENCE POUR LE SUIVI TISSULAIRE DE GREFFES DE CELLULES A POTENTIEL NEUROGENIQUE

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

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

par

VAN LIERDE Fabien
Né le 29/08/1995 à BEAUVAIS (60)

Directrice de thèse : Mme Isabelle RAYMOND-LETRON

JURY

PRESIDENT :

M. Jean-Christophe PAGES

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSEESSEURS :

Mme Isabelle RAYMOND-LETRON

Mme Alexandra DEVIERS

Professeure à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRES INVITES :

M. Alain PINTON

Ingénieur de recherche, plateforme de cytogénétique et UMR
GenPhySE, TOULOUSE

Mme Isabelle LOUBINOUX

Docteure, Inserm, ToNIC, TOULOUSE

Mme Carla CIRILLO

CRCN INSERM, ToNIC, TOULOUSE

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

Directeur : Professeur Pierre SANS

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Pharmacologie - 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**, (Emérite) - *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 1° CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- 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*
- Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation animale*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
- Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles*
- M. **RABOISSON Didier**, *Médecine de population et Économie de la santé animale*

PROFESSEURS CERTIFIÉS DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

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

MAÎTRES DE CONFÉRENCES HORS CLASSE

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*

- Mme **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
 M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
 M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
 M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
 Mme **PRIYMENKO 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 **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
 M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
 M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
 Mme **DANIELS Hélène**, *Immunologie- Bactériologie-Pathologie infectieuse*
 Mme **DAVID Laure**, *Hygiène et Industrie des aliments*
 Mme **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
 M. **DIDIMO IMAZAKI Pedro**, *Hygiène et Industrie des aliments*
 M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*
 Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
 Mme **GRANAT Fanny**, *Biologie médicale animale*
 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. **LHERMIE Guillaume**, *Economie de la santé animale*
 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*
 Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
 M. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire – Maladies animales règlementées*
 Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

CHARGES D'ENSEIGNEMENT CONTRACTUELS

- M. **BOLON Pierrick**, *Production et pathologie aviaire*
 M. **LEYNAUD Vincent**, *Médecine interne*
 Mme **ROBIN Marie-Claire**, *Ophthalmologie*
 Mme **TOUSSAIN Marion**, *Pathologie des équidés*

ENSEIGNANT DE PREMIERE ANNEE COMMUNE AUX ETUDES VETERINAIRES

- Mme **GAUCHARD Cécile**, *Biologie-écologie-santé*

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*
 M. **TOUITOU Florian**, *Alimentation animale*

A Monsieur le Professeur Jean-Christophe PAGES

Professeur des Universités et Praticien Hospitalier en Biologie Cellulaire à l'Université Paul Sabatier et au Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse

Qui m'a fait l'honneur d'accepter de présider ce jury. Mes hommages respectueux.

A Madame le Professeur Isabelle RAYMOND-LETRON

Professeur en Histologie et Anatomie Pathologique vétérinaire à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Qui m'a fait l'honneur de diriger cette thèse. Pour votre grande disponibilité et votre investissement dans le projet. Mes sincères remerciements.

A Madame le Docteur Alexandra DEVIERS

Maître de Conférences en Anatomie à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Qui a aimablement accepté de faire partie de ce jury de thèse. Ma profonde reconnaissance.

A Monsieur Alain PINTON

Ingénieur de Recherche à l'Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement, à la Plateforme de Cytogénétique et à l'Unité Mixte de Recherche GenPhySE de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pour votre précieux encadrement, votre disponibilité, votre temps consacré à ce travail et votre gentillesse. Ma profonde gratitude et mes sincères remerciements.

A Madame le Docteur Isabelle LOUBINOX

Directeur de Recherche à l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale de Toulouse et l'Unité Mixte de Recherche Toulouse NeuroImaging Center

Pour nous avoir confié ce projet. Mon profond respect.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES ILLUSTRATIONS	5
LISTE DES ABREVIATIONS	7
INTRODUCTION	8
1. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	11
1.1. CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES ET MEDECINE REGENERATIVE.....	11
1.1.1. Définition d'une cellule souche embryonnaire	11
1.1.2. Les cellules souches embryonnaires dans la recherche actuelle	12
1.1.3. Cellules souches embryonnaires humaines, point de vue éthique	14
1.1.4. Cellules souches embryonnaires chez le marmouset commun (<i>Callithrix jacchus</i>)15	
1.2. ETAT DES CONNAISSANCES DU MECANISME D'ACTION DES CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES	16
1.2.1. Propriétés biologiques des cellules souches embryonnaires	17
1.2.1.1. Autorenewement	17
1.2.1.2. Pluripotence	19
1.2.2. Modes d'administration des cellules souches embryonnaires	20
1.2.2.1. Types d'administrations de cellules souches embryonnaires déjà étudiés.....	20
1.2.2.2. Mise au point d'un support non biodégradable destiné à l'administration intracrânienne de cellules souches embryonnaires	21
1.3. METHODES DE SUIVI DES CELLULES SOUCHES.....	22
1.3.1. Marquage <i>in vivo</i>	22
1.3.1.1. Marquage direct.....	24
1.3.1.1.1. Marquage par des méthodes d'imagerie par résonance magnétique (IRM)	24
1.3.1.1.2. Marquage par tomographie par émission de positons (PET) et tomographie mono-photonique (SPECT)	25
1.3.1.1.3. Marquage par fluorescence optique (FLI)	26
1.3.1.2. Marquage indirect.....	27
1.3.1.2.1. Imagerie par bioluminescence (BLI)	27
1.3.1.2.2. Imagerie par résonance magnétique (IRM)	28
1.3.1.2.3. Tomographie par émission de positons (PET) ou mono-photonique (SPECT).....	30
1.3.2. Marquage <i>post mortem</i>	31

1.3.2.1. Immunohistochimie	31
1.3.2.2. Hybridation <i>in situ</i>	32
1.3.2.2.1. Principe de l'hybridation <i>in situ</i>	33
1.3.2.2.2. Application de l'hybridation <i>in situ</i> au marquage <i>post mortem</i> des cellules souches	34
1.3.3. Bilan sur les techniques de marquage	35
1.4. INTERET DES SONDAS DIRIGÉES VERS LES CHROMOSOMES SEXUELS	39
1.5. LE MARMOUSET COMMUN EN TANT QUE MODÈLE ANIMAL	40
2. ETUDE EXPERIMENTALE	42
2.1. OBJECTIFS DE L'ETUDE.....	42
2.1.1. Contexte.....	42
2.1.2. Buts de l'étude	44
2.1.3. Rappel du principe de réalisation des sondes	44
2.2. MATERIELS ET METHODES	45
2.2.1. Culture cellulaire à partir d'une biopsie cutanée	45
2.2.1.1. Prélèvement et mise en culture.....	46
2.2.1.2. Division et récupération des cellules en division	47
2.2.1.3. Fixation des cellules	48
2.2.1.4. Etalement sur lames.....	48
2.2.2. Culture et extraction des BACs	49
2.2.2.1. Sélection des BACs	49
2.2.2.2. Culture préliminaire des colonies de bactéries.....	49
2.2.2.2.1. Préculture bactérienne.....	50
2.2.2.2.2. Création d'un glycérol stock	50
2.2.2.2.3. Culture bactérienne.....	50
2.2.2.3. Extraction des ADN.....	50
2.2.2.4. Purification de l'ADN de BACs	51
2.2.2.5. Précipitation de l'ADN de BACs.....	51
2.2.2.6. Dosage par spectrophotométrie	52
2.2.3. Préparation d'ADN compétiteur (kit Nucléobond® Buffer Set IV de MACHEREY- NAGEL™)	53
2.2.3.1. Matériel nécessaire	53
2.2.3.2. Préparation des solutions	53

2.2.3.3. Lyse des tissus	54
2.2.3.4. Migration et élution sur colonnes.....	54
2.2.3.5. Sonication et dosage par spectrophotométrie	55
2.2.4. Réalisation des sondes (méthode de FISH).....	55
2.2.4.1. Marquage ADN (kit BioPrime® de INVITROGEN™)	55
2.2.4.2. Précipitation des sondes	56
2.2.4.3. Préparation des sondes.....	56
2.2.5. Hybridation <i>in situ</i> sur lames cytologiques.....	57
2.2.5.1. Préparation des lames cytologiques	57
2.2.5.2. Hybridation : protocole à l'Hybridizer® DAKO™	57
2.2.5.3. Lavages stringents	58
2.2.5.4. Préparation des anticorps	58
2.2.5.5. Révélation.....	58
2.2.5.6. Observation des lames	59
2.2.6. Hybridation <i>in situ</i> sur coupes histologiques.....	59
2.2.6.1. Préparation des lames.....	59
2.2.6.1.1. Réalisation des lames	59
2.2.6.1.2. Déparaffinage et réhydratation	59
2.2.6.1.3. Etapes de prétraitement et de digestion	60
2.2.6.2. Hybridation à l'Hybridizer® DAKO™	60
2.2.6.3. Lavages	61
2.2.6.4. Préparation des anticorps et révélation	61
2.3. RESULTATS.....	62
2.3.1. Cultures cellulaires.....	62
2.3.2. Sondes chromosomiques.....	63
2.3.2.1. Rappel du principe de réalisation des sondes.....	63
2.3.2.2. Test des sondes sur lames cytologiques	63
2.3.2.2.1. Premiers résultats.....	63
2.3.2.2.1.1. Sonde du chromosome Y	64
2.3.2.2.1.1.1. CH259-95C4.....	64
2.3.2.2.1.1.2. CH259-376N23	65
2.3.2.2.1.1.3. CH259-387M22	66

2.3.2.2.1.1.4. Sondes retenues.....	67
2.3.2.2.1.2. Sonde du chromosome X.....	68
2.3.2.2.1.2.1. CH259-113N17	68
2.3.2.2.1.2.2. CH259-135B11	69
2.3.2.2.1.2.3. CH259-506H3	70
2.3.2.2.1.2.4. Sondes retenues.....	71
2.3.2.2.2. Hybridation des sondes X et Y	71
2.3.2.3. Test des sondes sur coupes histologiques	73
2.3.2.3.1. Test des sondes sur coupes histologiques d'intestin grêle	74
2.3.2.3.2. Test des sondes sur coupes histologiques de poumon.....	77
2.3.2.3.3. Test des sondes sur coupes histologiques de testicule.....	78
2.4. DISCUSSION	78
2.4.1. Obtention des BACs	79
2.4.2. Intensité du signal de la sonde anti-X.....	79
2.4.3. Hybridation sur lames histologiques	80
2.4.3.1. Prétraitement des lames histologiques	80
2.4.3.2. Hybridation sur lames d'encéphale de marmouset commun	80
CONCLUSION	82
BIBLIOGRAPHIE.....	83

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Nombre de publications scientifiques sur PubMed avec les mots clefs « embryonic stem cells » par année (source : PubMed).....	12
Figure 2 : Répartition géographique des essais cliniques sur les cellules souches embryonnaires (d'après www.clinicaltrials.gov)	14
Figure 3 : Schéma des deux types de division cellulaire : symétrique et asymétrique (Berika <i>et al.</i> , 2014).....	18
Figure 4 : Aspect microscopique du biomatériau mis au point (Bédurier <i>et al.</i> , 2011)	21
Figure 5 : Marquage direct et marquage indirect (Gu <i>et al.</i> , 2012).....	23
Figure 6 : Immunohistochimie directe et indirecte (Ramos-Vara, 2005)	32
Figure 7 : Structure d'une molécule d'ADN (source : wikipedia.org)	33
Figure 8 : Hybridation <i>in situ</i> en fluorescence (source : http://www.wikipedia.org).....	45
Figure 9 : Caryotype d'un individu mâle de l'espèce <i>Callithrix jacchus</i> en coloration en bandes G (grossissement x1000) (source : banque de données Unité GenPhyse).....	63
Figure 10 : Métaphase de cellule de marmouset mâle après hybridation de sonde du chromosome Y obtenue à partir du BAC CH259-95C4 et avec de l'ADN compétiteur de marmouset (grossissement x1000).....	64
Figure 11 : Métaphase de cellule de marmouset mâle après hybridation de sonde du chromosome Y obtenue à partir du BAC CH259-95C4 et avec de l'ADN compétiteur humain (grossissement x1000).....	65
Figure 12 : Métaphase de cellule de marmouset mâle après hybridation de sonde du chromosome Y obtenue à partir du BAC CH259-376N23 et avec de l'ADN compétiteur de marmouset (grossissement x1000).....	65
Figure 13 : Métaphase de cellule de marmouset mâle après hybridation de sonde du chromosome Y obtenue à partir du BAC CH259-376N23 et avec de l'ADN compétiteur humain (grossissement x1000)	66
Figure 14 : Métaphase de cellule de marmouset mâle après hybridation de sonde du chromosome Y obtenue à partir du BAC CH259-387M22 et avec de l'ADN compétiteur de marmouset (grossissement x1000).....	66
Figure 15 : Métaphase de cellule de marmouset mâle après hybridation de sonde du chromosome Y obtenue à partir du BAC CH259-387M22 et avec de l'ADN compétiteur humain (grossissement x1000)	67
Figure 16 : Métaphase de cellule de marmouset mâle après hybridation de sonde du chromosome X obtenue à partir du BAC CH259-113N17 et avec de l'ADN compétiteur de marmouset (grossissement x1000).....	68

Figure 17 : Métaphase de cellule de marmouset mâle après hybridation de sonde du chromosome X obtenue à partir du BAC CH259-113N17 et avec de l'ADN compétiteur humain (grossissement x1000)	68
Figure 18 : Métaphase de cellule de marmouset mâle après hybridation de sonde du chromosome X obtenue à partir du BAC CH259-135B11 et avec de l'ADN compétiteur de marmouset (grossissement x1000).....	69
Figure 19 : Métaphase de cellule de marmouset mâle après hybridation de sonde du chromosome X obtenue à partir du BAC CH259-135B11 et avec de l'ADN compétiteur humain (grossissement x1000)	69
Figure 20 : Métaphase et interphase de cellule de marmouset mâle après hybridation de sonde du chromosome X obtenue à partir du BAC CH259-506H3 et avec de l'ADN compétiteur de marmouset (grossissement x1000).....	70
Figure 21 : Métaphase de cellule de marmouset mâle après hybridation de sonde du chromosome X obtenue à partir du BAC CH259-506H3 et avec de l'ADN compétiteur humain (grossissement x1000).....	70
Figure 22 : Métaphase de cellule de marmouset mâle après hybridation des sondes des chromosomes X et Y (grossissement x1000).....	72
Figure 23 : Métaphase de cellule de marmouset mâle après hybridation des sondes des chromosomes X et Y avec amplification du signal vert (grossissement x1000)	72
Figure 24 : Métaphases de cellule de marmouset mâle après hybridation des sondes des chromosomes X et Y avec amplification du signal vert et rajout de DAPI (grossissement x1000).....	73
Figure 25 : Noyaux de cellules de la sous-muqueuse de l'intestin grêle de marmouset mâle après hybridation de sondes anti-X et anti-Y (grossissement x400).....	74
Figure 26 : Noyau d'une cellule isolée de la sous-muqueuse de l'intestin grêle de marmouset mâle après hybridation de sondes anti-X et anti-Y (grossissement x400).....	75
Figure 27 : Noyaux de cellules de la sous-muqueuse de l'intestin grêle de marmouset mâle après hybridation de sondes anti-X et anti-Y avec amplification (grossissement x400)	76
Figure 28 : Noyaux de cellules de la sous-muqueuse de l'intestin grêle de marmouset mâle après hybridation de sondes anti-X et anti-Y avec amplification et réglages du logiciel (grossissement x400).....	77
Figure 29 : Noyaux de cellules de la muqueuse de poumon de marmouset mâle après hybridation de sondes anti-X et anti-Y (grossissement x400)	78
Tableau 1 : Avantages et inconvénients des techniques de tracking cellulaire	36
Tableau 2 : Concentration des ADN extraits à partir des BACs.....	52

LISTE DES ABREVIATIONS

<u>CSE</u> = Cellule Souche Embryonnaire	<u>ATP</u> = Adénosine Triphosphate
<u>CSED</u> = Cellule Souche Embryonnaire Différenciée	<u>CEST</u> = Transfert de Saturation par Echange Chimique
<u>CSEH</u> = Cellule Souche Embryonnaire Humaine	<u>HSV1-tk</u> = Herpes Simplex Virus type 1 thymidine kinase gene
<u>CSEM</u> = Cellule Souche Embryonnaire de Marmouset	<u>FIAU</u> = 2'-fluoro-2'-deoxy- β -D-arabinofuranosyl-5-iodouracil
<u>CSM</u> = Cellule Souche Mésenchymateuse	<u>FHBG</u> = 9-(4-fluoro-3-hydroxy-methyl-butyl) guanine
<u>IPS</u> = Cellule Souche Pluripotente Induite	<u>NIS</u> = sodium iodide symporter
<u>DLMA</u> = Dégénérescence Maculaire Liée à l'Âge	<u>IHC</u> = Immunohistochimie
<u>AVC</u> = Accident Vasculaire Cérébral	<u>ADN</u> = Acide Désoxyribo-Nucléique
<u>PDMS</u> = Polydiméthylsiloxane	<u>FISH</u> = Hybridation <i>in situ</i> par fluorescence
<u>IRM</u> = Imagerie par Résonance Magnétique	<u>BAC</u> = bacterial artificial chromosome = chromosome artificiel bactérien
<u>PET</u> = Tomographie par Emission de Positons	<u>PSM</u> = poste de sécurité microbiologique
<u>SPECT</u> = Tomographie par Emission Mono-Photonique	<u>PBS</u> = Dulbecco's Phosphate Buffered Saline®
<u>FLI</u> = Imagerie par Fluorescence Optique	<u>BSA</u> = Albumin bovine serum
<u>SPIO</u> = Oxyde de Fer Supermagnétique	<u>DAPI</u> = 4',6-diamidino-2-phénylindole
<u>BLI</u> = Imagerie par Bioluminescence	<u>TE</u> = Tris HCl-EDTA
<u>Fluc</u> = Firefly luciferase	
<u>Rluc</u> = Renilla luciferase	

INTRODUCTION

Les thérapies régénératives font partie d'un domaine méconnu mais prometteur de la médecine qui fait appel aux cellules souches pour régénérer des lésions tissulaires. Certaines études ont déjà prouvé l'efficacité des cellules souches en médecine. La médecine régénérative pose néanmoins des problématiques relatives aux effets secondaires et à l'éthique de l'utilisation des cellules souches.

Les propriétés des cellules souches embryonnaires (CSE) qui présentent un intérêt en médecine régénérative sont l'autorenouveau, qui est leur capacité de se reproduire à l'infini, et la pluripotence, à savoir leur aptitude à se différencier en n'importe quelle lignée cellulaire. Les étapes de prélèvement et de développement des CSE sont cruciales pour leur potentielle utilisation en thérapeutique. Une équipe de recherche a réussi à produire des précurseurs neuraux dérivés de cellules souches embryonnaires chez le marmouset commun (*Callithrix jacchus*), un petit primate non humain (Sasaki *et al.*, 2005). La production de lignées cellulaires nous permet d'imaginer leur utilisation pour le traitement de lésions considérées aujourd'hui comme incurables, en particulier dans le domaine des affections neurologiques.

Compte tenu de l'augmentation du nombre d'accidents vasculaires cérébraux (AVC) chez l'Homme, des instituts comme l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) comprenant des unités de recherche telles que ToNIC (Toulouse NeuroImaging Center, UMR 1214, Toulouse, France) travaillent pour élaborer des thérapies nouvelles. L'unité ToNIC a développé un biomatériau non dégradable permettant de gérer le développement de précurseurs neuraux obtenus à partir de CSE (Bédier *et al.*, 2011 ; 2012). Ce matériau, le PolyDiMethylsiloxane Substrate (PDMS), a été employé dans une étude chez le rat et a permis l'amélioration de lésions cérébrales (Davoust *et al.*, 2017). L'objectif de l'INSERM est d'élaborer des thérapies régénératives permettant la récupération d'AVC ou d'une autre lésion neurologique chez l'Homme.

Avant d'effectuer des essais sur l'Homme, il est nécessaire de passer par des modèles animaux pour attester de l'efficacité et de l'innocuité des thérapies cellulaires expérimentales. Le marmouset commun (*Callithrix jacchus*) est un petit primate non humain qui est intéressant en tant que modèle animal pour les expérimentations de neurosciences. Il présente en effet des possibilités d'enregistrement physiologique, de surveillance comportementale et d'étude

du contrôle moteur volontaire. De plus, certains dysfonctionnements neurologiques, comme la maladie de Parkinson ou les AVC, sont modélisables chez le marmouset (Walker *et al.*, 2017).

L'équipe iDREAM (INSERM, Université Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse NeuroImaging Center, UMR 1214, Toulouse, France, Dr. Isabelle Loubinoux) travaille sur un projet consistant en l'implantation de CSE de marmouset commun, prédifférenciées en précurseurs neuraux et associées au biomatériau PDMS, chez des individus de même espèce ayant subi des lésions du cortex moteur, dans le but d'étudier le pouvoir thérapeutique des CSE. Afin de suivre le devenir des CSE, l'équipe de recherche a besoin d'un outil de tracking cellulaire.

Le tracking cellulaire peut se faire par des techniques *in vivo* (imagerie par résonance magnétique, tomographie par émission de positons ou mono-photonique, fluorescence optique, bioluminescence) ou *post mortem* (immunohistochimie, hybridation *in situ*). Ces approches donnent des informations différentes et sont donc complémentaires. L'hybridation par fluorescence *in situ* (FISH), dans le cadre du tracking cellulaire de cellules souches, est une technique *post mortem* qui n'intervient pas lors du vivant des cellules à la différence des techniques *in vivo* : c'est pourquoi la méthode FISH a été retenue. Les sondes que nous avons élaborées dans notre étude sont dirigées vers les chromosomes sexuels (X et Y) : ce qui permet de différencier les cellules mâles implantées des cellules de l'individu femelle receveur. La présence/absence de chromosome Y suffit, à elle seule, pour distinguer les cellules implantées des cellules de l'individu receveur, et évite de devoir modifier en amont les cellules administrées.

Le but de notre étude est de fabriquer des sondes d'ADN marquées dirigées vers les chromosomes X et Y du marmouset commun. Elles seront d'abord testées sur des lames cytologiques contenant des cellules en métaphase, puis sur des lames histologiques. Ces sondes pourront ensuite être utilisées par l'équipe iDREAM pour identifier, par FISH, des précurseurs neuraux, obtenus à partir de cellules souches embryonnaires mâles, administrés chez des individus femelles de la même espèce. Ce travail a été réalisé sur la plateforme de cytogénétique de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse, en collaboration avec M. Alain Pinton et le Pr. Isabelle Raymond-Letron.

1. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES ET MEDECINE REGENERATIVE

1.1.1. Définition d'une cellule souche embryonnaire

Le terme de « cellule souche » désigne une cellule indifférenciée capable à la fois de générer des cellules spécialisées par différenciation cellulaire et de se proliférer indéfiniment par mitoses. On distingue deux notions qui sont la multipotence et l'autorenouvellement.

On différencie plusieurs types de cellules souches : elles peuvent être totipotentes, pluripotentes, multipotentes ou unipotentes. Les cellules souches totipotentes sont issues des premières divisions de l'œuf fécondé (jusqu'au 4^e jour) et sont capables de donner naissance à tous les types de cellules de l'organisme. Ce sont les seules qui permettent le développement complet d'un individu. Les cellules souches pluripotentes sont issues d'un embryon de 5 à 7 jours ou obtenues artificiellement après transformation de cellules adultes et peuvent donner naissance à plus de 200 types cellulaires, provenant des trois feuillets embryonnaires (mésoderme, endoderme, ectoderme), représentatifs de tous les tissus de l'organisme. On parle respectivement de cellules souches embryonnaires (CSE) et de cellules souches pluripotentes induites (IPS). Les cellules souches multipotentes (cellules fœtales et adultes) sont capables de donner naissance à plusieurs types cellulaires, de même que les cellules souches myéloïdes de la moelle osseuse. Il s'agit par exemple des cellules souches mésenchymateuses (CSM). Les cellules souches unipotentes sont en mesure de ne fournir qu'un seul type cellulaire (foie, peau, cerveau, ...).

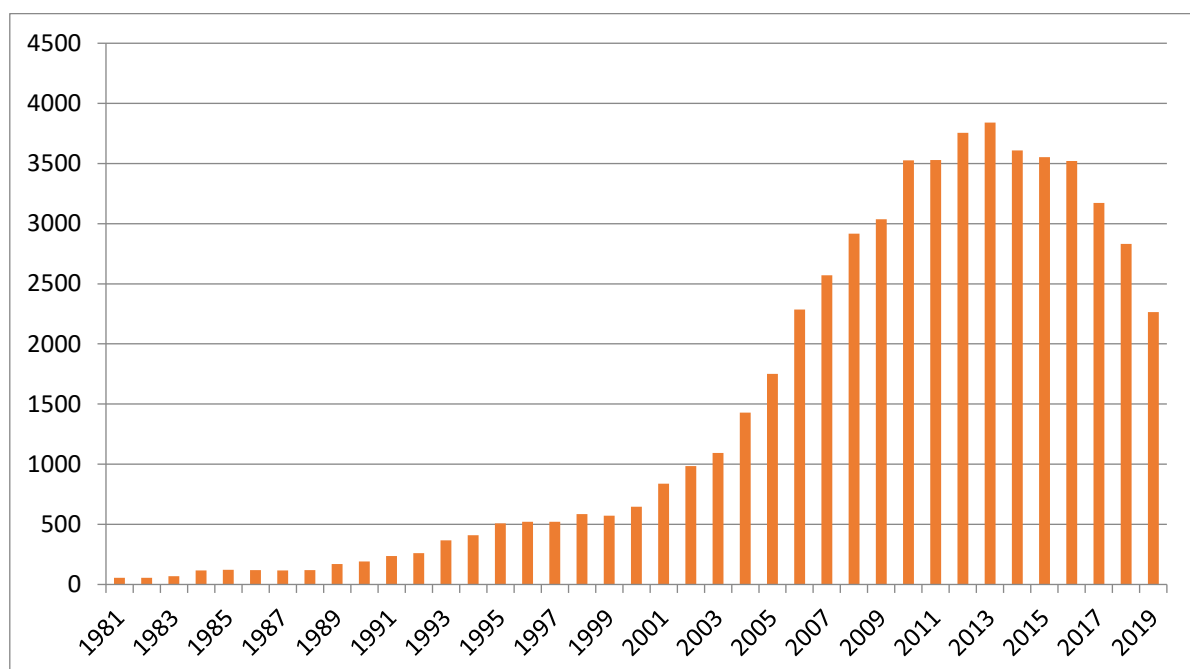
Le terme de « cellules souche embryonnaire » a été utilisé pour la première fois en 1981, permettant la distinction entre les cellules souches pluripotentes obtenues à partir d'embryons et les cellules souches pluripotentes dérivées de térato-carcinomes embryonnaires (Evans, Kaufman, 1981 ; Martin, 1981). Les CSE sont définies par un certain nombre de caractéristiques (Melton, Cowen, 2009) qui sont leur capacité d'autorenouvellement, leur multipotence voire pluripotence *in vitro* et *in vivo*, leur clonogénicité (capacité d'une cellule à proliférer sur un milieu donné), leur caryotype normal pour l'espèce et leur possibilité d'être congelées et décongelées au besoin.

