



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: <https://oatao.univ-toulouse.fr/27502/>

Ployon, Sophie . *Cellules souches mésenchymateuses canines issues du tissu adipeux : développement de sondes spécifiques des chromosomes sexuels X et Y en FISH et études de la stabilité*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2020, 79 p.

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

CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES CANINES ISSUES DU TISSU ADIPEUX : DEVELOPPEMENT DE SONDES SPECIFIQUES DES CHROMOSOMES SEXUELS X ET Y EN FISH ET ETUDES DE LA STABILITE CHROMOSOMIQUE

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

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

par

PLOYON Sophie

Née, le 29 août 1994 à SAINT-POL-SUR-TERNOISE (62)

Directrice de thèse : Mme Isabelle RAYMOND-LETRON

JURY

PRESIDENT :

M Jean Christophe Pages

PUPH en Biologie cellulaire, CHU de Toulouse

ASSESEURS :

Mme Isabelle Raymond Letron
Mme Alexandra Deviers

Pr. en Histologie – Anatomie Pathologique vétérinaire, ENVT
MC en Anatomie, ENVT

MEMBRE INVITE :

M Alain Pinton

IR Inrae, plateforme de cytogénétique et UMR GenPhySE,
ENVT

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

PROFESSEURS 2° CLASSE

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

PROFESSEURS 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 **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
- 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. **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*
- Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
- M. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire – Maladies animales réglementées*
- Mme **WARET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT CONTRACTUELS

- M. **DIDIMO IMAZAKI Pedro**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- M. **LEYNAUD Vincent**, *Médecine interne*
- Mme **ROBIN Marie-Claire**, *Ophthalmologie*
- Mme **ROMANOS Lola**, *Pathologie des ruminants*

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*

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Jean Christophe PAGES

Professeur des universités – praticien hospitalier en Biologie cellulaire au Centre Hospitalier de Toulouse

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

Hommages respectueux

A Madame la Professeure Isabelle RAYMOND-LETRON

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

Qui m'a confiée ce sujet de thèse et guidée tout au long de ce travail

Profonde gratitude et respect le plus sincère

A Madame la Docteure 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

Sincères remerciements

A Monsieur le Docteur Alain PINTON

Chercheur à l'Institut National de la Recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement et à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse au laboratoire de cytogénétique

Qui m'a accompagnée et aidée tout le long de ce travail. Pour sa grande disponibilité, sa pédagogie et surtout pour sa gentillesse

Sincères remerciements

TABLE DES MATIERES

Table des annexes	5
Table des illustrations	5
Liste des abréviations	7
Introduction	9
1. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	11
1.1. Présentation des cellules souches.....	11
1.1.1. Définition et caractéristiques des cellules souches.....	11
1.1.2. Les cellules souches mésenchymateuses (CSM)	11
1.1.3. Les cellules souches mésenchymateuses dérivées du tissu adipeux (ASC).....	12
1.1.3.1. Définition du tissu adipeux.....	12
1.1.3.2. Obtention des ASC.....	13
1.1.3.3. Intérêts des ASC.....	13
1.1.4. Mécanismes de réparation connus impliquant des cellules souches	14
1.1.4.1. Importance des signaux pour mobiliser les cellules.....	14
1.1.4.2. La prolifération	14
1.1.4.3. La transdifférenciation	15
1.1.4.4. Autres interactions participant à régénération tissulaire	18
1.2. Les utilisations actuelles des cellules souches	18
1.2.1. Paramètres déterminants d'un traitement par des (ou avec) cellules souches	18
1.2.2. Utilisation en médecine vétérinaire	22
1.2.3. Applications en médecine humaine	24
1.3. Les dangers liés à l'utilisation des cellules souches	26
1.3.1. Apparition d'anomalies génétiques des cellules en culture.....	26
1.3.1.1. Les différents types d'anomalies chromosomiques.....	26
1.3.1.2. Méthodes pour étudier la stabilité chromosomique	28
1.3.1.3. Etudes disponibles au sujet de la stabilité des cellules en culture.....	30
1.3.1.4. Facteurs étudiés pouvant influencer sur la stabilité des cellules en culture	31
1.3.1.5. Conséquences des anomalies génétiques en culture	33
1.3.2. Stimulation des gènes oncogènes des cellules environnantes	35
1.3.3. Effets secondaires des cellules souches	35
2. PARTIE EXPERIMENTALE.....	37
2.1. Matériels et méthodes.....	37
2.1.1. Objectif de notre étude	37

2.1.1.1.	Réalisation de sondes chromosomiques	37
2.1.1.2.	Suivi des cellules souches en culture.....	39
2.1.2.	Réalisation des sondes chromosomiques	39
2.1.2.1.	Obtention de chromosomes à partir de sang.....	39
2.1.2.1.1.	Prélèvement et mise en culture	39
2.1.2.1.2.	Arrêt des cultures et fixation.....	40
2.1.2.1.3.	Fixation des cellules.....	40
2.1.2.1.4.	Etalement des cellules sur lame	40
2.1.2.2.	Microdissection	40
2.1.2.2.1.	Préparation des lamelles.....	40
2.1.2.2.2.	Matériel pour microdissection des chromosomes.....	41
2.1.2.2.3.	Procédure de microdissection.....	41
2.1.2.3.	Première amplification	41
2.1.2.4.	Deuxième amplification.....	43
2.1.2.5.	Marquage des sondes par random priming	43
2.1.2.6.	Précipitation des sondes	44
2.1.2.7.	Préparation des sondes	44
2.1.3.	Protocole d'hybridation in-situ adapté aux lames cytologiques.....	45
2.1.3.1.	Préparation des lames cytologiques	45
2.1.3.2.	Hybridation.....	45
2.1.3.3.	Lavages stringents	45
2.1.3.4.	Révélation par anticorps marqués	46
2.1.4.	Protocole d'hybridation in-situ adapté aux lames histologiques.....	46
2.1.4.1.	Préparation des lames histologiques	46
2.1.4.2.	Hybridation, lavages et révélation	46
2.1.5.	La culture cellulaire des ASC canines.....	47
2.1.5.1.	Obtention des cellules.....	47
2.1.5.2.	Division	47
2.1.5.3.	Conservation d'une lignée de cellules.....	47
2.1.5.4.	Récupération de cellules en métaphase	47
2.1.6.	Suivi des cellules souches mésenchymateuses en culture.....	48
2.1.6.1.	Comptage des chromosomes au cours des passages.....	48
2.1.6.1.1.	Préparation des lames.....	48
2.1.6.1.2.	Observation des lames au microscope.....	48
2.1.6.2.	Suivi vidéo des cellules au cours de la division.....	48
2.1.6.2.1.	Matériel utilisé pour le suivi vidéo	48

2.1.6.2.2.	Préparation des cellules	49
2.1.6.2.3.	Paramétrage et capture des séquences vidéos	49
2.2.	Résultats	51
2.2.1.	Sondes chromosomiques et tracking cellulaire.....	51
2.2.1.1.	Réalisation des sondes	51
2.2.1.2.	Test des sondes sur coupes histologiques.....	52
2.2.1.3.	Utilisation des sondes sur coupe histologique de souris	53
2.2.2.	ASC canines en culture	54
2.2.2.1.	Comptage des chromosomes en métaphase	54
2.2.2.2.	Recherche de l'origine des tétraploïdies	56
2.2.2.2.1.	Recherche dans le tissu natif.....	56
2.2.2.2.2.	Suivi vidéo des divisions cellulaires en culture.....	60
2.3.	Discussion	63
3.	CONCLUSION	67

TABLE DES ANNEXES

Annexe 1 : Détail des produits utilisés dans notre étude	69
--	----

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Liste des figures :

Figure 1 : Schéma situant la capacité de différenciation des ASC au sein de celle des cellules souches	13
Figure 2 : Schéma représentant la formation de syncaryon ou d'hétérocaryon suite à une fusion cellulaire (Lluis, Cosma, 2010)	16
Figure 3 : Schéma des connaissances actuelles sur les différents mécanismes de transdifférenciation (Lluis, Cosma, 2010).....	17
Figure 4 : Répartition du nombre d'essais cliniques sur les cellules souches en Europe (https://ClinicalTrials.gov)	25
Figure 5 : Schéma des anomalies chromosomiques de nombre.....	27
Figure 6 : Schéma des anomalies chromosomiques de structure.....	28
Figure 7 : Caryotype d'une cellule souche mésenchymateuse humaine après méthode de G-banding (Borgonovo et al., 2014).	29
Figure 8 : Schéma représentant le principe de la FISH. La sonde étant colorée en rouge dans cette exemple.	30
Figure 9 : Schéma représentant le principe du marquage recherché avec la sonde du chromosome X envoyant un signal rouge et celle du Y un signal vert.	38
Figure 10 : Caryotype canin (www.vetogene.com)	38
Figure 11 : Métaphase de chien mâle après hybridation des sondes du chromosome Y (x1000).....	51
Figure 12 : Métaphase de chien mâle après hybridation des sondes du chromosome X (x1000).....	51
Figure 13 : Noyaux de cellule de chien mâle après hybridation des sondes des chromosomes X et Y (x1000)	52
Figure 14 : Sondes hybridées sur coupe histologique canine de peau après 30 minutes de pepsine (x1000).....	52
Figure 15 : Coupes histologiques de muscle de souris nude ayant reçu une injection de cellules souches canines femelles après digestion à la pepsine de 30 minutes puis hybridation des sondes du chromosome X (x100 à gauche et x400 à droite)	53
Figure 16 : Métaphase d'ASC canine de phénotype mâle tétraploïde, de formule ($4n = 156$) (x1000).....	54
Figure 17 : Métaphase d'ASC canine de phénotype mâle hexaploïde, de formule ($6n = 234$) (x1000).....	54
Figure 18 : Proportion de cellules tétraploïdes (en %) par rapport à l'étape de culture.	55
Figure 19 : Coupe histologique de peau avec une infiltration par une population tumorale (mastocytome) de chienne après digestion à la pepsine de 30 minutes puis hybridation des sondes du chromosome X (x400).....	56
Figure 20 : Coupe histologique de tissu adipeux (cellules adipeuses) de chienne après digestion à la pepsine de 30 minutes puis hybridation des sondes du chromosome X	57

Figure 21 : Coupe histologique de tissu adipeux de chienne après digestion à la pepsine de 30 minutes puis hybridation des sondes du chromosome X (x1000)	57
Figure 22 : Coupe histologique de tissu adipeux (cellules adipeuses) de chien après digestion à la pepsine de 30 minutes puis hybridation des sondes des chromosomes X et Y (x400)	58
Figure 23 : Coupe histologique de tissu adipeux de chien après digestion à la pepsine de 30 minutes puis hybridation des sondes des chromosomes X et Y (x1000)	58
Figure 24 : Noyaux condensés d'ASC chien mâle (P0) après hybridation des sondes des chromosomes X et Y (x400)	59
Figure 25 : Noyaux condensés de chien mâle (SVF) après hybridation des sondes des chromosomes X et Y (x1000)	59
Figure 26 : Métaphase et noyaux condensés d'ASC chien mâle (P0) après hybridation des sondes des chromosomes X et Y (x400)	60
Figure 27 : Extraits de time lapse suivant une cellule en endomitose..	61
Figure 28 : Extraits de time lapse suivant une cellule en mitose	62

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Cycles d'incubation du premier passage au thermocycleur pour l'amplification .	42
Tableau 2 : Cycles d'incubation du deuxième passage au thermal cycler pour l'amplification	42
Tableau 3 : Cycles d'incubation au thermal cycler pour la réamplification.....	43
Tableau 4 : Pourcentage de cellules tétraploïdes en fonction du passage et des individus. Les cellules grisées traduisent une donnée non disponible.	55

LISTE DES ABBREVIATIONS

- MTI : médicament de médecine innovante
- FISH : fluorescent in situ hybridization
- ES-like : embryonic stem cells-like
- CLP : cellules souches lymphoïdes
- CMP : cellules souches myéloïdes
- CSM = MSC : cellules souches mésenchymateuses
- ISCT® MSC : comité Cellules stromales mésenchymateuses de l'International Society for Cell & Gene Therapy
- ASC : cellules souches mésenchymateuses dérivées du tissu adipeux
- HIF-1 : facteur induit par l'hypoxie
- SDF-1 : stromal-derived factor-1
- VEGF : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
- MEF-2 : myocyte enhancer factor-2
- BM-MSC = BMSC : cellules souches mésenchymateuses dérivées de la moelle osseuse
- FGF2 : facteur de croissance des fibroblastes
- ARN : acide ribonucléique
- ESC : cellules souches embryonnaires
- GvHD : maladie du greffon contre l'hôte
- PRP : plasma riche en plaquettes
- BMF : facteur morphogénétique de l'os
- PDGF : facteur de croissance dérivé des plaquettes
- AMM : autorisation de mise sur le marché
- iPS : cellules souches pluripotentes induites
- FDA : Food and Drug Administration
- ADN : acide désoxyribonucléique
- CGH : hybridation génomique comparative
- SKY : caryotypage spectral
- SVF : fraction stromale vasculaire
- Pn : passage n
- SSC : solution saline citrate
- PSM : poste de sécurité microbiologique

INTRODUCTION

Actuellement, de nombreuses recherches sont menées sur les cellules souches dans le but d'obtenir des médicaments de thérapie innovante (MTI). Pour que ces thérapies soient optimales et que les risques soient maîtrisés, il est nécessaire de bien définir les populations de cellules souches utilisées et de connaître le rôle et le devenir de ces cellules une fois injectées au patient (Dulak et al., 2015). C'est ce qu'essaient de déterminer les études de biodistribution, d'efficacité et de sécurité lors des études réglementaires non cliniques comprises dans les plans de développement des MTI utilisant des cellules souches mésenchymateuses.

Les mécanismes d'action impliquant les cellules souches mésenchymateuses sont nombreux et encore mal connus. La première étape pour les cellules souches une fois administrées est d'atteindre le site ciblé pour la thérapie. Il est donc intéressant de suivre les cellules souches *in vivo* une fois injectées afin de mieux comprendre l'étape de biodistribution et de déterminer la meilleure voie d'administration pour atteindre un effet attendu (Je et al., 2017 ; Cao et al., 2016).

Dans notre étude, le suivi des cellules souches est réalisé dans l'espèce canine grâce à la méthode FISH (Fluorescent in situ Hybridization). Cette technique requiert des sondes moléculaires spécifiques de chromosomes et donc d'espèce. Le protocole de production des sondes a été validé dans cette étude afin de les utiliser sur des lames cytologiques et histologiques.

Les cellules souches utilisées dans notre étude sont des cellules souches mésenchymateuses provenant du tissu adipeux. Les principaux atouts de ces cellules sont leur facilité d'accès et de mise en culture. Elles peuvent se différencier en de nombreux types cellulaires, ce qui en fait un outil de choix dans la recherche de thérapies avec cellules souches. La culture cellulaire permet par leur amplification, d'obtenir les quantités de cellules très importantes nécessitées pour les traitements (Minteer et al., 2012). Cependant, ces étapes de cultures successives de cellules impliquant de nombreuses divisions cellulaires, elles représentent un risque potentiel d'instabilité chromosomique pouvant conduire à l'apparition d'anomalies et ainsi compromettre l'usage de cellules souches à des fins thérapeutiques chez l'Homme (Ferreira et al., 2012 ; Garcia-Martinez et al., 2016 ; Meza-Zepeda et al., 2008).

Après une première partie de synthèse bibliographique sur le sujet, la deuxième partie de notre étude est expérimentale et s'est intéressée à cette stabilité chromosomique *in vitro* des cellules souches mésenchymateuses dérivées du tissu adipeux canin. Les chromosomes ont été comptés à différents temps de culture pour déceler d'éventuelles anomalies. Ayant observé un taux de tétraploïdie augmentant au fil du temps de culture, les cellules ont ensuite été filmées afin d'observer le déroulement des divisions cellulaires.

Cette étude a été menée à l'ENVT dans le laboratoire de cytogénétique (Plateforme Cytogénétique, Equipe Cytogène, UMR1388, GenPhySE) et en collaboration avec l'unité de recherche STROMALab (Université de Toulouse, CNRS ERL5311, EFS, ENVT, Inserm U1031, UPS, Toulouse, France) pour qui le modèle canin représente un deuxième modèle mis en œuvre après des premières validations de l'utilisation de cellules souches d'origine humaine dans le modèle murin. Il est également utilisé dans le but de développer des thérapies innovantes pour des applications directes en médecine vétérinaire (Lemaitre et al., 2017).

1. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Présentation des cellules souches

1.1.1. Définition et caractéristiques des cellules souches

Une cellule souche est une cellule indifférenciée qui peut s'auto-renouveler et se spécialiser quand les conditions sont appropriées.

La capacité d'auto-renouvellement est la capacité à subir des cycles de mitoses tout en maintenant l'état indifférencié de la cellule mère (Weissman, 2000). Elle est indispensable pour conserver un pool de cellules souches au sein de l'organisme. On parle de division asymétrique.

Au sein des cellules souches, on distingue les cellules pluripotentes des cellules multipotentes.

Les seules cellules pluripotentes sont les cellules embryonnaires et les cellules souches pluripotentes induites. Elles peuvent se différencier en n'importe quelle lignée de l'organisme (Dulak et al., 2015). Les cellules pluripotentes induites sont aussi nommées « Embryonic stem cells-like » (ES-like). En effet, elles sont comparables aux cellules embryonnaires mais leur origine est différente. Les cellules embryonnaires nécessitent la destruction d'embryon pour les obtenir alors que les ES-like sont obtenues grâce à la reprogrammation cellulaire *in vitro*. Des ES-like ont été obtenues chez la souris à partir de cellules fibroblastiques (Takahashi, Yamanaka, 2006).

Les cellules multipotentes peuvent se différencier en diverses lignées au sein d'un tissu spécifique. Par exemple, les cellules hématopoïétiques, situées au niveau de la moelle osseuse, peuvent se différencier en globules rouges, globules blancs et plaquettes. On trouve aussi des cellules souches multipotentes au niveau du système nerveux et intestinal (Dulak et al., 2015).

Il existe aussi des cellules oligopotentes qui se différencient en des lignées cellulaires plus restreintes. C'est le cas des cellules souches lymphoïdes (CLP) et myéloïdes (CMP) (Lin et al., 2013).

On trouve des cellules unipotentes qui ne se différencient qu'en un seul type cellulaire. Cela est le cas des cellules satellites du muscle strié squelettique (Dulak et al., 2015).

1.1.2. Les cellules souches mésenchymateuses (CSM)

Les cellules souches mésenchymateuses ont été isolées et décrites pour la première fois il y a trente ans. Depuis, plus de 55 000 publications ont été écrites à leur sujet. Cependant, elles ne sont pas encore clairement définies et certaines de leurs propriétés dont le rôle de leurs exosomes et microvésicules restent des pistes à explorer (Pittenger et al., 2019).

En 2006, le comité Cellules stromales mésenchymateuses de l'International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT® MSC) a émis une liste de critères permettant de définir les cellules souches mésenchymateuses. Les cellules doivent être adhérentes au plastique, exprimer les marqueurs CD73, CD90 et CD105 sans exprimer les marqueurs CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, CD79a et HLA-DR. Elles doivent aussi être capables de se différencier *in vitro* en adipocytes, chondrocytes et ostéoblastes (Dominici et al., 2006). Cependant, en 2019, le même comité a annoncé que ces critères ne sont pas définitifs et absolus. En effet, selon l'origine des cellules, leur mode de culture et l'exposition à certaines molécules, l'expression des marqueurs peuvent être variables (Viswanathan et al., 2019).

En plus des critères définis précédemment, deux autres descriptions persistent à ce jour. Une se base sur les propriétés *in vivo* des CSM. Elles sont alors définies comme des cellules souches multipotentes post-natales pour le squelette, se rapprochant d'un type de cellules périvasculaires de la moelle osseuse. L'autre description se base sur les propriétés *in vitro* de ces cellules et sur leur emploi en thérapie. Ce dernier se base d'avantage sur leurs propriétés à moduler les fonctions du tissu hôte plutôt que sur leurs propriétés de cellules souches en tant que telles (Bianco, 2014).

La difficulté de les définir vient surtout d'un manque de standardisation des modes de culture (Bianco, 2014). Cependant, pour de futures thérapies à base de CSM, il est indispensable de les caractériser précisément afin de mieux connaître leurs mécanismes (Lin et al., 2013).

Chez la souris, des CSM ont été isolées à partir de nombreux tissus différents, mettant en évidence leur large distribution au sein de l'organisme (da Silva Meirelles, 2006).

1.1.3. Les cellules souches mésenchymateuses dérivées du tissu adipeux (ASC)

1.1.3.1. Définition du tissu adipeux

Le tissu adipeux est le résultat de la différenciation du mésoderme lors du développement embryonnaire (Minteer et al., 2012). Le tissu adipeux est présent chez tous les Mammifères et certaines espèces non-Mammifères. Il est localisé dans le tissu sous-cutané, à l'intérieur de la cavité péritonéale et diffusément dans tout le corps en tant que protection pour les structures vitales.

Il existe différentes catégories de tissu adipeux. Les cellules souches mésenchymateuses dérivées du tissu adipeux (ASC) étudiées proviennent principalement du tissu adipeux blanc. Il est principalement composé d'adipocytes matures, de tissu vasculaire, lymphatique, nerveux et stromal. Les adipocytes matures sont le résultat de la prolifération et de la différenciation d'ASC (Cinti, 2005).

1.1.3.2. Obtention des ASC

La procédure d'obtention d'ASC n'est pas complètement standardisée entre les différents laboratoires qui les produisent mais les grandes étapes de préparation sont similaires. Du tissu adipeux est prélevé et dilacéré en petits fragments. Il est digéré par différentes enzymes telles que la collagénase, dispase, trypsine ou d'autres de la même famille à 37°C pendant une durée allant de 30 minutes à plus d'une heure.

Le produit de la digestion est centrifugé. Cela permet de séparer la fraction vasculaire stromale des adipocytes matures. La fraction vasculaire stromale est mise en culture. Elle contient de nombreux types cellulaires dont des cellules souches adipeuses, des cellules souches hématopoïétiques ainsi que leurs précurseurs, des cellules endothéliales, des érythrocytes, fibroblastes, lymphocytes, monocytes, macrophages et péricytes. Après purification, les cellules adhérentes au plastique du milieu de culture sont récupérées. Il s'agit des cellules souches mésenchymateuses dérivées du tissu adipeux (BOURIN et al., 2013).

1.1.3.3. Intérêts des ASC

Les ASC sont très prometteuses en ce qui concerne la médecine régénérative et l'ingénierie tissulaire en raison de leur grande disponibilité et de leur capacité à se différencier en de nombreux tissus du mésoderme dont les tissus osseux, cartilagineux, musculaire et adipeux (Minteer et al., 2012). De plus, leur plasticité peut être augmentée *in vitro*. Leur usage permettrait d'éviter le recours à des cellules embryonnaires et donc d'éviter toute problématique éthique à ce sujet (A. Somoza, J. Rubio, 2012).

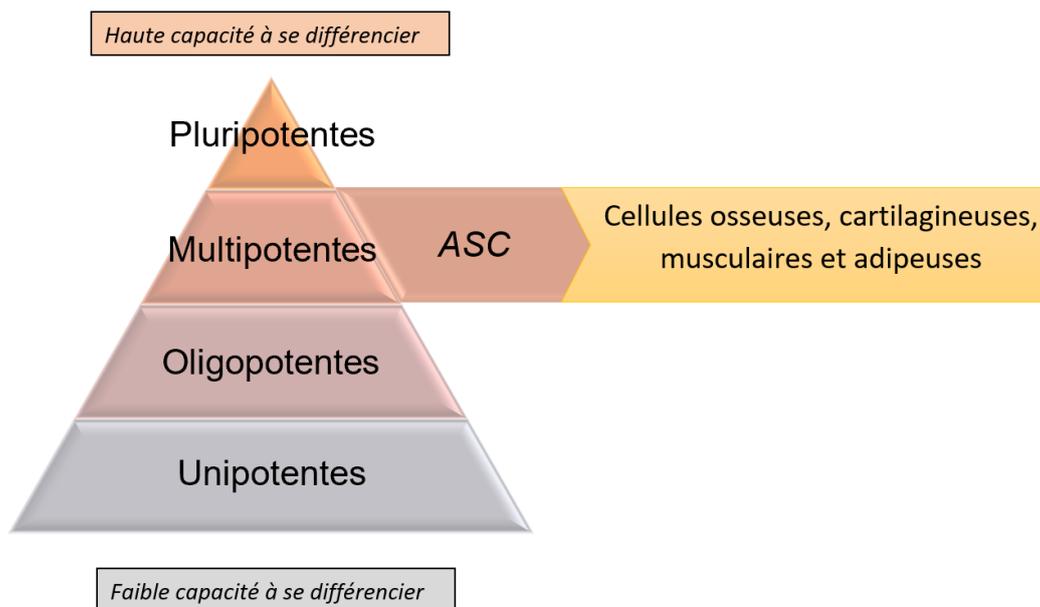


Figure 1 : Schéma situant la capacité de différenciation des ASC au sein de celle des cellules souches

1.1.4. Mécanismes de réparation connus impliquant des cellules souches

1.1.4.1. Importance des signaux pour mobiliser les cellules

➤ Notion de niche

Comme nous l'avons vu précédemment, tous les organes possèdent des cellules souches. Pour que l'homéostasie des cellules souches soit assurée, elles se situent dans un microenvironnement appelé niche. Chaque organe possède une niche, spécifique de celui-ci. Il existe donc une multitude de mécanismes qui ne sont pas encore bien connus. Cette niche est constituée d'éléments cellulaires et non cellulaires.

Grâce à un équilibre de signaux, la niche sert à la fois de support et de régulation pour les cellules souches dont l'activité est maintenue réduite en l'absence d'évènement particulier. Les signaux reçus par la niche peuvent provenir des cellules de la niche elle-même ou de l'organisme selon les modalités classiques (paracrine et endocrine). Ainsi, les cellules souches sont prêtes à être mobilisées si l'organisme en a besoin (Walker et al., 2009).

Selon les différents signaux auxquels les CSM peuvent être exposées, plusieurs comportements peuvent être adoptés par les cellules souches à savoir la prolifération, la différenciation, le homing cellulaire, l'apoptose, l'induction de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins et les processus de guérison incluant la cicatrisation (Markoski, 2016).

➤ Le homing

Le homing est un phénomène permettant à des cellules de migrer dans l'organisme, en réponse à des signaux émis par certains tissus. Le homing n'est pas une particularité des cellules souches.

Quand une lésion se produit, un profil inflammatoire se met en place. Plusieurs signaux entrent en jeu comprenant des facteurs (facteur induit par l'hypoxie, HIF-1), des cytokines (stromal-derived factor-1, SDF-1) et des facteurs de croissance (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire, VEGF). Ces signaux dans un premier temps permettent aux cellules de passer la barrière vasculaire afin d'accéder à la matrice extracellulaire puis d'activer la différenciation cellulaire. La réponse immunitaire intervient aussi dans le homing des cellules souches (Markoski, 2016).

1.1.4.2. La prolifération

Au sein de la niche, la multiplication des cellules souches est maintenue à un rythme lent (Walker et al., 2009). Cependant, après apparition d'une lésion, les cellules souches commencent à proliférer via une division symétrique afin de garder un stock de cellules

souches. Elles peuvent aussi se diviser de façon asymétrique afin de former d'autres cellules différenciées qui prendront part à la régénération cellulaire (Lluis, Cosma, 2010).

Le phénomène de prolifération a notamment été mis en évidence au sein du tissu musculaire. Pendant le développement et la régénération, des myoblastes mononucléés indifférenciés prolifèrent. Certains se retirent du cycle cellulaire, se différencient puis fusionnent pour former les fibres musculaires multinucléées matures. Ce processus est régulé par des protéines hélice-boucle-hélice spécifiques du muscle, la protéine E2A et le myocyte enhancer factor-2 (MEF-2) qui est un facteur de transcription (Lluis et al., 2006).

1.1.4.3. La transdifférenciation

➤ Définition de la transdifférenciation

La transdifférenciation est un mécanisme qui permet la conversion d'une cellule d'un tissu donné en une cellule d'une lignée distincte. Ainsi une cellule souche peut donner des cellules différenciées, entrant en jeu dans la régénération d'un tissu donné.

Il a été montré que les cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse sont capables de se transdifférencier en de nombreux types cellulaires tels que des neurones, des cellules osseuses, épithéliales au niveau du rein, hépatiques, et musculaires au niveau du cœur (Lluis, Cosma, 2010).

Elle peut avoir lieu grâce à différents mécanismes, exposés ci-dessous.

➤ Par signaux moléculaires

La transdifférenciation par signaux moléculaires est bien maîtrisée *in vitro*. Elle a d'ailleurs permis en 2006 d'obtenir par reprogrammation des cellules pluripotentes induites à partir de fibroblastes. Pour cela, les fibroblastes ont été exposés à quatre facteurs, Oct3/4, Sox2, c-Myc et Klf4. Les cellules ont ensuite montré des caractéristiques morphologiques et de croissance ainsi qu'une expression de gènes caractéristiques de cellules souches.

De plus, lorsque ces cellules ont été injectées par voie sous-cutanée à des souris nudes de la souche BALB/Jcl-nu, des tératomes, comprenant des lignées des trois feuillets embryonnaires sont apparus, prouvant une nouvelle fois la pluripotence des cellules obtenues expérimentalement (Takahashi, Yamanaka, 2006).

La différenciation par signaux moléculaires est aussi utilisée en culture selon des protocoles établis afin de vérifier la capacité des cellules souches à se différencier en différentes lignées (BOURIN et al., 2013).

In vivo, après un état d'hypoxie ou la mise en place d'un processus inflammatoire, le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire et l'angiopoïétine voient leur expression induite.

Cela va conduire à l'activation des cellules promotrices endothéliales, formant de nouveaux vaisseaux sanguins (Markoski, 2016).

➤ Par fusion cellulaire

Bien que les mécanismes ne soient pas connus, il a été montré que la transdifférenciation peut avoir lieu suite à une fusion de cellules.

Dans une étude, le tissu cérébral de patients ayant reçu une transplantation de moelle osseuse a été analysé. Les sujets ont été transplantés pour cause d'hémopathie maligne. Le traitement comprenait aussi une chimiothérapie et une radiothérapie. Les individus sont choisis sur la base du sexe du donneur. Ce dernier doit être de sexe opposé pour qu'il soit possible de détecter les cellules transplantées via les chromosomes sexuels. Le protocole de transplantation diffère d'un individu à un autre mais est précisé pour chaque individu.

Au niveau du système nerveux central, le matériel génétique des cellules transplantées a notamment été retrouvé dans des cellules de Purkinje binucléées, formant des hétérocaryons. L'étude de ces cellules polyploïdes a montré qu'elles résultaient de la fusion des cellules du donneur avec les cellules hôtes (Weimann et al., 2003).

Lors de fusion, on distingue les hétérocaryons qui contiennent plusieurs noyaux des syncaryons qui possèdent un seul noyau après que ceux des cellules mères aient fusionnés.

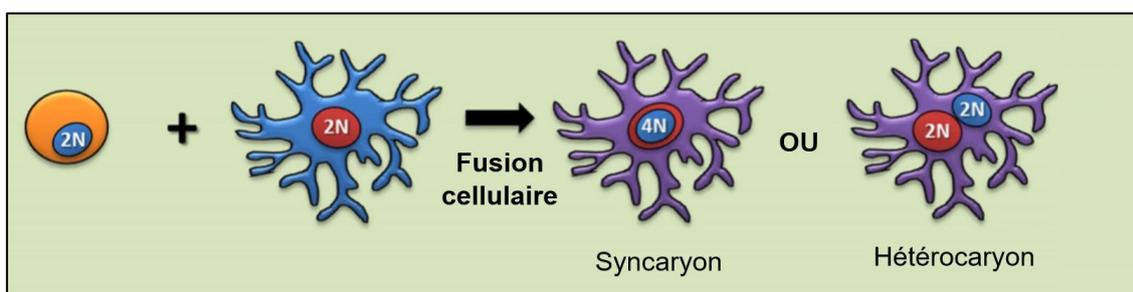


Figure 2 : Schéma représentant la formation de syncaryon ou d'hétérocaryon suite à une fusion cellulaire (Luis, Cosma, 2010)

L'étude de l'expression des gènes a mis en évidence qu'après un certain temps suivant la fusion, les anciens noyaux des cellules souches mésenchymateuses dérivées de la moelle osseuse (BM-MSC) expriment majoritairement des gènes caractéristiques des cellules de Purkinje. Cela montre qu'un type cellulaire peut être dominant sur l'autre pour l'expression des cellules filles résultant de la fusion. Il a d'ailleurs été avancé que si une des cellules mères a une plasticité importante, la cellule hybride peut même devenir pluripotente (Luis, Cosma, 2010).

Six ans après la transplantation, le matériel génétique du donneur a même été retrouvé dans 1% des neurones d'un des patients de l'étude et dans de nombreux types cellulaires non-neuronaux comme des oligodendrocytes, astrocytes et autres (Kemp et al., 2014).

Chez la souris, il a été établi que les MSC sont capables de fusionner avec des cellules pour en donner d'autres appartenant à la même lignée. Les types cellulaires concernés sont les cellules épithéliales, les neurones, hépatocytes et cardiomyocytes (Golpanian et al., 2016).

Aussi serait-il intéressant de connaître les mécanismes de régulation de la transdifférenciation afin de mieux la contrôler voire augmenter son efficacité *in vivo*. L'inflammation serait un des paramètres indispensables. Cela a été montré au niveau des cellules de Purkinje mais aussi au niveau du tissu musculaire (Camargo et al., 2003).

➤ Par fusion et reprogrammation

Ce mécanisme n'est pas encore connu pour les cellules souches. Cependant, il a bien lieu *in vivo* avec d'autres lignées cellulaires. En effet, lors de la fécondation, le spermatozoïde et l'ovocyte fusionnent pour donner la cellule œuf. La fusion produit à partir de deux cellules spécialisées une cellule totipotente qui est capable de former un organisme complet, avec tous les tissus qui le constituent (Lluis, Cosma, 2010).

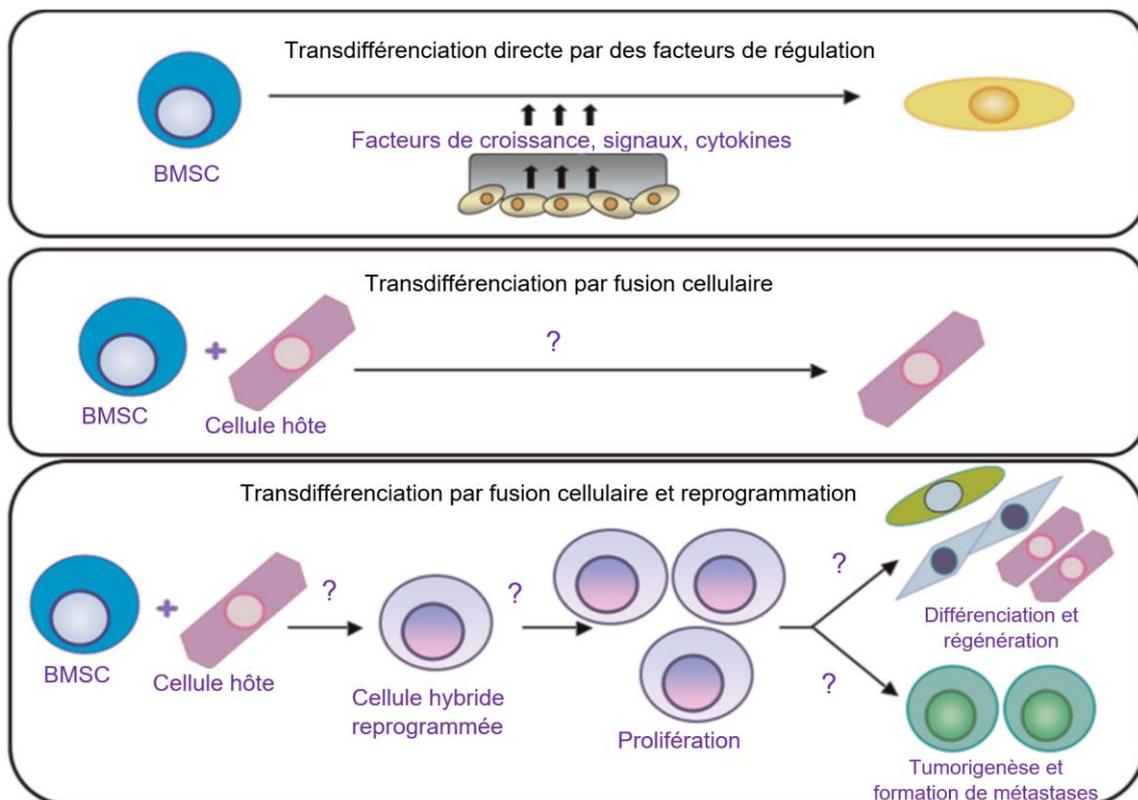


Figure 3 : Schéma des connaissances actuelles sur les différents mécanismes de transdifférenciation (Lluis, Cosma, 2010)

1.1.4.4. Autres interactions participant à régénération tissulaire

Comme nous l'avons vu précédemment, les cellules souches peuvent se différencier selon différents mécanismes afin d'apporter des cellules supplémentaires pouvant remplacer celles endommagées ou manquantes. Elles interviennent aussi selon d'autres modalités.

➤ Régulation de processus de croissance

Il a été montré que les CSM ont un rôle régulateur de certains processus de croissance dont l'angiogenèse. En effet, des injections répétées de CSM à des porcs ayant une proctite a eu pour effet de moduler l'expression du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), de son récepteur ainsi que de l'angiopoïétine et du facteur de croissance des fibroblastes (FGF2) (Markoski, 2016).

Les cellules souches peuvent aussi libérer des facteurs solubles et des exosomes contenant des acides ribonucléiques (ARN) messager qui stimulent les cellules précurseurs résidentes dans les tissus et activent leur prolifération. Ces mécanismes ont été observés notamment au niveau du cœur (Golpanian et al., 2016).

➤ Modulation de la réponse inflammatoire

Les cellules ont des propriétés anti-inflammatoires et limitent ainsi les phénomènes de fibrose, parfois handicapants pour certains organes dont le cœur (Golpanian et al., 2016).

➤ Modulation de la réponse immunitaire

Il a été établi que les CSM diminuent la prolifération des lymphocytes T responsables de la destruction des cellules souches étrangères à l'organisme. Une exposition préalable des CSM à l'interféron gamma permet d'augmenter l'efficacité de ce mécanisme (Polchert et al., 2008).

Il faut cependant garder à l'esprit que tous les mécanismes mettant en jeu les cellules souches ne sont pas élucidés. Cela n'empêche pas leur utilisation en thérapie régénérative qui a su montrer des résultats satisfaisants.