1.1.2. Les cellules souches embryonnaires dans la recherche actuelle

Lorsque l'on se penche sur le nombre d'articles scientifiques publiés en rentrant « embryonic stem cells » dans PubMed, on se retrouve avec un résultat de 51612 publications aujourd'hui. On peut voir sur la Figure 1 que l'intérêt en recherche pour les CSE a vraiment augmenté depuis le début des années 2000. Depuis 2006, ce sont plus de 2000 publications qui paraissent chaque année. Cela démontre l'intérêt que porte l'univers de la recherche aux cellules souches embryonnaires.

Depuis 2013, cet intérêt a diminué. Cette année-là, 3840 articles scientifiques avaient été publiés contre seulement 2264 publications en 2019. Cette baisse de publications peut s'expliquer par l'augmentation du nombre d'essais cliniques mettant en jeu les cellules souches embryonnaires.

Figure 1 : Nombre de publications scientifiques sur PubMed avec les mots clefs « embryonic stem cells » par année (source : PubMed)



D'après le site de l'INSERM, l'utilisation de CSE 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 CSE, puis à les injecter à un patient pour régénérer un organe ou restaurer sa fonction. Nous pouvons citer la société de biotechnologie américaine Ocata Therapeutics qui utilise des CSE humaines : différenciées en cellules de la rétine pour lutter contre la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA), et différenciées en cellules épithéliales pigmentaires de la rétine pour lutter contre la dystrophie maculaire de Stargardt. La sécurité et l'effet thérapeutique de ces approches sont évalués par des essais cliniques actuellement en cours.

Une équipe de l'hôpital européen Georges Pompidou (unité Inserm 970) a pratiqué en octobre 2014 une greffe de cellules cardiaques dérivées de CSE humaines, selon un procédé développé par des chercheurs de l'hôpital Saint-Louis (unité Inserm 1160). Dix semaines après l'intervention, l'état de la patiente de 68 ans atteinte d'insuffisance cardiaque sévère s'était nettement amélioré.

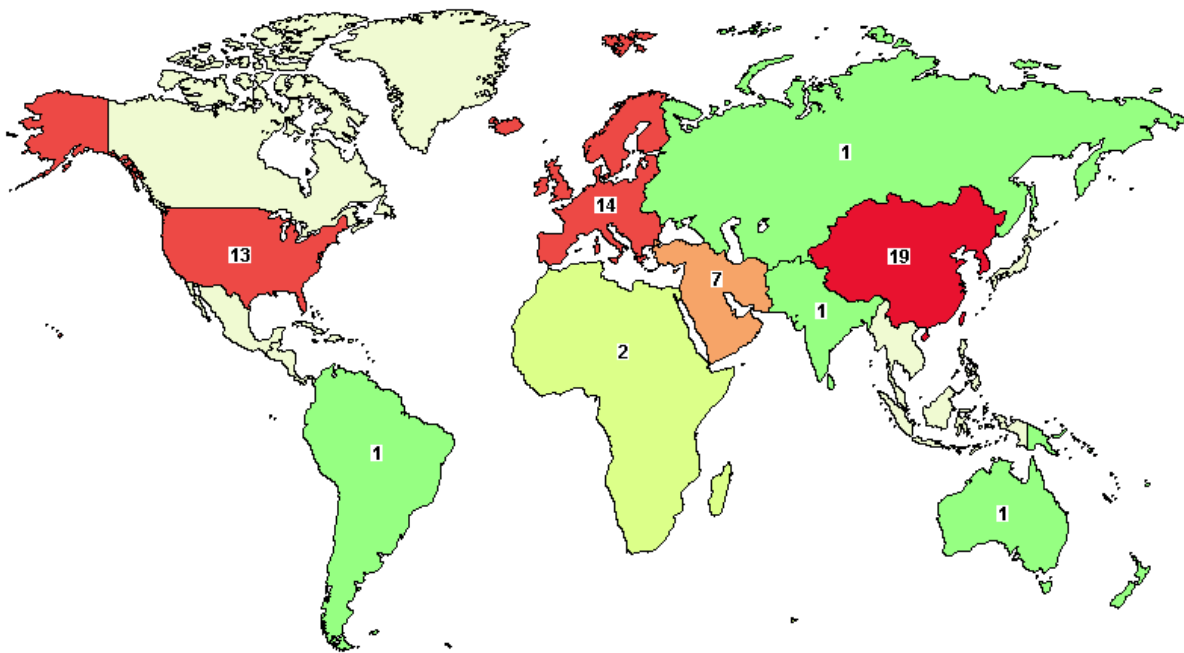
Le diabète de type 1 est une autre maladie ciblée par cette approche. La société de biotechnologie américaine ViaCyte prépare un essai clinique se fondant sur l'utilisation de cellules de pancréas productrices d'insuline obtenues à partir de CSE. Ces cellules sont encapsulées dans un disque sophistiqué puis greffées ce qui permettrait à l'insuline et au glucose de diffuser tout en protégeant le greffon d'une réaction immune de l'hôte. L'objectif est de restaurer la production d'insuline à long terme chez les patients.

Aujourd'hui, aucun traitement de thérapie cellulaire n'est autorisé en routine. Dans des pays comme le Mexique, le Panama ou encore l'Inde, des sociétés proposent des thérapies cellulaires avec l'utilisation de CSE. 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.

A ce jour, 62 essais cliniques sur l'utilisation de CSE ont été terminés, sont en cours ou sont en recrutement dans le monde d'après le site www.clinicaltrials.gov. Ces essais sont surtout répartis en Chine, en Europe et aux Etats-Unis comme le montre la Figure 2. Parmi ces essais cliniques, 7 sont actuellement en cours.

Il est important de noter la différence avec le nombre d'essais cliniques sur l'utilisation de CSM (1017 essais aujourd'hui). Les questionnements du point de vue éthique sont éventuellement à l'origine du frein à l'utilisation des CSE humaines.

Figure 2: Répartition géographique des essais cliniques sur les cellules souches embryonnaires (d'après www.clinicaltrials.gov)



1.1.3. Cellules souches embryonnaires humaines, point de vue éthique

Les CSE humaines sont produites à partir de la masse cellulaire interne d'embryons entre le cinquième et le septième jour suivant la fécondation (au stade de blastocyte). En pratique, les cellules souches embryonnaires sont prélevées sur des embryons surnuméraires obtenus par fécondation *in vitro* et qui ont été congelés en prévision d'un projet parental finalement abandonné. Cela permet la création d'une lignée de CSE. Le fait que les cellules soient pluripotentes et se multiplient à l'infini offre un réservoir inépuisable de cellules à partir d'une seule lignée. Les lignées peuvent donc être conservées et commercialisées par des laboratoires. Pour étudier une pathologie en particulier, il est parfois nécessaire de créer une nouvelle lignée à partir d'un embryon porteur de la maladie identifié par un diagnostic

préimplantatoire. Dans tous les cas, les parents biologiques doivent signer un consentement pour céder gratuitement l'embryon à la recherche.

Le problème éthique qui se pose est le fait qu'il faille, pour récupérer les CSE humaines, détruire un embryon donc une vie humaine potentielle. La « valeur » de l'embryon est discutée par les différentes cultures et religions. Certains estiment que la vie débute dès la fécondation de l'ovule, d'autres que la vie commence à un stade plus tardif, d'autres encore abordent la question différemment en jugeant que le bénéfice pouvant découler de ces recherches en termes de santé humaine justifierait ce sacrifice. En revanche, toutes les cultures s'accordent pour dire que l'embryon ne peut être instrumentalisé à des fins de recherche et ne peut donc être conçu dans cette seule finalité.

Les recherches sur les CSE humaines en France sont autorisées mais très encadrées. L'article 155 de la loi 2016-41 indique que la recherche sur CSE humaines est autorisée si la pertinence scientifique de la recherche est établie ; la recherche, fondamentale ou appliquée, s'inscrit dans une finalité médicale ; en l'état des connaissances scientifiques, cette recherche ne peut être menée sans recourir à ces embryons ou ces cellules souches embryonnaires ; le projet et les conditions de mise en œuvre du protocole respectent les principes éthiques relatifs à la recherche sur l'embryon et les cellules souches embryonnaires. L'Agence de la biomédecine veille à faire respecter ces conditions.

Pour ce qui est des mammifères, les animaux et les fœtus et embryons dans le dernier tiers de gestation sont soumis aux règles éthiques de la directive européenne 2010/63. Au stade auquel les cellules souches embryonnaires sont récupérées, les embryons n'entrent pas dans le champ de cette directive.

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

Callithrix jacchus ou ouistiti commun ou marmouset est une espèce primate de la famille des Callitrichidae. Il s'agit d'une espèce endémique du Brésil. La maturité sexuelle des femelles est atteinte à l'âge d'un an, mais il est généralement recommandé de ne pas les mettre à la reproduction avant l'âge d'un an et demi. Les femelles mettent bas 143 à 144 jours

après fécondation. Elles donnent naissance à 3 à 4 petits par portée en moyenne (Tardif *et al.*, 2003).

Actuellement, il existe peu de lignées de CSE de marmouset. Elles sont produites principalement au Japon par l'équipe d'Erika Sasaki. Les blastocystes sont prélevés sept à dix jours après l'ovulation par laparotomie et rinçage des cornes utérines, puis le liquide de rinçage est collecté. La masse cellulaire interne est ensuite isolée à partir des blastocystes grâce à des techniques d'immuno-chirurgie (Solter, Knowles, 1975). L'équipe a pu démontrer la pluripotence *in vitro* et *in vivo* des cellules obtenues. Les principaux types cellulaires observés sont mésodermiques et ectodermiques (Sasaki *et al.*, 2005).

Ces cellules ont ensuite pu être différenciées en cardiomyocytes (Chen *et al.*, 2008), en cellules germinales (Müller *et al.*, 2009), en cellules neurales (Shimada *et al.*, 2012) et en cellules endodermiques (Diekmann *et al.*, 2015).

L'équipe d'Hiroko Shimada a mis au point un protocole de différenciation des CSE de marmouset en cellules neurales. Les cellules obtenues sont des neurones et des astrocytes, ainsi que des oligodendrocytes en changeant quelques conditions du milieu de différenciation. Ce protocole a ensuite été renouvelé *in vivo* (par implantation dans le cerveau de souris). Il a abouti à une différenciation des CSE de marmouset en neurones, astrocytes et oligodendrocytes, ce qui démontre que la différenciation est aussi effective *in vivo* (Shimada *et al.*, 2012).

1.2. ETAT DES CONNAISSANCES DU MECANISME D'ACTION DES CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES

Du fait de leurs propriétés biologiques, à savoir autorenouvellement et pluripotence, les CSE présentent un intérêt majeur en médecine régénérative ainsi qu'en recherche pour l'étude de maladies génétiques et l'élaboration de traitements.

1.2.1. Propriétés biologiques des cellules souches embryonnaires

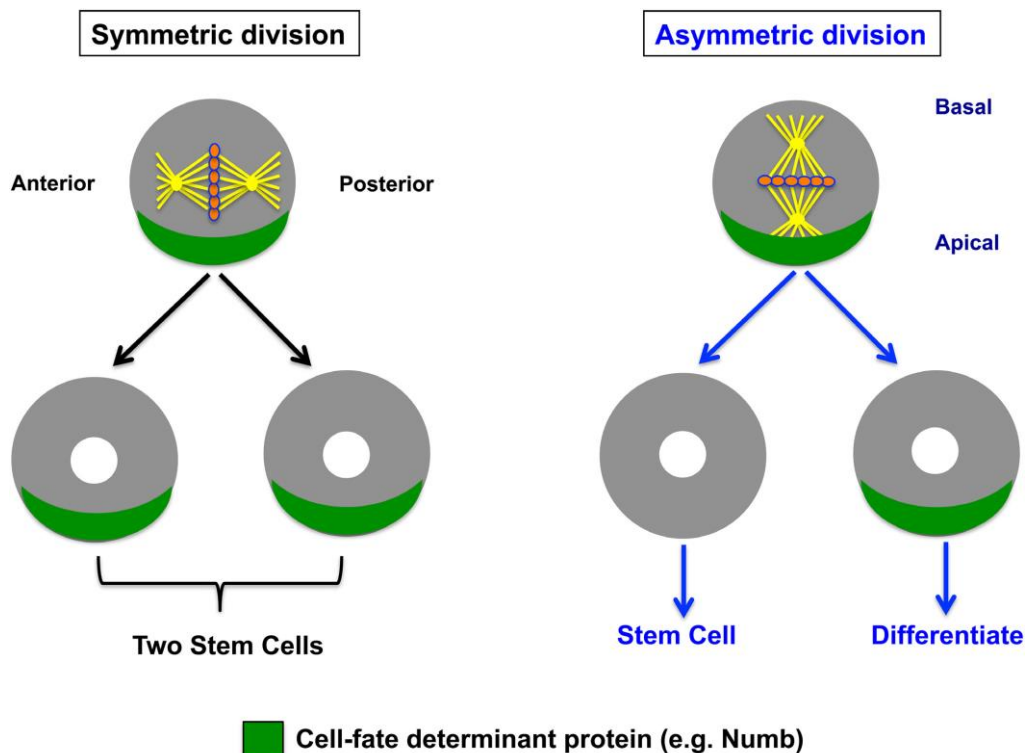
1.2.1.1. Autorenewement

La propriété d'autorenouvellement de cellules souches embryonnaires permet de maintenir une lignée de CSE indéfiniment, tout en gardant leur propriété de pluripotence. Afin de générer des lignées de CSE et pour les utiliser, il faut connaître le processus responsable de cet autorenewement.

Les CSE se renouvèlent en restant pluripotentes dans des conditions spécifiques de culture. Par exemple, les CSE de souris sont maintenues sur une couche de fibroblastes embryonnaires de souris inactivés pour la mitose (MEFs) dans un milieu auquel sont ajoutés des cytokines, des facteurs de croissance, et des médicaments (Huang *et al.*, 2015). Pour cultiver les CSE de marmouset commun, Erika Sasaki a utilisé des MEFs et un milieu DMEM (Gibco® DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium) avec 20% de Knockout Serum Replacement (Invitrogen™), de la L-glutamine, des facteurs de croissance, des antibiotiques (pénicilline, streptomycine) et un antimycotique (amphotéricine B) (Sasaki *et al.*, 2005).

Dans l'organisme, il existe deux types de division cellulaire : symétrique et asymétrique. L'intérêt de la division symétrique est la prolifération et conduit donc à l'augmentation de la population cellulaire. La division symétrique conduit à deux cellules filles identiques qui auront le même développement. La division asymétrique est une propriété des cellules souches qui donne deux cellules filles n'ayant pas le même développement : une cellule fille se différenciera en une lignée spécifique, l'autre aura la possibilité d'effectuer les divisions symétrique ou asymétrique comme sa cellule mère. La capacité de la cellule à effectuer la division asymétrique afin de conduire à deux types différents de cellules a un intérêt dans la diversité cellulaire des organismes pluricellulaires (Berika *et al.*, 2014).

Figure 3 : Schéma des deux types de division cellulaire : symétrique et asymétrique (Berika *et al.*, 2014)



Durant la division symétrique, l'orientation de l'axe de division et les facteurs déterminants ne sont pas coordonnés. Les facteurs déterminants sont répartis également, ce qui conduit à deux cellules souches identiques. Lors de la division asymétrique, l'orientation de l'axe de division et les facteurs déterminants sont coordonnés, ce qui conduit à une cellule souche identique à la cellule mère et une cellule qui va se différencier.

L'autorenouvellement des CSE est assuré par une activité importante de la télomérase, une reverse-transcriptase capable d'allonger les télomères. Les télomères sont des répétitions de séquences d'ADN au niveau des extrémités chromosomiques favorisant la stabilité des chromosomes. A chaque division cellulaire, la longueur des télomères diminue, impliquant le vieillissement du matériel génétique. La télomérase permet de réduire ce phénomène de raccourcissement. Au sein des CSE, la télomérase est activée et maintient la longueur télomérique, engendrant l'immortalité de la lignée cellulaire. Lorsque les cellules sont différenciées, l'activité de la télomérase est beaucoup plus faible. Les cellules souches non

embryonnaires possèdent aussi une activité moindre de la télomérase (Hiyama, Hiyama, 2007).

1.2.1.2. Pluripotence

La deuxième propriété des cellules souches embryonnaires est sa capacité à se différencier en n'importe quelle lignée cellulaire : la pluripotence. Les lignées cellulaires proviennent des trois feuillets embryonnaires que sont l'endoderme, le mésoderme et l'ectoderme. Cette propriété est attirante en recherche car elle pourrait permettre la régénération d'un tissu lésé grâce à une greffe de CSE. Durant les premiers stades embryonnaires, la propriété de pluripotence est conservée et n'est pas exploitée. Elle n'intervient que plus tard au cours des divisions cellulaires pour donner toutes les lignées cellulaires de l'organisme adulte.

Lors de la division asymétrique, une cellule fille différenciée est créée. Différents mécanismes vont entrer en jeu pour déterminer son devenir. Au niveau moléculaire, la CSE dépend de l'expression des trois facteurs de transcription que sont Oct4, Sox2 et Nanog (Boyer *et al.*, 2005).

Oct4 et Sox2 fonctionnent en association pour réguler la transcription d'un certain nombre de gènes impliqués dans la pluripotence (Loh *et al.*, 2006). Oct4 est aussi utilisé pour générer des cellules souches pluripotentes induites (Takahashi, Yamanaka, 2006).

Le facteur Sox2 permet la formation de la masse cellulaire interne, l'épiblaste, le tissu neural et l'ectoderme extra-embryonnaire. L'équipe d'Ariel Avilion a démontré que les embryons de souris dont le facteur Sox2 a été inactivé meurent dans les 7 à 8 jours post fécondation (Avilion *et al.*, 2003).

La pluripotence de la CSE est aussi gérée par le facteur Nanog. En effet, une étude a montré que la surexpression de ce facteur dans un embryon permet de maintenir ses cellules à un stade indifférencié et donc de garder une pluripotence. Les cellules d'un embryon déficient en ce facteur Nanog perdent leur pluripotence et ne peuvent se différencier qu'en cellules de la lignée de l'endoderme (Mitsui *et al.*, 2003).

1.2.2. Modes d'administration des cellules souches embryonnaires

Les capacités uniques des CSE présentent un potentiel thérapeutique qui reste à explorer. Il faut donc chercher et comprendre les modes d'administration avant d'envisager des protocoles thérapeutiques.

1.2.2.1. Types d'administrations de cellules souches embryonnaires déjà étudiés

Il est tout d'abord à noter que la plupart des études ayant besoin d'administrer des CSE utilisent des cellules souches embryonnaires différenciées (CSED) dans la lignée désirée. Elles sont administrées par voie locale sur le site d'intérêt. Les cellules souches proviennent d'un autre individu de la même espèce.

Une étude a utilisé la voie générale pour transplanter des CSED chez la souris atteinte de lésions cérébrales. Cette administration a permis la réduction de la taille des lésions ainsi qu'une accélération de l'angiogénèse dans les 8 jours post-injection (Nagai *et al.*, 2010)

Plusieurs études ont été menées chez la souris et le rat dans le cadre d'essais thérapeutiques par voie locale. Ainsi, une étude a évalué l'intérêt d'injections intra-thymiques de CSED chez la souris dans un contexte d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale. Les injections de cellules souches ont permis une amélioration de la régénération des lymphocytes T, une rémission et une prévention de l'encéphalomyélite auto-immune (Su *et al.*, 2015). Lors d'un essai préclinique sur l'administration de CSED dans un contexte de lésions de la moelle épinière, une étude a démontré la sécurité d'administration d'oligodendrocytes dérivés de CSE directement dans la moelle spinale de rats avec une aiguille de 32 gauges (Priest *et al.*, 2015).

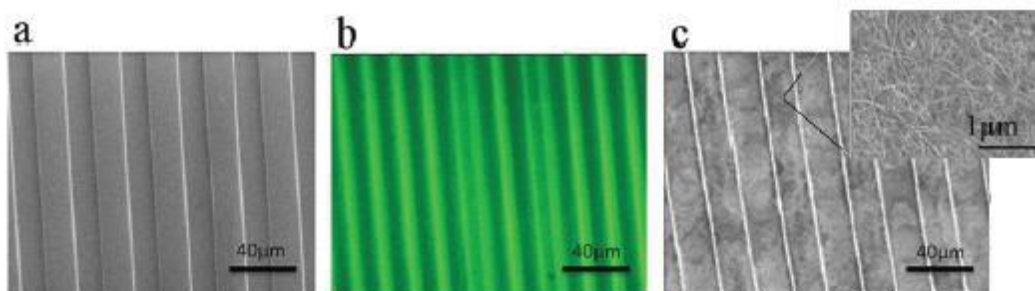
Chez l'homme, un essai clinique a été réalisé dans le but d'élaborer un traitement à la dystrophie maculaire de Stargardt. Douze patients ont reçu une transplantation subrétinienne de cellules souches embryonnaires humaines (CSEH) différenciées en cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien (RPE) ainsi qu'un traitement immunosuppresseur pendant 13 semaines. La survie des CSED a pu être objectivée mais aucune amélioration clinique n'a été démontrée lors de cet essai clinique (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

Le projet du Docteur Isabelle Loubinoux et de l'équipe iDREAM (Université Toulouse III Paul Sabatier, INSERM, Toulouse NeuroImaging Center, UMR 1214, Toulouse, France) consistera en l'administration de cellules souches embryonnaires de marmouset (CSEM) différenciées en précurseurs neuraux au niveau d'une lésion cérébrale induite reproduisant un accident vasculaire cérébral (AVC). Pour gérer le développement des précurseurs neuraux, un biomatériau a été mis au point par l'équipe en 2011 (Bédurier *et al.*, 2011).

Cette étude a permis le développement d'un substrat en 2 dimensions non biodégradable constitué de polydiméthylsiloxane (PDMS). Ce biomatériau est capable de guider les neurites le long des rainures. La dimension la plus efficace pour allier densité cellulaire, taux de différenciation et alignement des neurites est une largeur de 20 μm (cf. Figure 4). Effectivement, des rainures plus étroites augmentent la densité cellulaire mais déforment les cellules. Ce biomatériau est recouvert de nanotubes de carbone, il a permis d'obtenir des CSE adhérentes d'une densité de 104 cellules/cm² et un ratio de différenciation de presque de 100% (Bédurier *et al.*, 2011).

Figure 4 : Aspect microscopique du biomatériau mis au point (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

L'équipe iDREAM a ensuite testé son biomatériau *in vivo* chez le rat ayant subi une lésion du cortex moteur primaire induisant des déficits moteurs. Les rats ont soit reçu une implantation de CSEH prédifférenciées en cellules neurales associées au biomatériau, soit de

CSEH prédifférenciées sans biomatériau, soit de biomatériau sans cellule, soit une intervention factice constituant le groupe témoin. Les animaux ayant reçu une implantation de CSEH prédifférenciées associées au biomatériau ont montré une récupération motrice significativement plus rapide et efficace que les individus ayant reçu des CSEH prédifférenciées seules, du biomatériau seul, ainsi que celle du groupe témoin. L'administration d'implants seuls a abouti des résultats similaires à l'absence d'implantation, démontrant l'innocuité du PDMS, aucun signe d'inflammation ou de cytotoxicité n'a été observé après implantation du biomatériau. Cette étude a de plus prouvé que l'administration de CSED seules au niveau d'une lésion cérébrale n'est pas suffisante à induire un effet thérapeutique car le taux de survie des CSED est extrêmement bas dans les jours suivant leur implantation (Vaysse *et al.*, 2015).

Il a été démontré par la suite que la greffe de PDMS associé aux CSED humaines chez le rat permet l'amélioration de la reconstruction tissulaire, la limitation de l'atrophie hémisphérique et l'extension des cicatrices gliales (Davoust *et al.*, 2017).

1.3. METHODES DE SUIVI DES CELLULES SOUCHES

La recherche concernant cellules souches implique le besoin de pouvoir suivre ces cellules pour comprendre leur mécanisme de fonctionnement, leur distribution, leur localisation finale et leur devenir. Il a donc fallu mettre au point des méthodes de suivi (tracking cellulaire). La difficulté réside dans le fait de bien suivre une cellule souche implantée et non une cellule quelconque préalablement présente. On distingue le marquage *post mortem*, démontrant de grandes sensibilité et spécificité, du marquage en temps réel *in vivo*. Ces deux types de marquage peuvent être utilisés complémentaires au cours d'une étude.

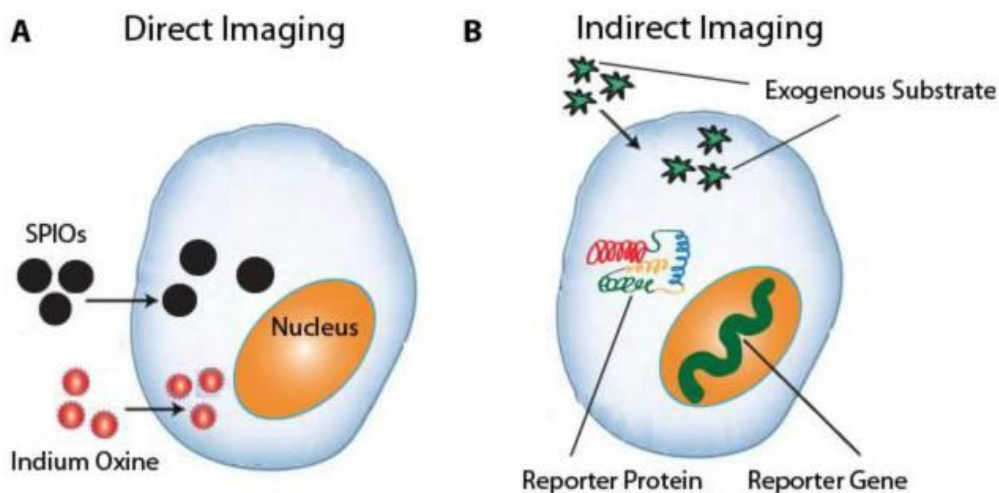
1.3.1. Marquage *in vivo*

Le marquage *in vivo* permet d'obtenir un tracking cellulaire en temps réel et ne nécessitant pas la mort du sujet. L'enjeu est de ne pas modifier le fonctionnement des cellules à suivre pour ne pas risquer de fausser les résultats. Le marquage *in vivo* peut être direct ou indirect.

Le marquage direct consiste à insérer un marqueur dans la cellule à suivre ou à sa surface. Selon la nature du marqueur, il se trouvera dans le cytoplasme, dans le noyau, dans les deux, ou au niveau de la membrane plasmique. La mise en place de ce marqueur se fait avant l'administration de la cellule à suivre dans l'organisme receveur (Gu *et al.*, 2012).

Le marquage indirect consiste à modifier la cellule génétiquement pour qu'elle synthétise une protéine rapportrice qui pourra être reconnue par une sonde ou un système d'imagerie spécifiques. Les avantages sont que les cellules suivies sont des cellules vivantes, puisque les cellules mortes ne sont pas capables de transcrire et traduire le gène rapporteur conduisant au signal, et qu'il n'y a pas de perte d'intensité au cours des divisions cellulaires. Le marquage indirect pose cependant un problème de mutagenèse puisque les cellules sont génétiquement modifiées à l'aide de plasmides ou de vecteurs viraux (Cao *et al.*, 2007).

Figure 5 : Marquage direct et marquage indirect (Gu *et al.*, 2012)



A. Le marquage direct implique le marquage préalable des cellules souches par des molécules spécifique. B. Le marquage indirect implique l'expression d'un gène rapporteur codant pour une protéine rapportrice qui métabolise un substrat exogène et produit ainsi un signal détectable.

1.3.1.1. Marquage direct

Plusieurs techniques de marquage direct existent, nous en développerons les principales : 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 (IRM)

Le principe de l'IRM consiste à réaliser des images grâce aux nombreux atomes d'hydrogène présents chez le sujet. Placés dans un puissant champ magnétique, tous les atomes d'hydrogène s'orientent dans la même direction. Ils sont alors mis en résonance par des ondes radio durant une très courte période. A l'arrêt de cette stimulation, les atomes restituent l'énergie accumulée en produisant un signal qui est enregistré et traité sous forme d'image par un système informatique. L'intensité du signal observé va dépendre de la concentration en eau du tissu et du temps de relaxation des spins nucléaires. Les agents de contraste en IRM ont pour but de diminuer le temps de relaxation afin d'augmenter l'intensité des signaux.

Le premier agent de contraste historiquement utilisé a été le gadopentétate de diméglumine. Il est de nos jours l'agent de contraste le plus utilisé en imagerie clinique, il présente en effet une élimination rénale complète et rapide. Il a été démontré qu'il était efficace pour le suivi de CSE neurales (Rudelius *et al.*, 2003). Cependant, la famille de cette molécule présente une toxicité à long terme comme la fibrose systémique néphrogénique (Thomsen, 2016). Cette famille d'agents de contraste est par conséquent peu utilisée pour des trackings cellulaires en recherche. Cette technique permet de localiser les cellules marquées avec une haute résolution mais n'est pas adaptée à la surveillance de la viabilité de la cellule (Li *et al.*, 2008).

Le manganèse est lui aussi un agent de contraste, il pénètre dans les cellules à suivre grâce aux canaux calciques. Il est transporté le long des microtubules jusqu'aux synapses où il est libéré, puis capturé par les autres neurones. Ainsi, il peut rendre compte du transport axonal. Son utilisation apporte donc des informations sur la connectivité fonctionnelle cérébrale. Il présente cependant une toxicité lors de surdosage ou à long terme avec désordre

progressif du système extrapyramidal similaire à la maladie de Parkinson (Crossgrove et Zheng, 2004).

Les oxydes de fer super-paramagnétiques (SPIO pour superparamagnetic iron oxide) sont aussi utilisés en tant qu'agent de contraste. Ils induisent un hyposignal en séquence T2*. Le ferumoxide est le produit de contraste de qualité pharmaceutique utilisé en Europe (Endorem ND) et aux Etats-Unis (Feridex ND) pour le tracking cellulaire en recherche (Bulte, 2009). Il a été rapporté la possibilité de marquer des CSE neurale humaines (Zhu *et al.*, 2006).

1.3.1.1.2. Marquage par tomographie par émission de positons (PET) et tomographie mono-photonique (SPECT)

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

La molécule la plus utilisée est le ^{18}F -fluorodesoxyglucose (^{18}F -FDG), elle permet de suivre le métabolisme du glucose. D'autres molécules sont utilisables pour suivre les CSE comme le 3-N-(2-[^{18}F]fluoroethyl)spiperone (^{18}F -FESP) et le 9-(4-[^{18}F]Fluoro-3-hydroxymethylbutyl) guanine (^{18}F -FHBG) selon une étude de 2014 (Nguyen *et al.*, 2014). Il existe également plusieurs de molécules radioactives utilisées cliniquement pour l'imagerie par PET, dont les demi-vies varient de quelques minutes (^{15}O et ^{13}N) à 1 à 2 heures (^{18}F et ^{68}Ga) jusqu'à presque 13 heures (^{64}Cu) (Bose, Mattrey, 2018).

La tomographie par émission mono-photonique (SPECT pour single positron emission computed tomography) est similaire à la PET mais le traceur radioactif émet des rayons gammas détectables par une caméra rotative adaptée.

Les traceurs radioactifs retrouvés principalement pour la SPECT sont l'oxynate d'indium (^{111}In) et le technicium-99m métastable ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) (Bose, Mattrey, 2018). Leurs temps de demi-vie sont de 2,8 jours pour le ^{111}In , et de 6 heures pour le $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (Cen *et al.*, 2016).

Plusieurs équipes de recherche ont utilisé des trackings cellulaires par PET ou SPECT. En effet, une étude préclinique initiale a surveillé l'évolution de greffes intra-myocardiques de CSE chez des souris grâce au marqueur ^{18}F -FDG suivi par PET (Lang *et al.*, 2013). Une autre

étude compare trois techniques de greffes cardiaques de CSE (injection dans le myocarde, dans le ventricule gauche ou dans la veine cave caudale) à l'aide de PET et d'IRM avec des cellules marquées au ^{18}F -FDG et des cellules marquées au SPIO (Elhami *et al.*, 2013). Des chercheurs ont greffé des cellules souches autologues obtenues à partir de la moelle osseuse marquées au ^{18}F -FDG afin de déterminer la meilleure voie d'administration de cellules souches chez des patients diabétiques (Sood *et al.*, 2015). La SPECT a été utilisé dans une étude pour suivre des CSM fœtales de rat marquées au $^{99\text{m}}\text{Tc}$ greffées afin d'étudier leur fonction et la perfusion cardiaque chez des sujets ayant subi une lésion du myocarde (Garikipati *et al.*, 2014). Des cellules souches neurales, suivies par SPECT dans une étude, conjuguées à du ^{111}In ont été greffées chez des souris atteintes de glioblastome (Cheng *et al.*, 2016).

La PET est plus sensible que la SPECT et permet de détecter des signaux même très faibles (Nguyen *et al.*, 2014). Cependant, ces deux méthodes d'imagerie présentent certains inconvénients. Il est par exemple nécessaire d'avoir des repères anatomiques afin d'interpréter les images obtenues. Des équipes de recherche ont développé une PET-CT et une SPECT-CT, où les appareils de PET ou SPECT sont associés à un appareil de tomodensitométrie. Cela permet de combiner l'environnement anatomique de la tomodensitométrie avec les images de PET ou SPECT (Rodriguez-Porcel *et al.*, 2008). On note une perte de signal au fur et à mesure des divisions cellulaires, ce qui empêche un tracking cellulaire sur le long terme (Rodriguez-Porcel *et al.*, 2008). Enfin, le tracking par PET ou SPECT nécessite l'utilisation de produits radioactifs contrôlés et dont la toxicité dépend de la nature du produit et de son temps de demi-vie (Zanzonico *et al.*, 2006).

1.3.1.1.3. Marquage par fluorescence optique (FLI)

L'imagerie par fluorescence (FLI) est une méthode d'imagerie optique par marquage direct. Elle est souvent utilisée dans des études précliniques pour évaluer la localisation, la distribution et la fonction des cellules souches. Les cellules suivies sont préalablement marquées par des sondes d'ADN couplées à des molécules fluorescentes : des fluorophores. La transmission de lumière dans le tissu provoque l'excitation des fluorophores, l'émission fluorescente peut alors être récupérée et observée. La FLI a une grande sensibilité et permet de suivre des cellules souches (Bose, Mattrey, 2018).

Les cellules sont directement marquées avec des fluorophores ou bien modifiées génétiquement pour exprimer une protéine fluorescente. Les fluorophores sont choisis *in vivo* pour émettre des ondes dans le domaine de l'infrarouge afin que le signal soit détectable en profondeur dans les tissus (Gavins, Smith, 2015). De nos jours, les nanoparticules fluorescentes les plus courantes sont les nanoparticules de polystyrène, largement commercialisées pour la recherche (Wang *et al.*, 2013). Cette méthode de marquage par fluorescence optique est très utilisée en cancérologie pour étudier la formation de tumeurs et leur sensibilité aux thérapies anti-cancéreuses. Des études ont employé la FLI pour visualiser la migration de cellules cancéreuses dans les vaisseaux sanguins et ainsi suivre les métastases (Yamauchi *et al.*, 2005).

Cependant, l'utilisation de fluorophores a des limites. En plus de subir une dilution verticale à force de division cellulaire, les fluorophores présentent une dilution horizontale avec une perte de signal au long terme (Wang *et al.*, 2013).

Les quantum dots (QDs) sont d'autres marqueurs pour la FLI : ce sont des nanoparticules colloïdales, cristallines et semiconductrices avec des longueurs d'onde d'émission plus courtes. Ils émettent généralement entre les ultraviolets et le visible. Les QDs sont plus résistants que les fluorophores classiques, ce qui les rend utiles pour le tracking cellulaire. Cependant, les QDs présentent un prix coûteux (150 à 300 dollars la micromole), une toxicité liée à la présence de métaux lourds comme le Cd^{2+} , Pd^{2+} , Se^{2+} , ainsi que la nécessité d'utiliser des doses importantes engendrant un bruit de fond et des marquages non spécifiques (Wang *et al.*, 2013).

1.3.1.2. Marquage indirect

Le marquage indirect peut par la suite être mis en évidence avec plusieurs techniques d'imagerie comme l'imagerie par bioluminescence (BLI), l'IRM, la PET ou la SPECT.

1.3.1.2.1. Imagerie par bioluminescence (BLI)

L'imagerie par bioluminescence permet d'obtenir un signal lumineux suite à la métabolisation de la D-luciférine par l'enzyme Firefly luciferase (Fluc) codée par le gène luc intégré préalablement au code génétique des cellules à suivre. La D-luciférine est apportée de

manière exogène, au moment où l'on veut suivre les cellules, elle est oxydée par la Fluc en utilisant du magnésium et l'adénosine triphosphate (ATP). Le gène luc est extrait de la luciole nord-américaine (*Photinus pyralis*). Cette méthode a pour avantage de permettre un tracking sur le long terme tant que la D-luciférine est administrée (Gu *et al.*, 2012). La longueur d'onde d'émission de la luciférase est dans le domaine du visible aux alentours de 560 nm. L'utilisation de la luciférase est cependant limitée aux petits animaux puisque la pénétration tissulaire maximale des signaux est de 3 centimètres (Sutton *et al.*, 2008).

La BLI a été utilisée pour le tracking de cellules souches hématopoïétiques greffées chez des rongeurs (Cao *et al.*, 2004 ; Wang *et al.*, 2003). Une thérapie émergente du diabète de type 1 a été testée chez la souris et a nécessité un suivi cellulaire des îlots pancréatiques grâce à la luciférase (Fowler *et al.*, 2005 ; Lu *et al.*, 2004). Chez l'Homme, cette méthode présente une mauvaise résolution spatiale, elle nécessite de fortes doses et il existe un potentiel d'immunogénicité de la luciférase (Rudin *et al.*, 2005).

A l'image de la Fluc, la Renilla luciférase (Rluc) catalyse l'oxydation de la coelenterazine, ce qui émet une lumière de longueur d'onde centrée sur 482 nm. La Rluc provient de la pensée de mer (*Renilla reniformis*). La durée d'émission est plus courte qu'avec la Fluc (Lorenz *et al.*, 1991). Une étude a démontré que la Rluc peut être utilisée en BLI pour le tracking cellulaire chez la souris, le couplage Rluc-Fluc peut également être employé (Bhaumik, Gambhir, 2002). L'utilisation de la Rluc présente en revanche certaines limites : instabilité, faible perméabilité de la coelenterazine et bruit de fond élevé causé par un phénomène d'auto-oxydation de la coelenterazine (Luker, Luker, 2008).

1.3.1.2.2. Imagerie par résonance magnétique (IRM)

L'utilisation d'un gène rapporteur en IRM a commencé avec un gène codant pour une créatine kinase qui permet d'accumuler de la phosphocréatine détectable par IRM (Koretsky *et al.*, 1990). Quatre catégories de gènes rapporteurs ont été étudiées depuis : ceux induisant une accumulation de fer endogène (Genove *et al.*, 2005 ; Liu *et al.*, 2009), ceux permettant l'exploitation d'interactions de surface cellulaire (Tannous *et al.*, 2006), 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 code pour une métalloprotéine comme la ferritine. Cette protéine capte une grande quantité du fer et induit son accumulation dans la cellule. L'IRM permet de détecter le fer mais ce fer capté dans la cellule émet un signal à long terme puisqu'il reste même après la mort de la cellule. La viabilité cellulaire n'est donc pas évaluable avec cette méthode (Gu *et al.*, 2012). Des études ont eu recours à cette méthode pour le tracking de cellules souches cardiaques porcines greffées chez la souris (Campan *et al.*, 2011) ainsi que pour le suivi de CSE chez des souris transgéniques (Liu *et al.*, 2009). Il a été démontré par ailleurs grâce à ces deux études que la capacité de différenciation et la viabilité des cellules souches n'étaient pas atteintes.

L'utilisation des interactions à la surface cellulaire se fait grâce à un gène rapporteur codant pour un peptide biotine-accepteur, synthétisé grâce la biotine ligase endogène, exprimé à la surface cellulaire. Le signal est visualisé par IRM lorsque le peptide reçoit des sondes exogènes marquées par de la streptavidine (Tannous *et al.*, 2006).

Les gènes rapporteurs basés sur des réactions enzymatiques sont les gènes codant pour la β -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 β -galactosidase a été utilisée pour le tracking *in vivo* de cellules de la moelle osseuse chez la souris (Bengtsson *et al.*, 2010). Une étude a employé la tyrosinase humaine pour le suivi de cellules cancéreuses dans le cadre du cancer du sein (Alfke *et al.*, 2003).

L'utilisation des gènes rapporteurs la plus prometteuse est celle reposant sur le transfert de saturation par échange chimique (CEST). Les protons dans les polypeptides, comme la poly-L-lysine, ont une fréquence de résonance magnétique nucléaire différente de celle des protons solubles dans l'eau. Cette fréquence peut être manipulée avec une impulsion de radiofréquence pour perturber la distribution de Boltzmann. Cette perturbation est transférée grâce à un échange chimique vers les protons aqueux, qui sont 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 lors de l'impulsion de radiofréquence ; la protéine rapportrice est biodégradable donc possède une innocuité cellulaire ; on peut suivre plusieurs localisations anatomiques en utilisant différentes fréquences d'excitation selon l'agent de contraste utilisé.

Pour l'instant, le CEST n'est pas employé couramment. 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.

1.3.1.2.3. Tomographie par émission de positons (PET) ou mono-photonique (SPECT)

Dans le cas du marquage indirect par PET ou SPECT, le gène rapporteur code pour soit une enzyme, soit un transporteur, soit un récepteur cellulaire qui sont capables d'intégrer les radiotraceurs substrats administrés de manière exogène. Ces radio-nucléotides sont ensuite révélés par des appareils PET ou SPECT (Jiang *et al.*, 2011).

Dans cette technique d'imagerie, l'herpes simplex virus type 1 thymidine kinase gene (HSV1-tk) est le gène rapporteur le plus utilisé. La thymidine kinase codée par ce gène phosphoryle deux grands types de sondes exogènes : les dérivés de la pyrimidine comme la FIAU (2'-fluoro-2'-deoxy-β-D-arabinofuranosyl-5-iodouracil) et les dérivés de l'acycloguanosine comme la FHBG (9-(4-fluoro-3-hydroxy-methyl-butyl)guanine). La phosphorylation permet de suivre les cellules viables mais marque aussi toutes les réactions de la thymidine kinase avec de multiples substrats (Pomper *et al.*, 2009 ; Gu *et al.*, 2012).

Les sondes exogènes sont associées à des isotopes radioactifs comme l'iode ^{124}I ou l'iode ^{125}I qui émettent des rayons gammas ou le fluor ^{18}F qui émet des rayons beta. Une étude a suivi l'évolution de tératomes chez la souris ayant reçu une greffe de CSEH grâce à l'imagerie par SPECT en utilisant le ^{125}I -FIAU comme traceur (Pomper *et al.*, 2009). Un suivi par PET employant du ^{18}F -FHBG a permis d'observer la distribution et la survie de CSM implantées dans le myocarde chez le porc (Gyöngyösi *et al.*, 2008), ainsi que pour effectuer un tracking de CSM migrant vers le stroma tumoral (Hung *et al.*, 2005).

Le sodium iodide symporter (NIS) code pour une protéine transmembranaire absorbant l'iode des cellules thyroïdiennes. Il peut être employé pour la PET et SPECT. En effet, lorsqu'il est exprimé dans des cellules non thyroïdiennes, par transfection, le NIS permet une imagerie par PET avec ^{124}I et une imagerie par SPECT avec ^{123}I ou le $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (Kim *et al.*, 2005 ; Gu *et al.*, 2012). Ce gène rapporteur a été utilisé dans une étude *in vivo* pour suivre des cellules cardiaques transplantées chez le rat (Terrovitis *et al.*, 2008). Une autre étude a eu

recours à ce gène pour effectuer un tracking de CSM vers le stroma tumoral dans le cadre de la recherche d'une thérapie du cancer du sein (Dwyer *et al.*, 2011).

Certains des avantages des gènes couplés aux radionucléotides sont leur grande sensibilité et leur capacité à détecter uniquement les cellules vivantes. Il est de plus possible d'atténuer les risques d'oncogénicité en associant le ganciclovir au HSV1-tk (Cao *et al.*, 2007). Enfin, le NIS est utilisé en imagerie et est aussi un outil thérapeutique (Dwyer *et al.*, 2011). Les gènes couplés aux radionucléotides présentent une fuite de radiotraceurs vers les tissus normaux, il peut donc y avoir un signal non spécifique (Jiang *et al.*, 2011).

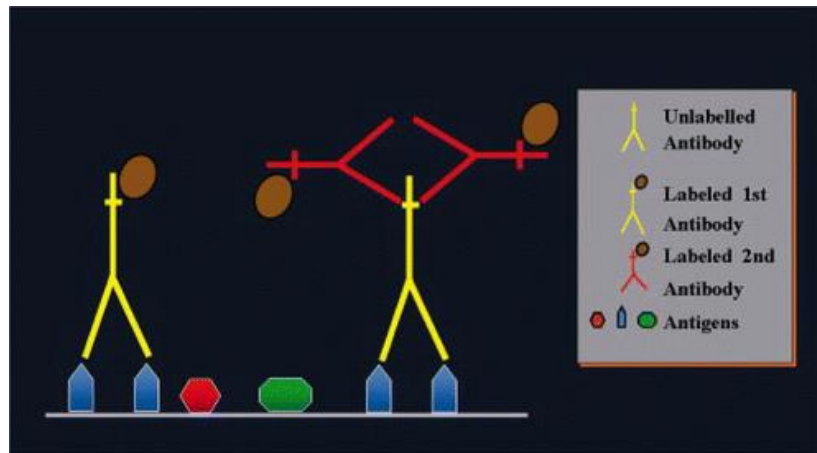
1.3.2. Marquage *post mortem*

Une autre façon d'effectuer un tracking cellulaire est l'approche par le marquage *post mortem*. Elle apporte des informations différentes de celles obtenues par le marquage *in vivo*, et permet donc deux approches complémentaires. Le marquage *post mortem* s'effectue sur des coupes histologiques. Les techniques principales sont l'immunohistochimie et l'hybridation *in situ*.

1.3.2.1. Immunohistochimie

L'immunohistochimie (IHC) a pour but de détecter des protéines cibles dans une coupe histologique. Cela permet de localiser les protéines, et de connaître leur quantité approximative. Des anticorps spécifiques se lient à des antigènes particuliers présents sur la protéine cible. Le complexe anticorps-antigène est ensuite révélé : soit l'anticorps est déjà couplé à un fluorophore, on parle d'immunohistochimie directe ; soit l'anticorps est ciblé par un autre anticorps couplé à un fluorophore, on parle d'immunohistochimie indirecte.

Figure 6 : Immunohistochimie directe et indirecte (Ramos-Vara, 2005)



L'IHC est généralement utilisée sur des coupes histologiques congelées et non paraffinées. Une étude de 2017 utilise l'IHC pour le tracking de cellules souches transplantées dans des foies cirrhotiques humains en phase terminale par différentes techniques de marquage dont l'immunohistochimie (Rogler *et al.*, 2017).

L'IHC, comme toutes les techniques de tracking *post mortem*, ne modifie pas les cellules de leur vivant. Elle propose aussi l'avantage d'être rapide et peu onéreuse. La sensibilité et la spécificité sont élevées. Cependant, cette technique n'offre qu'une visualisation en deux dimensions d'une coupe histologique, et elle nécessite la mort d'un animal.

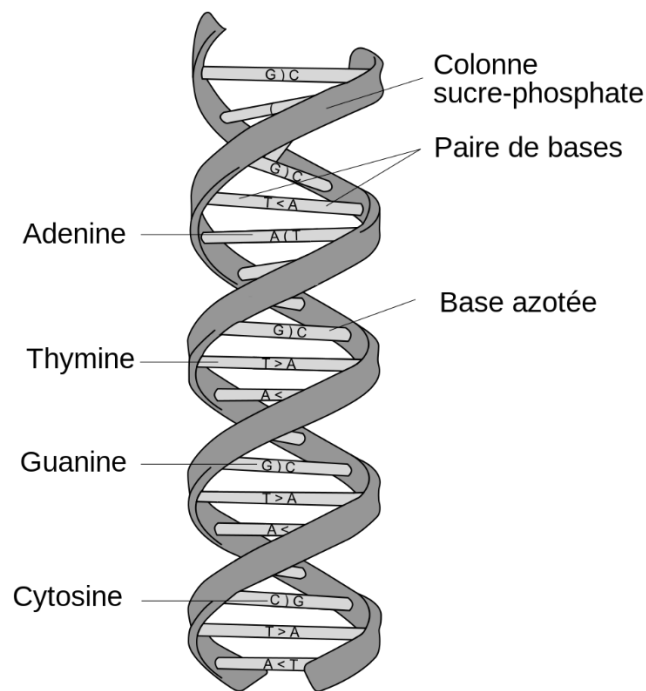
1.3.2.2. Hybridation *in situ*

L'hybridation *in situ* est une méthode de tracking cellulaire *post mortem* permettant de localiser, dans le noyau des cellules d'une coupe histologique, une séquence de nucléotides connue, qu'il s'agisse d'ADN ou d'ARN. Une sonde d'hybridation est composée d'une séquence de bases azotées complémentaire à celle de la séquence ciblée. La sonde est marquée pour être ensuite repérable : soit la sonde est liée à un fluorophore (ou est liée à une molécule permettant indirectement de la fluorescence) et est révélée par microscopie à fluorescence ; soit elle est couplée à un isotope radioactif et est révélée par autoradiographie ; soit elle est associée à une enzyme et est révélée par la réaction avec le substrat.

1.3.2.2.1. Principe de l'hybridation *in situ*

L'acide désoxyribonucléique (ADN) est une macromolécule formée par deux chaînes de nucléotides, appelés brins d'ADN. Ces brins sont complémentaires, parallèles et enroulés formant ainsi une double hélice. Les nucléotides sont reliés entre elles par des liaisons phosphodiester. Chaque nucléotide est composé d'un groupe phosphate, d'un ose (le désoxyribose pour l'ADN), et d'une base nucléique ou base azotée. Les quatre bases azotées de l'ADN sont l'adénine (A), la cytosine (C), la guanine (G) et la thymine (T). Les associations de nucléotides pour former la double hélice ne peuvent être que les suivantes : A avec T, et C avec G. Les deux brins se complètent grâce aux liaisons hydrogènes entre les nucléotides face à face.

Figure 7 : Structure d'une molécule d'ADN (source : wikipedia.org)



L'hybridation *in situ* repose sur le principe de complémentarité des brins d'ADN ainsi que sur ses propriétés chimiques. A partir d'une séquence cible isolée, une sonde d'ADN peut être synthétisée. Elle s'hybridera par la suite spécifiquement avec un brin d'ADN comprenant la séquence strictement complémentaire qui sera présente dans les cellules cibles (cellules souches qui seront implantées dans le cadre de notre étude). Avant l'hybridation de la sonde, il faut d'abord dénaturer l'ADN pour briser les liaisons hydrogènes de la double hélice. Cela

permet d'avoir un ADN simple brin, dit dénaturé, afin de rendre accessibles les bases azotées ciblées. L'hybridation a ensuite lieu en ajoutant en grande quantité la sonde d'ADN dans le milieu et en permettant la renaturation du brin d'ADN cible avec la sonde. Ce processus de dénaturation-renaturation se met en œuvre grâce à une augmentation de la température du milieu au-delà de 95°C (température où toutes les liaisons hydrogène sont rompues) suivie d'un refroidissement rapide.

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

Pour effectuer un tracking cellulaire, après hybridation des sondes, il faut les révéler. Les sondes doivent donc être associées à un marqueur. Il existe différents types de marquages.

Le marquage de la sonde peut être réalisé grâce à des isotopes radioactifs comme le tritium ^3H , le phosphore ^{32}P ou ^{33}P , ou le soufre ^{35}S . Ce type de sonde est révélé par autoradiographie avec une émulsion de cristaux ou de grains d'halogénures d'argent, ou bien avec un film photographique. Les rayonnements ionisants (particules bêta ou rayonnements gamma) des sondes radioactives réduisent par collision des cristaux ou des grains d'halogénure d'argent en argent métallique, provoquant un noircissement visible par la suite. Cette technique n'est pas la plus utilisée de nos jours.

Le marquage peut aussi se faire avec des marqueurs non radioactifs fluorescents (technique de FISH directe) ou non-fluorescents avec la biotine, la digoxigénine (FISH indirecte), ou encore des enzymes (comme la phosphatase alcaline par exemple). Pour les techniques de FISH, la révélation se fait au microscope à fluorescence en cas de FISH, et avec en plus de la streptavidine pour la biotine et des anticorps marqués par un enzyme et/ou avec de l'or colloïdal pour la digoxigénine, anticorps ou chromogènes pour les enzymes.

L'hybridation *in situ* par fluorescence (FISH) est encore de nos jours utile en recherche, en particulier dans le domaine des cellules souches. Une équipe a identifié la niche cellulaire des cellules souches de la crête neurale en utilisant la FISH (Lignell *et al.*, 2017). Une autre étude a mis en évidence l'expression de facteurs spécifiques aux CSE (Nanog, Oct4 et Sox2) chez 11 patients atteints de granulomes pyogéniques par IHC et HIS (Blackwell *et al.*, 2016). Des chercheurs ont de plus étudié la distribution de marqueurs spécifiques de CSM intestinales dans des lésions précancéreuses du rectum-colon chez l'humain grâce à la HIS

(Jang *et al.*, 2016). Enfin, une étude a combiné un marquage ADN et ARN par FISH pour étudier l'inactivation du chromosome X dans des CSE chez la souris (Barakat, Gribnau, 2014).