1.2. Les utilisations actuelles des cellules souches

1.2.1. Paramètres déterminants d'un traitement par des (ou avec) cellules souches

Avant de commencer une thérapie cellulaire, il est indispensable d'étudier certains facteurs pour que la réponse soit optimale. Il s'agit du type cellulaire utilisé et son origine, la voie d'administration ainsi que le nombre et la fréquence d'applications (Markoski, 2016). Un passage en culture peut parfois être nécessaire notamment si un nombre important de cellules est requis ou pour modifier les capacités de différenciation cellulaire.

➤ Type de cellules souches

Le type de cellules souches utilisé est important. Par exemple, les CSM présentent moins de risque à l'utilisation que les cellules souches embryonnaires (ESC). En effet, les ESC ont tendance à former des tératomes une fois injectées. Un tératome est une tumeur qui peut être bénigne ou maligne, comprenant des cellules des trois feuillets embryonnaires (Solter, 2006).

Il y a donc un compromis entre avoir accès à tous les types cellulaires et avoir plus de sécurité. Cela ne devrait cependant pas poser de problème si le tissu à soigner est ciblé et que cela réduit le nombre de lignées cellulaires recherchées.

La majorité des essais cliniques disponibles dans la littérature sont réalisés avec des cellules souches somatiques dérivées de la moelle osseuse ou du tissu adipeux car en plus d'avoir un usage plus sûr, leur accessibilité et leur disponibilité sont aussi meilleures. Leurs sites et méthodes de prélèvement sont d'ailleurs standardisés pour plusieurs espèces (Markoski, 2016). Le site de prélèvement peut d'ailleurs influencer les propriétés des cellules souches en culture dont le taux d'apoptose (Minteer et al., 2012).

Il faut aussi prendre en compte les capacités de différenciation des différents types de cellules souches. En effet, les ASC semblent plus aptes à se différencier en cellules musculaires et cardiomyocytes, par rapport aux BMSC, tout en ayant des propriétés moins fortes pour les lignées chondrogéniques et ostéogéniques (BOURIN et al., 2013).

➤ Origine des cellules

Il est important de choisir l'individu sur lequel les cellules sont prélevées. Elles peuvent être prélevées sur l'individu qui est destiné à les recevoir, l'utilisation est dite autologue. Quand l'utilisation est dite allogénique, le donneur et le receveur sont alors deux individus distincts.

Comme pour les greffes d'organes, lors d'une transplantation allogénique, il peut y avoir une réponse de l'organisme à l'encontre des cellules souches introduites. Ce phénomène appelé maladie du greffon contre l'hôte (GvHD) concerne environ 50% des transplants de cellules souches. Or, grâce aux propriétés immuno-modulatrices des cellules souches vues précédemment, il devient possible de se protéger de ce processus, grâce aux cellules souches elles-mêmes (Polchert et al., 2008).

Il est important de comprendre et maîtriser les propriétés immunomodulatrices des CSM pour tirer profit des administrations allogéniques de cellules souches. En effet, les administrations allogéniques permettent de prélever des cellules chez des individus jeunes et en bonne santé pour lesquels les propriétés des cellules souches seront plus optimales pour prendre part à

des thérapies (Markoski, 2016). La culture *in vitro* d'ASC humaines a montré que la capacité de prolifération et de différenciation était meilleure chez les sujets jeunes (Minteer et al., 2012).

D'autres facteurs entreraient en jeu dont le sexe du donneur. Il a été établi que les ASC provenant d'hommes se différencient plus rapidement et plus efficacement que celles provenant de femmes (Minteer et al., 2012 ; Zimmerlin et al., 2011). Chez les chiens, il a été montré que les propriétés de prolifération, de sénescence et de différenciation *in vitro* sont globalement les mêmes. Cependant, il existe quelques spécificités de races. En effet, Les Border Collie ont des cellules avec une meilleure capacité de division et de différenciation en lignée ostéogénique. Les bergers, Labrador et Golden ont un pourcentage de cellules sénescents plus important (Markoski, 2016).

➤ Eventuelles manipulations avant administration

Les thérapies nécessitant une quantité de cellules importante, une expansion de la population *in vitro* est indiquée. Pour une utilisation thérapeutique, la durée de la culture s'élève en moyenne à quatre semaines. Ainsi, elle n'est pas envisageable pour les traitements d'affections aiguës nécessitant une intervention rapide sauf dans un cas particulier. En effet, certaines banques proposent le stockage de cellules souches. Si un individu a des cellules disponibles dans ces banques, la thérapie sera mise en place plus rapidement.

Un autre atout de la culture est qu'elle permet d'obtenir une population de cellules plus homogène. Elle rend aussi possible une caractérisation plus approfondie des cellules avant leur administration tout en vérifiant leurs propriétés dont celles de différenciation en différentes lignées cellulaires (Markoski, 2016). La stabilité chromosomique des cellules souches est notamment un des paramètres à vérifier. Elle peut être remise en question lors de multiplication *in vitro*, aspect qui est étudié plus tard dans notre étude (Meza-Zepeda et al., 2008 ; Ueyama et al., 2012 ; Jung-Ah Kim et al., 2015 ; Nikitina et al., 2018).

Pour les thérapies qui s'inscrivent dans le temps ou pour avoir accès à des lignées pour la recherche, il est possible de cryoconserver les cellules souches. Ce mode de conservation n'altère pas leurs propriétés. Cela a notamment été montré pour des ASC provenant de l'Homme (Minonzio et al., 2014), du porc (Dariolli et al., 2013) et du chien (Martinello et al., 2011).

L'intérêt de la culture ne se limite pas à l'obtention d'un stock de cellules et à leur étude. En effet, il est possible d'exposer les cellules à des facteurs ou même de modifier leur patrimoine génétique afin d'augmenter leur efficacité régénérative. Par exemple, une exposition au VEGF conduit à une induction des facteurs de survie cellulaire (Akt et Bcl-xL) et une diminution d'expression des inhibiteurs du cycle cellulaire (p16 et p21). Une optimisation de la greffe

cellulaire a été observée suite à l'exposition des cellules souches à l'IGF-1. En ce qui concerne la modification génétique des cellules, il est possible de leur faire exprimer des récepteurs cellulaires en plus grande quantité. C'est le cas pour le récepteur CCR1 qui, s'il est plus exprimé, permet aux cellules d'avoir un potentiel migratoire plus important et une diminution de l'apparition d'apoptose (Golpanian et al., 2016).

➤ Modes d'administration des cellules souches

Comme pour tout produit administré lors d'une thérapie, il est indispensable de définir la voie d'administration ainsi que le nombre et la fréquence d'applications, c'est-à-dire le protocole d'utilisation clinique.

La règle de base d'une expérimentation correctement conduite est la connaissance exacte de la nature et la quantité de la substance administrée. Ainsi, pour être cohérent avec les bonnes pratiques lors d'expérimentation cellulaire, les concentrations et la viabilité des cellules injectées doivent être mesurées avant et après injection. Ces quantités doivent être exprimées très précisément, soit en volume, soit en nombre de cellules par animal ou par unité de poids (Eskes et al., 2017).

Une étude a testé l'effet d'une augmentation de dose et de fréquence lors d'administration de MSC par voie intraveineuse sur des chiens. L'étude est composée de trois groupes d'animaux, un recevant une dose unique de MSC, le deuxième recevant une dose unique dix fois plus importante et le troisième recevant la dose initiale mais deux fois. L'étude n'a pas montré de différence significative entre les trois groupes concernant l'apparition de signes cliniques compatibles avec des effets indésirables suite à l'administration allogénique de cellules souches. Cependant, un des chiens ayant eu deux injections a été victime de vomissements, de toux, d'une augmentation des fréquences respiratoires et cardiaques et de la température sept jours après les administrations. Il a été établi que ces signes soient possiblement apparus à cause des injections de cellules souches mais ces résultats sont à interpréter précautionneusement (Kang, Park, 2014). De plus, la quantité de cellules injectées est très rarement standardisée bien que renseignée (Markoski, 2016). Il est ainsi difficile d'avoir des valeurs de référence pour évaluer un éventuel surdosage.

L'efficacité de la voie intraveineuse et ses effets secondaires sont controversés. Il a été décrit que l'administration dans la veine de cellules souches pourrait conduire à une capture pulmonaire avec formation de thrombi et d'occlusion micro-vasculaire. D'ailleurs, dans cette même étude, quatre chiens ont d'ailleurs montré un œdème et la présence d'hémorragie pulmonaires grâce à un examen tomographique (Kang, Park, 2014).

1.2.2. Utilisation en médecine vétérinaire

En médecine vétérinaire, la quasi-totalité des tissus peuvent être réparés ou régénérés par action de cellules souches. Les protocoles disponibles dans la littérature utilisent principalement des cellules souches mésenchymateuses dérivées de la moelle osseuse et du tissu adipeux. Prélever ces deux types cellulaires permet de diminuer la morbidité au prélèvement (de Bakker et al., 2013).

➤ Animaux de sport et pathologies ostéoarticulaires

Les animaux de sport sont un modèle de choix pour les pathologies articulaires, tendineuses, cartilagineuses et ligamenteuses. Les études sont surtout portées sur le cheval pour lesquels les résultats sont prometteurs (Markoski, 2016).

○ *Tissu musculaire*

Après un effort intense, le cheval peut être victime d'un syndrome appelé rhabdomyolyse à l'exercice. Cela conduit à la destruction des fibres musculaires et une myosite. Une étude a étudié les effets d'une injection autologue de fraction cellulaire mononucléaire de la moelle osseuse contenant des CSM combinée à du plasma riche en plaquettes (PRP), contenant des facteurs de croissance. L'injection a été réalisée directement sur le site lésionnel du muscle repéré par échographie. Tous les chevaux ont montré une amélioration significative et après un an, 11 parmi les 13 ont pu retrouver un niveau d'activité égal à celui avant l'atteinte par le syndrome. En ce qui concerne les deux autres chevaux, les auteurs émettent l'hypothèse que l'âge et l'état des donneurs peuvent influencer sur les propriétés des cellules souches (Torricelli et al., 2011).

○ *Tissu tendineux*

En ce qui concerne les tendons, de plus en plus de protocoles décrivent des issues favorables suite à l'utilisation de cellules souches combinées à des facteurs de croissance. Les principaux facteurs de croissance étudiés sont le facteur morphogénétique de l'os (BMF), le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), le FGF, VEGF et le facteur de croissance insuline-like 1 (Bussche, Van de Walle, 2014 ; Carvalho et al., 2013).

Par exemple, des chevaux soumis à l'administration d'ASC et de plaquettes ont montré une diminution de la vitesse d'évolution d'une tendinite parfois jusqu'à 16 semaines. Une meilleure organisation des fibres de collagène et une diminution de l'infiltrat inflammatoire ont été mises en évidence par rapport au groupe témoin (Smith et al., 2003).

- *Tissu cartilagineux*

Bien que l'apparition de lésion au niveau des cartilages active le homing des cellules souches, l'activité de ce mécanisme est physiologiquement très faible dans cette partie de l'organisme. Comme les MSC ont une capacité de différenciation pour les lignées ostéogéniques et chondrogéniques, elles sont un outil de choix dans ce contexte.

In vitro, il semblerait que les BMSC aient un potentiel de différenciation chondrogénique supérieur aux ASC.

- *Tissu ligamentaire*

Une étude a évalué l'efficacité des MSC dans le traitement d'une maladie dégénérative du ligament chez le cheval. Le protocole est composé d'injections de MSC allogéniques provenant du commerce couplées à du plasma riche en plaquettes à quatre et seize semaines après le diagnostic. Après trente-deux semaines, grâce à un suivi échographique, une restauration complète et un retour à l'état initial ont été observés (Vandenberghe et al., 2015).

- Animaux de compagnie

La médecine régénérative est maintenant mise à disposition des vétérinaires. En effet, Vetbiobank est le premier laboratoire français de médecine régénérative vétérinaire. Il propose des thérapeutiques à base de cellules stromales mésenchymateuses pour les espèces canine, féline et équine. Des traitements sont proposés pour l'arthrose et la gingivo-stomatite. Certains produits sont en développement clinique dont un pour la dermatite atopique (www.vetbiobank.com).

Dans la littérature, différentes pathologies, autres que celles touchant le système locomoteur font l'objet d'essais cliniques.

Lors d'un défaut de tissu parodontal chez le chien, la greffe d'ASC et de PRP donne de bons résultats. Non seulement par la matière générée mais surtout de part sa structure, proche de celle d'origine. En effet, l'architecture des tissus formés comprend de l'os alvéolaire et des structures proches du ciment dentaire et du ligament parodontal. Le rôle du PRP serait principalement de prévenir l'invasion par le tissu gingival des lésions (Tobita, Uysal, 2013).

Chez des chiens victimes de fistules périanales réfractaires à la cyclosporine, l'ajout de MSC au traitement a permis la fermeture complète des fistules chez tous les chiens après trois mois. L'usage allogénique d'ASC a été testé chez des chats ayant une entéropathie chronique. Après deux mois de suivi, une amélioration clinique a été observée mais il n'y a pas de changement notable en ce qui concerne les analyses de laboratoire. L'usage allogénique d'ASC a aussi été exploré chez les chats souffrant d'insuffisance rénale chronique. Après huit

semaines, bien que certains chats aient été victimes de vomissements, une baisse de la créatininémie et une augmentation du débit de filtration glomérulaire toutes deux significatives ont été reportées. Cela traduit une amélioration de la fonction rénale (Hoffman, Dow, 2016).

Des protocoles pour le traitement de maladies cardiaques, de lésion ou de dysplasie de la moelle osseuse à base d'ASC sont aussi très prometteurs pour l'espèce canine (Markoski, 2016). De plus, il faut élargir le champ des possibilités aux protocoles testés pour la médecine humaine.

1.2.3. Applications en médecine humaine

Chez l'Homme, la thérapeutique à base de cellules souches reste surtout expérimentale sauf pour quelques cas particuliers comme les transplantations de moelle osseuse pour les traitements des leucémies, anémies ou d'immunodéficience. Les cellules souches cutanées sont utilisées lors de brûlure sévère. Les cellules souches du limbe sont utilisées lors de lésions cornéennes (Dulak et al., 2015).

Même si la majorité des MTI sont en essais cliniques de phase précoce, quelques rares médicaments de thérapie cellulaire ont eu des autorisations de mise sur le marché (AMM) dont l'Holoclar dans le traitement chez l'adulte de la déficience en cellules souches limbiques. Ce médicament est à base de cellules souches limbiques autologues amplifiées.

En ce qui concerne la thérapeutique cardiaque, les MSC sont très prometteuses pour les cardiomyopathies ischémiques et non ischémiques. Globalement, il y a deux stratégies : remuscler les cicatrices apparues sur le muscle cardiaque qui réduisent l'efficacité de ses contractions grâce à l'usage de cellules souches pluripotentes induites (iPS) ou d'ESC ou stimuler les mécanismes endogènes de réparation en faisant appel aux MSC (Golpanian et al., 2016).

Le site [clinicaltrials.gov](https://www.clinicaltrials.gov) recense les essais cliniques en cours dans le monde. En 2020, 6 318 essais portent sur les cellules souches comme traitement (<https://www.clinicaltrials.gov/>, recherche avancée avec « stem cell » comme mot clé dans la catégorie « traitement/intervention », le 15/11/2020) . Plus de la moitié de ces essais ont lieu aux Etats-Unis. En Europe, cela représente 1 295 essais cliniques dont la répartition est montrée en figure 4.

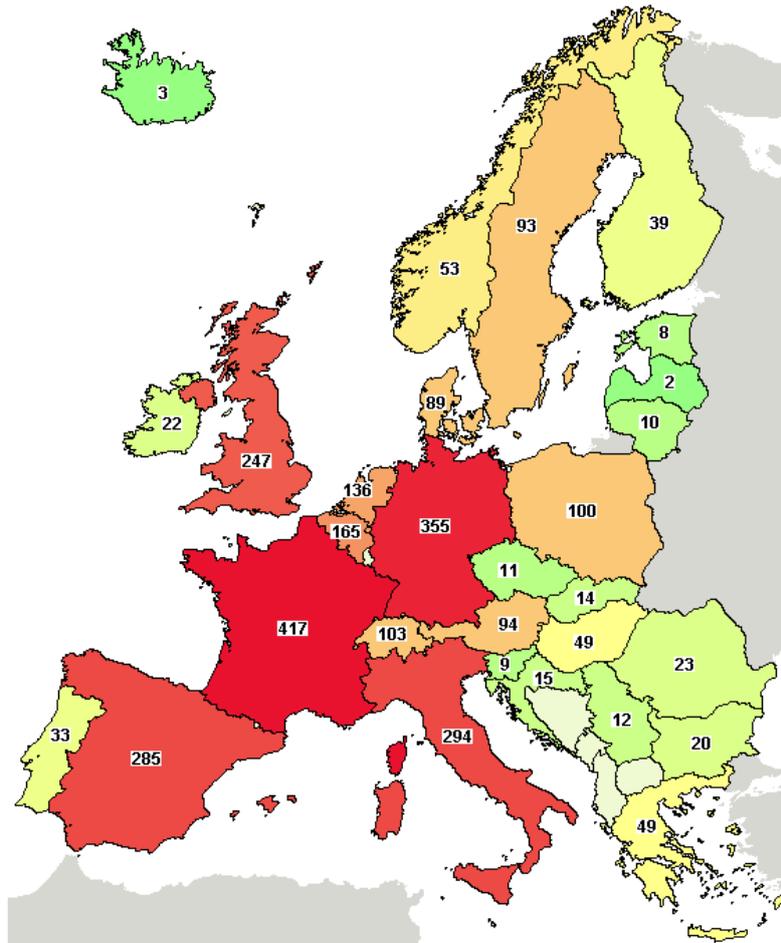


Figure 4 : Répartition du nombre d'essais cliniques sur les cellules souches en Europe (<https://ClinicalTrials.gov>)

Les maladies concernées par les essais cliniques sont très variées, montrant tout le potentiel des cellules souches en thérapeutique. Parmi ces maladies nous pouvons citer :

- La néphropathie diabétique
- Les tumeurs hématologiques malignes
- La dysplasie bronchopulmonaire
- La dystrophie musculaire de Duchenne
- L'urticaire chronique
- Les neuropathies optiques
- L'autisme
- Les fistules consécutives à la maladie de Crohn
- Les lésions de la moelle osseuse
- Les carences en hormone sexuelle
- La maladie de Charcot
- Les fractures osseuses
- L'infirmité motrice cérébrale
- Le diabète sucré de type 1
- Le diabète de type 2
- L'infertilité due à une azoospermie non obstructive
- L'insuffisance ovarienne précoce
- L'arthrite rhumatoïde
- Les scléroses
- Les neuropathies périphériques

Si on se limite aux cellules souches mésenchymateuses tous types confondus, 1 186 essais cliniques sont annoncés à travers le monde (<https://ClinicalTrials.gov>, consulté le 30/09/2020).

L'efficacité d'un nouveau traitement humain et sa sécurité doivent être évaluées sur deux modèles animaux. La première est souvent un rongeur et la deuxième est un animal non rongeur, présentant des similarités avec l'Homme. Il s'agit souvent de l'espèce canine qui est assez similaire à l'espèce humaine sur les plans anatomiques, physiologiques et pathogéniques. Elle permet une évaluation plus détaillée des effets thérapeutiques (de Bakker et al., 2013).

Pour tester les cellules souches sur les animaux, il y a deux possibilités. La première utilise des modèles dit immunocompromis, comme les souris Nude ou les NOD-SCID. Il s'agit d'individus ne possédant pas de lymphocyte T. Cela permet de ne pas avoir de phénomène de rejet quand des cellules étrangères sont transplantées. Ce modèle est idéal pour examiner le comportement des cellules d'origine humaine sur les modèles animaux. De plus, le potentiel de différenciation des cellules *in vitro* et le fait qu'elles conservent les anomalies génétiques lors de la division représentent un potentiel majeur pour la modélisation et l'étude de maladies en laboratoire (Lin et al., 2013).