L'hybridation *in situ* propose une bonne sensibilité et une bonne spécificité. De plus, elle ne présente pas les principaux inconvénients du marquage *ante mortem* : modification de la viabilité cellulaire, modifications génétiques. L'HIS permet une haute résolution cellulaire. De plus, le comptage des grains d'argent sur les autoradiographies lors de marquage par isotopes radioactifs rend possible une étude semi-quantitative. L'HIS présente cependant l'inconvénient de n'être réalisable que sur des coupes histologiques qui n'offrent pas de visualisation en trois dimensions d'un tissu. De plus, le temps nécessaire pour le protocole expérimental est généralement assez long (quatre jours pour la FISH) et les manipulations sont plus coûteuses que pour l'IHC. Enfin, l'HIS ne permet de suivre que des cellules xénotransplantées. En effet, s'il ne s'agissait pas d'une séquence génétique introuvable chez le receveur, la révélation pourrait se faire dans toutes les cellules.

1.3.3. Bilan sur les techniques de marquage

Toutes les techniques de tracking cellulaire présentent des avantages et des inconvénients, qu'il s'agisse de technique *ante* ou *post mortem*, direct ou indirect. Elles peuvent être utilisées complémentaires en fonction des besoins. Aucun consensus n'existe à l'heure actuelle concernant le tracking de cellules souches. Les points positifs et négatifs de chaque technique d'imagerie sont résumés dans le tableau suivant.

Tableau 1 : Avantages et inconvénients des techniques de tracking cellulaire

Technique de tracking cellulaire	Avantages	Inconvénients
<p><u>IRM</u> <u>Marqueurs</u> : gadopentétate de diméglumine, Mn, SPIO</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Résolution spatiale élevée - Résolution temporelle assez élevée - Résolution en profondeur élevée - Détail des tissus mous - Visualisation morphologique et fonctionnelle - Pas d'émission radioactive 	<ul style="list-style-type: none"> - Sensibilité faible - Coûteux - Quantification du signal difficile - Pas d'information sur la viabilité cellulaire - Pas de suivi à long terme - Dilution du signal au cours du temps - Toxicité par accumulation de certaines sondes
<p><u>PET/SPECT</u> <u>Marqueurs</u> : ^{18}F, ^{111}I, $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{64}Cu</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Résolution spatiale élevée - Résolution temporelle assez élevée - Résolution en profondeur élevée - Sensibilité élevée 	<ul style="list-style-type: none"> - Très coûteux - Quantification du signal difficile - Pas d'information sur la viabilité cellulaire - Nécessité d'associer à d'autres techniques pour avoir des repères anatomiques - Emissions radioactives - Pas de suivi à long terme (selon la demi-vie du marqueur) - Dilution du signal au cours du temps
<p><u>Fluorescence optique</u></p>	<ul style="list-style-type: none"> - Résolution temporelle élevée - Sensibilité très élevée - Faible coût - Pas d'émission radioactive 	<ul style="list-style-type: none"> - Résolution spatiale faible - Résolution en profondeur très faible - Quantification du signal difficile

<p><u>Marqueurs</u> : fluorophores, QDs</p>		<ul style="list-style-type: none"> - Pas d'information sur la viabilité cellulaire - Pas de suivi à long terme - Dilution du signal au cours du temps - Bruit de fond important - Cytotoxicité potentielle des QDs
<p><u>Bioluminescence</u> <u>Marqueurs</u> : Fluc, Rluc</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Sensibilité très élevée - Faible coût - Pas d'émission radioactive - Discrimination cellule vivante/morte - Suivi à long terme possible - Pas de dilution du signal au cours du temps 	<ul style="list-style-type: none"> - Résolution spatiale faible - Résolution en profondeur très faible - Quantification du signal difficile - Modifications génétiques nécessaires
<p><u>IRM</u> <u>Marqueurs</u> : ferritine, gènes rapporteurs</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Résolution spatiale élevée - Résolution temporelle assez élevée - Résolution en profondeur élevée - Détail des tissus mous - Visualisation fonctionnelle et morphologique - Pas d'émission radioactive - Discrimination cellule vivante/morte - Pas de dilution du signal au cours du temps 	<ul style="list-style-type: none"> - Sensibilité faible - Coûteux - Quantification du signal difficile - Modifications génétiques de la cellule nécessaires - Toxicité par accumulation de certaines sondes
<p><u>PET/SPECT</u></p>	<ul style="list-style-type: none"> - Résolution spatiale élevée - Résolution temporelle assez élevée 	<ul style="list-style-type: none"> - Très coûteux - Quantification du signal difficile

<p>Marqueurs : (HSV1-tk, ^{18}F, ^{124}I, ^{125}I)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Résolution en profondeur élevée - Sensibilité élevée - Discrimination cellule vivante/morte - Pas de dilution du signal au cours du temps 	<ul style="list-style-type: none"> - Nécessité d'associer à d'autres techniques pour avoir des repères anatomiques - Emissions radioactives - Modifications génétiques de la cellule nécessaires
<p><u>Immuno-histochimie</u> Marqueurs : fluorophores, anticorps spécifiques</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Sensibilité élevée - Spécificité élevée - Résolution cellulaire élevée - Faible coût - Rapidité - Pas de modification de la cellule de son vivant 	<ul style="list-style-type: none"> - Visualisation en deux dimensions d'une petite partie d'une coupe histologique - Pas d'information structurale - Xénotransplantation nécessaire - Sacrifice d'animaux nécessaire
<p><u>Hybridation in situ</u> Marqueurs : ^3H, ^{32}P, ^{33}P, ^{35}S, biotine, digoxigénine, enzymes spécifiques</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Sensibilité élevée - Spécificité élevée - Résolution cellulaire élevée - Quantification du signal possible (grains d'argent) - Pas de modification de la cellule de son vivant 	<ul style="list-style-type: none"> - Coûteux - Long à mettre en œuvre - Visualisation en 2D d'une petite partie d'une coupe histologique - Pas d'information structurale - Xénotransplantation nécessaire - Sacrifice d'animaux nécessaire

	Tracking cellulaire <i>in vivo</i> direct
	Tracking cellulaire <i>in vivo</i> indirect
	Tracking cellulaire <i>post mortem</i>

La résolution spatiale permet de déterminer la dimension du plus petit élément visible sur l'image. Plus la résolution est élevée, plus l'image rendue est nette. La résolution spatiale

correspond à la taille d'un voxel (pixel en trois dimensions) et est exprimée en mm³. La résolution temporelle correspond au nombre d'images par seconde pouvant être prises par la technique d'imagerie.

1.4. INTERET DES SONDES DIRIGÉES VERS LES CHROMOSOMES SEXUELS

En marquage *post mortem*, aucun marqueur ne permet de suivre des cellules souches provenant d'une autogreffe sans que des modifications cellulaires n'aient été préalablement effectuées, qu'elles soient génétiques, fonctionnelles ou structurelles.

L'hybridation *in situ* offre la possibilité de suivre une séquence génétique particulière. Il est donc possible de cibler une séquence génétique présente chez l'individu donneur de cellules souches et pas chez le receveur. C'est pourquoi il est intéressant d'administrer des cellules mâles à un individu femelle. En effet, il sera possible de suivre les cellules greffées parce qu'elles possèdent un chromosome Y alors que l'individu receveur n'en possède pas. Il suffira de cibler la sonde d'ADN vers une séquence génétique propre au chromosome Y.

Ce type de sondes d'HIS a déjà été produit chez plusieurs espèces dont l'Homme. Certains laboratoires en commercialisent pour le modèle murin, le plus utilisé en recherche. Des sondes commerciales chez le chien ont été utilisées dans une étude de 2013. Ces sondes marquent une partie des chromosomes sexuels et non le chromosome en entier. Cette sonde a été utilisée pour sexer le sperme de chien par méthode FISH (Ol et al., 2013). La FISH a aussi été utilisée pour le sexage du sperme chez les bovins (Habermann et al., 2005), et chez le porc (Kawarasaki et al., 2000).

Une étude a utilisé une sonde anti-Y de souris pour détecter des CSM mâles transplantées dans un tissu pulmonaire chez une souris femelle par hybridation *in situ* et marquage par immunohistochimie (Trotman et al., 2004). Une étude clinique a également été menée à bien chez quatre femmes atteintes d'hépatite alcoolique à qui des CSM mâles ont été implantées. Des biopsies hépatiques ont ensuite été réalisées puis analysées par FISH, montrant que les CSM participent à la fibrose hépatique (Dalakas et al., 2010).

La FISH utilisant une sonde spécifique du chromosome Y n'impose pas de modifications génétiques. Cela permet de plus, puisqu'étant un marquage *post mortem*, de ne pas les cellules de leur vivant, que ce soit fonctionnellement ou structurellement. En revanche, le

tracking du chromosome Y impose un cadre d'étude en ayant recours à une xénogreffe d'un donneur mâle à un receveur femelle (Cen *et al.*, 2016)

1.5. LE MARMOuset COMMUN EN TANT QUE MODELE ANIMAL

De nombreuses espèces animales sont utilisées pour les expérimentations à but scientifique. Le modèle animal le plus utilisé est le modèle murin : la souris. Ce modèle est connu par tous les scientifiques et est bien documenté : le génome murin a été entièrement séquencé en 2002 (Mouse Genome Sequencing Consortium, 2002). Les laboratoires fabriquent en quantité des outils pour utiliser ce modèle comme des sondes d'ADN et de l'ADN compétiteur par exemple. De plus, pour des études données, les centres de recherche peuvent se procurer des souris présentant certaines caractéristiques particulières : des souris « nude » (dont le thymus est absent ou détérioré), des souris albinos (dont la production de mélanine a été bloquée), des « oncosouris » (génétiquement modifiées pour développer plus de tumeurs que la moyenne), des souris « knock out » (dont certains gènes sont inactivés, les prédisposant par exemple à l'obésité ou les rendant tolérantes au froid), et beaucoup d'autres souris permettant de répondre à des problématiques variées. Enfin, le coût et les contraintes d'élevage des rongeurs sont faibles. Le monde de la recherche, dont la recherche en médecine régénérative utilisant les cellules souches, travaille donc préférentiellement avec le modèle murin.

Cependant, en médecine régénérative, la transition du modèle murin à l'Homme est trop radicale et souvent les résultats des recherches faites chez la souris ne se retrouvent pas chez l'humain. Une étude de 2013 a proposé d'autres modèles animaux plus adaptés à la médecine régénérative : les lapins, les chiens, les cochons, les moutons, les chèvres, les chevaux et les primates non humains. Selon cette étude, chacune de ces espèces a un intérêt particulier en fonction du domaine étudié : chats, chiens et cochons pour les maladies oculaires ; chiens, cochons et chevaux pour l'étude des affections musculo-squelettiques ; chiens, cochons et moutons pour les maladies cardio-vasculaires ; primates non humains pour les atteintes neuronales. Ces animaux présentent l'avantage d'avoir une durée de vie longue, permettant ainsi d'étendre les études thérapeutiques à long terme. En outre, leurs propriétés physiologiques et le fonctionnement de leur système immunitaire sont plus proches de ceux de l'Homme que la souris (Harding *et al.*, 2013).

Le marmouset commun (*Callithrix jacchus*) est un petit primate non humain qui est intéressant en tant que modèle animal pour les expérimentations de neurosciences. Ceci est, en partie, dû à l'existence de marmousets transgéniques qui permettent de combiner des manipulations génétiques avec un enregistrement physiologique et une surveillance comportementale, afin d'étudier les systèmes neuronaux. Il est ainsi possible d'étudier le contrôle moteur volontaire. Certains dysfonctionnements neurologiques, comme la maladie de Parkinson ou les AVC, sont modélisables chez le marmouset. C'est pourquoi ce modèle est fortement utilisé pour des essais de thérapies régénératives d'affections neuronales (Walker *et al.*, 2017).

Chez le marmouset commun, la production de cellules souches est en plein essor depuis quelques années. Certaines équipes ont réussi à créer des lignées de cellules souches embryonnaires de marmouset (CSEM) avec succès (Thomson *et al.*, 1996 ; Sasaki *et al.*, 2005).

Les modèles murins utilisent souvent des animaux immunodéprimés comme la souris nude qui permettent la transplantation et l'étude *in vivo* de cellules humaines. L'identification des cellules humaines dans les tissus murins est aisée car elle requiert des marqueurs spécifiques d'espèce. En revanche, chez le marmouset qui est un modèle immunocompétent, on ne peut transplanter que des cellules souches de même espèce. Il faut donc réaliser des outils pour réussir à suivre les cellules souches administrées.

2. ETUDE EXPERIMENTALE

L'équipe iDREAM (INSERM, Université Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse NeuroImaging Center, UMR 1214, Toulouse, France, Dr. Isabelle Loubinoux) avait contacté l'unité de recherche GenPhySE (Université de Toulouse, INRA, ENVT, Toulouse, France) par l'intermédiaire du Pr. Isabelle Raymond-Letron. Le but était d'élaborer un outil de recherche permettant d'identifier des précurseurs neuraux issus de cellules souches de marmouset commun (*Callithrix jacchus*) implantés chez un sujet de cette même espèce.

Cet outil de tracking cellulaire a été réalisé en 2019-2020 sous la supervision de M. Alain Pinton à l'ENVT (unité de recherche GenPhySE). Ainsi, sur la plateforme de cytogénétique de l'ENVT, des sondes chromosomiques ont été créées grâce à l'utilisation de BACs (bacterial artificial chromosome) et testées par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH).

2.1. OBJECTIFS DE L'ETUDE

2.1.1. Contexte

L'accident vasculaire cérébral (AVC) est un déficit neurologique soudain, d'origine vasculaire, causé par un infarctus ou une hémorragie au niveau du cerveau. L'accident vasculaire cérébral est la seconde cause de mortalité au niveau mondial (la première dans les pays en voie de développement, la seconde dans les pays développés) et la sixième cause en termes d'années de handicap. En France, les AVC sont la troisième cause de décès (après l'infarctus du myocarde et les cancers), ils sont responsables d'un décès par an pour 1 000 habitants. Chaque année, ils touchent 150 000 individus, dont 25 % âgés de moins de 65 ans, et font environ 30 000 décès. L'accident vasculaire cérébral est la première cause de handicap acquis et la seconde cause de démence. 25 % des individus actifs frappés d'un AVC pourront un jour travailler à nouveau.

L'AVC est dans 80% des cas d'origine ischémique chez l'Homme : 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.

Dans le cadre d'un AVC ischémique, un traitement aigu peut être envisagé idéalement dans les 90 minutes et au grand maximum moins de 4h30 après les premiers symptômes. Les médicaments sont des thrombolytiques (altéplase, urokinase, streptokinase). Ils permettent la dissolution d'un caillot par thrombolyse ou fibrinolyse par voie intraveineuse. La thrombectomie, lorsqu'elle est possible (si un thrombus dans un vaisseau à destinée cérébrale est visualisé) est une alternative aux médicaments ou bien les complète. Le délai avant thrombectomie a pu être augmenté sur certains patients jusqu'à 24 heures après l'AVC (Nogueira *et al.*, 2017).

Jusqu'à aujourd'hui, peu de transferts à l'Homme de thérapies étudiées chez les animaux ont été concluants malgré de bons résultats chez l'animal. Le modèle le plus souvent employé est le modèle murin. Cependant, il existe une trop grande différence phylogénétique entre la souris et l'humain. Il est donc suggéré d'utiliser des primates non humains, plus proches de l'Homme. Le recours aux grands primates comme les chimpanzés, les macaques ou les babouins est possible mais pose des problèmes éthiques et des limites pratiques (accès à ces espèces, conditions de détention, difficultés de manipulation). Ainsi, les petits primates non humains, comme le marmouset, se trouvent être des modèles facilement utilisables en recherche.

L'équipe iDREAM a démontré qu'une greffe *in vivo* de cellules souches neurales chez le rat, associées à des prothèses micro-structurées de PDMS décrites dans le [paragraphe 1.2.2.2.](#), a permis la récupération fonctionnelle après une lésion cérébrale (Vaysse *et al.*, 2015). L'équipe iDREAM a pour objectif de reproduire cette expérience chez le marmouset, une espèce parmi les petits primates non humains, dans le but de devenir une piste de thérapie 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*. Cette lésion mime une atteinte ischémique similaire au type principal de lésions lors d'AVC. Ensuite, certains des marmousets qui ont subi la lésion recevront une greffe d'implant en PDMS associé aux précurseurs neuronaux obtenus à partir de cellules souches. La lésion cérébrale en elle-même sera constamment évaluée, de même pour les déficits moteurs et les récupérations spontanées. Des paramètres particuliers seront mesurés, tels que la force de préhension. Un suivi par IRM sera effectué afin de visualiser la lésion, la thérapie testée pouvant ainsi être évaluée.

Il se révèle intéressant de coupler ce suivi du vivant de l'animal à une étude *post mortem* du devenir des implants. Il faut pour cela procéder à un tracking des cellules souches de marmouset différenciées en précurseurs neuraux sur coupes histologiques de cerveaux. Notre exercice de thèse s'inscrit dans cette démarche.

2.1.2. Buts de l'étude

Pour suivre notre implant de cellules mâles, nous devons élaborer une sonde spécifique du chromosome Y du marmouset commun *Callithrix jacchus*. Afin d'y parvenir, des sondes ont été fabriquées à partir de chromosomes artificiels bactériens (BACs) sélectionnés au préalable. Ensuite, plusieurs étapes ont eu lieu : culture bactérienne, extraction et purification de l'ADN bactérien, ensuite marquage des sondes pour FISH.

En administrant des cellules mâles à un individu femelle, il sera possible de suivre les cellules greffées parce qu'elles possèdent un chromosome Y alors que l'individu receveur n'en possède pas. Il suffit de cibler la sonde d'ADN vers une séquence génétique propre au chromosome Y. Nous avons de plus fabriqué une sonde spécifique du chromosome X témoin, puisqu'elle permettra de démontrer que l'absence de signal Y n'est pas due à un problème d'hybridation de la sonde.

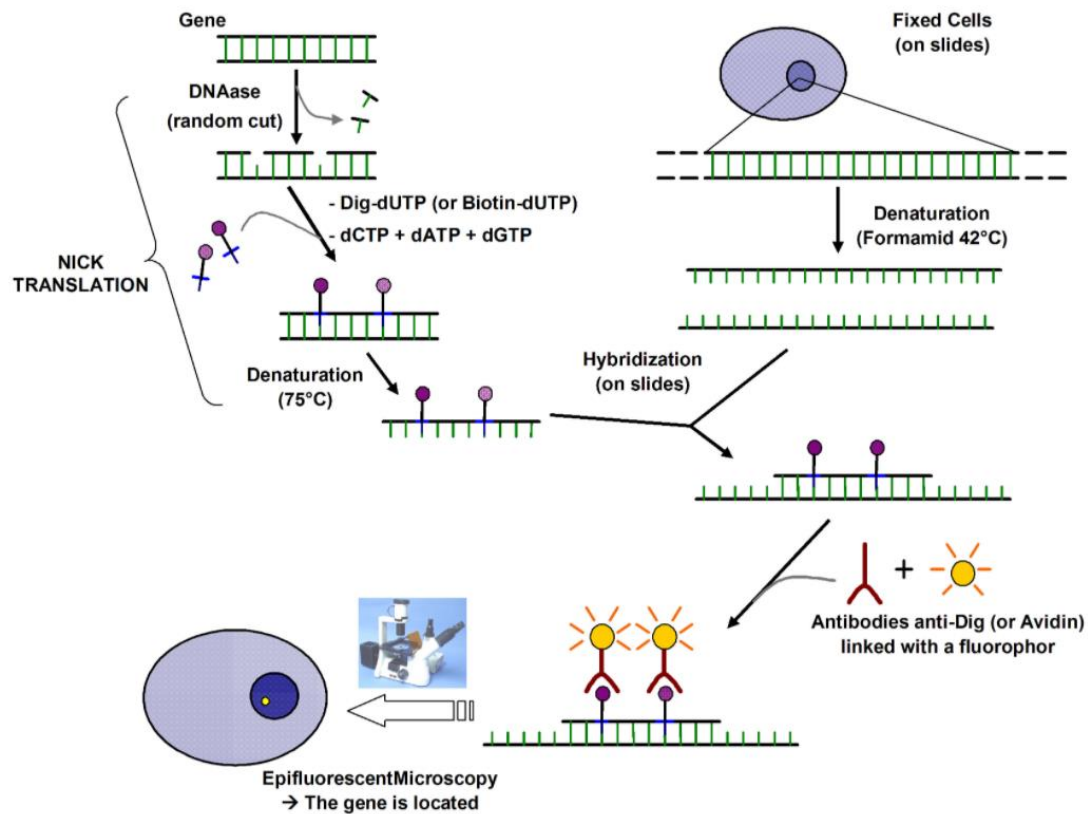
Plusieurs études similaires ont eu lieu par le passé. Une étude chez le chien avait été réalisée dans la même plateforme de l'ENVT sous la direction de M. Alain Pinton par le Dr. Charlotte Bonnemaïson, dans le cadre de sa thèse d'exercice vétérinaire (Bonnemaïson, 2017). Une étude chez le marmouset a été menée par le Dr. Julie Rigal en 2019 (Rigal, 2019), dans le même cadre de travail, mais en élaborant des sondes grâce à la technique de microdissection des chromosomes. De nombreuses étapes de notre protocole expérimental s'inspirent de leurs travaux.

2.1.3. Rappel du principe de réalisation des sondes

L'hybridation *in situ* est une technique qui permet de localiser une séquence connue d'ARN ou d'ADN dans des cellules, qu'elles soient seules ou en tissu. La complémentarité de la sonde avec la séquence de nucléotides recherchée permet, grâce à un marquage préalable

de la sonde, de visualiser le site d'intérêt. Le principe de la FISH (hybridation in situ en fluorescence) est schématisé dans la Figure 8.

Figure 8 : Hybridation *in situ* en fluorescence (source : <http://www.wikipedia.org>)



2.2. MATERIELS ET METHODES

2.2.1. Culture cellulaire à partir d'une biopsie cutanée

Pour travailler par la suite sur des chromosomes de marmouset, il a fallu préalablement mettre en culture des cellules, et les fixer en métaphase afin de visualiser les chromosomes isolés. Cette culture cellulaire a été effectuée à partir de tissu cutané. Il aurait été possible d'effectuer des cultures cellulaires de marmouset à partir de prélèvements sanguins (culture de leucocytes) mais, d'après M. Alain Pinton, le nombre de cellules en métaphase aurait été moindre et les cultures plus fastidieuses.

2.2.1.1. Prélèvement et mise en culture

La biopsie cutanée a été réalisée dans les locaux de l'INSERM à Toulouse par les Dr. Isabelle Loubinoux et Alice Le Friec. 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 biopsies ont été faites et stockées en toute stérilité afin d'éviter une quelconque contamination des cellules. Certaines de ces biopsies cutanées ont été congelées dans l'azote liquide à -200°C , ce sont ces échantillons qui ont été utilisés pour démarrer les cultures. Les manipulations par la suite ont été réalisées sous un poste de sécurité microbiologique (PSM).

Des boîtes de culture (CORNING® Flask 25 cm²) sont d'abord préparées avec un fond d'environ 1 mL de milieu de culture (Gibco® DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium F-12 Nutriment Mixture (Ham) + 10% de sérum de veau foetal + 1% d'antibiotiques et antimycotiques). Le milieu de culture est réparti sur le fond de la boîte puis l'excédent est retiré par aspiration à la pipette Pasteur, dans le but de seulement tapisser le fond de la boîte.

La biopsie cutanée est découpée en plusieurs explants, des morceaux de diamètre de 1 mm maximum. Une dizaine d'explants sont déposés au fond de la boîte de culture. Les boîtes sont d'abord laissées verticalement pendant 10 minutes pour assurer que les explants adhèrent bien au fond de la boîte. Ensuite, un millilitre de milieu est ajouté dans chaque boîte. Les boîtes sont doucement rabattues horizontalement puis placées dans une étuve à 37°C pendant au moins 2 jours.

Après ces deux jours, l'intégrité des cultures et l'absence de contaminations sont vérifiées dans les boîtes de culture. En cas de contamination, des changements macroscopiques auraient lieu, tels l'apparition d'un film de moisissures ou bien un changement de couleur du milieu. Une observation au microscope permet de visualiser la croissance de fibroblastes à partir des explants. Ensuite, le milieu est renouvelé après récupération grâce à une pipette Pasteur puis en ajoutant 1 mL de milieu de culture neuf avec une nouvelle pipette. Les boîtes sont replacées horizontalement à l'étuve à 37°C pendant à nouveau 2 jours minimum.

Le milieu de culture est renouvelé deux fois par semaine, en contrôlant à chaque fois les cultures cellulaires.

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).

Après 3 semaines, les cultures sont très riches et les explants sont retirés des milieux de cultures. Les explants sont doucement décollés du fond de la boîte par aspiration avec une pipette Pasteur et sont mis dans des tubes Eppendorf. Ces tubes sont remplis avec 1 ml d'une solution de DMSO dilué (1 mL de DMSO (diméthylsulfoxyde) + 9 ml de sérum de veau fœtal), puis placés au congélateur à -80°C avant d'être remis dans l'azote liquide à -200°C un jour plus tard. Ensuite, les milieux de cultures des boîtes sont enlevés, le tapis cellulaire est rincé avec du PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline®) et on ajoute 2 mL d'Accutase® par boîte, laissée alors 5 à 10 minutes sous contrôle au microscope. Après ce délai, les boîtes sont tapées 4 à 5 fois dans la paume de la main afin de décoller les cellules ; le mélange d'Accutase® et de cellules est récupéré dans un tube Falcon® de 15 mL. Le tube est centrifugé à 500 g pendant 5 minutes et le surnageant est retiré par aspiration à la pipette. Le culot contenant les cellules est remis en suspension avec 1 ml de milieu de culture par boîte. Le milieu est réparti en plusieurs boîtes, où est déposé 1 mL de milieu contenant les cellules et 4 mL de milieu de culture neuf. Les boîtes sont placées horizontalement à l'étuve à 37°C.

2.2.1.2. Division et récupération des cellules en division

Lorsque les fonds des boîtes sont uniformément tapissés de fibroblastes, les populations de cellules sont divisées. Les boîtes subissent le même protocole que celui qui vient d'être décrit. A la fin du protocole, les cellules sont réparties dans deux fois plus de boîtes. Ces divisions de boîtes sont effectuées deux fois par semaine, l'après-midi.

Le lendemain matin, un grand nombre de cellules se retrouvent synchronisées en métaphase et sont alors récupérées. Etant depuis peu de temps dans leur nouveau milieu, les cellules ne sont pas toutes adhérentes au fond de la boîte, l'ajout d'Accutase® n'est donc pas nécessaire. Les boîtes sont tapées dans la paume de la main, le milieu de culture est récupéré dans des tubes Falcon® de 15 mL et 5 mL de milieu de culture neuf est ajouté aux boîtes qui retournent à l'étuve à 37°C. Les tubes sont centrifugés à 500 g pendant 5 minutes et le surnageant est retiré par aspiration. Un choc hypotonique est ensuite réalisé par l'ajout de 15 mL d'une solution de sérum de veau fœtal dilué à 1/6ème par tube. Cette solution de choc est

préalablement chauffée à 37°C. Les tubes sont placés par la suite à 37°C au bain-marie pendant 20 minutes.

2.2.1.3. Fixation des cellules

La solution de fixation a préalablement été préparée à partir de 75% d'éthanol absolu et 25% d'acide acétique. Une préfixation est faite par l'ajout de quelques gouttes de fixateur dans chaque tube. Les tubes sont à nouveau centrifugés à 500 g pendant 5 minutes et le surnageant est enlevé par aspiration. La solution fixatrice est ajoutée aux culots cellulaires à raison de 15 mL minimum par tube, tout en décollant les cellules grâce à un vortex. Les tubes se conservent au réfrigérateur à 4°C.

2.2.1.4. Etalement sur lames

Des lames de verre rectangulaires ont été préalablement placées dans un bocal d'eau distillée à 4°C. Cette conservation particulière permet d'éliminer les bulles d'air entre les lames et peut nécessiter une durée de stockage de plusieurs semaines.

Après avoir été fixées en métaphase, les cellules sont étalées sur des lames afin d'être observées. Les tubes Falcon® contenant les cellules fixées conservés au réfrigérateur à 4°C sont centrifugés à 500 g pendant 5 minutes, le surnageant est retiré par aspiration et le culot est remis en suspension avec une pipette Pasteur.

Une lame conservée dans de l'eau distillée à 4°C est doucement extraite du bocal avec une pince, et l'eau à sa surface est enlevée par capillarité sur un papier absorbant. La lame est penchée à 45° et une goutte du culot est déposée sur le tiers supérieur de la lame. Cette goutte est étalée en soufflant légèrement vers le bas. La lame est mise à sécher sur un portoir.

La qualité des lames est jugée à l'aide d'un microscope à contraste de phases. La richesse en métaphases de la lame et l'étalement des métaphases (espacement des chromosomes d'une même métaphase) sont des critères recherchés ; les lames contenant une grande quantité d'éléments non désirés sont retirées de l'étude.

2.2.2. Culture et extraction des BACs

2.2.2.1. Sélection des BACs

Afin de cibler des séquences de nucléotides particulières des chromosomes Y et X, il a d'abord fallu se renseigner sur le génome du marmouset commun *Callithrix jacchus*. Ce dernier a été étudié et enregistré dans des bases de données. Des gènes spécifiques des chromosomes Y et X ont été identifiés : TSPY et RBMY pour Y, XIST et DMD pour X. Les gènes TSPY et XIST ont été retenus pour la suite de l'étude. Le site <https://genome.ucsc.edu/> offre une cartographie du génome des espèces qui ont été étudiées ; il recense de plus les BACs disponibles en recherche et permet de comparer leur taille et les régions qu'ils couvrent. Ainsi plusieurs BACs ont été retenus pour notre étude : CH259-95C4, CH259-376N23 et CH259-387M22 pour le gène TSPY du chromosome Y de marmouset ; CH259-113N17, CH259-506H03 et CH259-135B11 pour le gène XIST du chromosome X de marmouset. Ils ont été choisis pour leur grande taille (supérieure à 130 kilobases) et pour leur répartition, le but étant de couvrir le gène d'intérêt au maximum en limitant les superpositions entre eux. Les BACs ont ensuite été commandés sur le site <https://bacpacresources.org/>, qui opère depuis le Children's Hospital Oakland Research Institute.

2.2.2.2. Culture préliminaire des colonies de bactéries

Avant de pouvoir extraire l'ADN des BACs dans le but de créer nos sondes, il nous a fallu préalablement mettre en culture nos bactéries. Cela nous a permis d'avoir une quantité plus importante de matériel génétique, et aussi de former un glycérol stock conservable pour réitérer l'expérience.

Les colonies bactériennes reçues ont été placées par le commerçant dans de l'agar à l'intérieur de tubes Eppendorf.

Pour les étapes suivant les cultures bactériennes, on utilise le Kit NucleoBond® Xtra Midi de Macherey-Nagel™.

2.2.2.2.1. Préculture bactérienne

Un milieu de culture des bactéries est tout d'abord préparé avec du milieu de culture LB dans lequel sont ajoutés 34 mg/ml de chloramphénicol. Cet antibiotique a pour but d'éviter de possibles contaminations des cultures, nos bactéries étant résistantes au chloramphénicol.

Grâce à une tigette plastique stérile, on récupère dans l'agar les colonies de bactéries pour une culture donnée, sans mélanger les BACs. Cette tigette est ensuite remuée dans 3mL de milieu LB avec du chloramphénicol dans un tube Falcon® de 15 mL. Le tube n'est pas refermé complètement. La préculture est placée à agiter à 37°C dans un incubateur pendant toute une nuit. L'opération est répétée pour chaque BACs.

2.2.2.2.2. Création d'un glycérol stock

La création d'un glycérol stock consiste en une sauvegarde des précultures bactériennes. Pour cela, on mélange 750 µL de glycérol à 30% (dilué dans de l'eau) et 750 µL de notre préculture pour chaque BAC dans un cryotube. Les stocks sont conservés par la suite à -80°C, dans l'idée d'être réutilisables si besoin.

2.2.2.2.3. Culture bactérienne

Pour chacun des 6 BACs, on ensemence 4 tubes Falcon® de 50 mL contenant chacun 20 mL de milieu culture avec 200 µL de préculture. Les tubes ne sont pas complètement fermés. Pour chaque BAC, nous avons donc 4 tubes, soit 24 tubes au total, qui sont laissés à incuber à 37°C sous agitation continue pendant au minimum toute une nuit. La progression de la culture est évaluée en fonction de la turbidité du liquide : il nous a fallu dans notre étude attendre deux jours entiers.

2.2.2.3. Extraction des ADN

Pour préparer l'extraction, la solution Buffer ELU est mise à chauffer à 50°C au bain marie, et une centrifugeuse est allumée pour abaisser sa température à 4°C. On vérifie la

solution Buffer LYS : si un précipité blanc est visible, on fait chauffer le tampon à 30-40°C jusqu'à dissolution complète.

Les cultures bactériennes sont rassemblées deux par deux : on fait un pool de 2 fois 20 mL. On obtient donc 2 tubes de 40 mL par BAC soit 12 tubes. Ces tubes sont mis à centrifuger à 4500 g pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant est éliminé en étant versé doucement dans un bidon poubelle (à destination des déchets présentant un danger biologique) puis délicatement à l'aide d'une pipette. Pour chaque BAC, les deux culots de bactéries sont remis en suspension par aspiration et refoulement avec 4 mL de Resuspension Buffer RES + RNAse A. Les deux culots sont ensuite rassemblés en un pool de 8 mL. On ajoute 8 mL de Lysis Buffer LYS et on agite par inversions répétées du tube jusqu'à que la suspension devienne bleue. On laisse incuber 5 minutes à température ambiante. On ajoute enfin 8 mL de Neutralization Buffer NEU et on agite par inversions répétées jusqu'à décoloration complète de la suspension.

2.2.2.4. Purification de l'ADN de BACs

Des colonnes d'élution sont posées sur un portoir Macherey-Nagel™ à raison d'une colonne par BAC. Chaque colonne est équilibrée avec 12 mL d'Équilibration Buffer EQU, il ne faut pas laisser les colonnes sécher. Nos suspensions de bactéries sont homogénéisées par inversions répétées des tubes. On dépose ensuite entièrement sur chaque colonne une suspension qui migre par gravité. La colonne est lavée avec 5 mL de tampon Buffer EQU. Le filtre est retiré de la colonne. On lave ensuite la colonne avec 8 mL de tampon Buffer WASH. Enfin, la colonne est placée sur de nouveaux tubes Falcon® de 50 mL et l'ADN est élué avec 5 mL de tampon Buffer ELU chauffé à 50°C. Ainsi, dans chaque tube, on obtient de l'ADN bactérien purifié correspondant à chaque BAC.

2.2.2.5. Précipitation de l'ADN de BACs

L'ADN est ensuite précipité afin de pouvoir être dosé par la suite par spectrophotométrie, et pour sa conservation à -20°C.

Pour chaque tube obtenu après l'étape de purification, l'éluat est transféré dans un tube Falcon® de 15 mL. Sous hotte, on ajoute 3,5 mL d'isopropanol (0,7 vol) et le tube est mélangé au vortex. Les tubes sont laissés reposer toute une nuit au réfrigérateur.

Chaque tube est centrifugé 15 minutes à 4500 g, le surnageant est éliminé à la pipette. On lave le culot avec 2 mL d'éthanol à 70%. On effectue à nouveau une centrifugation à 4500 g pendant 15 minutes et on élimine le surnageant à l'aide d'une pipette. Les culots sont mis à sécher ensuite pendant au moins une heure sous une hotte ; puis ils sont remis en suspension dans 30 µL de Tris HCl-EDTA (TE) et laissés à incuber sur paillasse toute la nuit.

2.2.2.6. Dosage par spectrophotométrie

Il est nécessaire pour la suite de connaître la concentration en ADN et la pureté des échantillons. L'ADN est dosé à l'aide du spectrophotomètre GeneQuant® Pro RNA/DNA Calculator de Biotech™.

Tableau 2 : Concentration des ADN extraits à partir des BACs

<u>Nom du BAC</u>	<u>Concentration ADN (ng/µl)</u>	<u>230 (A)</u>	<u>260 (A)</u>	<u>280 (A)</u>	<u>320 (A)</u>	<u>260/230</u>	<u>260/208</u>
135B11	151,4	0,743	1,542	0,848	0,028	2,117	1,846
506H3	42,2	0,244	0,43	0,242	0,008	1,788	1,803
113N17	144,4	0,871	1,525	0,965	0,081	1,828	1,633
387M22	24,4	0,155	0,256	0,15	0,012	1,706	1,768
95C4	18,5	0,135	0,196	0,116	0,011	1,492	1,762
376N23	140,1	0,671	1,422	0,816	0,021	2,155	1,762

	BAC sélectionné pour la sonde anti-X
	BAC sélectionné pour la sonde anti-Y

La pureté des échantillons est évaluée en mesurant l'absorbance à 280 nm et 230 nm. Le ratio 260/280 permet de détecter une contamination des acides nucléiques par des

protéines. Sa valeur varie entre 1,8 et 2,0 pour de l'ADN et entre 2,0 et 2,2 pour de l'ARN. Le ratio 260/230 doit se situer entre 2,0 et 2,2. Lorsqu'il est plus faible, cela indique la présence de contaminants comme le phénol, l'EDTA, guanidine, HCL, etc. Dans notre étude, nos échantillons sont légèrement impurs.

2.2.3. Préparation d'ADN compétiteur (kit Nucléobond® Buffer Set IV de MACHEREY-NAGEL™)

L'ADN compétiteur a pour but de s'hybrider sur les régions non spécifiques constituées de séquences d'ADN répétées. Il permet d'éliminer les hybridations non spécifiques en FISH, qui provoqueraient un « bruit de fond » lors de l'observation au microscope.

Dans le cadre de l'étude, les deux ADNs compétiteurs utilisés sont des ADNs de marmouset et humain. L'ADN humain est un ADN compétiteur du commerce et l'ADN de marmouset a été récupéré des travaux menés par le Dr J. Rigal (Rigal, 2019). Le protocole de préparation d'ADN compétiteur est cependant rappelé ci-dessous.

2.2.3.1. Matériel nécessaire

L'ADN compétiteur de marmouset a été extrait à partir de deux foies et deux rates entiers de marmouset. Ces organes avaient été récupérés sur deux animaux euthanasiés pour les besoins d'une autre étude. Ces tissus étaient conservés congelés dans des tubes.

L'extraction d'ADN compétiteur a été effectuée avec le kit Nucléobond® Buffer Set IV de MACHEREY-NAGEL™. Le protocole ci-dessous s'inspire donc de la notice d'instruction du kit.

2.2.3.2. Préparation des solutions

Tout d'abord, 1 mL de Buffer G2 est ajouté à l'ampoule de RNase A. La solution est mélangée au vortex puis versée dans la bouteille de Buffer G2. La bouteille est ensuite homogénéisée par légères secousses. Le mélange peut être stocké à 4°C pendant au moins 6 mois.

Ensuite, 2,5 mL de Proteinase Buffer PB sont ajoutés à la fiole de protéinase K lyophilisée pour créer la solution de Proteinase K. Cette préparation peut être conservée à -20°C pendant au moins 6 mois.

2.2.3.3. Lyse des tissus

Il faut d'abord découper les tissus en morceaux de 400 mg chacun. Chaque échantillon est mis dans un tube avec 10 mL de solution de Buffer G2. Les échantillons sont pilés au mortier afin de faciliter la lyse des tissus.

Chaque homogénat est transféré dans un tube Falcon® de 50 mL dans lequel sont ajoutés 450 µL de Proteinase K solution (à 20 mg/mL). Le tube est mélangé au vortex pendant 30 secondes pour aboutir à un mélange homogène. Les échantillons sont ensuite incubés à 50°C pendant 3 à 4 heures avec une homogénéisation toutes les heures à l'aide d'un mortier.

2.2.3.4. Migration et élution sur colonnes

D'abord, les colonnes sont équilibrées en faisant migrer 5 mL de Buffer N2 dans chaque colonne vide. Ensuite, 10 mL de Buffer N2 sont ajoutés aux échantillons. Chaque tube est mélangé au vortex à vitesse maximale pendant 15 secondes. L'homogénat est ensuite versé dans les colonnes à raison d'un tube par colonne. Il migre ensuite à travers la résine par gravité.

Les colonnes sont par la suite lavées 3 fois chacune avec 8 mL de Buffer N3. Une fois les lavages passés par gravité, des tubes sont placés sous les colonnes et l'ADN est élué avec 8 mL de Buffer N5.

Enfin, l'éluat récupéré est précipité grâce à l'ajout de 5,6 mL d'isopropanol. Chaque tube est incubé 60 minutes à température ambiante. Les échantillons sont ensuite mis à centrifuger à la vitesse de 15 000 rotations par minute pendant 25 minutes. Le surnageant est retiré complètement, d'abord par retournement puis précisément à la micropipette.

Les culots d'ADN obtenus sont séchés dans une cloche à vide pendant au moins 30 minutes. Dès que les culots sont secs, ils sont remis en suspension dans 15 µL de TE (Tris HCl-EDTA) à pH = 8 et les échantillons sont rassemblés dans un tube.

2.2.3.5. Sonication et dosage par spectrophotométrie

L'ADN obtenu doit être découpé en petits morceaux afin d'être le moins spécifique d'une séquence précise. Il subit donc un procédé de sonication, qui consiste en une agitation des particules par ultrasons. La taille des fragments est vérifiée par électrophorèse. Le résultat obtenu doit être sous forme de smear (traînée colorée continue).

Une fois la qualité de la fragmentation vérifiée, il est nécessaire de connaître la concentration en ADN et la pureté des échantillons. L'ADN est dosé par spectrophotométrie à l'aide du spectrophotomètre GeneQuant® Pro RNA/DNA Calculator de Biotech™.

2.2.4. Réalisation des sondes (méthode de FISH)

2.2.4.1. Marquage ADN (kit BioPrime® de INVITROGEN™)

Le marquage de l'ADN a été réalisé en utilisant le kit BioPrime® DNA Labelling System de INVITROGEN™.

Le kit prévoit une concentration d'ADN à marquer d'environ 50 ng/μL. Or nos 6 échantillons ne possèdent pas tous la même concentration en ADN (cf [Tableau 2](#)). Il faut adapter la quantité d'ADN ajoutée dans le protocole.

A notre quantité d'ADN, il faut ajouter de l'H₂O B Braun. Le but étant d'obtenir, à la fin du protocole de marquage, un volume total de 55 μL pour chacun de nos 6 tubes, la quantité d'eau ajoutée est à ajuster en fonction de la quantité d'ADN, et le volume cumulé de l'ADN et de l'eau doit donc être de 20,5 μL.

A ces 20,5 μL sont ajoutés 20 μL de Primers 2,5X. Le mélange est homogénéisé par tapotement. Le tube est ensuite rapidement centrifugé afin que toute la solution se retrouve au fond du tube sans gouttelettes adhérentes à la paroi du tube. Ceci permet d'éviter les pertes au vu du faible volume sur lequel nous travaillons.

Le tube est placé dans de l'eau à 100°C pendant 5 minutes pour l'étape de dénaturation. Les tubes sont équipés d'un bouchon anti-pression pour éviter leur ouverture à cette température. L'étape de dénaturation est ensuite interrompue en plaçant les tubes dans de la glace.

Ensuite, 5 μL de dNTP 10X (adénine, guanine, cytosine et quelques bases thymine) ainsi que 3,5 μL d'UTP marqué sont ajoutés aux tubes. L'UTP est marqué à la biotine pour les sondes anti-Y et à la digoxigénine pour les sondes anti-X. L'enzyme Klenow est enfin ajoutée dans chaque tube à raison d'1 μL par tube. Les échantillons sont à nouveau mélangés par tapotement du fond du tube puis centrifugés rapidement.

Les échantillons sont placés à incuber à 37°C au bain marie pendant 2 à 4 heures. A leur sortie du bain marie, il leur est ajouté 5 μL de Stop Buffer par tube pour un volume total de 55 μL chacun.

L'étape suivante est celle de la précipitation des sondes. Cette étape voit intervenir l'ADN compétiteur. Ainsi, puisque nous voulions tester des sondes avec de l'ADN compétiteur de marmouset et de l'ADN compétiteur humain, l'étape de marquage a été effectuée sur le double de tubes pour chacun des BACs. Cela permettra de tester les deux ADN compétiteurs pour chaque BAC.

2.2.4.2. Précipitation des sondes

Après l'étape de marquage, les tubes sont à nouveau centrifugés rapidement. Il est ajouté 15 μL de sperme de saumon (facilitant la précipitation) par tube, 15 μL d'ADN compétiteur (de marmouset ou humain), 3,54 μL de NaCl et 1 mL d'éthanol absolu. Les échantillons sont mélangés par retournements successifs. Une fois l'éthanol ajouté, il se crée un précipité blanc qui n'est autre que la sonde d'ADN précipitée. Les tubes sont ensuite mis à -20°C pendant au moins 12h ou à -80°C pendant 3 heures.

2.2.4.3. Préparation des sondes

Les tubes obtenus après l'étape de précipitation des sondes sont centrifugés à 13 000 rotations par minute à 4°C pendant 30 minutes.

Le surnageant est éliminé par retournement et 1 mL d'éthanol 70% à -20°C est ajouté. Le culot est décollé grâce à un vortex et par tapotement.

Les tubes sont ensuite centrifugés à 13 000 rotations par minute à 4°C pendant 10 minutes. Le surnageant est éliminé par retournement et 1 mL d'éthanol 70% à -20°C est ajouté. Cette étape est effectuée une fois de plus.

Afin de retirer le plus d'éthanol possible des tubes, une micropipette P20 est utilisée et les culots sont mis à sécher au moins 30 minutes sous une cloche à vide.

Les culots sont ensuite remis en suspension avec 15 µL d'une solution d'hybridation (solution à 50% de formaldéhyde). Ils sont laissés à 37°C au bain marie pendant au moins 4 heures, avec des mélanges réguliers toutes les heures à l'aide d'un vortex. Les tubes sont ensuite conservés au congélateur à -20°C.

2.2.5. Hybridation *in situ* sur lames cytologiques

Cette étape d'hybridation *in situ* sur lames cytologiques nous a permis de sélectionner les sondes pour la suite de l'étude, notamment concernant l'étape de FISH sur lames histologiques. Les sélections sont faites selon le BAC et l'ADN compétiteur utilisés. Les sondes montrant des résultats insatisfaisants seront écartées.

2.2.5.1. Préparation des lames cytologiques

Les lames cytologiques sont préparées comme indiqué dans le [paragraphe 2.2.1.4.](#) avec des cellules de marmouset commun en métaphase obtenues après culture décrite au [paragraphe 2.2.1.](#) Chaque lame est vérifiée au microscope à contraste de phases, afin de repérer les endroits les plus riches en métaphase, qui seront les sites d'hybridation.

2.2.5.2. Hybridation : protocole à l'Hybridizer® DAKO™

Chaque sonde (anti-X ou anti-Y, avec l'ADN compétiteur de marmouset ou humain) est déposée sur une lame cytologique à raison de 10 µL par site d'hybridation, chaque lame pouvant accueillir jusqu'à deux sites d'hybridation. Une lamelle carrée de 22 x 22 mm est ensuite délicatement posée sur chaque goutte. Puis les lamelles sont collées à la lame avec de la colle Elmer's Rubber Cement® pour empêcher une éventuelle évaporation lors du processus d'hybridation.

Deux bandes imbibées d'une solution saline sont insérées initialement dans l'Hybridizer® DAKO™ pour éviter de dessécher les lames. Les lames sont ensuite placées dans la machine et traitées selon un programme prédéfini : 8 minutes à 75°C puis 24 heures à 37°C.

2.2.5.3. Lavages stringents

Une fois le protocole d'hybridation terminé, la colle est retirée des lames grâce à un scalpel.

Chaque lame est ensuite plongée dans une solution SSC 2X (sodium citrate deux fois concentré) à température ambiante. Cela a pour but de stabiliser la sonde, l'ADN étant chargé négativement et la solution positivement. Un deuxième lavage s'ensuit dans une solution de SSC 0,4X à 72°C au bain marie pendant 4 minutes. Enfin, la lame est mise à température ambiante dans du PBT, solution composée de 500 mL de PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline®), de 500 µL de Tween et de 0,75g de BSA (albumin bovine serum).

2.2.5.4. Préparation des anticorps

Pour la révélation, les anticorps sont préparés à une concentration de 1%. Pour la sonde anti-Y, le mélange est constitué d'1 µL de streptavidine Alexa Fluor® 594 (SAF 594, signal fluorescent rouge) dans 100 µL de PBT ; et pour la sonde anti-X d'1 µL d'anticorps anti-digoxigénine marqués à la fluorescéine (FITC, signal fluorescent vert) dans 100 µL de PBT. Les mélanges sont ensuite homogénéisés au vortex puis centrifugés brièvement.

2.2.5.5. Révélation

La lame préalablement laissée dans le PBT en est retirée et le liquide restant à sa surface est enlevé par capillarité sur un papier absorbant. Ensuite, 70 µL du mélange anticorps-PBT sont déposés sur la lame et une lamelle rectangulaire de 24 x 60 mm est posée.

La lame est ensuite placée à 37°C pendant 1 heure dans une boîte fermée contenant un tissu humidifié. Après ce délai, la lame est sortie et la lamelle retirée. Puis trois lavages de la lame ont lieu dans du PBS + Tween (2 µL/mL) pendant trois fois 6 minutes sous agitation permanente, à l'abri de la lumière.

Enfin, une goutte de Vectashield + DAPI® est appliquée sur la lame. Le Vectashield permet de protéger la fluorescence, et le DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole) est un agent intercalant de l'ADN qui donne une coloration fluorescente bleue à l'ADN. Une lamelle

rectangulaire de 24 x 60 mm est posée sur la lame. Les lames ainsi préparées peuvent être observées et sont conservées à l'abri de la lumière au réfrigérateur à 4°C.

2.2.5.6. Observation des lames

Les lames sont observées avec un microscope à épifluorescence ImagerZ2® associé à un système d'analyse d'image Cytovision® développé par LEICA™.

Le microscope émet de la lumière qui permet d'isoler les fluorescences rouge, verte et bleue mais aussi de les réunir sur la même image. Les chromosomes Y ont été ciblés par une sonde marquée à la biotine donnant une fluorescence rouge, et les chromosomes X par une sonde marquée à la digoxigénine donnant une fluorescence verte. Le reste de l'ADN est marqué au DAPI aboutissant à une fluorescence bleue.

2.2.6. Hybridation *in situ* sur coupes histologiques

2.2.6.1. Préparation des lames

2.2.6.1.1. Réalisation des lames

Les tissus préalablement conservés dans du formol 10% sont d'abord paraffinés en blocs. Des coupes d'un tissu sont réalisées grâce à un microtome par le service d'anatomie pathologie de l'ENVT. L'épaisseur des coupes est réglée à 4 µm. Ces coupes sont déposées sur des lames de verre et placées à l'étuve à 40°C.

Les tissus qui ont été sélectionnés dans le cadre de cette étude sont le poumon, le tube digestif et le testicule du marmouset commun *Callithrix Jacchus*. Les testicules de marmouset qui ont permis les coupes avaient été congelés pour leur conservation.

2.2.6.1.2. Déparaffinage et réhydratation

Avant de réaliser la procédure de digestion des tissus, les lames doivent être déparaffinées puis réhydratées. Tout résidu de paraffine provoquerait une augmentation de la coloration non spécifique. Ce processus s'effectue à température ambiante (20 à 25 °C).

Chaque lame est plongée dans un bain de xylène pendant 5 minutes, deux fois consécutives, puis dans de l'éthanol 96% pendant 2 minutes, deux fois, puis dans de l'éthanol 70% pendant deux minutes, deux fois. Enfin, la lame est plongée pendant 2 minutes dans du SSC 2X. Elle est ensuite stockée dans de l'eau pour éviter une déshydratation. Cette étape a été réalisée par le service d'anatomie pathologique de l'ENVT.

2.2.6.1.3. Etapes de prétraitement et de digestion

L'étape de prétraitement des lames se fait à l'aide du Histology FISH Accessory Kit® K5799 de DAKO™.

Les lames sont d'abord mises dans un bain de Pre-Treatment Solution à 95°C pendant 10 minutes. La cuve de lames est sortie du bain marie et laissée à refroidir à température ambiante pendant 15 minutes. Puis les lames sont plongées dans du Wash Buffer pendant 3 minutes à température ambiante. Le tampon Wash Buffer est ensuite renouvelé et les lames y sont laissées à nouveau 3 minutes.

Après cette étape de prétraitement vient celle de digestion des tissus. Les lames sont déposées sur l'Hybridizer® DAKO™ et on rajoute sur chacune d'entre elle 5 à 8 gouttes de pepsine froide (stockée au réfrigérateur à 4°C) en veillant à bien recouvrir l'intégralité de l'échantillon. La lame est incubée à 37°C pendant un temps allant de 2 à 15 minutes en fonction de la nature du tissu, de sa fixation et de l'épaisseur de la coupe. Pour chaque tissu, plusieurs temps de digestion ont été testés et la qualité de digestion a été évaluée au microscope à contraste de phases.

Les lames sont ensuite lavées dans deux bains consécutifs de Wash Buffer pendant 3 minutes chacun. Puis elles sont plongées dans des cuves d'alcool de plus en plus concentré. Chaque bain dure 2 minutes, d'abord dans de l'éthanol 70%, puis éthanol 90% et enfin éthanol absolu. Les lames sèchent enfin à l'air libre sur la paillasse.

2.2.6.2. Hybridation à l'Hybridizer® DAKO™

L'hybridation est réalisée comme décrite dans le [paragraphe 2.2.5.2.](#)

Pour rappel, chaque sonde (anti-X ou anti-Y, avec l'ADN compétiteur de marmouset ou humain) est déposée sur une lame cytologique à raison de 10 µL par site d'hybridation, chaque

lame pouvant accueillir jusqu'à deux sites d'hybridation. Une lamelle carrée de 22 x 22 mm est ensuite délicatement posée sur chaque goutte. Puis les lamelles sont collées à la lame avec de la colle Elmer's Rubber Cement® pour empêcher une éventuelle évaporation lors du processus d'hybridation.