La deuxième possibilité est de procéder à des transplantations autologues, l'animal ne réagissant normalement pas à des cellules provenant de son propre organisme (Minteer et al., 2012)

1.3. Les dangers liés à l'utilisation des cellules souches

L'utilisation des cellules souches en thérapie peut exposer à des risques. La Food and Drug Administration (FDA) a d'ailleurs communiqué à ce sujet. En 2019, l'organisation mettait en garde toute personne projetant d'avoir recours aux cellules souches selon un protocole non validé. Les conséquences mises en avant vont d'une réaction au site d'administration à une inefficacité totale du traitement voire l'apparition de tumeur. Notre étude va maintenant se focaliser sur ces différents aspects (Commissioner, 2019).

1.3.1. Apparition d'anomalies génétiques des cellules en culture

1.3.1.1. Les différents types d'anomalies chromosomiques

➤ Anomalie de nombre

Une cellule qui contient le nombre normal de chromosomes dans l'espèce donnée est dite euploïde. Par exemple, une cellule humaine normale contient 23 paires de chromosomes ($2N = 46$).

On parle de polyplôïdie quand tous les chromosomes sont surnuméraires. Par exemple, si une cellule humaine contient 23 groupes de quatre chromosomes ($4N = 92$), cette cellule est dite tétraploïde (Huret et al., 2012).

Quand le nombre de chromosomes total n'est plus un multiple du nombre de chromosomes en situation normale, on parle d'aneuploïdie (Orr et al., 2015). Dans ce cas, si un des chromosomes est surnuméraire on parle de trisomie. Si un est manquant, on parle de monosomie.

Le caryotype est toujours déséquilibré lors d'une anomalie de nombre, c'est-à-dire qu'il y a perte ou gain de matériel génétique.

Ces anomalies de nombre peuvent apparaître soit parce que la cellule mère contient déjà une anomalie chromosomique de nombre soit à cause d'une non disjonction des chromosomes lors de la division cellulaire (Huret et al., 2012). La tétraploïdie peut aussi apparaître suite à une fusion de cellule et de noyau, comme pour les syncaryons évoqués précédemment.

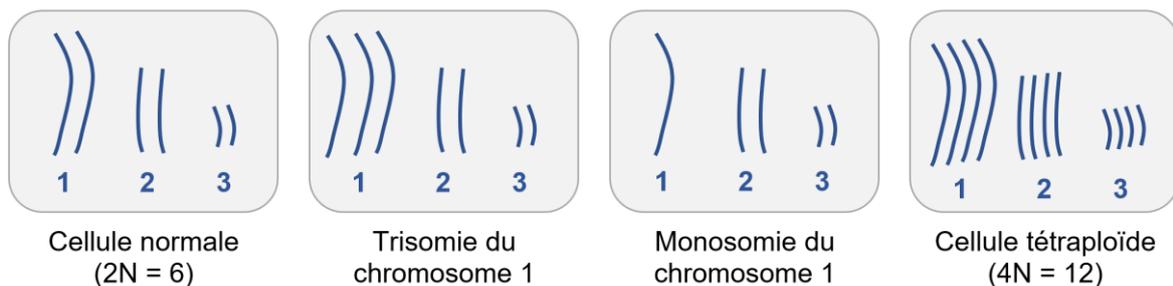


Figure 5 : Schéma des anomalies chromosomiques de nombre

➤ Anomalie de structure

Les chromosomes peuvent subir des cassures éventuellement suivies de réorganisation des segments chromosomiques générés. De plus, plusieurs cassures et recollement peuvent se combiner. Ainsi, les types d'anomalies de structure sont nombreux. Nous n'allons donc exposer que celles qui sont le plus fréquemment rencontrées.

Parmi les anomalies de structure les plus courantes, on trouve les translocations. Elles reposent sur le principe de cassure et d'échange réciproque avec un autre chromosome. Le plus souvent le site de cassure ne se trouve pas dans une séquence codante et ne provoque pas de mutation. Ainsi, le caryotype peut rester équilibré suite à une cassure. Il est aussi important que le segment recombiné n'active pas un gène important, pouvant activer des gènes oncogéniques.

Si le recollement du fragment ne s'effectue pas sur les bords libres du chromosome, on parle d'insertion. Quand une cassure a lieu mais que le fragment détaché est perdu, il s'agit d'une délétion. Quand le fragment est retrouvé en plusieurs exemplaires, on parle de duplication.

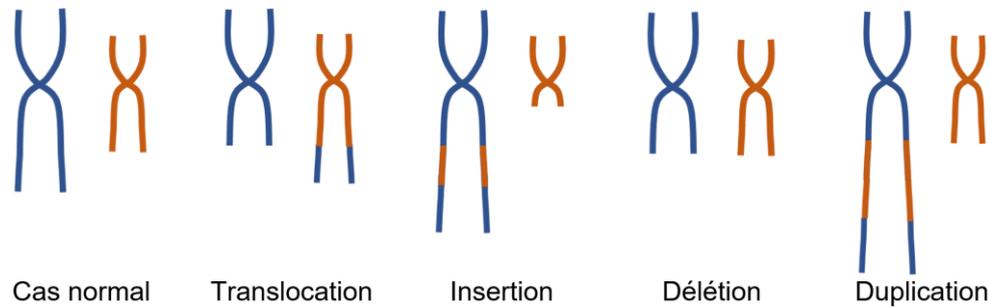


Figure 6 : Schéma des anomalies chromosomiques de structure

Ces anomalies peuvent provenir des cellules mères si la cellule est viable et non éliminée par les mécanismes de réparation ou apparaître lors de la division cellulaire, selon la disposition des chromosomes, la disposition des fragments peuvent varier (Huret et al., 2012).

1.3.1.2. Méthodes pour étudier la stabilité chromosomique

Deux méthodes principalement utilisées pour l'analyse des chromosomes sont le G-banding et la FISH : Fluorescent in-situ hybridization.

➤ Obtention des chromosomes

La première étape de l'analyse des chromosomes est l'étalement de métaphases. Il s'agit du seul stade cellulaire pendant lequel les chromosomes sont condensés et seront facilement identifiables et individualisables. Les résultats des analyses menées dépendent de la qualité de cette étape.

Les protocoles peuvent varier selon le type cellulaire ou l'analyse menée ensuite.

Suite à une étape de culture avec un agent mitogène, les cellules sont en suspension. Elles subissent un traitement hypotonique qui augmente le volume cellulaire jusqu'à rompre la membrane des globules rouges pour les cultures de sang, permettant de les éliminer du milieu. Plusieurs étapes de centrifugations sont réalisées afin de fixer et laver les cellules qui se trouvent dans le culot. Les cellules sont ensuite diluées à la concentration souhaitée puis disposées et étalées sur une lame à l'aide d'une pipette (Henegariu et al., 2001).

➤ Giemsa (G)-banding

Le G-banding est la méthode de banding la plus répandue. Grâce au Giemsa, les chromosomes sont colorés en bandes claires et foncées, ce qui permet d'identifier des chromosomes ou des régions de chromosomes.



Figure 7 : Caryotype d'une cellule souche mésenchymateuse humaine après méthode de G-banding (Borgonovo et al., 2014).

Cette technique permet de compter les chromosomes dans leur globalité et au sein de leur paire. En effet, si la cellule est aneuploïde, le G-banding permet de déterminer quelle paire de chromosomes est concernée. D'éventuels remaniements chromosomiques peuvent aussi être détectés après construction du caryotype.

L'avantage de cette coloration est qu'elle ne nécessite pas de matériel particulier. Les bandes peuvent être observées avec un microscope classique. De plus, la coloration persiste et permet des observations dans le temps (Schreck, Distèche, 2001).

➤ FISH : Fluorescence in-situ hybridization

L'hybridation in situ permet de marquer des cellules en utilisant une des propriétés des acides nucléiques : la réassociation spécifique d'une molécule d'acide désoxyribonucléique (ADN) simple brin marquée (appelée sonde), avec sa séquence complémentaire (appelée cible).

Un noyau contient des molécules d'ADN qui sont double-brin. La dénaturation va séparer ces deux brins. On met au contact de l'ADN dénaturé de la sonde simple brin dont la séquence correspond à celle du chromosome. En abaissant la température, il va y avoir hybridation des séquences complémentaires. La sonde va alors être intégrée à la molécule d'ADN. Si cette sonde est marquée, il sera alors possible de détecter des séquences particulières du matériel génétique de la cellule. La révélation de la sonde se fait souvent grâce à des anticorps marqués. Ils vont envoyer des signaux lumineux caractéristiques, pouvant être vus grâce un microscope en fluorescence. La sonde est spécifique d'un chromosome entier ou d'une portion de chromosome qu'il devient donc possible de suivre (Muleris, 1996).

Pour utiliser la sonde, il faut dénaturer l'ADN. Cela s'effectue en élevant la température. La FISH se réalise donc sur des coupes histologiques de tissus ou des prélèvements cellulaires et non sur des tissus vivants.

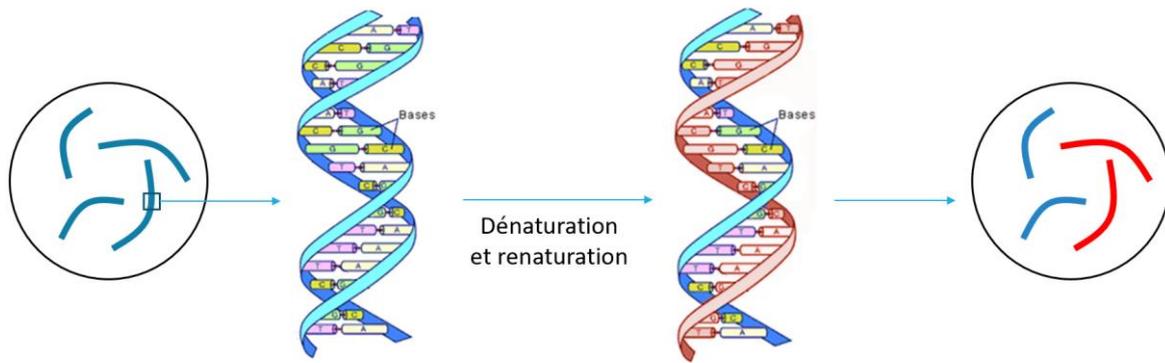


Figure 8 : Schéma représentant le principe de la FISH. La sonde étant colorée en rouge dans cet exemple.

➤ Utilisation du G-banding et de la FISH en pratique

Une des limites du G-banding, lors de l'étude d'une population de cellules en culture, est que l'analyse porte uniquement sur les cellules en métaphases, soit environ 0,01% des cellules (Jung-Ah Kim et al., 2015). De plus, sous conditions de culture stressantes, les cellules peuvent passer dans un état de quiescence et les anomalies ne seront pas détectées par G-banding (Seon Young Kim et al., 2015).

Plusieurs études combinent donc ces deux méthodes pour analyser les chromosomes des cellules souches au cours de leur culture (Meza-Zepeda et al., 2008 ; Nikitina et al., 2018). L'une d'entre elles a d'ailleurs mis en avant le fait qu'il n'y avait pas de corrélation significative entre les anomalies détectées par le G-banding et celles détectées par la FISH. Les auteurs conseillent donc de systématiquement mener des analyses grâce à ces deux techniques pour maximiser le taux de détection d'éventuelles anomalies chromosomiques (Seon Young Kim et al., 2015 ; Jung-Ah Kim et al., 2015).

D'autres techniques, grâce à des analyses informatiques, permettent une résolution beaucoup plus importante de l'étude des fragments génomiques. Il s'agit de l'hybridation génomique comparative (Comparative genomic hybridation, CGH) et du caryotypage spectral (Spectral karyotyping, SKY). Cependant, le coût élevé et le matériel requis pour ces analyses font qu'elles ne sont pas utilisées en routine pour le moment (Cheung, Bi, 2018 ; Schrock et al., 1996).

1.3.1.3. Etudes disponibles au sujet de la stabilité des cellules en culture

Peu d'études sont disponibles au sujet de la stabilité chromosomique des cellules souches au cours de leur culture. Elles sont principalement réalisées chez l'homme avec des MSC de différentes origines. Les résultats ne sont pas homogènes et parfois contradictoires.

Cela est souvent expliqué par un manque de standardisation des contrôles génétiques à réaliser sur les cellules avant leur usage en thérapeutique. Les différents auteurs utilisant alors parfois le G-banding seul (Ueyama et al., 2012 ; Bellotti et al., 2013 ; Binato et al., 2012), le G-banding associé à la FISH (Meza-Zepeda et al., 2008 ; Seon Young Kim et al., 2015 ; Jung-Ah Kim et al., 2015 ; Nikitina et al., 2018) ou la CGH bien qu'il soit mentionné que la réelle signification des anomalies décelées avec cette méthode n'est pas toujours connue (Meza-Zepeda et al., 2008).

L'espèce canine est rarement l'objet de ce type d'étude. L'analyse des caryotypes est réalisée avec des méthodes de banding seules et n'a pas montré d'anomalie chromosomique pour le moment. Cela est le cas de MSC pendant quatre passages (Filioli Uranio et al., 2011), d'ES-like produites à partir de fibroblastes de chien jusqu'à 30 passages (Lee et al., 2011) et d'ESC jusqu'à 23 passages (Vaags et al., 2009). Comme nous l'avons vu précédemment, l'emploi des méthodes de banding seules n'est pas optimal pour mettre en évidence d'éventuelles anomalies chromosomiques (Seon Young Kim et al., 2015 ; Jung-Ah Kim et al., 2015). L'apparente stabilité des cellules souches canines en culture est donc encore questionnable.

1.3.1.4. Facteurs étudiés pouvant influencer sur la stabilité des cellules en culture

Selon Wang, la présence d'anomalies chromosomiques en culture peut provenir soit d'une population qui a subi une transformation en culture soit d'une population anormale dans les cellules du donneur qui se serait multipliée. Il est donc nécessaire d'étudier à la fois les méthodes de culture et les populations présentes dans les cellules prélevées pour culture (Wang et al., 2005).

1.3.1.4.1. Temps de culture et nombre de passages

En 2012, une étude a recoupé les données de quinze publications parues entre 2000 et 2012 au sujet de la stabilité chromosomique des BMSC et des ASC *in vitro*. Pour la majorité des études menées, le temps de culture et le nombre de passages n'ont pas été retenus comme facteurs déterminants dans l'apparition d'anomalies chromosomiques (Ferreira et al., 2012).

Cependant, par la suite, plusieurs études ont mis en évidence une augmentation de la fréquence de détection des aneuploïdes avec un allongement du temps de culture. Différents types cellulaires ont montré ces résultats dont les ESC-like (Garcia-Martinez et al., 2016), les MSC (Stultz et al., 2016 ; Borgonovo et al., 2014), les BMSC (Ueyama et al., 2012 ; Binato et al., 2012) et les ASC (Froelich et al., 2013 ; Bellotti et al., 2013).

Suite à ces observations, les recommandations liées à la sécurité divergent. Certains auteurs conseillent de se limiter à l'usage des cellules issues des passages précoces (Bellotti et al., 2013 ; Binato et al., 2012 ; Jung-Ah Kim et al., 2015) alors que d'autres, ayant observé une

incidence décroissante des anomalies au cours de la culture conseillent des cultures longues pour avoir un génotype plus stable (Meza-Zepeda et al., 2008).

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette divergence dans les résultats. Comme nous l'avons vu précédemment, la méthode d'analyse du matériel génétique des cellules a son importance. Cela est d'autant plus vrai dans les premiers temps de culture où les cellules semblent présenter des anomalies plus mineures et donc plus difficiles à détecter (Ferreira et al., 2012). Il faut aussi garder à l'esprit que d'autres facteurs entrent en jeu et peuvent moduler la fréquence d'apparition des anomalies génétiques.

1.3.1.4.2. Conditions de culture

Plusieurs auteurs avancent le fait que les conditions de culture ont leur importance quant à l'apparition d'anomalies génétiques sur les cellules souches (Garcia-Martinez et al., 2016).

L'amplification de BM-MSC dans un environnement pauvre en dioxygène (5%) favorise l'instabilité chromosomique dès les passages précoces et s'accompagne d'une augmentation du taux de prolifération (Ueyama et al., 2012).

Une étude a montré que l'ajout de sérum de veau fœtal à 10% dans le milieu de culture conduit à une augmentation significative de la fréquence d'anomalies génétiques (Crespo-Diaz et al., 2011). Cependant, les modes de culture n'étant pas standardisés il est difficile de tirer des conclusions quant à ce facteur.

1.3.1.4.3. Obtention des cellules souches

➤ Présence d'anomalies dans les cellules prélevées

Des cellules aneuploïdes ont été reprogrammées pour donner des cellules pluripotentes. L'anomalie chromosomique de ces cellules a persisté après reprogrammation. Cela montre que des anomalies chromosomiques dans les cellules en culture peuvent provenir de cellules prélevées anormales (Baird et al., 2015 ; Garcia-Martinez et al., 2016). De plus, cela a un intérêt majeur pour la possibilité d'étudier des maladies héréditaires *in vitro*.

Dans certaines études, les caryotypes ont été analysés avant mise en culture des cellules. Par exemple, des MSC prélevées sur un Homme de 67 ans ont montré dès le deuxième passage des trisomies sur les chromosomes 4, 5, 10 et X. Or, le caryotype des cellules avant expansion ne montrait aucune anomalie (Borgonovo et al., 2015). Dans ce cas précis, les anomalies sont apparues au cours de la culture cellulaire.

Le même phénomène a été mis en évidence dans une autre étude. Le but de l'étude était de comparer la mise en culture de MSC génétiquement anormales et des cellules prélevées sur

des individus sains. Les cellules des témoins, qui ne présentaient pas d'anomalie génétique à la sélection, ont montré des trisomies chez 16% des patients sains (Kouvidi et al., 2016).

➤ Types cellulaires prélevés

Il semblerait que les ASC soient plus sujettes aux remaniements chromosomiques que les BMSC (Ferreira et al., 2012).

➤ Méthode de dissociation des cellules

Les méthodes de dissociation manuelle et enzymatique ont été comparées pour des ESC. Il n'y a pas de différence significative entre les deux méthodes par rapport à l'apparition d'aneuploïdie au cours de la culture (Tosca et al., 2015).

➤ Age de l'individu donneur

En ce qui concerne les cellules somatiques, les aneuploïdies sont plus fréquentes quand l'âge augmente. En ce qui concerne les cellules souches, leur nombre ne diminue pas dans le temps mais c'est leur capacité à se différencier qui est moins efficace (Garcia-Martinez et al., 2016). Ces deux informations sont possiblement liées, les aneuploïdes pouvant conduire à une perte de capacité de différenciation des cellules.

1.3.1.5. Conséquences des anomalies génétiques en culture

➤ Avantage en culture

Certaines études avancent que la présence d'une anomalie génétique n'avantagerait pas la croissance de la population par rapport à une population sans anomalie.

Cependant, d'autres études mettent en avant le fait que la fréquence de détection des anomalies génétiques augmente jusqu'à un certain nombre de passages après lesquels cette fréquence de détection diminue (Binato et al., 2012 ; Meza-Zepeda et al., 2008 ; Stultz et al., 2016). Parfois, cette observation n'est faite que chez quelques individus (Kouvidi et al., 2016).

Ces résultats seraient à nuancer car bien qu'il semblerait qu'une aneuploïdie ne soit pas viable et disparaisse après quelques passages, elle pourrait être qualifiée d'adaptation et permettre à une population de se multiplier au dépend des populations saines (Garcia-Martinez et al., 2016 ; Jung-Ah Kim et al., 2015).