Deux bandes imbibées d'une solution saline sont insérées initialement dans l'Hybridizer® DAKO™ pour éviter de dessécher les lames. Les lames sont ensuite placées dans la machine et traitées selon un programme prédéfini : 8 minutes à 75°C puis 24 heures à 37°C.

2.2.6.3. Lavages

Les lavages sont réalisés comme décrits dans le [paragraphe 2.2.5.3.](#)

Une fois le protocole d'hybridation terminé, la colle est retirée des lames grâce à un scalpel.

Chaque lame est ensuite plongée dans une solution SSC 2X (sodium citrate deux fois concentré) à température ambiante. Cela a pour but de stabiliser la sonde, l'ADN étant chargé négativement et la solution positivement. Un deuxième lavage s'ensuit dans une solution de SSC 0,4X à 72°C au bain marie pendant 4 minutes. Enfin, la lame est mise à température ambiante dans du PBT, solution composée de 500 mL de PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline®), de 500 µL de Tween et de 0,75g de BSA (albumin bovine serum).

2.2.6.4. Préparation des anticorps et révélation

Ces étapes de préparation des anticorps et de révélation sont réalisées comme décrites dans les [paragraphe 2.2.5.4.](#) et [2.2.5.5.](#)

Pour la révélation, les anticorps sont préparés à une concentration de 1%. Pour la sonde anti-Y, le mélange est constitué d'1 µL de streptavidine Alexa Fluor® 594 (SAF 594, signal fluorescent rouge) dans 100 µL de PBT ; et pour la sonde anti-X d'1 µL d'anticorps anti-digoxigénine marqués à la fluorescéine (FITC, signal fluorescent vert) dans 100 µL de PBT. Les mélanges sont ensuite homogénéisés au vortex puis centrifugés brièvement.

La lame préalablement laissée dans le PBT en est retirée et le liquide restant à sa surface est enlevé par capillarité sur un papier absorbant. Ensuite, 70 μ L du mélange anticorps-PBT sont déposés sur la lame et une lamelle rectangulaire de 24 x 60 mm est posée.

La lame est ensuite placée à 37°C pendant 1 heure dans une boîte fermée contenant un tissu humidifié. Après ce délai, la lame est sortie et la lamelle retirée. Puis trois lavages de la lame ont lieu dans du PBS + Tween (2 μ L/mL) pendant trois fois 6 minutes sous agitation permanente, à l'abri de la lumière.

Enfin, une goutte de Vectashield + DAPI® est appliquée sur la lame. Le Vectashield permet de protéger la fluorescence, et le DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole) est un agent intercalant de l'ADN qui donne une coloration fluorescente bleue à l'ADN. Une lamelle rectangulaire de 24 x 60 mm est posée sur la lame. Les lames ainsi préparées peuvent être observées et sont conservées à l'abri de la lumière au réfrigérateur à 4°C.

2.3. RESULTATS

2.3.1. Cultures cellulaires

Les cultures cellulaires réalisées à partir des explants de peau de marmouset commun ont été fructueuses et ont permis de récupérer un nombre important de cellules en métaphase qui ont alors été fixées. Cette fixation en métaphase est importante afin de pouvoir distinguer les chromosomes, de les reconnaître grâce à un caryotype (Figure 9) et de vérifier la spécificité de l'hybridation *in situ*.

Figure 9 : Caryotype d'un individu mâle de l'espèce *Callithrix jacchus* en coloration en bandes G (grossissement x1000) (source : banque de données Unité GenPhyse)



2.3.2. Sondes chromosomiques

2.3.2.1. Rappel du principe de réalisation des sondes

Des sondes des chromosomes Y et X de marmouset commun ont été créées comme expliqué dans le [paragraphe 2.2.4](#). Elles ont été ensuite hybridées sur lames cytologiques ou histologique puis révélées selon les protocoles décrits aux [paragraphes 2.2.5](#) et [2.2.6](#). Le principe de l'hybridation in situ en fluorescence est illustré par la [Figure 8](#) ([paragraphe 2.1.3](#)).

2.3.2.2. Test des sondes sur lames cytologiques

2.3.2.2.1. Premiers résultats

Pour chaque chromosome, des sondes ont été réalisées à partir de 3 BACs : CH259-95C4, CH259-376N23 et CH259-387M22 pour le gène TSPY du chromosome Y de marmouset ;

CH259-113N17, CH259-506H03 et CH259-135B11 pour le gène XIST du chromosome X de marmouset.

De plus, lors de la création des sondes, deux ADN compétiteurs ont été utilisés (ADN humain et ADN de marmouset) pour évaluer l'efficacité de chacun d'entre eux. Ainsi, plusieurs essais sur lames cytologiques ont été effectués afin de déterminer à partir de quel BAC est issue la sonde la plus efficace.

Dans le cadre de ces essais sur lames cytologiques, les sondes utilisées ont été marquées à la biotine, puis révélées à la streptavidine donnant une fluorescence rouge au microscope à épifluorescence. Pour rappel, lorsqu'il n'est pas marqué par une sonde, l'ADN est marqué en bleu grâce au DAPI.

2.3.2.2.1.1. Sonde du chromosome Y

2.3.2.2.1.1.1. CH259-95C4

Figure 10 : Métaphase de cellule de marmouset mâle après hybridation de sonde du chromosome Y obtenue à partir du BAC CH259-95C4 et avec de l'ADN compétiteur de marmouset (grossissement x1000)

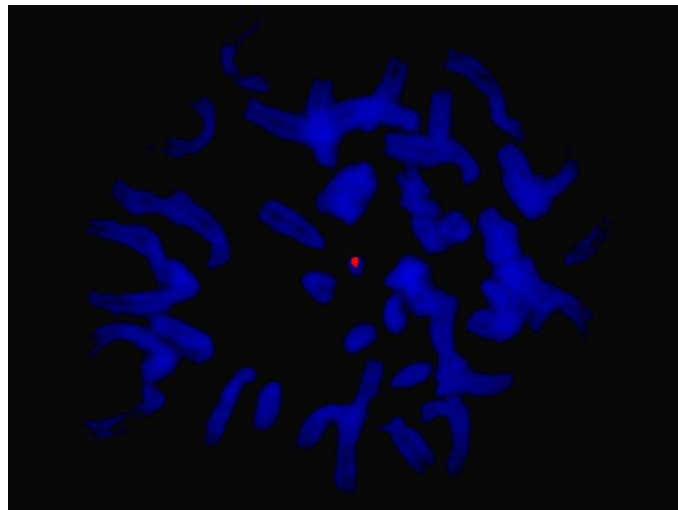
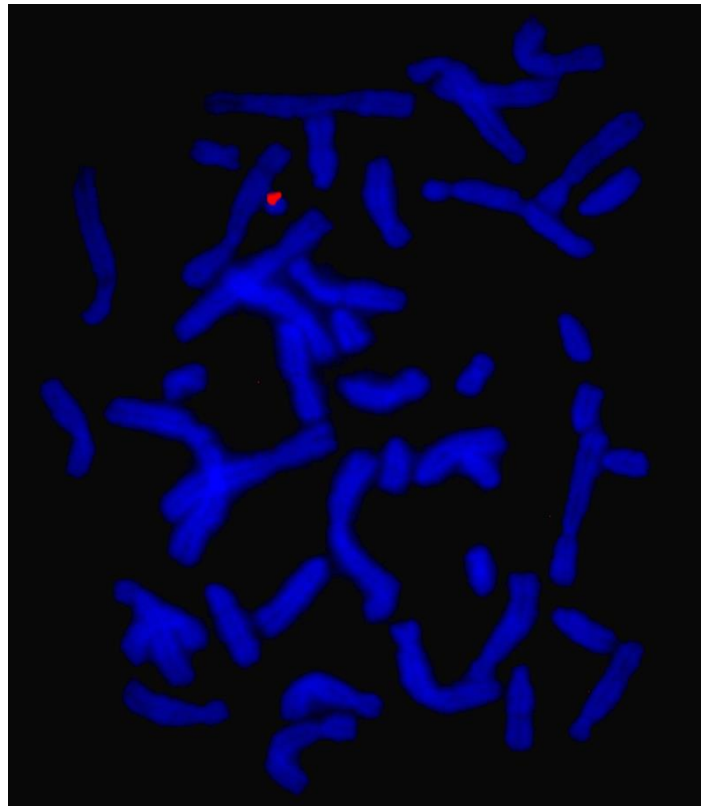


Figure 11 : Métaphase de cellule de marmouset mâle après hybridation de sonde du chromosome Y obtenue à partir du BAC CH259-95C4 et avec de l'ADN compétiteur humain (grossissement x1000)

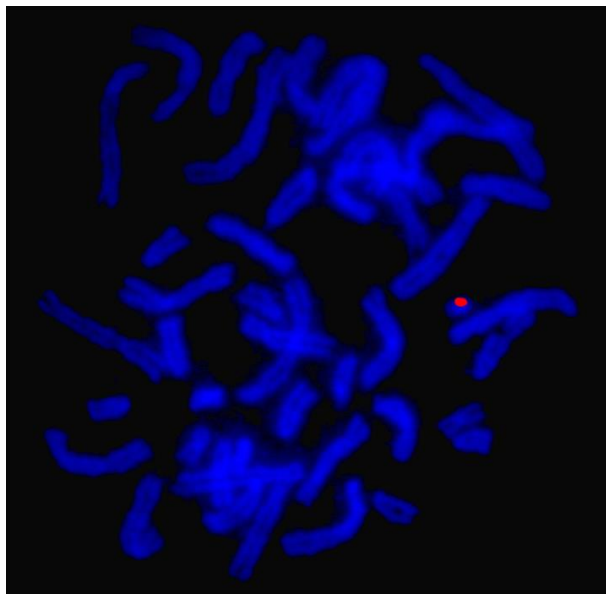


2.3.2.2.1.1.2. CH259-376N23

Figure 12 : Métaphase de cellule de marmouset mâle après hybridation de sonde du chromosome Y obtenue à partir du BAC CH259-376N23 et avec de l'ADN compétiteur de marmouset (grossissement x1000)



Figure 13 : Métaphase de cellule de marmouset mâle après hybridation de sonde du chromosome Y obtenue à partir du BAC CH259-376N23 et avec de l'ADN compétiteur humain (grossissement x1000)



2.3.2.2.1.1.3. CH259-387M22

Figure 14 : Métaphase de cellule de marmouset mâle après hybridation de sonde du chromosome Y obtenue à partir du BAC CH259-387M22 et avec de l'ADN compétiteur de marmouset (grossissement x1000)

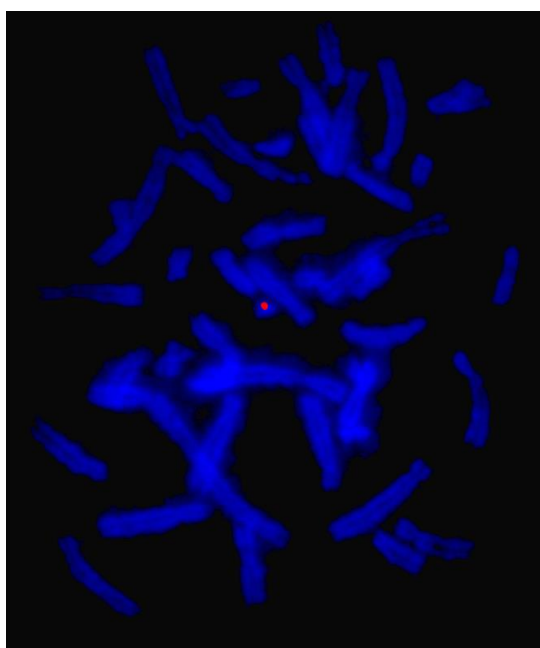
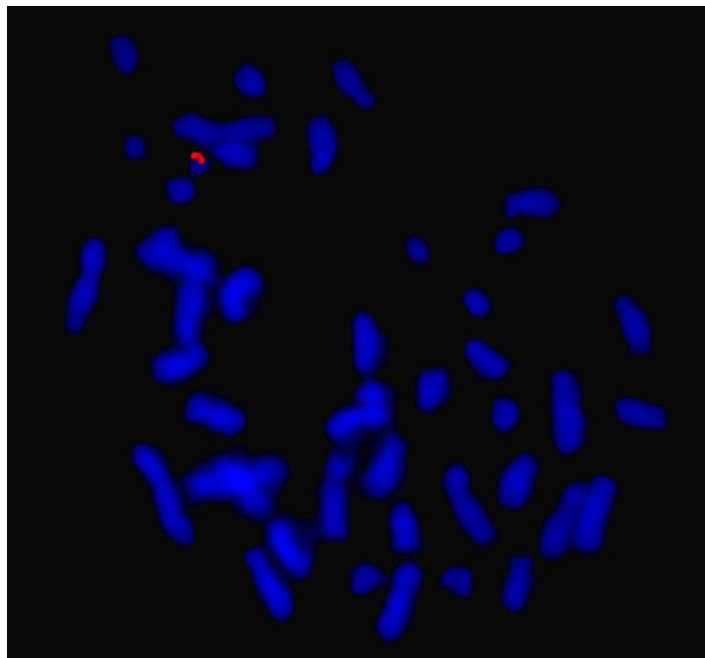


Figure 15 : Métaphase de cellule de marmouset mâle après hybridation de sonde du chromosome Y obtenue à partir du BAC CH259-387M22 et avec de l'ADN compétiteur humain (grossissement x1000)



2.3.2.2.1.1.4. Sondes retenues

Au vu des résultats de qualité pour toutes les sondes testées, quel que soit le BAC dont la sonde a pu être issue ou quel que soit l'ADN compétiteur utilisé, toutes les sondes ont été retenues pour passer à l'étape de l'hybridation sur tissu.

2.3.2.2.1.2. Sonde du chromosome X

2.3.2.2.1.2.1. CH259-113N17

Figure 16 : Métaphase de cellule de marmouset mâle après hybridation de sonde du chromosome X obtenue à partir du BAC CH259-113N17 et avec de l'ADN compétiteur de marmouset (grossissement x1000)

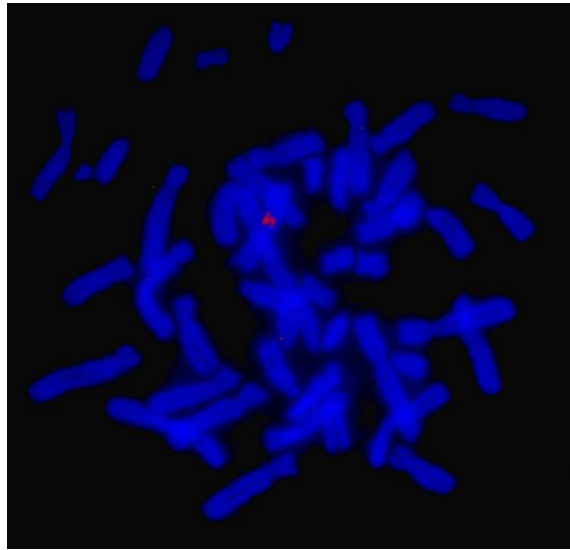
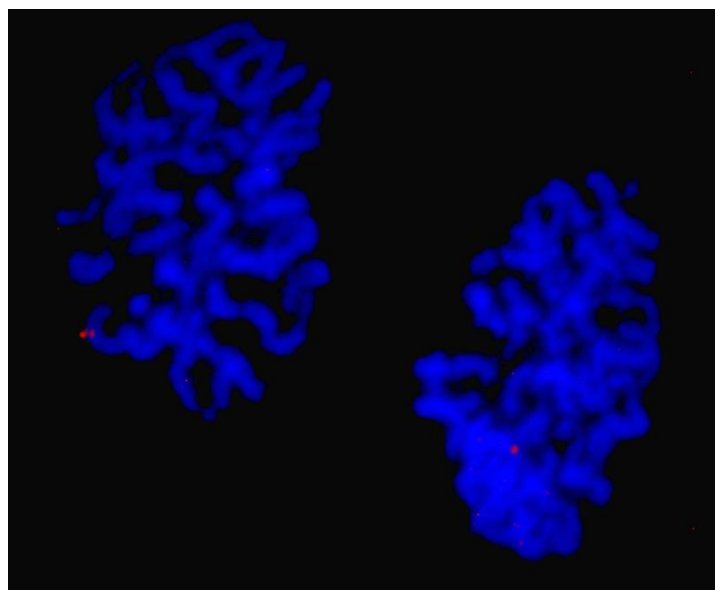


Figure 17 : Métaphase de cellule de marmouset mâle après hybridation de sonde du chromosome X obtenue à partir du BAC CH259-113N17 et avec de l'ADN compétiteur humain (grossissement x1000)



2.3.2.2.1.2.2. CH259-135B11

Figure 18 : Métaphase de cellule de marmouset mâle après hybridation de sonde du chromosome X obtenue à partir du BAC CH259-135B11 et avec de l'ADN compétiteur de marmouset (grossissement x1000)

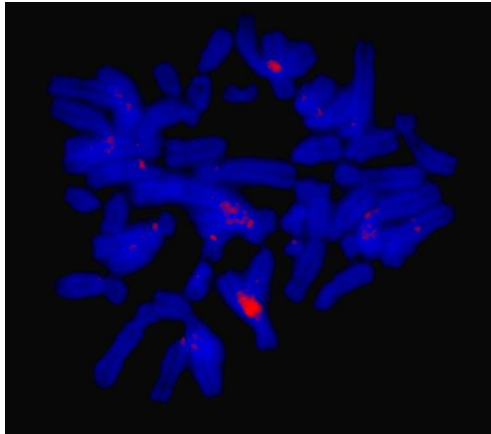
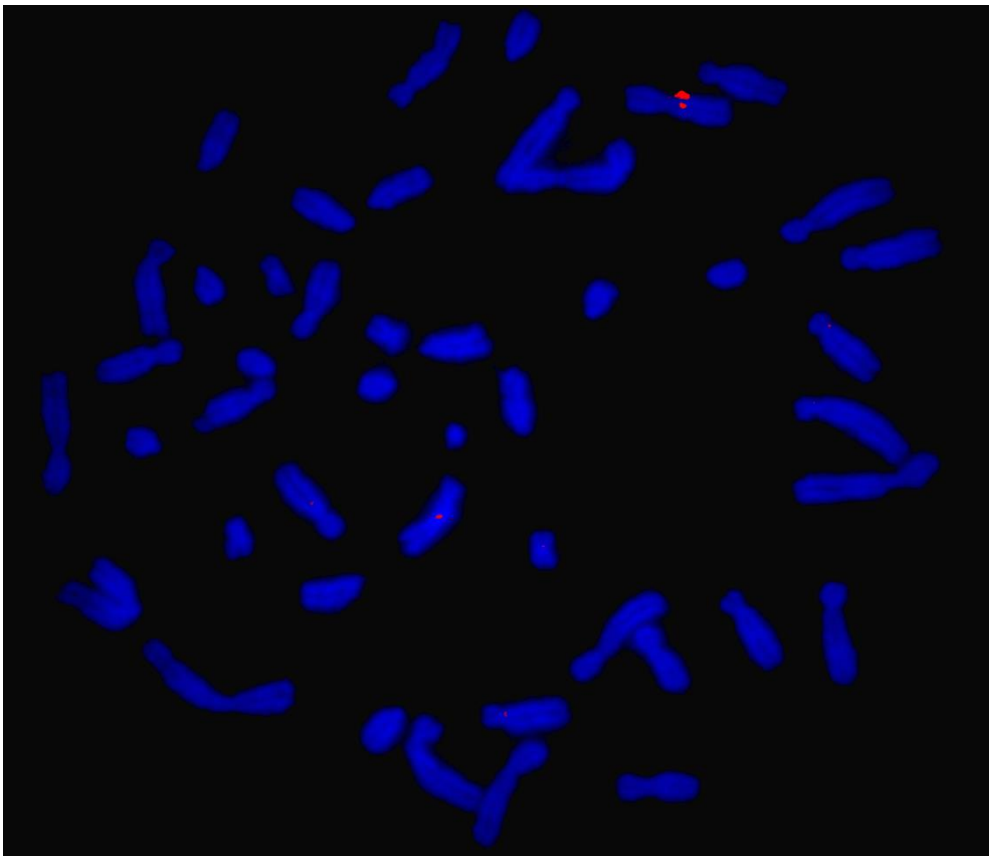


Figure 19 : Métaphase de cellule de marmouset mâle après hybridation de sonde du chromosome X obtenue à partir du BAC CH259-135B11 et avec de l'ADN compétiteur humain (grossissement x1000)



2.3.2.2.1.2.3. CH259-506H3

Figure 20 : Métaphase et interphase de cellule de marmouset mâle après hybridation de sonde du chromosome X obtenue à partir du BAC CH259-506H3 et avec de l'ADN compétiteur de marmouset (grossissement x1000)

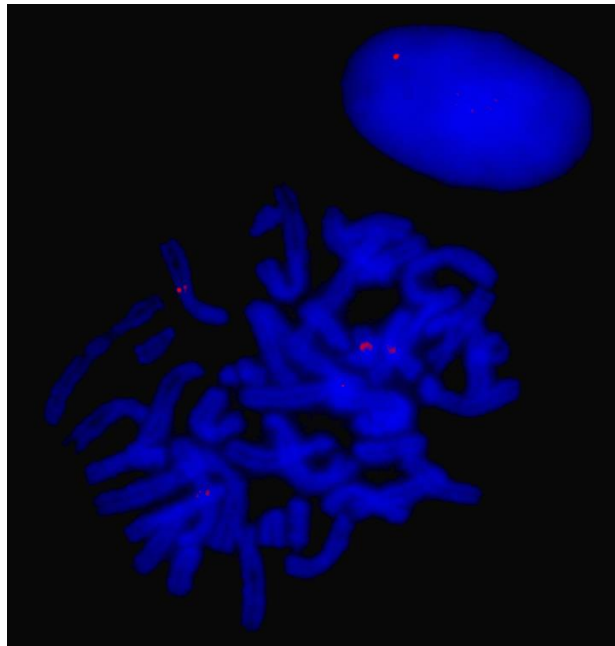
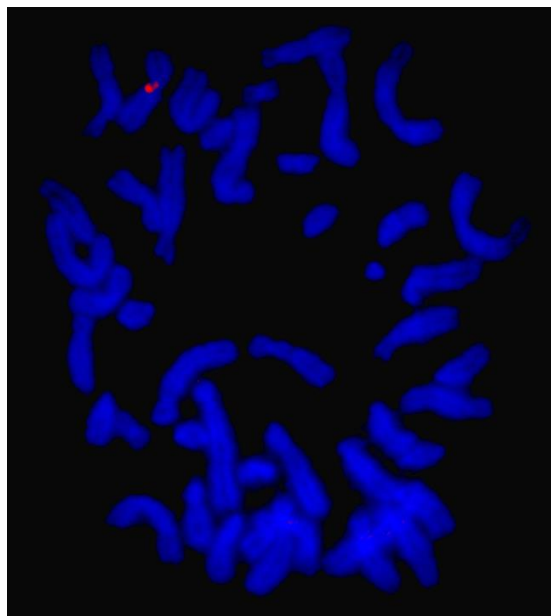


Figure 21 : Métaphase de cellule de marmouset mâle après hybridation de sonde du chromosome X obtenue à partir du BAC CH259-506H3 et avec de l'ADN compétiteur humain (grossissement x1000)



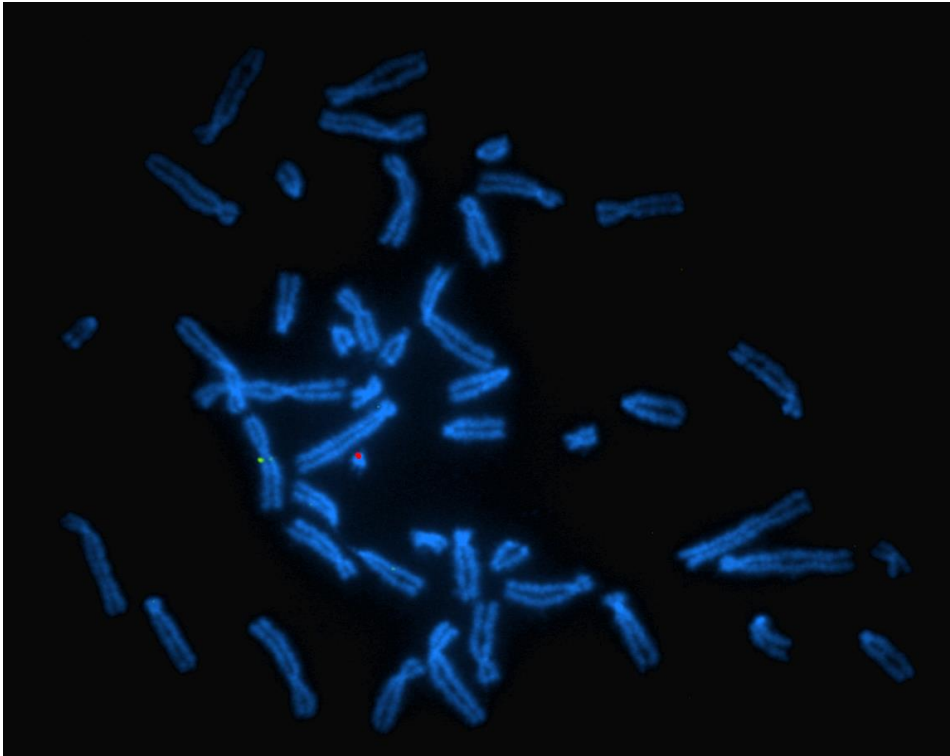
2.3.2.2.1.2.4. Sondes retenues

Les sondes obtenues à partir des BACs CH259-135B11 et CH259-506H3 présentent des hybridations non spécifiques, ces sondes ont donc été écartées de la suite de l'étude. La sonde obtenue à partir du BAC CH259-113N17 montre de bons résultats quel que soit l'ADN compétiteur utilisé, cette sonde est donc retenue pour la suite de l'étude.

2.3.2.2.2. Hybridation des sondes X et Y

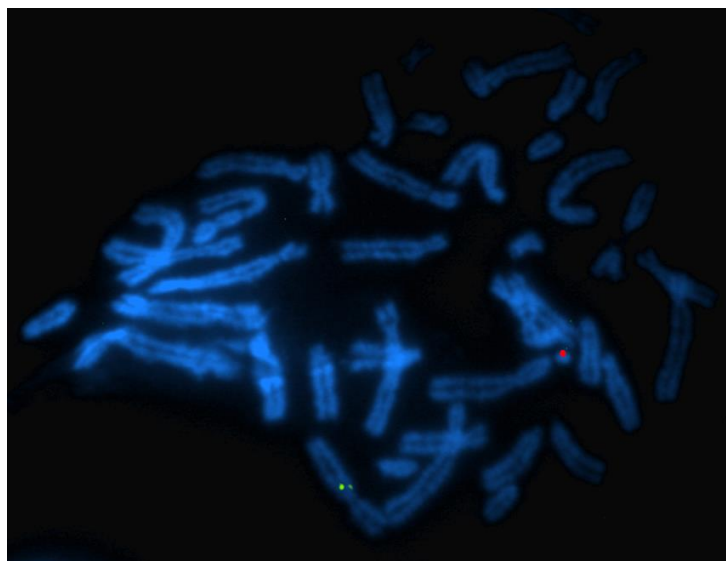
Afin de tester nos sondes sur lames cytologiques, les sondes ciblées sur le chromosome Y ont été mises en commun dans un même tube (CH259-95C4, CH259-376N23, CH259-387M22 ; ADN compétiteur de marmouset et humain) et seront regroupées sous le nom de « sondes anti-Y ». Les sondes ciblées sur le chromosome X (CH259-113N17 ; ADN compétiteur de marmouset et humain) ont aussi été mises en commun et seront rassemblées sous le nom de « sondes anti-X ». Cette fois-ci, les sondes anti-X ont été marquées à la digoxigénine et sont révélées à la fluorescéine (FITC) qui donne un signal fluorescent vert. Les sondes anti-Y sont toujours marquées à la biotine et révélées à la streptavidine donnant un signal fluorescent rouge. Ont ensuite été effectués des hybridations des deux ensembles de sondes sur des mêmes lames.

Figure 22 : Métaphase de cellule de marmouset mâle après hybridation des sondes des chromosomes X et Y (grossissement x1000)



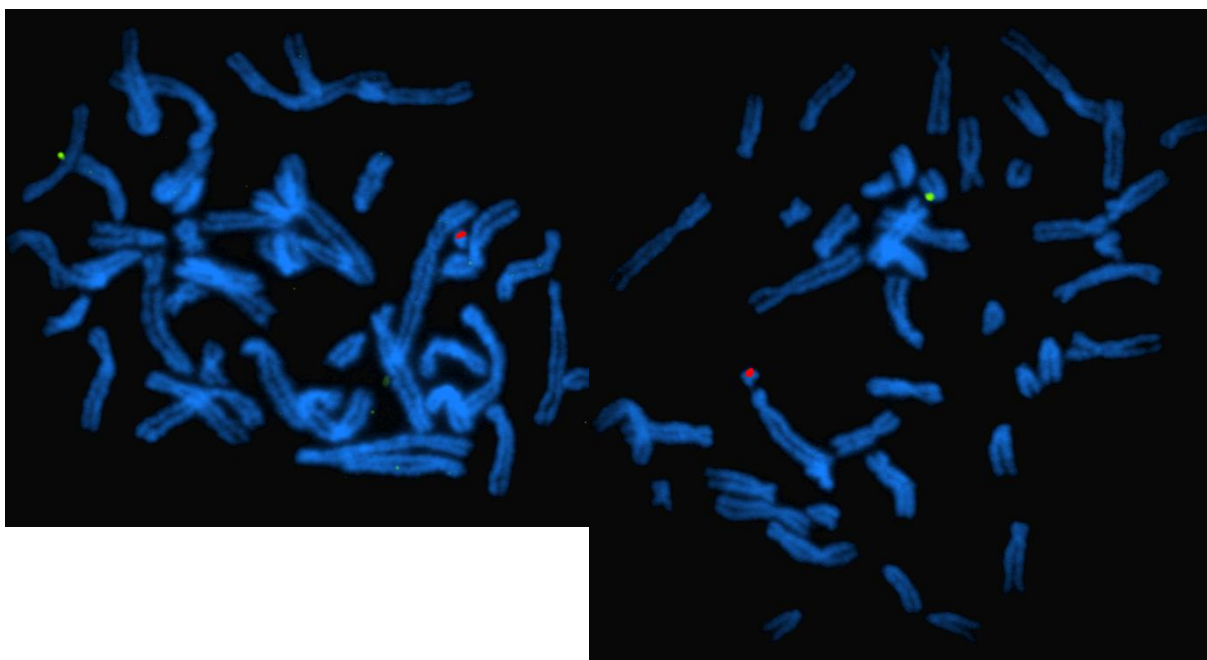
Le signal vert étant jugé un peu faible, une amplification du signal grâce à des anticorps anti-fluorescéine a été réalisée.

Figure 23 : Métaphase de cellule de marmouset mâle après hybridation des sondes des chromosomes X et Y avec amplification du signal vert (grossissement x1000)



La nouvelle hybridation et la manipulation des lames ont engendré une perte du signal témoin bleu. Une nouvelle application de DAPI a alors été faite.

Figure 24 : Métaphases de cellule de marmouset mâle après hybridation des sondes des chromosomes X et Y avec amplification du signal vert et rajout de DAPI (grossissement x1000)



Cette étape a provoqué l'apparition de bruit de fond à certains endroits (points verts faibles sur l'image de gauche) et disparition du signal à d'autres (image de droite). Nous avons donc décidé d'éviter d'amplifier les signaux lors des hybridations sur coupes histologiques, malgré la légère faiblesse du signal vert.

2.3.2.3. Test des sondes sur coupes histologiques

Pour l'étape de FISH sur tissus, les sondes utilisées seront les sondes anti-Y et anti-X, les mêmes que pour l'hybridation sur lames cytologiques, comme expliqué au [paragraphe 2.3.2.2.2.](#)

2.3.2.3.1. Test des sondes sur coupes histologiques d'intestin grêle

Pour l'intestin grêle, le temps de digestion retenu après vérification au microscope à contraste de phases est de 13 minutes.

Figure 25 : Noyaux de cellules de la sous-muqueuse de l'intestin grêle de marmouset mâle après hybridation de sondes anti-X et anti-Y (grossissement x400)

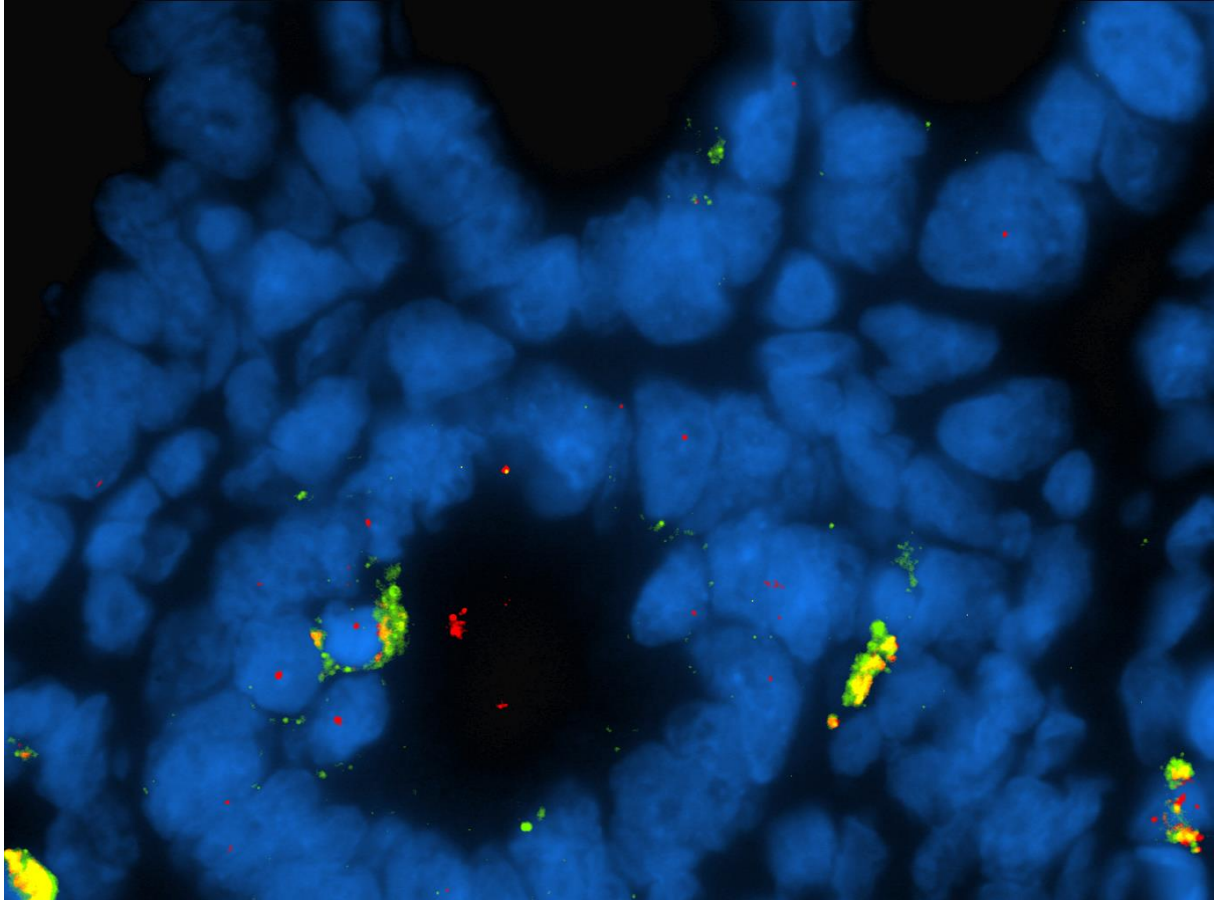
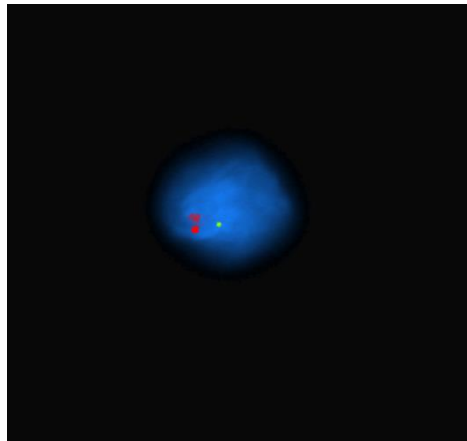


Figure 26 : Noyau d'une cellule isolée de la sous-muqueuse de l'intestin grêle de marmouset mâle après hybridation de sondes anti-X et anti-Y (grossissement x400)

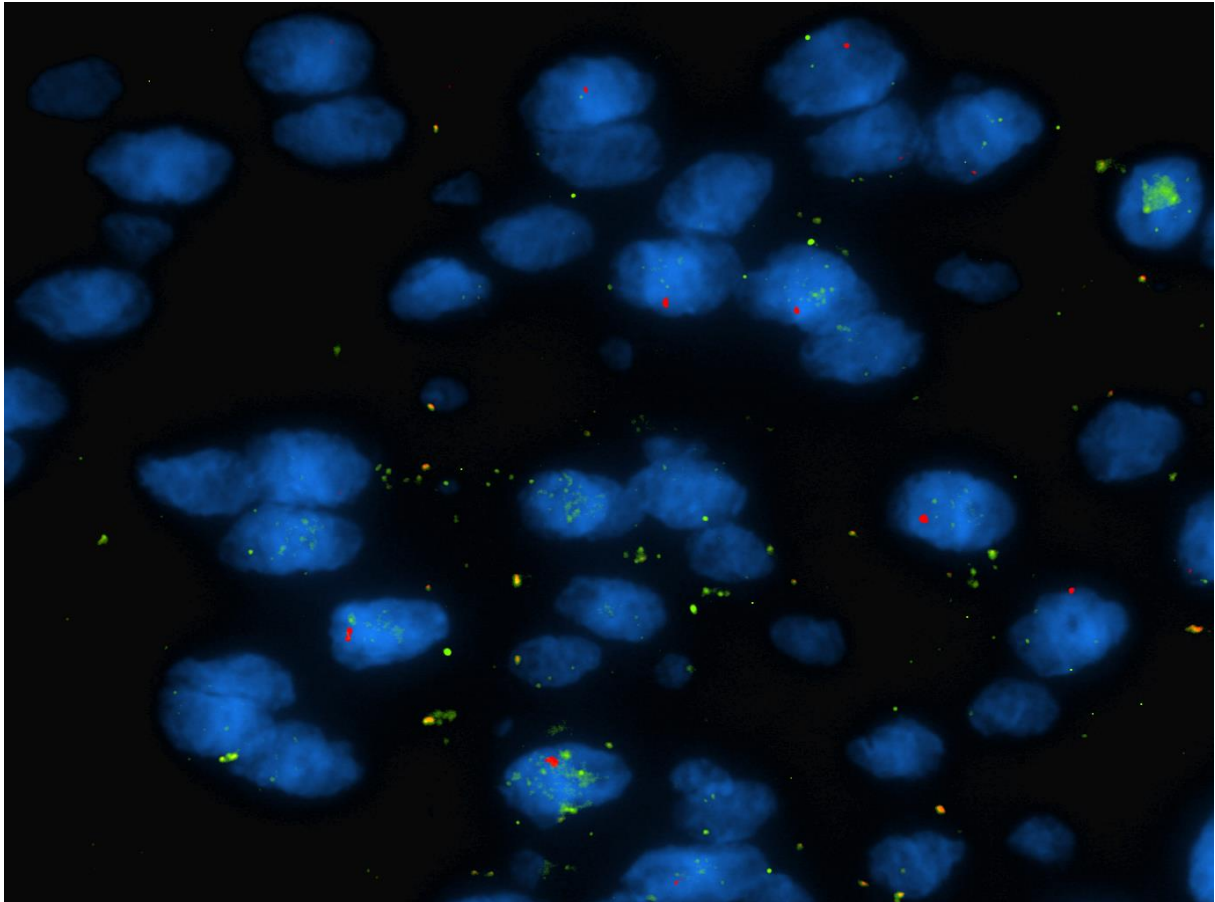


Sur des cellules isolées, par exemple la Figure 25, les sondes marquent correctement, même si un signal rouge plus faible est visible à côté d'un signal rouge fort. Cela peut être dû à un artefact de coloration, une hybridation non spécifique ou une superposition de deux chromosomes Y de deux noyaux différents.

Sur un ensemble de cellules proches, on observe un signal rouge sur un certain nombre d'entre elles, ce qui montre que la sonde anti-Y s'hybride. En revanche, le signal vert est faible voire absent selon les cellules, et un bruit de fond vert est présent par endroits. Nous avons donc décidé d'amplifier le signal vert.

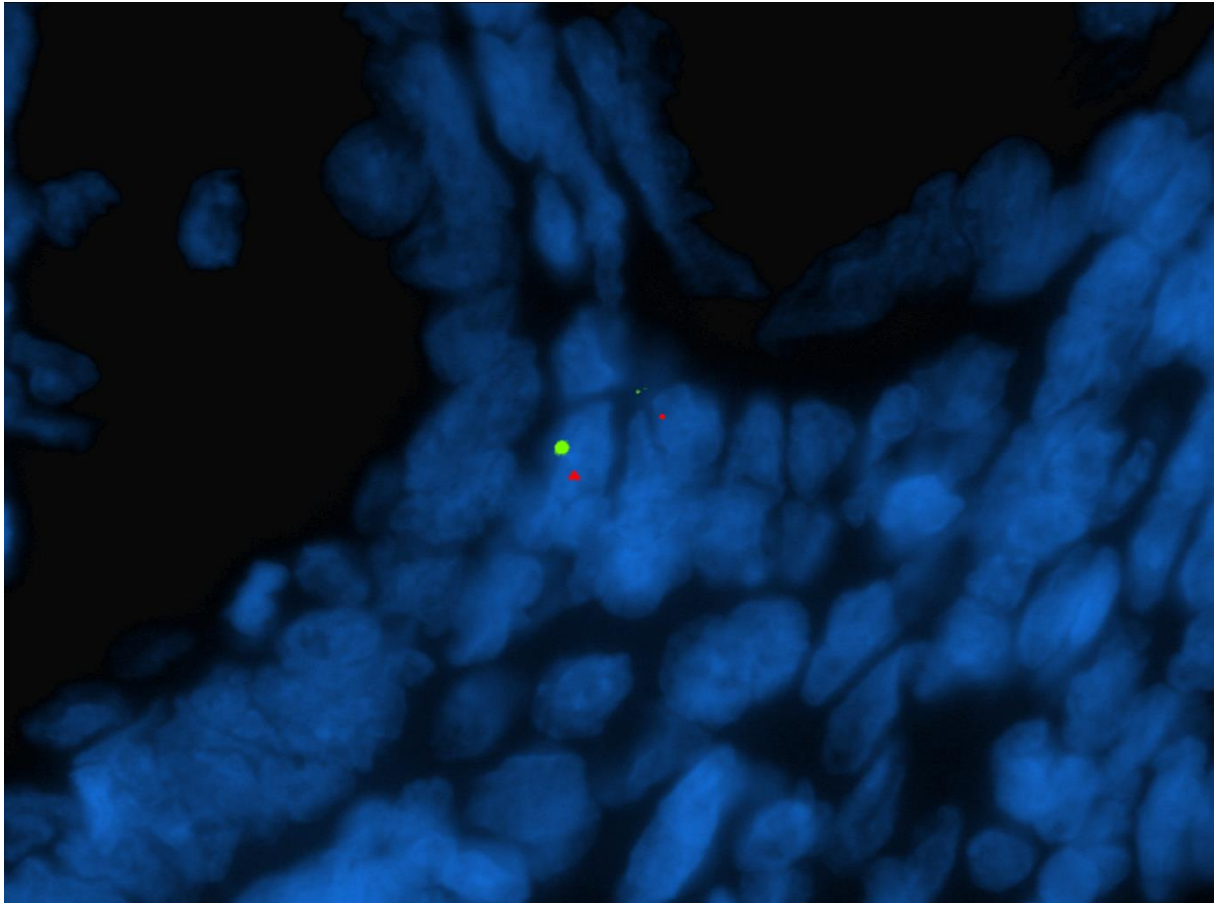
L'absence de signaux sur certaines des cellules peut s'expliquer par le fait que la coupe ne passe pas par les chromosomes d'intérêt, par un défaut d'hybridation ou une digestion à la pepsine insuffisante.

Figure 27 : Noyaux de cellules de la sous-muqueuse de l'intestin grêle de marmouset mâle après hybridation de sondes anti-X et anti-Y avec amplification (grossissement x400)



Après amplification, il y a un bruit de fond important. Nous avons essayé de modifier les paramètres du logiciel CytoVision® pour diminuer la sensibilité aux signaux verts, et sélectionner ainsi les signaux les plus forts.

Figure 28 : Noyaux de cellules de la sous-muqueuse de l'intestin grêle de marmouset mâle après hybridation de sondes anti-X et anti-Y avec amplification et réglages du logiciel (grossissement x400)

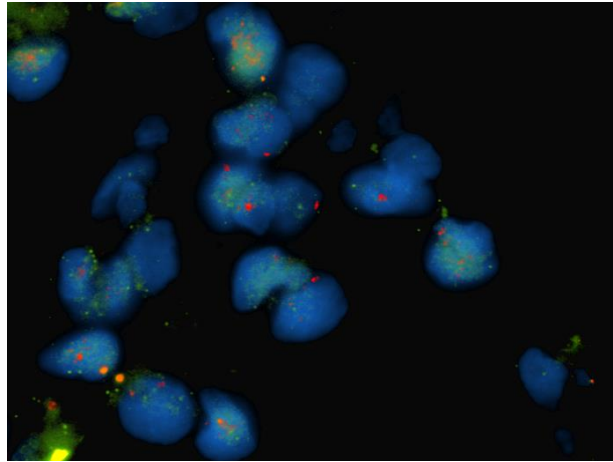


Les réglages imposés au logiciel nous permettent d'avoir des signaux nets et puissants. Cependant, on perd un grand nombre de signaux sur l'image.

2.3.2.3.2. Test des sondes sur coupes histologiques de poumon

Pour le poumon, le temps de digestion retenu après vérification au microscope à contraste de phases est de 7 minutes.

Figure 29 : Noyaux de cellules de la muqueuse de poumon de marmouset mâle après hybridation de sondes anti-X et anti-Y (grossissement x400)



Le bruit de fond est important mais des signaux sont discernables. Le signal rouge anti-Y est net et puissant, sur la quasi-totalité des noyaux. Le signal vert anti-X est faible, parfois discernable du bruit de fond sur certaines cellules.

2.3.2.3.3. Test des sondes sur coupes histologiques de testicule

En théorie, les images sur coupes de testicules nous auraient permis de visualiser les différentes étapes de la méiose avec, entre autres, des spermatozoïdes présentant soit un signal rouge, soit un signal vert. Cependant, la qualité des coupes après digestion ne nous a pas permis d'obtenir des images de qualité. Il est possible que ce défaut soit dû à la congélation pour la conservation du tissu.

2.4. DISCUSSION

Notre étude avait pour objectif de créer une sonde d'ADN dirigée vers le chromosome Y du marmouset commun *Callithrix jacchus*, afin d'obtenir des images au microscope électronique à épifluorescence après marquage par FISH. Il aurait été possible de localiser des cellules souches mâles de marmouset, préalablement implantées chez un individu receveur femelle par greffe grâce à des prothèses micro-structurées de PDMS, sur des coupes histologiques d'encéphale.

Dans ce but, plusieurs étapes pratiques ont été effectuées. Cette partie de discussion revient sur les difficultés rencontrées et certaines solutions proposées.

2.4.1. Obtention des BACs

Les BACs ont été commandés sur le site <https://bacpacresources.org/>, qui opère depuis le Children's Hospital Oakland Research Institute. Le délai d'obtention des BACs fut de deux mois et demi, retardant les manipulations expérimentales. En effet, les bactéries contenant les BACs ont d'abord nécessité une préculture par le laboratoire expéditeur, pour en faire des colonies dans de l'agar. De plus, des renseignements d'adresse et de facturation manquaient à l'expéditeur pour envoyer le colis. Enfin, des incidents météorologiques ont eu lieu en Californie, retardant encore plus l'envoi.

Une fois reçus, les BACs ont de suite pu être utilisés. Après la préculture bactérienne effectuée par nos soins, un glycérol stock a été réalisé. Il a permis d'obtenir une population bactérienne sauvegardée, destinée à être utilisée par la suite de l'étude pour réaliser des sondes ADN à plus grande échelle.

2.4.2. Intensité du signal de la sonde anti-X

Sur lame histologique, et de manière moindre sur lame cytologique, la sonde anti-X donne un signal faible. Nous avons décidé dans notre étude d'amplifier le signal pour mieux le visualiser. Il est envisageable que cette faiblesse de signal résulte d'un manque d'hybridation de la sonde par rapport à la sonde anti-Y. En effet, la sonde anti-Y s'hybride plusieurs fois sur le même chromosome Y car sa cible TSPY est une région répétée. En revanche, la sonde anti-X ne s'hybride qu'une seule fois car sa cible est le gène XIST qui n'est présent qu'une fois sur le chromosome X. Ces ratios d'hybridations par chromosome résultent en une différence d'intensité avec le signal Y beaucoup plus fort que le signal X. Il est donc parfois difficile de visualiser le signal de la sonde anti-X.

Plusieurs essais pourraient être effectués pour obtenir un signal X fort avec, par exemple, un mélange des sondes issues des BACs pour le chromosome Y et des sondes obtenues par microdissection (Rigal, 2019) pour le chromosome X. De plus, pour continuer à utiliser les chromosomes bactériens, une région répétée uniquement sur le chromosome X du

marmouset commun pourrait être recherchée. Cela permettrait d'obtenir une quantité d'hybridations importante sur le chromosome X, résultant en un signal fort comme actuellement pour le signal Y.

2.4.3. Hybridation sur lames histologiques

2.4.3.1. Prétraitement des lames histologiques

Plusieurs durées de digestions à la pepsine ont été essayées au moment du prétraitement des lames histologiques. Les lames ont été incubées à 37°C pendant un temps allant de 2 à 15 minutes. La qualité de digestion a été évaluée au microscope à contraste de phases.

Malgré ces vérifications post-digestion, les résultats après FISH sont peu concluants. Lors de l'observation au microscope électronique à épifluorescence, certaines lames ne présentaient aucun signal témoignant d'une digestion trop faible des tissus, et certaines présentaient des signaux orangés sur une grande partie des tissus, imputables à une digestion trop importante. De plus, sur les images retenues, il y a parfois des cellules qui ne présentent aucun signal, ou qu'un seul signal sur les deux. Cela peut être dû à une digestion trop faible et non maîtrisée des tissus.

Il nous faut donc mettre au point cette étape de prétraitement des lames histologiques. Cela peut se faire par exemple en utilisant une autre molécule pour la digestion des tissus. De plus, nous avons vérifié la digestion des tissus à l'aide d'un microscope à contraste de phases, avant l'étape d'hybridation. Il nous a donc été impossible de juger réellement du temps de digestion adapté à la FISH pour chaque tissu. Or, en raison de la faible quantité de sondes produites, nous avons décidé de ne pas hybrider sur toutes les lames, ce qui a conduit à une mauvaise précision au niveau de la digestion des tissus.

2.4.3.2. Hybridation sur lames d'encéphale de marmouset commun

Pour répondre à l'objectif de notre étude, il est finalement important de savoir si l'outil et les protocoles que nous avons mis au point sont utilisables sur des lames histologiques d'encéphale de marmouset commun.

Nos sondes peuvent être utilisées pour hybridation sur lames cytologiques et sur lames histologiques, malgré un besoin d'adaptation du protocole de prétraitement des lames histologiques. Notre protocole sur coupes de tissus a été travaillé pour une épaisseur de 4 μm .

Cependant, il nous a été impossible d'accéder à des coupes d'encéphales de marmouset de 4 μm d'épaisseur. En effet, les coupes pouvant être fournies par l'équipe iDREAM font 30 μm d'épais. Le service d'anatomie pathologique de l'ENVT ne possédait que des blocs paraffinés d'encéphales d'individus femelles qui avaient été congelés, la congélation n'étant pas un moyen de conservation adapté à l'hybridation *in situ*.

Pour pallier ce problème, il peut être envisagé de recouper les coupes de 30 μm en coupes de 4 μm le plus délicatement possible pour ne pas altérer l'organisation tissulaire, d'élaborer un protocole de digestion pour une épaisseur de coupe de 30 μm , d'augmenter la quantité de sondes par lame.

CONCLUSION

Les thérapies régénératives sont de plus en plus étudiées et constituent l'avenir de la médecine. Les cellules souches mésenchymateuses sont les plus utilisées en recherche, du fait de leur facilité de prélèvement et d'administration, ainsi que de leur innocuité démontrée. Les cellules souches embryonnaires, moins utilisées, éveillent néanmoins un intérêt grandissant de la part des chercheurs. En effet, l'espoir de pouvoir régénérer un tissu lésé et traiter des affections chroniques incurables à ce jour est motivant. Plusieurs études précliniques utilisant les CSE sont actuellement menées à travers le monde pour avancer sur le sujet. Avant d'effectuer des essais sur l'Homme, il est nécessaire, pour objectiver l'efficacité et l'innocuité des thérapies cellulaires expérimentales, de passer par des modèles animaux, dont le marmouset commun *Callithrix jacchus* qui est un excellent modèle en neurosciences. Dans cette optique, il faut pouvoir suivre les CSE implantées pour juger de leur viabilité, leur distribution et leur devenir. Il faut donc mettre au point des techniques de tracking cellulaire.

Le tracking cellulaire peut se faire par différentes approches, que ce soit *in vivo* (IRM, PECT, SPECT, fluorescence optique, bioluminescence) ou *post mortem* (immunohistochimie, hybridation *in situ*), qui donnent des informations différentes et qui sont complémentaires. L'intérêt de la FISH pour le tracking cellulaire de cellules souches est que cette méthode n'intervient pas lors du vivant des cellules : l'absence de modification des cellules n'influe pas sur le comportement des CSE telles qu'elles seront lors de thérapies.