➤ Apparition de critères de malignité en culture

La majorité des cellules cancéreuses sont aneuploïdes. Ces aneuploïdes contribuent aussi à leur évolution (Sansregret, Swanton, 2017). En effet, les réarrangements chromosomiques peuvent inactiver les gènes suppresseurs de tumeurs aussi appelés anti-oncogènes ou conduire à l'induction de gènes proto-oncogènes (Lluis, Cosma, 2010).

Les anomalies génétiques pouvant être décelées lors de la culture des cellules souches, il est nécessaire d'évaluer les risques de ces cellules lors de l'administration à un individu quant à la formation de tumeur (Ueyama et al., 2012 ; Binato et al., 2012 ; Seon Young Kim et al., 2015 ; Jung-Ah Kim et al., 2015).

Des cellules souches mésenchymateuses humaines dérivées de la moelle osseuse et du foie ont présenté spontanément après cinq semaines de culture une morphologie et un avantage de croissance, envahissant les cellules saines (4 cultures sur 46). L'analyse du matériel génétique a révélé la présence de duplications et de délétions. Ces cellules ont été transplantées dans des souris immunocompromises de souche NOD/SCID. Des tumeurs partageant des caractéristiques avec un sarcome sont apparues. Bien que cet événement soit rare en culture, il apparaît indispensable de surveiller l'émergence de critères de malignité au sein des cellules en culture (Pan et al., 2014).

Ce phénomène a aussi été observé chez la souris. Des BMSC ont été mises en culture et ont montré des capacités de prolifération plus élevée que la normale au vingt-neuvième passage. Quand ces cellules ont été transplantées, elles ont formé des fibrosarcomes. Les mécanismes à l'origine de ce processus retenus dans l'étude sont l'accumulation d'anomalies génétiques mais aussi une augmentation progressive de l'activité télomérase dont le rôle est d'ajouter les télomère lors de la réplication pour conserver la longueur des chromosomes et une augmentation de l'expression de c-myc qui est un proto-oncogène (Miura et al., 2006).

➤ Perte de la capacité de différenciation des cellules

Rapidement après avoir isolé des BM-MSc et les avoir mises en culture, certaines cellules se sont distinguées par le fait qu'elles étaient plus larges et multinucléées. Elles sont entrées dans une phase dite dormante pendant laquelle elles ne se sont pas divisées. Après une mise en culture de deux mois, ces mêmes cellules ont donné une lignée cellulaire immortalisée non tumorale caractérisée par des cellules mononucléées, qui ont montré une capacité de multiplication plus importante mais avec un potentiel de différenciation plus bas. En effet, ces cellules ont proliféré pendant plus d'un an. Elles étaient capables de se différencier en cellules de la lignée osseuse mais incapables de se différencier en chondrocytes et adipocytes (Ahmadbeigi et al., 2011).

La capacité de différenciation est indispensable pour mener à bien les thérapies régénératives. Il est donc important de considérer l'éventuelle altération de cette capacité au cours de la culture des cellules souches.

1.3.2. Stimulation des gènes oncogènes des cellules environnantes

Dans ce cas de figure, ce ne sont pas les anomalies génétiques portées par la cellule qui sont incriminées mais les facteurs qu'elles sécrètent.

Chez l'Homme, le transfert autologue de tissu adipeux pour la reconstruction de tissus mous est décrit depuis longtemps. Il a notamment été envisagé comme moyen de reconstruction mammaire suite à une mammectomie. La survie du greffon à long terme étant variable, il a été envisagé d'ajouter des ASC au greffon dans le but de soutenir l'angiogenèse, souvent insuffisante. Une étude sur l'innocuité de ce procédé a été réalisée. *In vitro*, il a été observé que les ASC accélèrent la prolifération des effusions métastatiques pleurales. *In vivo*, le même phénomène a été observé lorsque les cellules tumorales exprimaient le facteur CD90+. Cela serait dû à la sécrétion d'adipsine associée aux adipocytes et de leptine par les ASC (Zimmerlin et al., 2011).

1.3.3. Effets secondaires des cellules souches

Il est rare d'avoir des effets secondaires observés lors de l'utilisation des cellules souches. Le cas le plus fréquent est une réaction au site d'injection mais qui se résout sans intervention.

Nous avons vu précédemment le cas d'un chien ayant été victime de signes cliniques sept jours après les administrations de cellules souches. Le lien cause à effet n'a pas été clairement établi avec les injections de cellules. Les mécanismes d'action n'ayant pas tous été élucidés, il est difficile de faire le lien avec une éventuelle mise en cause des cellules souches.

De même, il a été décrit que l'administration intraveineuse de cellules souches pourrait conduire à une capture pulmonaire avec formation de thrombi et d'occlusion vasculaire (Kang, Park, 2014).

Comme le montre la littérature, les cellules souches ouvrent de grands espoirs thérapeutiques pour le développement de nouveaux MTI dans de très nombreuses affections pour lesquelles les solutions thérapeutiques actuelles sont insuffisantes.

Cependant, la recherche des effets thérapeutiques des cellules souches doit aller de pair avec la démonstration de la sécurité de leur emploi afin de garantir la translation jusqu'au marché du médicament des thérapies innovantes à base de cellules souches.

C'est dans ce contexte qu'apparaît toute l'utilité de la cytogénétique. En effet, grâce à des outils performants, il est possible d'évaluer l'efficacité ou la sécurité des cellules souches. De même, ils permettent de produire de nouvelles données de biologie, dès le prélèvement des cellules souches, jusqu'à l'évaluation de leur efficacité en passant par les étapes in vitro, leur administration et leur biodistribution. Dans notre travail, cela concerne notamment les ASC.

2. PARTIE EXPERIMENTALE

Développer de nouveaux MTI passe par la modélisation préclinique pour la médecine humaine sur des modèles animaux de pathologie comparée. C'est dans cette optique que l'ANR ASC PARO, dans laquelle l'ENVT et STROMALab sont partenaires, a pour volonté de développer des ASC canines, notamment pour le traitement de la parodontite. La méthode FISH permet de détecter des cellules sur coupe histologique grâce à des sondes chromosomiques. Il s'agit donc d'un outil de choix pour réaliser des études de tracking des cellules souches. Cependant, il n'existe pas à l'heure actuelle de sondes FISH spécifiques du chien, en raison d'un marché très confidentiel pour ce type d'outil moléculaire.

Dans notre travail, ces sondes ont été développées puis leur efficacité a été validée, à la fois sur cytologie et sur lames histologiques.

La cytogénétique permet également d'explorer la stabilité génétique des cellules souches dans les tissus natifs et au cours des passages successifs en culture. Notre travail et les sondes FISH anti-chromosomes sexuels produites ont permis de montrer à la fois l'existence d'une fraction non négligeable de cellules binucléées dans les tissus natifs, mais aussi d'évaluer l'évolution de la polyploïdie en condition de culture, avec une augmentation avec le nombre de passages, pour les tissus et les ASC d'origine canine.

2.1. Matériels et méthodes

2.1.1. Objectif de notre étude

2.1.1.1. Réalisation de sondes chromosomiques

La première partie de notre étude est la réalisation de sondes chromosomiques permettant de détecter des cellules souches sur coupe histologique grâce à la méthode FISH. Les cellules souches et les coupes histologiques sont d'origine canine.

Les sondes sont spécifiques d'un chromosome or deux individus canins de même sexe ont les mêmes chromosomes. Notre choix pour la production des sondes s'est donc porté sur les chromosomes sexuels du chien. En effet, en produisant une sonde spécifique du chromosome X canin et une sonde spécifique du chromosome Y canin, il est possible de différencier les cellules mâles de phénotype XY des cellules femelles de phénotype XX.

Dans cette optique, les animaux receveurs sont des chiennes et les cellules injectées proviennent de chiens mâles. Le signal envoyé par la sonde du chromosome Y est donc caractéristique des cellules souches injectées. La sonde du chromosome X sert alors de témoin pour vérifier qu'il n'y ait pas de défaut d'hybridation.

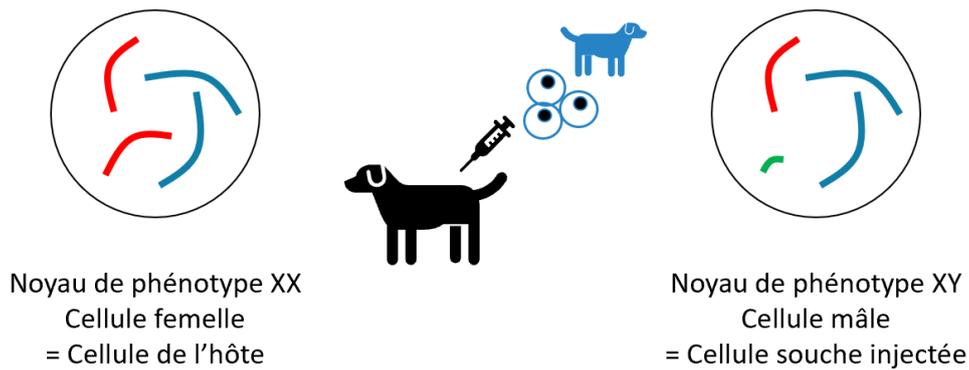


Figure 9 : Schéma représentant le principe du marquage recherché avec la sonde du chromosome X envoyant un signal rouge et celle du Y un signal vert.

Les sondes sont produites par amplification de matériel génétique obtenu par microdissection. Les chromosomes sexuels sont facilement reconnaissables en métaphase. En effet, dans le caryotype canin, le chromosome X est le seul chromosome submétacentrique et le chromosome Y est le seul chromosome métacentrique.

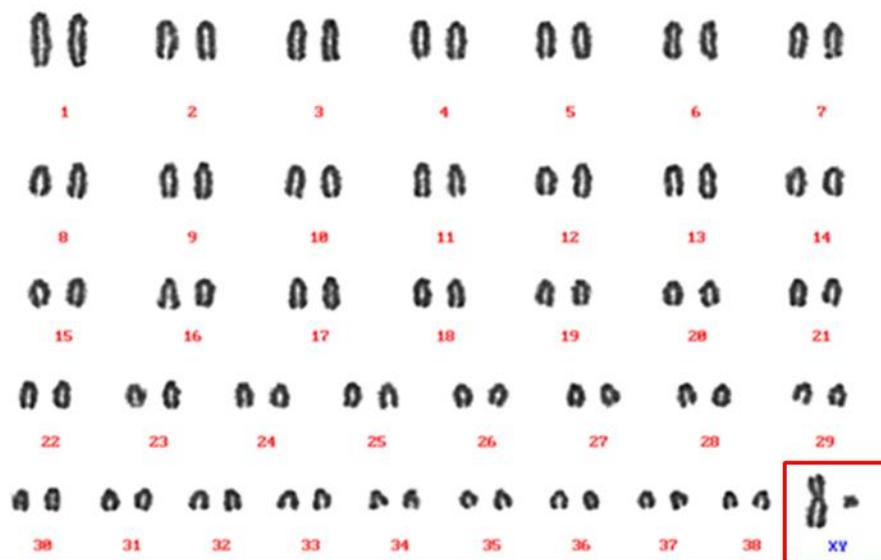


Figure 10 : Caryotype canin (www.vetogene.com)

Le modèle canin est choisi pour l'étude car c'est le modèle animal de pathologie comparée utilisée pour la preuve d'efficacité des ASC dans le traitement de la parodontite (ANR ASC PARO, dans laquelle l'ENVT et STROMALab sont partenaires). Pour ce type d'études d'efficacité, des ASC canines ont été produites et caractérisées et la seule possibilité de les suivre au niveau tissulaire à distance de la greffe serait de disposer de sondes FISH pour les chromosomes sexuels.

2.1.1.2. Suivi des cellules souches en culture

Afin de mieux caractériser les ASC canines pour ces études, nous nous sommes intéressés à la stabilité chromosomique de ces cellules et plus précisément au suivi et à l'origine des polyploïdies au cours de la culture.

La culture des ASC commence par leur isolement à partir de la fraction stromale vasculaire (SVF) qui est obtenue après digestion du tissu adipeux. Les ASC sont isolées par leurs propriétés d'adhérence au plastique. Un lavage permet donc d'éliminer les cellules non-voulues. Les ASC sont ensuite amplifiées jusqu'à confluence. Cette étape est nommée passage 0 (P0).

Quand le fond de la boîte de culture des ASC est recouverte à confluence, les cellules sont décollées et retirées de la boîte. Les ASC ainsi isolées sont réintroduites dans de nouvelles boîtes à des concentrations préalablement déterminées. L'action de diviser ainsi la population cellulaire en culture s'appelle un passage et chaque nouvelle division augmente son rang d'une unité. Ainsi plus le nombre de passage est élevé, plus la durée de culture est longue.

Les ASC ont été analysées pour les passages P0, P1, P2 et P6. Pour cela, les chromosomes ont été colorés au Giemsa et comptés sur les étalements de métaphases.

Des polyploïdies ayant été observées dès le passage P0, la possibilité que des cellules polyploïdes se trouvent dans le tissu natif a été explorée. Elles ont été recherchées par la méthode FISH sur des coupes histologiques de tissu adipeux canin natif ainsi que des étalements de cellules provenant de la SVF et du P0.

Une autre hypothèse a été explorée selon laquelle les polyploïdies proviendraient d'erreur de division cellulaire. Pour cela, des ASC canines ont été marquées avec des sondes CellLight™ Nucleus-GFP, BacMam 2.0. Les noyaux ainsi colorés en rouge et en vert ont pu être suivis grâce à un système de capture vidéo afin d'observer les étapes de mitose ayant lieu *in vitro*.

2.1.2. Réalisation des sondes chromosomiques

2.1.2.1. Obtention de chromosomes à partir de sang

2.1.2.1.1. Prélèvement et mise en culture

Du sang est prélevé sur un chien sur un tube hépariné. Dans un tube Falcon® de 50mL, 10mL de milieu RPMI complétementé de 10% en sérum de veau foetal sont introduits. Ensuite 100µL de Pokeweed (un agent mitogène, qui induit notamment la prolifération des lymphocytes) sont ajoutés. Enfin, environ 15 gouttes de sang hépariné sont introduites dans le tube. Le mélange est rapidement homogénéisé et placé à l'étuve à 37°C pendant 72h. Les tubes sont inclinés de 45° environ dans l'étuve.

2.1.2.1.2. Arrêt des cultures et fixation

Une fois les tubes sortis de l'étuve, il n'est plus nécessaire de travailler dans des conditions stériles. Le culot est remis en suspension et 100 µL de colchicine sont ajoutés au milieu. La colchicine est un poison du fuseau achromatique, permettant de bloquer les divisions cellulaires, afin d'avoir le plus de cellules en métaphases possible. Les tubes sont placés droits dans l'étuve à 37°C pendant 2 heures.

2.1.2.1.3. Fixation des cellules

Les tubes sont ensuite centrifugés 10 minutes à 1600 tours/minute et le surnageant retiré. 20mL de choc hypotonique à 37°C sont ajoutés sur vortex. Le choc contient du sérum de veau nouveau-né dilué au sixième dans de l'eau distillée. Il est réalisé afin d'éliminer les globules rouges par hémolyse, d'éliminer le cytoplasme et la membrane cytoplasmique des globules blancs et de séparer les chromosomes dans les noyaux. Les tubes sont de nouveau placés à l'étuve à 37°C pendant 20 minutes.

Dans chaque tube, 5 gouttes de fixateur sont ajoutées et les tubes sont centrifugés pendant 10 minutes à 1800 tours/minute. Le fixateur est un mélange d'un volume d'acide acétique pour trois volumes d'éthanol. Le surnageant est retiré.

Les étapes à partir de l'ajout de fixateur sont répétées une seconde fois. La fixation permet de tuer les cellules et de fixer les chromosomes afin qu'ils puissent être étalés sur lame et colorés.

Une fois le surnageant retiré, les cellules peuvent être étalées directement ou stockées à 4°C dans 10 mL de fixateur. Il faudra alors de nouveau les centrifuger pour récupérer un culot.

2.1.2.1.4. Etalement des cellules sur lame

L'étalement est réalisé sur des lames conservées à 4°C dans un bocal contenant de l'eau distillée. L'excédent d'eau est retiré en posant le bord de la lame sur du papier buvard. Le culot est remis en suspension dans le fixateur restant dans le tube à l'aide d'une pipette Pasteur. Quelques gouttes de culot sont prélevées, une goutte est déposée au milieu d'une lame et étalée en soufflant.

La lame est mise à sécher sur un portoir. Une fois sèches, les lames peuvent être stockées à -20°C dans un tube rempli d'éthanol 100%.

2.1.2.2. Microdissection

2.1.2.2.1. Préparation des lamelles

Les lamelles contiennent des métaphases de cellules canines, obtenues et étalées selon le protocole précédent (cf. partie 2.1.2.1)

Les lamelles sont laissées à l'air libre le temps de sécher. Une fois sèches, les lamelles sont trempées successivement dans les bains suivants :

- 30 secondes dans une solution de trypsine. 0,05g de trypsine sont dissouts dans 50 mL d'eau distillée. La trypsine permet de digérer le cytoplasme restant des cellules et de faciliter l'étape de microdissection.
- Rinçage dans du PBS
- 4 minutes dans du colorant de Giemsa dilué au dixième dans de l'eau distillée
- Rinçage dans de l'eau distillée

Les lamelles sont laissées à l'air libre le temps de sécher avant de débiter l'étape de microdissection.

2.1.2.2.2. Matériel pour microdissection des chromosomes

Pour la microdissection, des microtubes Safelock Eppendorff 0,2mL sont préparés avec chacun 9 μ L d'eau stérile à l'intérieur. Ces microtubes recevront les chromosomes microdisséqués.

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

2.1.2.2.3. Procédure de microdissection

La mise au point optique est faite sur une cellule en métaphase. Une goutte d'eau stérile est apposée sur la lamelle en regard de la zone d'intérêt. Les chromosomes X ou Y sont repérés puis grattés avec l'aiguille afin de les détacher. Les chromosomes collent alors à l'extrémité de l'aiguille. Celle-ci est retirée du microscope et introduite dans un microtube. Le bout de l'aiguille est cassé sur le côté du microtube afin que le chromosome se retrouve dedans.

Suite à la microdissection, un tube contient 9 μ L d'eau stérile et 12 copies du chromosome X et un autre tube contient 9 μ L d'eau stérile et 12 copies du chromosome Y.

2.1.2.3. Première amplification

L'amplification est réalisée grâce au kit GenomePlex® Single Cell Whole Genome Amplification Kit, kit de Sigma-Aldrich. Le protocole suivant est celui du kit.

Un mélange est préparé contenant 16 μ L de 10x Single Cell Lysis & Fragmentation Buffer auxquels est ajouté 1 μ L de Protéinase K Solution. Ce mélange est passé sur le vortex. 1 μ L de ce mélange est ajouté dans chaque tube contenant les copies des chromosomes sexuels.

Les tubes sont mélangés en tapotant dessus et passés rapidement à la centrifugeuse. Une goutte d'huile minérale est ajoutée dans chaque tube pour éviter l'évaporation. Les tubes sont placés dans le thermocycleur puis incubés à 50°C pendant une heure puis à 99°C pendant 4 minutes. Une fois le programme terminé, les tubes sont placés sur de la glace.

2 µL de 1x Single Celle Library Preparation Buffer et 1 µL de Library Stabilization Solution sont ajoutés dans chaque tube. Les tubes sont mélangés en tapotant dessus et passés rapidement à la centrifugeuse. Les tubes sont placés dans le thermocycleur puis incubés à 95°C pendant deux minutes. Une fois le programme terminé, les tubes sont placés sur de la glace.

1 µL de Library Preparation Enzyme est ajouté dans chaque tube. Les tubes sont mélangés en tapotant dessus puis centrifugés rapidement. Les tubes sont placés dans le thermocycleur programmé pour suivre les cycles décrits dans le tableau X. Le volume total dans le tube est alors de 14 µL.

Cycles	Température	Temps
1	16°C	20 minutes
1	24°C	20 minutes
1	37°C	20 minutes
1	75°C	5 minutes
1	4°C	Infini

Tableau 1 : Cycles d'incubation du premier passage au thermocycleur pour l'amplification

Les tubes sont retirés du thermocycleur, centrifugés rapidement et placés sur la glace. Les réactifs suivants sont ajoutés dans chaque tube : 7,5 µL de 10x Amplification Master Mix, 48,5 µL d'eau et 5,0 µL de WGA DNA Polymerase. Les tubes sont mélangés en tapotant dessus puis centrifugés rapidement. Les tubes sont placés dans le thermocycleur programmé pour suivre les cycles suivants. Le volume total dans le tube est alors de 75 µL.

Cycles	Température	Temps
1	95°C	3 minutes
25	94°C	30 secondes
	65°C	15 minutes
1	4°C	Infini

Tableau 2 : Cycles d'incubation du deuxième passage au thermal cycler pour l'amplification

La première étape de 95°C pendant 3 minutes correspond à l'étape de dénaturation initiale. Les 25 cycles sont ensuite une alternance entre dénaturation et synthèse d'ADN.

Une fois les cycles terminés, les échantillons sont gardés à 4°C dans le thermocycleur pendant toute la nuit. Les échantillons sont ensuite conservés à -20°C.

2.1.2.4. Deuxième amplification

La réamplification est réalisée grâce au kit GenomePlex® WGA Reamplification Kit (WGA3), kit de Sigma-Aldrich. Le protocole suivant est celui du kit.

10 µL du mélange issu de la première amplification sont mélangés à 49,5 µL d'eau, 7,5 µL d'Amplification Master Mix concentré à 10X, 3,0 µL du mélange de dNTP concentré à 10 mM et à 5,0 µL de WGA DNA Polymerase.

Les tubes sont mélangés en tapotant dessus puis centrifugés rapidement. Les tubes sont placés dans le thermocycleur programmé pour suivre les cycles suivants. Le volume total dans le tube est alors de 75 µL.

Cycles	Température	Temps
1	95°C	3 minutes
14	94°C	15 secondes
	65°C	5 minutes
1	4°C	Infini

Tableau 3 : Cycles d'incubation au thermal cycler pour la réamplification

Une fois les cycles terminés, les échantillons sont gardés à 4°C dans le thermocycleur pendant toute la nuit. Les échantillons sont ensuite conservés à -20°C.

2.1.2.5. Marquage des sondes par random priming

Le marquage des sondes est effectué par random priming grâce au kit BioPrime®.

Un mélange est réalisé dans des tubes de 2 mL. Il contient 8 µL d'ADN obtenus après amplification, 20 µL de Primers à une concentration de 2,5X et 12,5 µL d'eau. Le kit recommande d'introduire 1 µL d'ADN mais ici 8 µL sont utilisés car l'ADN contenu dans les tubes n'est pas dosé.

Des bouchons anti-pression sont placés sur les tubes. Les tubes sont placés 5 minutes dans un bain marie à 100 °C puis 3 minutes au minimum dans de la glace. Cette étape permet de dénaturer l'ADN, y placer les amorces et de garder les deux brins séparés par diminution brutale de la température.

Dans chaque tube, 5µL de dNTP à une concentration de 10X sont ajoutés, ainsi que 3,5 µL d'UTP marqués. Ces deux produits ne font pas partie du kit. 1 µL de Klenow (enzyme) est ajouté dans chaque tube.

En ce qui concerne les dNTP, il s'agit d'un mélange de dATP, dTTP, dCTP et dGTP. Le dTTP est contenu en plus faible quantité. En effet, on veut que les UTP marqués s'intègrent à la séquence. Or, on craint que s'il y a trop de U à un seul endroit (beaucoup de A dans une séquence particulière du brin matrice), la réaction s'arrête à cause de l'encombrement stérique des dUTP marqués. C'est pour cela que des dNTP doivent aussi être intégrés.

Les UTP sont marqués soit à la biotine soit à la digoxigénine. La biotine est utilisée pour les sondes du chromosome X et la digoxigénine pour celles du chromosome Y. Les tubes sont passés au vortex puis placés au bain marie à 37°C pendant 5 heures.

2.1.2.6. Précipitation des sondes

Après l'étape de marquage, les tubes sont récupérés dans le bain marie. Ils sont brièvement centrifugés. Dans chaque tube, 5 µL de stop buffer, 15 µL d'ADN de saumon, 15 µL d'ADN compétiteur (Hybloc DNA : ADN de séquences répétées), 3,54 µL de NaCl et 1 000 µL d'éthanol pur sont ajoutés. Les tubes sont ensuite placés au congélateur pendant une nuit.

Le stop buffer permet de stopper les activités enzymatiques. Il n'est pas ajouté dans les cas où l'ADN a été amplifié par DOP-PCR. L'ADN de saumon aide à la précipitation et le compétiteur augmente la sensibilité des sondes en se fixant sur leurs séquences peu spécifiques.

Les tubes contenant les sondes sont récupérés dans le congélateur. Ils sont centrifugés à 13 000 tours/minute pendant 30 minutes à 5°C. L'attache du bouchon du tube sert de repère. Elle est placée vers l'extérieur dans la centrifugeuse afin de mieux repérer le culot par la suite.

Le surnageant est éliminé en le faisant couler dans une poubelle avec précaution afin de ne pas éliminer le culot en même temps. 1 mL d'éthanol à 70% conservé à -20°C est ajouté à l'aide d'une micropipette. Le tube est ensuite mélangé sur un vortex afin de remettre le culot en suspension puis centrifugé à 13 000 tours/minute pendant 10 minutes à 5°C. Ces étapes sont répétées une seconde fois.

Une fois le surnageant éliminé par retournement du tube, les tubes sont centrifugés quelques secondes. Le restant de surnageant est éliminé à l'aide d'une micropipette p100. Les tubes sont mis à sécher sous cloche à vide pendant dix minutes.

2.1.2.7. Préparation des sondes

20 µL de solution d'hybridation (Sigma) à 37°C est ajoutée dans chaque tube. Sa quantité a été modifiée au cours des expériences, variant de 10 à 30 µl, afin de tester différentes concentrations de sonde. Cette solution est constituée à 50% de formamide et de 50% de solution saline citrate (SSC) 2X et facilite l'hybridation. Les tubes sont placés dans un bain marie à 37°C. Deux heures après, la solution d'hybridation est mélangée à l'aide d'une

micropipette. Des allers retours sont réalisés en déposant la solution d'hybridation au niveau du culot. Une fois le mélange réalisé, l'ensemble de la solution doit se trouver au fond du tube. Les tubes sont placés au bain marie à 37°C pendant deux heures.

Une fois cette étape réalisée, il est possible de stocker les sondes à -20°C. Dans ce cas, avant leur usage, les tubes doivent être placés au bain marie à 37°C.

2.1.3. Protocole d'hybridation in-situ adapté aux lames cytologiques

2.1.3.1. Préparation des lames cytologiques

Les lames cytologiques sont obtenues selon le protocole décrit en partie 2.1.2.1. Elles doivent être bien sèches avant de passer à l'étape d'hybridation.

Plusieurs types cellulaires ont été étudiés. Dans certains cas, des ampoules contenant les cellules étaient disponibles directement. Les cellules sont alors placées dans 10 mL de milieu de culture, centrifugés à 1800 tours/min pendant 10 minutes. La préparation des lames reprend ensuite à l'étape de fixation ces cellules (partie 2.1.2.1.3.).

2.1.3.2. Hybridation

Le milieu contenant les sondes est récupéré dans le bain marie à 37°C. A l'aide d'une micropipette, une quantité définie en fonction de la taille de la lamelle est apposée sur la lame. Elle est de 7 µL pour une lamelle de 18 mm sur 18 mm, 10 µL pour une lamelle de 22 mm sur 22 mm et de 15 µL pour une de 22 mm sur 40 mm.

Après que le milieu ait diffusé sous la lamelle, les bulles d'air sont retirées en tapotant avec une pince. Les bulles d'air en périphérie de la lamelle doivent être éliminées afin que la colle utilisée ensuite ne passe pas sous la lamelle par capillarité.

La lamelle est scellée à l'aide de colle Rubber cement. La colle est appliquée sur tout le bord de la lamelle. Les lames sont ensuite placées dans l'Hybridizer. L'appareil chauffe 8 minutes à 75°C, c'est l'étape de dénaturation, et 24 heures à 37°C.

2.1.3.3. Lavages stringents

Les lames sont récupérées dans l'Hybridizer et placées dans une boîte porte-lames contenant une solution saline sodium citrate (SSC) 2X après retrait de la lamelle.

Les lames sont ensuite placées dans une autre boîte porte-lames fermée contenant de la solution SSC 0,4X à 72°C pendant quatre minutes. Les lames sont retirées puis placées dans une boîte contenant du PBT (PBS + BSA + Tween 20).

2.1.3.4. Révélation par anticorps marqués

Un mélange est réalisé contenant 100 µL de PBT et 1 µL d'anticorps spécifiques pour chaque sonde par lame. Les anticorps anti-digoxigénine marqués à la fluorescéine FITC (Fluoprobe) sont utilisés pour le chromosome Y. La streptavidine-Alexa594 (Molecular Probes) est utilisée pour le chromosome X. Ce mélange est déposé sur une lame à l'aide d'une micropipette. Une grande lamelle est déposée. Les lames sont placées dans une boîte à atmosphère humide pendant une heure à température ambiante.

Les lames sont ensuite plongées dans une boîte contenant une solution de Tween et PBS (500µL de Tween pour 500mL de PBS). La boîte est placée sur un plateau mobile qui permet de mélanger le milieu pendant 6 minutes. Le Tween est éliminé puis remplacé par du Tween neuf. Deux autres lavages sont réalisés en suivant les mêmes étapes.

Les lames sont retirées du Tween (détergent). L'excédent de Tween est éliminé sur papier buvard. Une goutte de Vectashield avec DAPI est ajoutée et une grande lamelle est placée. Le Vectashield est un milieu de montage qui permet de conserver la fluorescence. Le DAPI s'intercale dans l'ADN et donne une fluorescence bleue aux chromosomes. Les lames sont ensuite observées au microscope à fluorescence.

2.1.4. Protocole d'hybridation in-situ adapté aux lames histologiques

2.1.4.1. Préparation des lames histologiques

Les lames histologiques sont pré-traitées en utilisant le kit « Histology FISH accessory kit » de Dako.

Un tube Falcon® de 50 mL est préparé, contenant la « pre-treatment solution » diluée à 1X et placé dans un bain marie à 95°C. La lame est plongée dans ce tube pendant 10 minutes. Le tube est ensuite retiré du bain marie, ouvert et laissé à refroidir pendant 15 minutes.

La lame est plongée dans deux bains successifs de SSC 2X de 3 minutes chacun. Le SSC 2X est renouvelé entre les deux bains. Quelques gouttes de pepsine sont placées sur la lame. Une lamelle est déposée et scellée à l'aide de colle Rubber Cement. La lame est placée dans l'hybridizer pendant 30 minutes à 37°C afin que la digestion par la pepsine s'effectue.

Pour éliminer la pepsine, la lamelle est retirée et la lame est plongée dans deux bains successifs de SSC 2X de 3 minutes chacun. Le SSC 2X est renouvelé entre les deux bains.

2.1.4.2. Hybridation, lavages et révélation

Après les bains de SSC 2X, la lame est plongée successivement dans des bains d'éthanol à 70%, 90% puis pur, de deux minutes chacun. La lame est laissée à l'air libre afin de sécher.

Ensuite, les étapes d'hybridation, de lavages stringents et de révélation aux anticorps sont les mêmes que pour les lames cytologiques (cf. parties 2.1.3.2 à 2.1.3.4.).

2.1.5. La culture cellulaire des ASC canines

2.1.5.1. Obtention des cellules

Les ASC sont fournies par le laboratoire STROMALab (Toulouse) et sont issues de l'ANR ASC PARO. Elles sont isolées selon les étapes évoquées dans la partie 2.1.1.2.. Huit individus ont été étudiés à des passages différents allant de P0 à P6. La culture des cellules est ensuite poursuivie à l'ENVT.

2.1.5.2. Division

Lors d'une division de boîte, le milieu de culture est retiré à l'aide d'une pipette pasteur reliée à une pompe à vide sous poste de sécurité microbiologique (PSM). Deux lavages sont effectués en ajoutant 2,5 mL de trypsine EDTA et en les retirant rapidement. 2,5 mL de trypsine EDTA sont ajoutés et la boîte de culture est laissée à l'horizontale le temps que les cellules se décollent. L'avancée du décollement se vérifie sous microscope. Frapper la boîte permet de décoller les cellules restantes.

Un tube Falcon® de 15 mL est préparé avec 5 mL de milieu préalablement chauffé à 37°C au bain marie. Lorsque toutes les cellules sont décollées, la totalité de la trypsine EDTA est prélevée et placée dans le tube préparé auparavant. Le tube est centrifugé pendant 6 minutes à 500 G. Le surnageant est éliminé. Le culot est remis en suspension à l'aide d'une pipette pasteur dans un volume connu de milieu de culture. Un comptage est réalisé sur lame de Malassez. Les cellules sont remises en culture à une concentration de 2 000 cellules / cm². Le format et le nombre de boîte sont déterminés par le nombre de cellules disponibles.

2.1.5.3. Conservation d'une lignée de cellules

Il est possible de conserver des lignées cellulaires. Pour cela, le culot obtenu selon le protocole évoqué précédemment est mis en suspension dans 1 mL de diméthylsulfoxyde (DMSO) à l'aide d'une pipette Pasteur. Le tout est ensuite prélevé et placé dans un tube cryogénique. Le tube est conservé dans une cuve à azote liquide à – 180°C.

2.1.5.4. Récupération de cellules en métaphase

Les boîtes de culture contenant les cellules sont tapées afin de décoller les cellules qui sont en division. En effet, les cellules en division se situent à la surface du tapis cellulaire et sont moins adhérente au fond de la boîte. Le milieu de culture qui contient alors les cellules en suspension est récupéré et placé dans un tube Falcon® 50 mL.

Pour pouvoir être analysées, les cellules en métaphases sont étalées selon le protocole précédent (cf. partie 2.1.2.1).

2.1.6. Suivi des cellules souches mésenchymateuses en culture

2.1.6.1. Comptage des chromosomes au cours des passages

2.1.6.1.1. Préparation des lames

Une fois les cellules étalées, les lames sont colorées au Giemsa. Les lames doivent être bien sèches afin que la coloration soit efficace. Les lames sont introduites pendant douze minutes dans un bain de Giemsa dilué au dixième dans de l'eau distillée. Elles sont ensuite rincées à l'eau du robinet.

2.1.6.1.2. Observation des lames au microscope

Les lames sont observées au microscope optique. Les métaphases sont recensées selon leur degré de polyploidie. On distingue donc les cellules normales qui contiennent une paire de chaque chromosome, les cellules tétraploïdes contenant des lots de quatre chromosomes et les cellules hexaploïdes contenant des lots de six chromosomes.

Les mesures sont faites sur huit individus et sur différents passages notés P0, P1, P2 et P6 correspondant aux cellules issues des cultures après les premier, deuxième et sixième passages. Un objectif de 100 métaphases est fixé par passage.

2.1.6.2. Suivi vidéo des cellules au cours de la division

2.1.6.2.1. Matériel utilisé pour le suivi vidéo

Les séquences vidéos sont acquises grâce au EVOS® FL Auto Imaging System. Il s'agit d'un microscope automatique permettant des acquisitions fluorescentes multicanal. Pour que les cellules soient dans un environnement adéquat pendant des acquisitions de plusieurs heures, elles sont placées dans un EVOS™ Onstage Incubator. Cet incubateur permet un contrôle de la température, de l'humidité, de la teneur en oxygène et en dioxyde de carbone.

Pour les acquisitions, le logiciel EVOS® FL Auto software est utilisé. La fonction choisie dans notre étude est l'acquisition de time-lapses. Les paramètres à entrer sont l'objectif du microscope, la zone d'acquisition sur le milieu de culture, la durée d'acquisition et l'intervalle de capture.

Pour suivre les cellules, les noyaux sont marqués grâce aux sondes CellLight™ Nucleus-GFP, BacMam 2.0. Suite à une transfection, les cellules expriment une protéine verte fluorescente au niveau de leurs noyaux sans que cela soit toxique pour les cellules. Les sondes sont fournies prêtes à l'emploi en milieu liquide.

2.1.6.2.2. Préparation des cellules

Des cellules souches d'origine adipeuse canines sont prélevées dans leur milieu de culture. Les cellules choisies proviennent de passages tardifs pour lesquelles la proportion de cellules polyploïdes est plus grande.

Des plaques à six puits sont utilisées pour l'EVOS™ Onstage Incubator. La quantité de cellules introduite dans chaque puits est fixée à 300 000 cellules.

Une fois les cellules introduites dans les puits, du milieu de culture est ajouté pour que le volume total par puits soit de 2 mL. 80 µL de préparation contenant les sondes CellLight™ Nucleus-GFP, BacMam 2.0 sont introduits. Les cellules sont placées dans l'incubateur pour la nuit le temps que la transfection se fasse.

La température de l'incubateur est fixée à 37°C, le taux de dioxyde de carbone à 5% et de taux de dioxygène à 0%.

2.1.6.2.3. Paramétrage et capture des séquences vidéos

Les séquences vidéos, aussi appelées time lapses sont paramétrées directement sur l'appareil. Dans un premier temps, la zone d'intérêt appelée Beacon est déterminée. La durée d'acquisition et le nombre de captures pendant cette période sont ensuite choisies.

2.2. Résultats

2.2.1. Sondes chromosomiques et tracking cellulaire

2.2.1.1. Réalisation des sondes

Les sondes ont été produites à partir de la microdissection des chromosomes X et Y de chien. Elles sont testées par la méthode FISH sur un étalement de cellules canines en métaphase. De cette manière, il est possible d'évaluer la spécificité des sondes et la force de leur signal.