L'équipe iDREAM (INSERM, Université Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse NeuroImaging Center, UMR 1214, Toulouse, France, Dr. Isabelle Loubinoux) a besoin d'un outil de tracking cellulaire dans le cadre d'un travail sur une thérapie régénérative d'AVC grâce à des CSE. C'est pourquoi nous avons fabriqué des sondes d'ADN marquées dirigées vers les chromosomes X et Y du marmouset commun afin d'identifier par FISH des précurseurs neuraux, obtenus à partir de cellules souches embryonnaires mâles, administrés chez des individus femelles de la même espèce. Ce travail, effectué au sein de la plateforme de cytogénétique de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse sous la direction de M. Alain Pinton et du Pr. Isabelle Raymond-Letron, participe à la recherche menée par l'équipe iDREAM, sachant que des ajustements de protocoles seront nécessaires.

BIBLIOGRAPHIE

EVANS M., KAUFMAN M. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. Jul. 292:154-156

MARTIN G. R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Dec. 78(12):7634-7638

MELTON D.A., COWEN. C. (2009). "Stemness": Definitions, Criteria, and Standards. *Essentials of Stem Cell Biology (Second Edition)*. 23-24

TARDIF S.D., SMUCNY D.A., ABBOTT D.H., MANSFIELD K., SCHULTZ-DARKEN N., YAMAMOTO M.E. (2003). Reproduction in captive common marmosets (*Callithrix jacchus*). *Comparative Medicine*. Aug. 53(4):364-368

SOLTER D., KNOWLES B.B. (1975). Immunosurgery of mouse blastocyst. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Dec. 72(12):5099-102.

SASAKI E. HANAZAWA K., KURITA R., AKATSUKA A., YOSHIZAKI T., ISHII H., TANIOKA Y., OHNISHI Y., SUEMIZU H., SUGAWARA A., TAMAOKI N., IZAWA K., NAKAZAKI Y., HAMADA H., SUEMORI H., ASANO S., NAKATSUJI N., OKANO H., TANI K. (2005). Establishment of Novel Embryonic Stem Cell Lines Derived from the Common Marmoset. *Stem Cells*. Oct. 23(9):1304-13

CHEN H., HATTORI F., MURATA M., LI W., YUASA S., ONIZUKA, T., SHIMOJI K., OHNO Y., SASAKI E., KIMURA K., HAKUNO D., SANO M., MAKINO S., OGAWA S., FUKUDA K. (2008). Common marmoset embryonic stem cell can differentiate into cardiomyocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. May. 369(3):801-6.

MÜLLER T., FLEISCHMANN G., EILDERMANN K., MÄTZ-RENSING K., HORN P.A., SASAKI E., BEHR R. (2009). *Human Reproduction*. Jun. 24(6):1359-72

SHIMADA H., OKADA Y., IBATA K., EBISE H., OTA S., TOMIOKA I., NOMURA T., MAEDA T., KOHDA K., YUZAKI M., SASAKI E., NAKAMURA M., OKANO H. (2012). Efficient derivation of multipotent neural stem/progenitor cells from non-human primate embryonic stem cells. *PLoS One*. Nov. 7(11)

DIEKMANN U., NAUJOK O., BLASCZYK R., MÜLLER T. (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. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Apr. 9(4):473-9

BERIKA M., ELGAYYAR M.E., EL-HASHASH A.H.K. (2014). Asymmetric cell division of stem cells in the lung and other systems. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. Jul. 2:33

HIYAMA E., HIYAMA K. (2007). Telomere and telomerase in stem cells. *British Journal of Cancer*. Apr. 96(7):1020-4.

BOYER L.A., LEE T.I., COLE M.F., JOHNSTONE S.E., LEVINE S.S., ZUCKER J.P., GUENTHER M.G., KUMAR R.M., MURRAY H.L., JENNER R.G., GIFFORD D.K., MELTON D.A., JAENISCH R., YOUNG R.A. (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*. Sept. 122(6):947-56.

TAKAHASHI K., YAMANAKA S. (2006). Induction of pluripotent cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. Aug. 126(4):663-76.

LOH Y.H., WU Q., CHEW J.L., VEGA V.B., ZHANG W., CHEN X., BOURQUE G., GEORGE J., LEONG B., LIU J., WONG K.Y., SUNG K.W., LEE C.W., ZHAO X.D., CHIU K.P., LIPOVICH L., KUZNETSOV V.A., ROBSON P., STANTON L.W., WEI C.L., RUAN Y., LIM B., NG H.H. (2006). The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nature Genetics*. Apr. 38(4):431-40.

AVILION A.A., NICOLIS S.K., PEVNY L.H., PEREZ L., VIVIAN N., LOVELL-BADGE R. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes and Development*. Jan. 17(1):126-40.

MITSUI K., TOKUZAWA Y., ITOH H., SEGAWA K., MURAKAMI M., TAKAHASHI K., MARUYAMA M., MAEDA M., YAMANAKA S. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*. May. 113(5):631-42.

NAGAI N., KAWAO N., OKADA K., OKUMOTO K., TERAMURA T., UESHIMA S., UMEMURA K., MATSUO O. (2010). Systemic transplantation of embryonic stem cells accelerates brain lesion decrease and angiogenesis. *Neuroreport*. Jun. 21(8):575-9.

SU M., SONG Y., HE Z., HU R., ROOD D., LAI L. (2015). Administration of embryonic stem cell-derived thymic epithelial progenitors expressing MOG induces antigen-specific tolerance and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Autoimmunity Reviews*. Apr. 58:36-47.

PRIEST C.A., MANLEY N.C., DENHAM J., WIRTH E.D., LEBKOWSKI J.S. (2015). Preclinical safety of human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitors supporting clinical trials in spinal cord injury. *Regenerative medicine*. Nov. 10(8):939-58.

MEHAT M.S., SUNDARAM V., RIPAMONTI C., ROBSON A.G., SMITH A.J., BOROOAH S., ROBINSON M., ROSENTHAL A.N., INNES W., WELEBER R.G., LEE R.W.J. , CROSSLAND M., RUBIN G.S., DHILLON B., STEEL D.H.W. , ANGLADE E, LANZA R.P., ALI R.R., MICHAELIDES M., BAINBRIDGE J.W.B. (2018). Transplantation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelial Cells in Macular Degeneration. *Ophthalmology*. Nov. 125(11):1765-1775.

BÉDUER A., VAYSSE L., FLAHAUT E., SEICHEPINE F., LOUBINOUX I., VIEU C. (2011). Multi-scale engineering for neuronal cell growth and differentiation. *Microelectronic Engineering*. Aug. 88(8):1668-1671.

VAYSSE L., BEDUER A., SOL J.C., VIEU C., LOUBINOX I. (2015). Micropatterned bioimplant with guided neuronal cells to promote tissue reconstruction and improve functional recovery after primary motor cortex insult. *Biomaterials*. Jul. 58:46-53.

DAVOUST C., PLAS B., BEDUER A., DEMAÏN B, SALABERT A-S., SOL J.C., VIEU C., VAYSSE L, LOUBINOX I. (2017). Regenerative potential of primary adult human neural stem cells on micropatterned bio-implants boosts motor recovery. *Stem Cell Research & Therapy*. Nov. 8(1):253.

GU E., CHEN W.Y., GU J., BURRIDGE P., WU J.C. (2012). Molecular Imaging of Stem Cells: Tracking Survival, Biodistribution, Tumorigenicity, and Immunogenicity. *Theranostics*. Apr. 2(4): 335–345.

CAO F., DRUKKER M., LIN S., SHEIKH A.Y., XIE X., LI A., CONNOLLY A.J., WEISSMAN I.L., WU J.C. (2007). Molecular imaging of embryonic stem cell misbehavior and suicide gene ablation. *Cloning and Stem Cells*. Spring. 9(1):107-17

RUDELIUS M., DALDRUP-LINK H.E., HEINZMANN U., PIONTEK G., SETTLES M., LINK T.M., SCHLEGEL J. (2003). Highly efficient paramagnetic labelling of embryonic and neuronal stem cells. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. Jul. 30(7):1038-44.

THOMSEN H.S. (2016). Nephrogenic systemic fibrosis: a serious adverse reaction to gadolinium. *Acta Radiologica*. Jun. 57(6):643-8.

LI Z., SUZUKI Y., HUANG M., CAO F., XIE X., CONNOLLY A.J., YANG P.C., WU J.C. (2008). Comparison of reporter gene and iron particle labeling for tracking fate of human embryonic stem cells and differentiated endothelial cells in living subjects. *Stem cells*. Apr. 26(4):864-73.

CROSSGROVE J., ZHENG W. (2004). Manganese toxicity upon overexposure. *NMR in Biomedicine*. Dec. 17(8):544-53.

BULTE J.M.W. (2009). *In Vivo* MRI Cell Tracking: Clinical Studies. *American Journal of Roentgenology*. Aug. 193(2): 314–325.

ZHU J., ZHOU L., XINGWU F. (2006). Tracking Neural Stem Cells in Patients with Brain Trauma. *The New England Journal of Medicine*. Nov. 355(22):2376-8.

NGUYEN P.K., RIEGLER J., WU J.C. (2014). Stem cell imaging: from bench to bedside. *Cell Stem Cell*. Apr. 14(4):431-44.

BOSE R.J.C., MATTREY R.F. (2018). Accomplishments and challenges in stem cell imaging *in vivo*. *Drug Discovery Today*. Feb. 24(2):492-504.

CEN P., CHEN J., HU C., FAN L., WANG J., LI L. (2016). Noninvasive in-vivo tracing and imaging of transplanted stem cells for liver regeneration. *Stem Cell Research and Therapy*. Sep. 7:143.

LANG C., LEHNER S., TODICA A., BOENING G., FRANZ W.M., BARTENSTEIN P., HACKER M., DAVID R. (2016). Positron emission tomography based in-vivo imaging of early phase stem cell retention after intramyocardial delivery in the mouse model. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. Oct. 40(11):1730-8.

ELHAMI E., DIETZ B., XIANG B., DENG J., WANG F., CHI C., GOERTZEN A.L., MZENGEZA S., FREED D., ARORA R.C., TIAN G. (2013). Assessment of three techniques for delivering stem cells to the heart using PET and MR imaging. *EJNMMI Research*. Oct. 3(1):72.

SOOD V., MITTAL B.R., BHANSALI A., SINGH B., KHANDELWAL N., MARWAHA N., JAIN A. (2015). Biodistribution of ¹⁸F-FDG-Labeled Autologous Bone Marrow-Derived Stem Cells in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus: Exploring Targeted and Intravenous Routes of Delivery. *Clinical Nuclear Medicine*. Sep. 40(9):697-700.

GARIKIPATI V.N.S., JADHAV S., PAL L., PRAKASH P., DIKSHIT M., NITYANAND S. (2014). Mesenchymal stem cells from fetal heart attenuate myocardial injury after infarction: an *in vivo* serial pinhole gated SPECT-CT study in rats. *PLoS One*. Jun. 27;9(6).

CHENG S.H., YU D., TSAI H.M., MORSHED R.A., KANOJIA D., LO L.W., LEONI L., GOVIND Y., ZHANG L., ABOODY K.S., LESNIAK M.S., CHEN C.T., BALYASNIKOVA I.V. (2016). Dynamic *In Vivo* SPECT Imaging of Neural Stem Cells Functionalized with Radiolabeled Nanoparticles for Tracking of Glioblastoma. *The Journal of Nuclear Medicine*. Feb. 57(2):279-84.

RODRIGUEZ-PORCEL M., WU J.C., GAMBHIR S.S. (2009). Molecular imaging of stem cells. *StemBook*.

ZANZONICO P., KOEHNE G., GALLARDO H.F., DOUBROVIN M., DOUBROVINA E., FINN R., BLASBERG R.G., RIVIERE I., O'REILLY R.J., SADELAIN M., LARSON S.M. (2006). [¹³¹I]FIAU labeling of genetically transduced, tumor-reactive lymphocytes: cell-level dosimetry and dose-dependent toxicity. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. Sep. 33(9):988-97.

GAVINS F.N.E., SMITH H.K. (2015). Cell tracking technologies for acute ischemic brain injury. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. Jul. 35(7):1090–1099.

WANG Y., XU C., OW H. (2013). Commercial Nanoparticles for Stem Cell Labeling and Tracking. *Theranostics*. Jul. 3(8):544–560.

YAMAUCHI K., YANG M.P., YAMAMOTO N., XU M., AMOH Y., TSUJI K., BOUVET M., TSUCHIYA H., TOMITA K., MOOSSA A.R., HOFFMAN R.M. (2005). Real-time in vivo dual-color imaging of intracapillary cancer cell and nucleus deformation and migration. *Cancer Research*. May. 65(10):4246-52

CAO Y.A., WAGERS A.J., BEILHACK A., DUSICH J., BACHMANN M.H., NEGRIN R.S., WEISSMAN I.L., CONTAG C.H. (2004). Shifting foci of hematopoiesis during reconstitution from single stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Jan. 101(1):221-226.

FOWLER M., VIROSTKO J., CHEN Z., POFFENBERGER G., RADHIKA A., BRISSOVA M., SHIOTA M., NICHOLSON W.E., SHI Y., HIRSHBERG B., HARLAN D.M., JANSEN E.D., POWERS A.C. (2005). Assessment of pancreatic islet mass after islet transplantation using in vivo bioluminescence imaging. *Transplantation*. Apr. 79(7):768-776.

LU Y., DANG H., MIDDLETON B., ZHANG Z., WASHBURN L., CAMPBELL-THOMPSON M., ATKINSON M.A., GAMBHIR S.S., TIAN J., KAUFMAN D.L. (2004). Bioluminescent monitoring of islet graft survival after transplantation. *Molecular Therapy*. Mar. 9(3):428-435.

RUDIN M., RAUSCH M., STOECKLI M. (2005). Molecular imaging in drug discovery and development: potential and limitations of nonnuclear methods. *Molecular imaging and biology*. Feb. 7(1):5-13.

LORENZ W.W., MCCANN R.O., LONGIARU M., CORMIER M.J. (1991). Isolation and expression of a cDNA encoding *Renilla reniformis* luciferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. May. 88(10):4438-4442.

BHAUMIK S., GAMBHIR S. S. (2002). Optical imaging of *Renilla* luciferase reporter gene expression in living mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Jan. 99(1):377-382.

LUKER K.E., LUKER G.D. (2008). Applications of bioluminescence imaging to antiviral research and therapy: multiple luciferase enzymes and quantitation. *Antiviral Research*. Jun. 78(3):179-187.

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

GENOVE G., DEMARCO U., XU H., GOINS W.F., AHRENS E.T., 2005. A new transgene reporter for in vivo magnetic resonance imaging. *Nature Medicine*. Apr. 11(4):450-454.

LIU J., CHENG E.C.H., LONG R.C., YANG S.H., WANG L., CHENG P.H., YANG J., WU D., MAO H., CHAN A.W.S. (2009). Noninvasive monitoring of embryonic stem cells in vivo with MRI transgene reporter. *Tissue Engineering*. Dec. 15(4):739-747.

TANNOUS B.A., GRIMM J., PERRY K.F., CHEN J.W., WEISSLEDER R., BREAKFIELD X.O. (2006). Metabolic biotinylation of cell surface receptors for in vivo imaging. *Nature Methods*. May. 3(5):391-396.

BENGTSSON N.E., BROWN G., SCOTT E.W., WALTER G.A. (2010). lacZ as a genetic reporter for real-time MRI. *Magnetic Resonance in Medicine*. Mar. 63(3):745-753.

ALFKE H., STÖPPLER H., NOCKEN F., HEVERHAGEN J.T., KLEB B., CZUBAYKO F., KLOSE K.J. (2003). *In vitro* MR imaging of regulated gene expression. *Radiology*. Aug. 228(2):488-492.

GILAD A.A., MCMAHON M.T., WALCZAK P., WINNARD P.T., RAMAN V., VAN LAARHOVEN H.W.M., SKOGLUND C.M., BULTE J.W.M., VAN ZIJL P.C.M. (2007). Artificial reporter gene providing MRI contrast based on proton exchange. *Nature Biotechnology*. Feb. 25(2):217-219.

CAMPAN M., LIONETTI V., AQUARO G.D., FORINI F., MATTEUCCI M., VANNUCCI L., CHIUPPESI F., DI CRISTOFANO C., FAGGIONI M., MAIOLI M., BARILE L., MESSINA E., LOMBARDI M., PUCCI A., PISTELLO M. RECCHIA F.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. *American Journal of Physiology*. Jun. 300(6):2238-2250.

JIANG H., CHENG Z., TIAN M., ZHANG H. (2011). *In vivo* imaging of embryonic stem cell therapy. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. Apr. 38(4):774-784.

POMPER M.G., HAMMOND H., YU X., YE Z., FOSS C.A., LIN D.D., FOX J.J., CHENG L. (2009). Serial imaging of human embryonic stem-cell engraftment and teratoma formation in live mouse models. *Cell research*. Mar. 19(3):370-379.

GYÖNGYÖSI M., BLANCO J., MARIAN T., TRÓN L., PETNEHÁZY O., PETRASI Z., HEMETSBERGER R., RODRIGUEZ J., FONT G., PAVO I.J., KERTÉSZ I., BALKAY L., PAVO N., POSA A., EMRI M., GALUSKA L., KRAITCHMAN D.L., WOJTA J., HUBER K., GLOGAR D. (2008). Serial noninvasive *in vivo* positron emission tomographic tracking of percutaneously intramyocardially injected autologous porcine mesenchymal stem cells modified for transgene reporter gene expression. *Cardiovascular Imaging*. Sep. 1(2):94-103.

HUNG S.C., DENG W.P., YANG W.K., LIU R.S., LEE C.C., SU T.C., LIN R.J., YANG D.M., CHANG C.W., CHEN W.H., WEI H.J., GELOVANI J.G. (2005). Mesenchymal stem cell targeting of microscopic tumors and tumor stroma development monitored by noninvasive *in vivo* positron emission tomography imaging. *Clinical Cancer Research*. Nov. 11(21):7749-7756.

KIM Y.H., LEE D.S., KANG J.H., LEE Y.J., CHUNG J.K., ROH J.K., KIM S.U., LEE M.C. (2005). Reversing the Silencing of Reporter Sodium/Iodide Symporter Transgene for Stem Cell Tracking. *Journal of Nuclear Medicine*. Jan. 46(2):305-311.

TERROVITIS J., KWOK K.F., LAUTAMÄKI R., ENGLES J.M., BARTH A.S., KIZANA E., MIAKE J., LEPPÖ M.K., FOX J., SEIDEL J., POMPER M., WAHL R.L., TSUI B., BENGEL F., MARBÁN E., ABRAHAM M.R. (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. *Journal of the American College of Cardiology*. Nov. 52(20):1652-1660.

DWYER R.M., RYAN J., HAVELIN R.J., MORRIS J.C., MILLER B.W., LIU Z., FLAVIN R., O'FLATHARTA C., FOLEY M.J., BARRETT H.H., MURPHY J.M., BARRY F.P., O'BRIEN T., KERIN M.J. (2011). Mesenchymal Stem Cell-mediated delivery of the sodium iodide symporter supports radionuclide imaging and treatment of breast cancer. *Stem Cells*. Jul. 29(7):1149-1157.

ROGLER C.E., BEBAWEE R., MATARLO J., LOCKER J., PATTAMANUCH N., GUPTA S., ROGLER L.E. (2017). Triple Staining Including FOXA2 Identifies Stem Cell Lineages Undergoing Hepatic and Biliary Differentiation in Cirrhotic Human Liver. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. Nov. 65(1):33-46.

RAMOS-VARA J.A. (2005). Technical Aspects of Immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*. Jul. 42(4):405-26

LIGNELL A., KEROSUO L., STREICHAN S.J., CAI L., BRONNER M.E. (2017). Identification of a neural crest stem cell niche by Spatial Genomic Analysis. *Nature Communications*. Nov. 8(1):1830.

BLACKWELL M.G., ITINTEANG T., CHIBNALL A.M., DAVIS P.F., TAN S.T. (2016). Expression of embryonic stem cell markers in pyogenic granuloma. *Journal of Cutaneous Pathology*. Dec. 43(12):1096-1101.

JANG B.G., KIM H.S., KIM K.J., RHEE Y.Y., KIM W.H., KANG G.H. (2016). Distribution of intestinal stem cell markers in colorectal precancerous lesions. *Histopathology*. Mar. 68(4):567-577.

BARAKAT T.S., GRIBNAU J. (2014). Combined DNA-RNA Fluorescent *In situ* Hybridization (FISH) to Study X Chromosome Inactivation in Differentiated Female Mouse Embryonic Stem Cells. *Journal of Visualized Experiments*. Jun. 88.

OI M., YAMADA K., HAYAKAWA H., SUZUKI H. (2013). Sexing of Dog Sperm by Fluorescence *In Situ* Hybridization. *The Journal of Reproduction and Development*. Feb. 59(1):92-96.

HABERMANN F.A., WINTER A., OLSAKER I., REICHERT P., FRIES R. (2005). Validation of sperm sexing in the cattle (*Bos taurus*) by dual colour fluorescence *in situ* hybridization. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. Apr. 122(1):22-27.

KAWARASAKI T., MATSUMOTO K., CHIKYU M., ITAGAKI Y., HORIUCHI A. (2000). Sexing of porcine embryo by *in situ* hybridization using chromosome Y- and 1-specific DNA probes. *Theriogenology*. Apr. 53(7):1501-9

TROTMAN W., BECKETT T., GONCZ K.K., BEATTY B.G., WEISS D.J. (2004). Dual Y chromosome painting and *in situ* cell-specific immunofluorescence staining in lung tissue: an improved

method of identifying donor marrow cells in lung following bone marrow transplantation. *Histochemistry and Cell Biology*. Jan. 121(1):73-79.

DALAKAS E., NEWSOME P.N., BOYLE S., BROWN R., PRYDE A., MCCALL S., HAYES P.C., BICKMORE W.A., HARRISON D.J., PLEVRIS J.N. (2010). Bone marrow stem cells contribute to alcohol liver fibrosis in humans. *Stem Cells and Development*. Sep. 19(9):1417-1425.

MOUSE GENOME SEQUENCING CONSORTIUM (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*. Dec. 420:520-562.

HARDING J., ROBERTS R.M., MIROCHNITCHENKO O. (2013). Large animal models for stem cell therapy. *Stem Cell Research & Therapy*. Mar. 4(2):23.

WALKER J., MACLEAN J., HATSOPOULOS N.G. (2017). The marmoset as a model system for studying voluntary motor control. *Developmental Neurobiology*. Oct. 77(3):273-285.

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

NOGUEIRA R.G., JADHAV A.P., HAUSSEN D.C., BONAFE A. (2017). Thrombectomy 6 to 24 Hours after Stroke with a Mismatch between Deficit and Infarct. *New England Journal of Medicine*. Jan. 378(1):11-21.

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

RIGAL J. (2019). 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, 122p.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

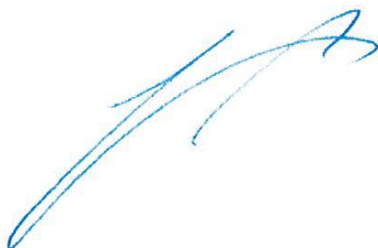
En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussignée, Isabelle RAYMOND-LETRON, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directrice de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **VAN LIERDE Fabien** intitulée « Marquage histologique du chromosome Y chez le marmouset commun (*Callithrix jacchus*), petit primate non humain. Mise au point d'une sonde d'hybridation in situ en fluorescence pour le suivi tissulaire de greffes de cellules à potentiel neurogénique » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.


Fait à Toulouse, le 13/11/2020
Enseignant-chercheur de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
Professeure Isabelle RAYMOND-LETRON



Vu :
Le Président du jury
Professeur Jean-Christophe PAGES



Vu :
Le Directeur de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
M. Pierre SANS



Vu et autorisation de l'impression :
Le Président de l'Université Paul Sabatier
M. Jean-Marc BROTO

Le Président de l'Université Paul Sabatier,
M. Jean-Marc BROTO



M. VAN LIERDE Fabien
a été admis(e) sur concours en : 2014
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le: 09.07.2019
a validé son année d'approfondissement le: 15/10/2020
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.



Nom : Van Lierde

Prénom : Fabien

Marquage histologique du chromosome Y chez le marmouset commun (*Callithrix jacchus*), petit primate non humain. Mise au point d'une sonde d'hybridation *in situ* en fluorescence pour le suivi tissulaire de greffes de cellules à potentiel neurogénique.

RESUME :

Notre travail s'inscrit dans un projet d'étude de médecine régénérative dans le cadre d'atteintes cérébrales, tel que l'accident vasculaire cérébral. Ce projet a besoin d'un essai sur le modèle animal qu'est le marmouset commun (*Callithrix jacchus*). Dans une première partie, nous présentons d'abord les différents types de cellules souches existantes ainsi que leurs applications en médecine régénérative. Nous exposons ensuite les capacités des cellules souches embryonnaires qui seront utilisées dans le projet. Puis nous développons les différentes méthodes de suivi cellulaire utilisables et expliquons le choix de l'hybridation *in situ* en fluorescence. Pour finir cette première partie, nous expliquons l'intérêt du modèle marmouset en recherche dans le cadre de ce projet, ainsi que le choix du suivi des chromosomes sexuels. Dans une deuxième partie, nous décrivons d'abord les protocoles expérimentaux permettant la création des sondes chromosomiques spécifiques aux chromosomes X et Y. Ces sondes sont ensuite testées sur des cellules en métaphase isolées puis sur des coupes de tissus. Ces sondes, après quelques modifications du protocole expérimental, permettront de différencier une cellule mâle d'une cellule femelle sur une lame histologique. Il sera donc possible de suivre un implant de cellules mâles chez un individu receveur femelle grâce à une méthode de suivi par FISH.

MOTS CLEFS :

FISH, hybridation *in situ*, sonde d'ADN, sonde chromosomique, suivi cellulaire, tracking cellulaire, médecine régénérative, cellules souches, cellules souches embryonnaires, marmouset commun, *Callithrix jacchus*

Histological tracking of the Y chromosome in the common marmoset (*Callithrix jacchus*), a small non-human primate. Development of a fluorescence *in situ* hybridization probe for tissue tracking cell with neurogenic potential transplants.

ABSTRACT :

Our work is part of a project to study regenerative medicine in the context of brain disorders, such as strokes. This project needs a test on the animal model that is the common marmoset (*Callithrix jacchus*). In the first part, we present the different types of existing stem cells and their applications in regenerative medicine. Then we expose the capacities of embryonic stem cells that will be used in the project. Then we develop the different cell tracking methods that can be used and we explain the choice of *in situ* fluorescence hybridization. To end this first part, we explain the interest of the marmoset model in research for this project, as well as the choice of sexual chromosome tracking. In a second part, we first describe the experimental protocols allowing the creation of chromosomal probes specific to X and Y chromosomes. These probes are then tested on isolated metaphase cells and then on tissue sections. These probes, after some modifications of the experimental protocol, will allow to differentiate a male cell from a female cell on a histological section. It will therefore be possible to track an implant of male cells in a female recipient individual using a FISH monitoring method.

KEYWORDS :

FISH, *in situ* hybridization, DNA probe, chromosomal probe, cell tracking, regenerative medicine, stem cells, embryonic stem cells, common marmoset, *Callithrix jacchus*