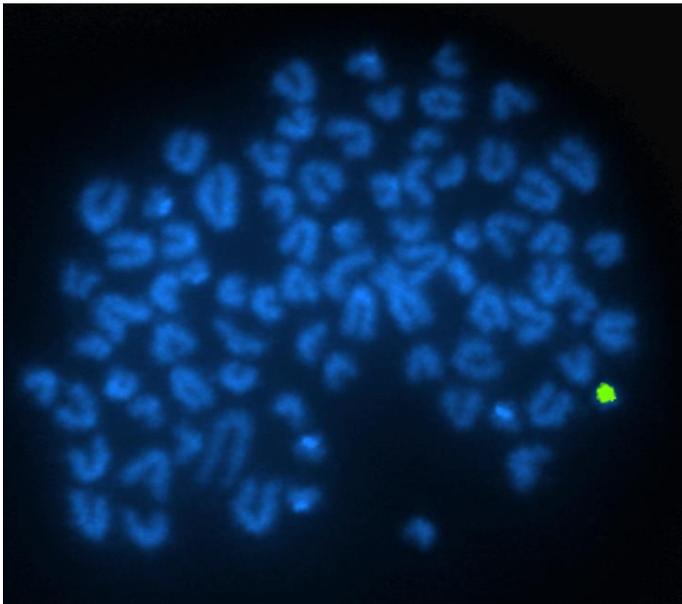


Figure 11 : Métaphase de chien mâle après hybridation des sondes du chromosome Y (x1000)

Le chromosome Y est marqué avec la sonde du chromosome Y contenant de la digoxigénine révélée par des anti-corps anti-digoxigénine FITC (vert)

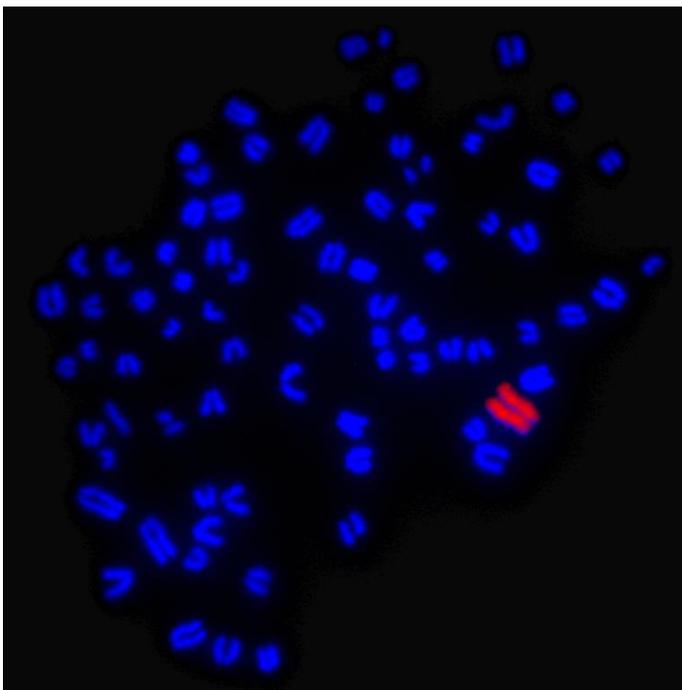


Figure 12 : Métaphase de chien mâle après hybridation des sondes du chromosome X (x1000)

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

Sur les lames cytologiques utilisées, il y avait également des cellules en interphase avec un noyau bien condensé. Il a également pu être mis en évidence l'efficacité des sondes sur ce type de noyaux et pas seulement sur des chromosomes individualisés.

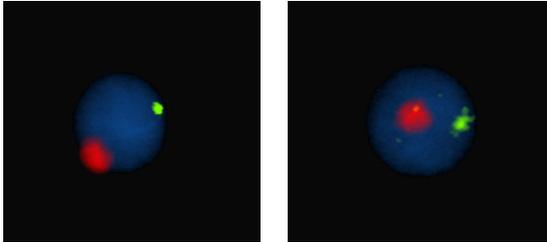


Figure 13 : Noyaux en interphase de cellule de chien mâle après hybridation des sondes des chromosomes X et Y (x1000)

Dans les figures précédentes, la sonde ne se lie qu'au chromosome ciblé et le bruit de fond est absent. Le protocole de production des sondes est validé. Les sondes peuvent être utilisées sur coupes histologiques.

2.2.1.2. Test des sondes sur coupes histologiques

Les sondes ont été testées sur des coupes histologiques canines de peau. Un temps de digestion à la pepsine de 30 minutes a été testé en comparaison à des temps allant de 2 à 15 minutes, déjà utilisés sur des coupes de tissu testiculaire.

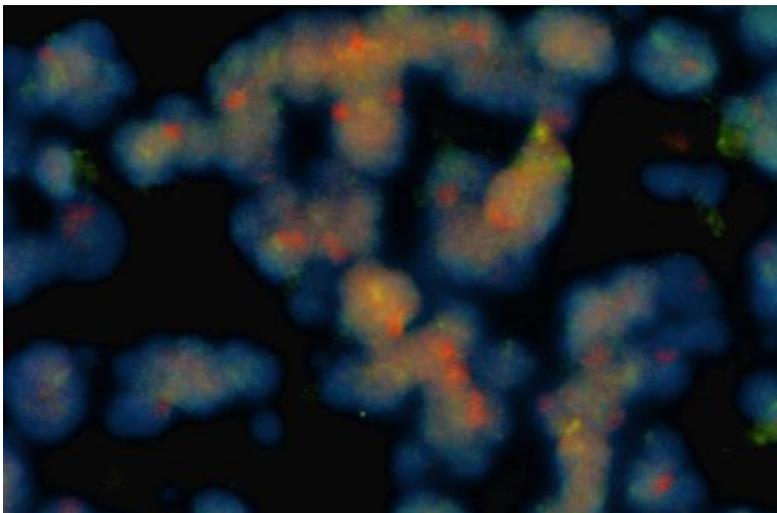


Figure 14 : Sondes hybridées sur coupe histologique canine de peau après 30 minutes de pepsine (x1000)

La proportion de cellules montrant deux signaux correspondant aux deux chromosomes sexuels est plus élevée avec un temps de digestion à la pepsine de 30 minutes, en comparaison avec des temps de digestion allant de 2 à 15 minutes. De plus, une durée de 30 minutes permet d'avoir moins d'auto-florescence tissulaire et de bruit de fond.

La détection des cellules étant meilleure, c'est ce temps qui a été retenu pour les coupes histologiques à la fois de chien et de souris étudiées par la suite.

2.2.1.3. Utilisation des sondes sur coupe histologique de souris

Les sondes ont été utilisées sur des coupes histologiques de souris nude ayant reçu une injection de cellules souches d'origine canine. Cela a permis d'évaluer le temps de digestion des tissus par la pepsine nécessaire lors du prétraitement de la lame histologique. Cette utilisation a aussi permis de voir s'il était possible de repérer les cellules souches canines au sein d'une coupe de tissu murin.

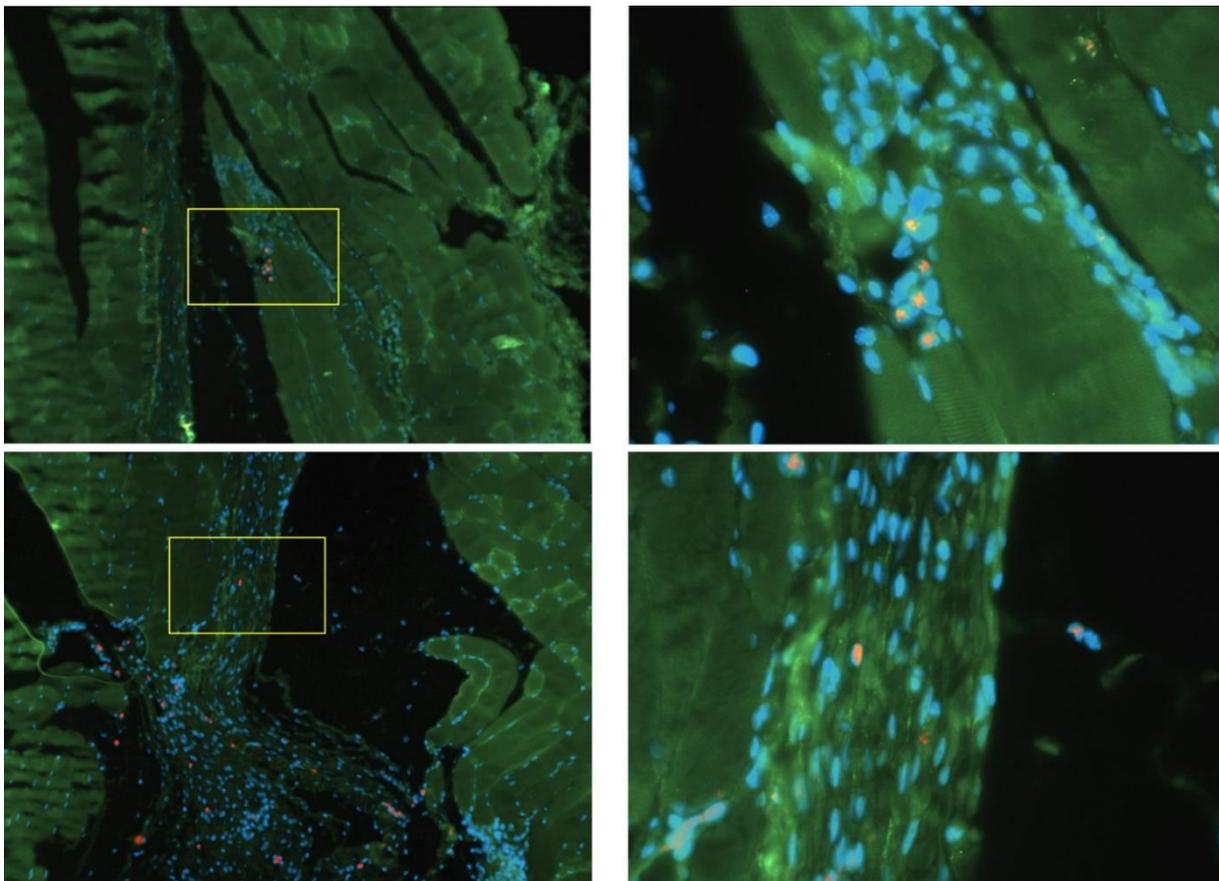


Figure 15 : Coupes histologiques de muscle de souris nude ayant reçu une injection de cellules souches canines femelles après digestion à la pepsine de 30 minutes puis hybridation des sondes du chromosome X (x100 à gauche et x400 à droite)

Le cadre jaune représente la zone de la photo de droite. La couleur verte des tissus provient de l'auto fluorescence tissulaire.

Comme le montrent les photos ci-dessus (Figure 15), les sondes des chromosomes X de chien créées ont la possibilité de marquer les chromosomes sexuels des ASC canines greffées dans une coupe de tissu musculaire de souris nude.

En ce qui concerne les sondes, on remarque qu'elle se fixent à un nombre limité de noyaux, ce qui est favorable quant à leur spécificité. Pour ce qui est du temps de digestion à la pepsine.

Une durée de 30 minutes permet d'avoir peu d'auto-florescence tissulaire et peu de bruit de fond, ce qui est satisfaisant.

2.2.2. ASC canines en culture

2.2.2.1. Comptage des chromosomes en métaphase

Lors du suivi en culture des ASC, différents degrés de polyplôïdie ont été observés au cours des différents passages. Les figures suivantes exposent les cas de métaphases d'ASC tétraploïde et hexaploïde.

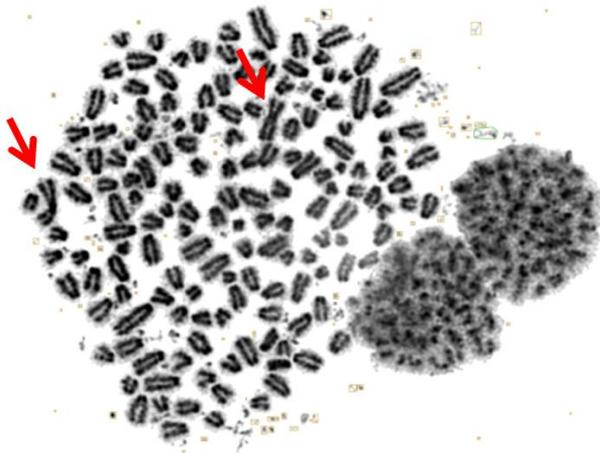


Figure 16 : Métaphase d'ASC canine de phénotype mâle tétraploïde, de formule ($4n = 156$) (x1000)

Les flèches rouges indiquent les chromosomes sexuels X

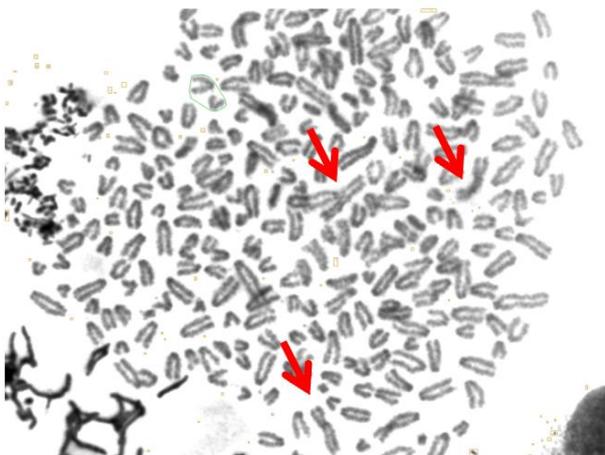


Figure 17 : Métaphase d'ASC canine de phénotype mâle hexaploïde, de formule ($6n = 234$) (x1000)

Les flèches rouges indiquent les chromosomes sexuels X

La présence de cellules hexaploïdes étant exceptionnelle, les résultats se basent sur le pourcentage de cellules tétraploïdes au cours des différents passages pour les différents individus. Les résultats sont recensés dans le tableau suivant.

Passage	P0	P1	P2
Individu 1			9,6
Individu 2	4,3	3,5	
Individu 3		10,0	12,3
Individu 4		5,0	13,2
Individu 5	3,9	6,0	15,2
Individu 6	1,4		
Individu 7			7,2
Individu 8			4,7

Tableau 4 : Pourcentage de cellules tétraploïdes en fonction du passage et des individus.
Les cellules grisées traduisent une donnée non disponible.

La représentation des pourcentages moyens de cellules tétraploïdes au fil des passages, tout individus confondus se trouve en figure 18.

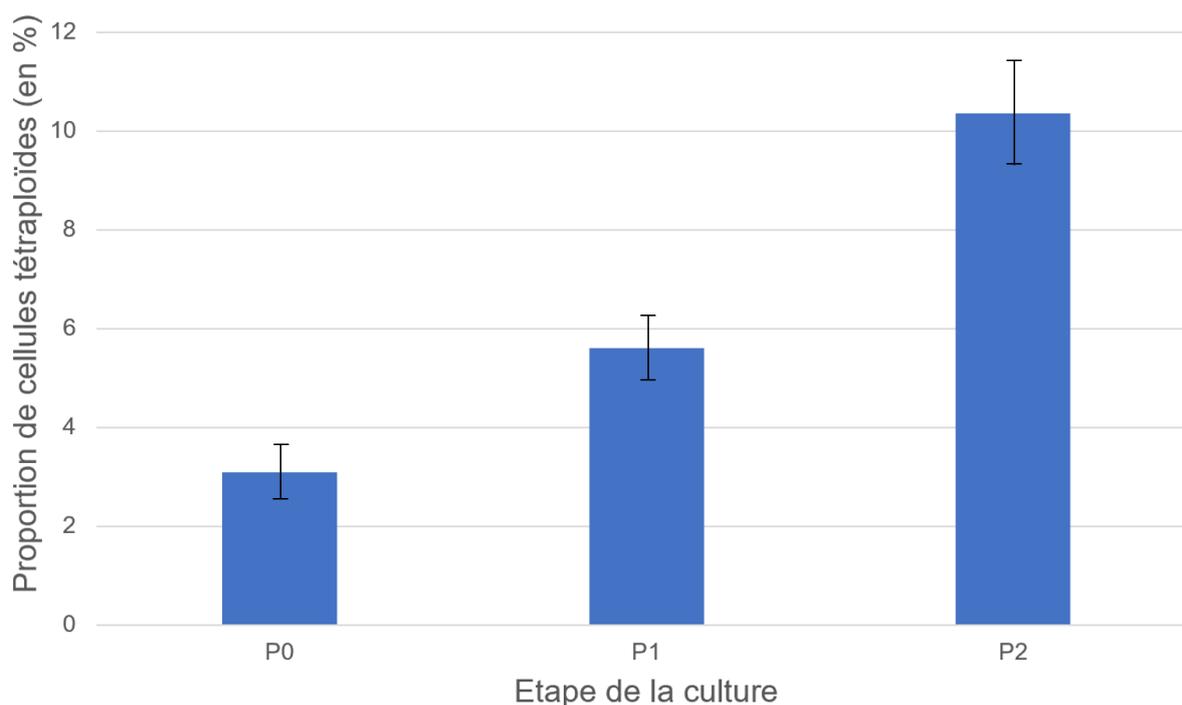


Figure 18 : Proportion de cellules tétraploïdes (en %) par rapport à l'étape de culture.

Les barres d'erreur correspondent aux intervalles de confiance à 95% (valeur positive et négative).

2.2.2.2. Recherche de l'origine des tétraploïdies

2.2.2.2.1. Recherche dans le tissu natif

Des cellules tétraploïdes étant observées aux stades les plus précoces de la culture, leur présence a été recherchée dans des coupes histologiques incluant du tissu adipeux provenant de chiens mâles et femelles.

L'observation des lames a montré des zones, en dehors du tissu adipeux, où les signaux sont forts et où une grande majorité de cellules sont marquées, comme dans la figure 19 ci-dessous.

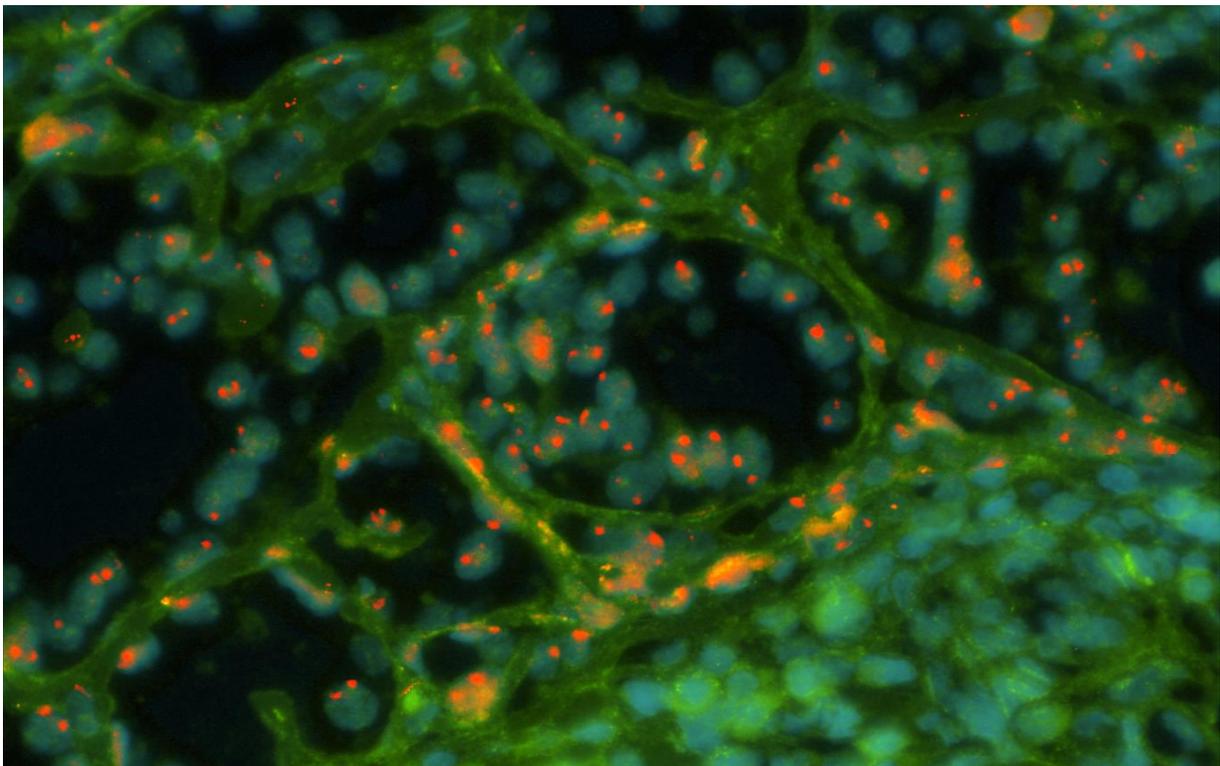


Figure 19 : Coupe histologique de peau avec une infiltration par une population tumorale (mastocytome) de chienne après digestion à la pepsine de 30 minutes puis hybridation des sondes du chromosome X (x400)

Dans le tissu adipeux sous cutané, la densité cellulaire est faible en raison de la taille très grande des cellules avec des petits noyaux repoussés en périphérie. Les noyaux et donc les signaux sont plus faibles et difficiles à observer. Cependant, des figures de tétraploïdies ont pu être observées et capturées (cf. figures 20 à 23).

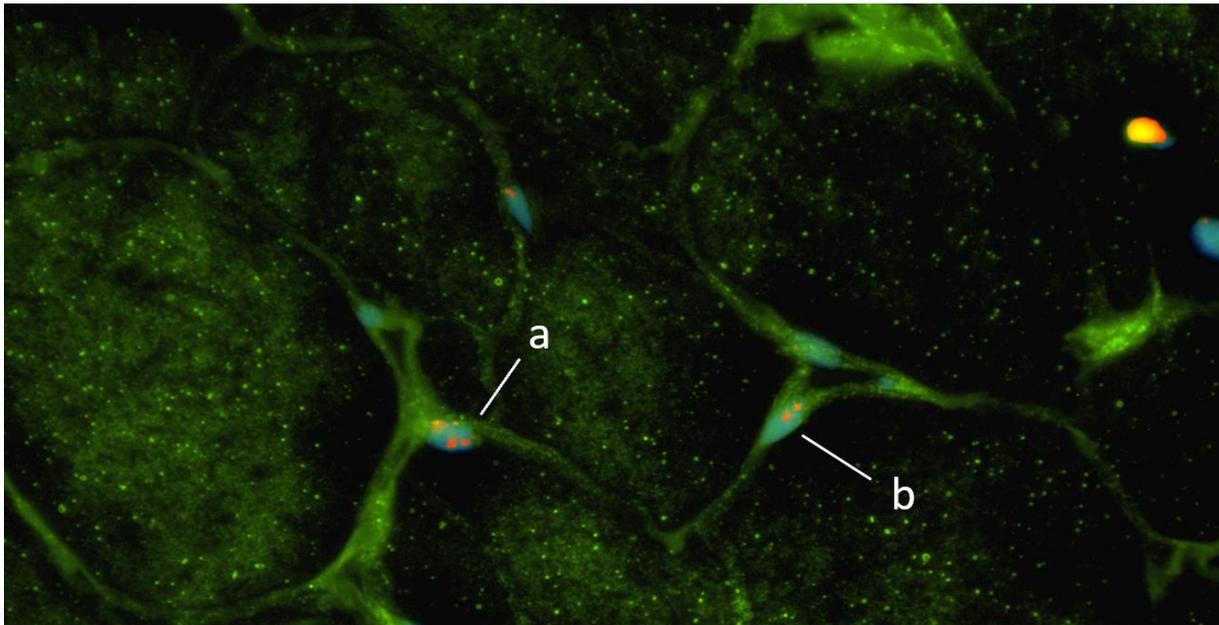


Figure 20 : Coupe histologique de tissu adipeux (cellules adipeuses) de chienne après digestion à la pepsine de 30 minutes puis hybridation des sondes du chromosome X (x400)
 – a : cellule tétraploïde / b : cellule diploïde

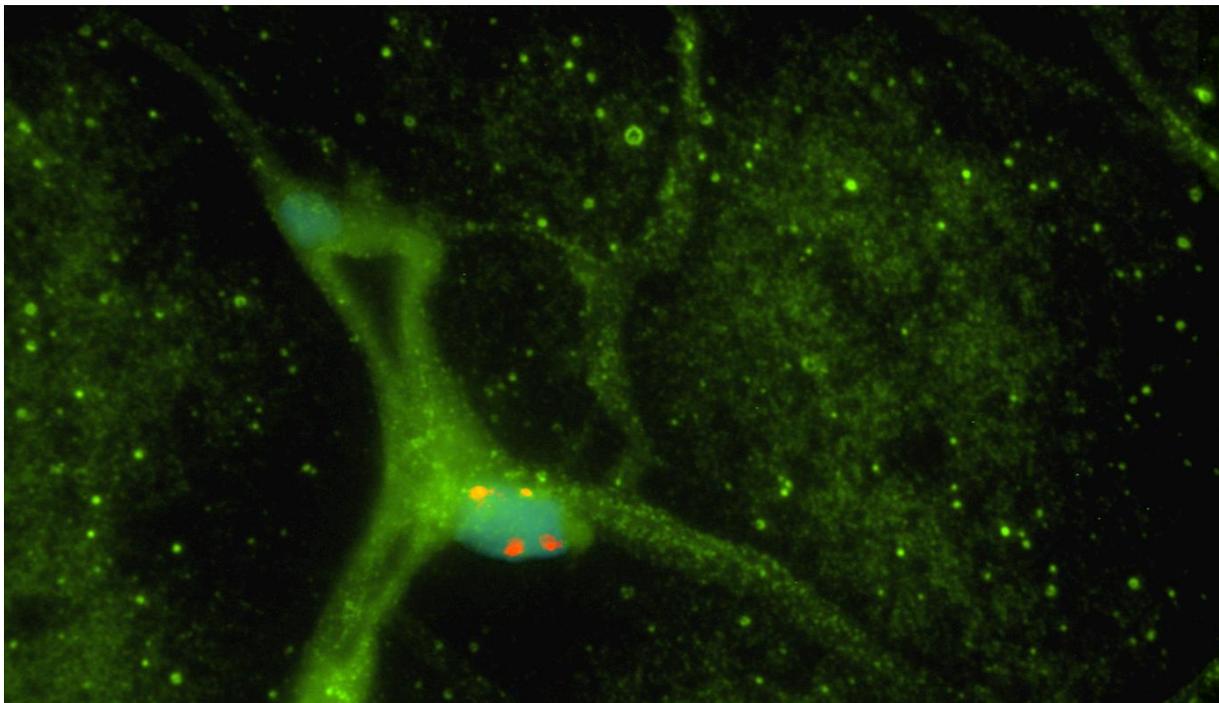


Figure 21 : Détail d'une cellule tétraploïde sur une coupe histologique de tissu adipeux de chienne après digestion à la pepsine de 30 minutes puis hybridation des sondes du chromosome X (x1000)

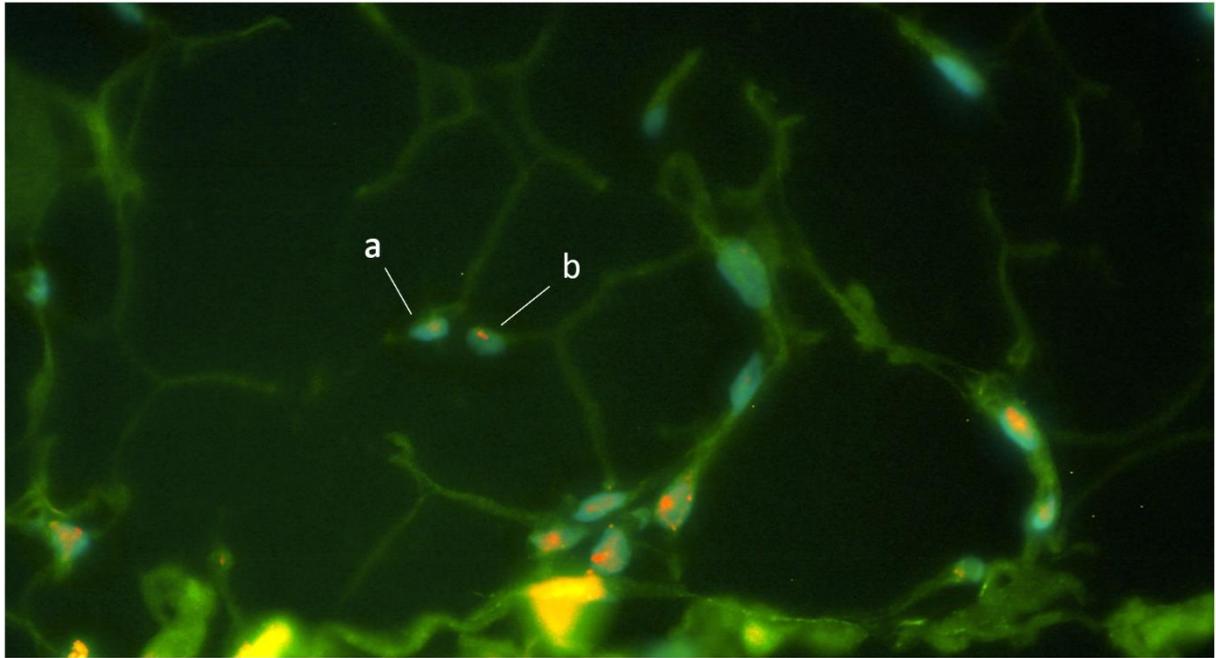


Figure 22 : Coupe histologique de tissu adipeux (cellules adipeuses) de chien après digestion à la pepsine de 30 minutes puis hybridation des sondes des chromosomes X et Y (x400) – a : cellule diploïde / b : cellule tétraploïde

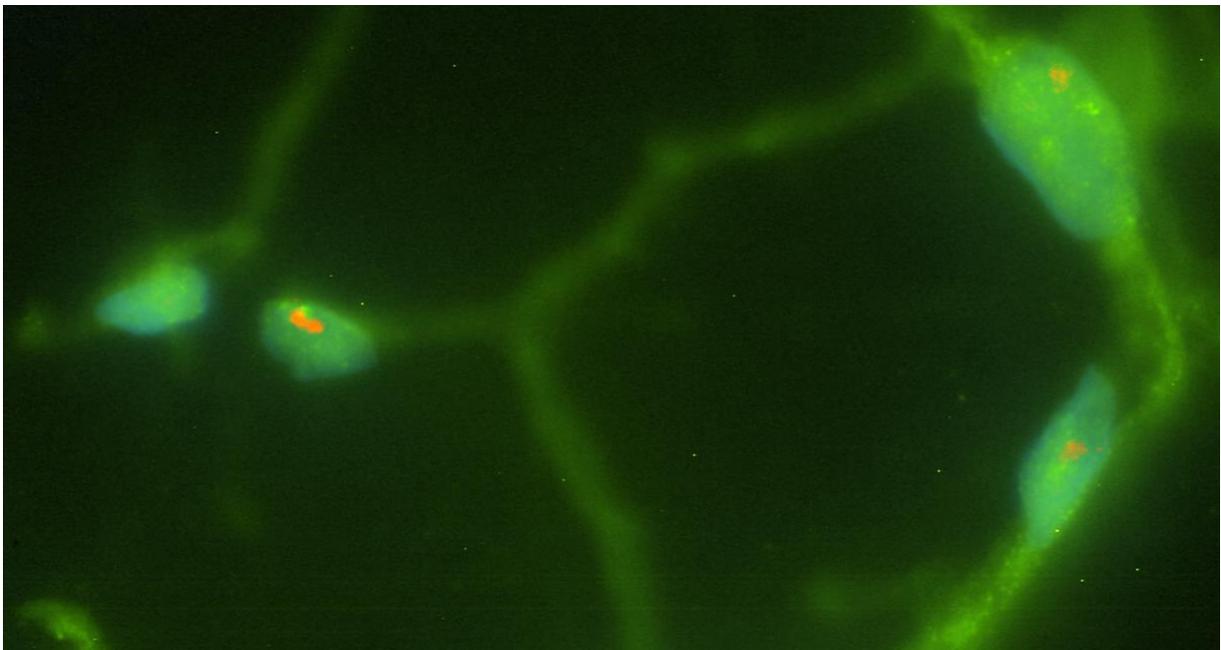


Figure 23 : Détail d'une cellule tétraploïde sur coupe histologique de tissu adipeux de chien après digestion à la pepsine de 30 minutes puis hybridation des sondes des chromosomes X et Y (x1000)

La perception des signaux au sein des coupes histologiques de tissu adipeux étant limitée, des figures de tétraploïdie ont aussi été recherchées sur des étalements cellulaires de SVF et d'ASC provenant du P0 pour des chiens mâles. L'accès au noyau est alors direct et l'étape de digestion à la pepsine n'est pas nécessaire.

La SVF permet d'observer les cellules sans que ces dernières ne soient passées par une étape de culture. Cependant, les ASC du P0 ont déjà subi une phase de croissance *in vitro* bien qu'elle soit courte.

Des exemples de noyaux polyploïdes sont présentés dans les figures ci-dessous.

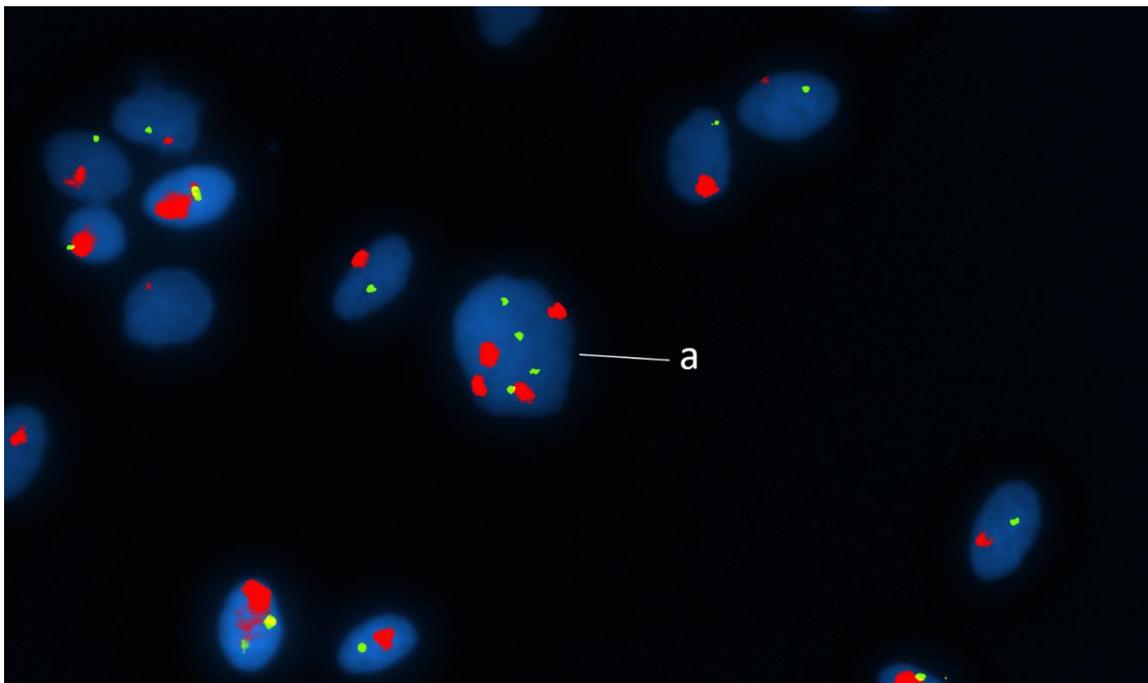


Figure 24 : Noyaux condensés d'ASC chien mâle (P0) après hybridation des sondes des chromosomes X et Y (x400) - a : *noyau condensé d'ASC octoploïde*

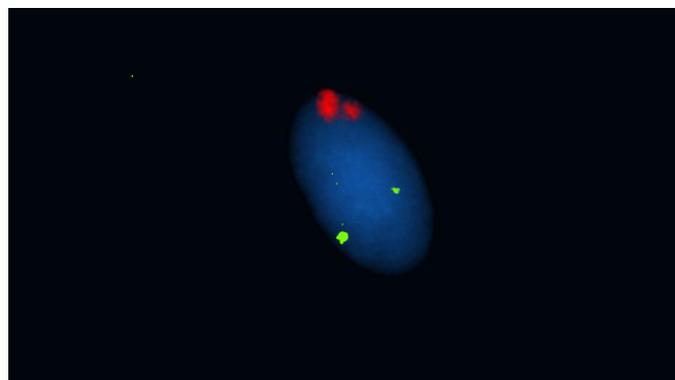


Figure 25 : Noyaux condensés de chien mâle (SVF) après hybridation des sondes des chromosomes X et Y (x1000)

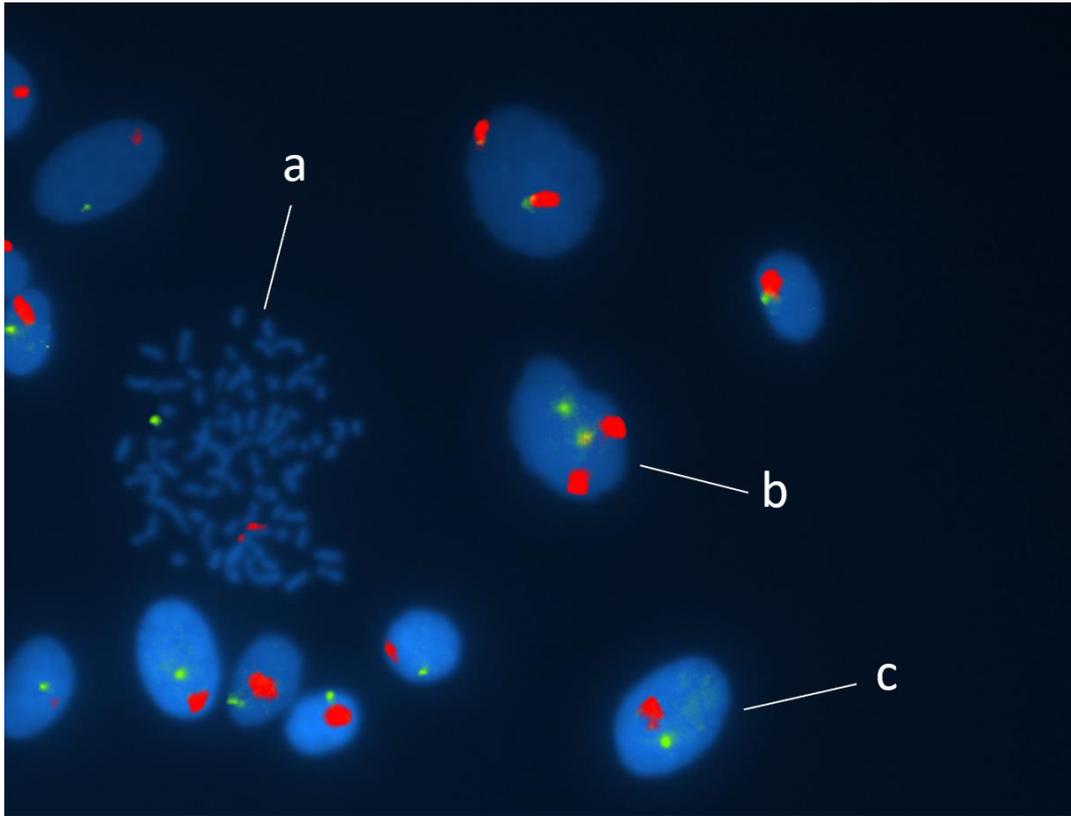


Figure 26 : Métaphase et noyaux condensés d'ASC chien mâle (P0) après hybridation des sondes des chromosomes X et Y (x400) - a : métaphase d'ASC diploïde / b : noyau condensé d'ASC tétraploïde / c : noyau condensé d'ASC diploïde

Des comptages ont été réalisés pour évaluer la proportion de cellules polyploïdes. Parmi les ASC du P0, 30 noyaux sur 982 ont été relevés comme tétraploïdes soit une proportion de $3,2 \pm 1,1$ % (intervalle de confiance à 95%).

Pour la SVF, il n'a pas été possible de déterminer une proportion fiable du fait de l'aspect des noyaux. En effet, leur aspect n'était pas assez satisfaisant pour pouvoir distinguer correctement les signaux des sondes. Cependant, trois noyaux tétraploïdes ont été observés sur l'ensemble d'une lame, révélant la présence de cellules tétraploïdes au sein de la SVF bien qu'en faible quantité apparente.

2.2.2.2.2. Suivi vidéo des divisions cellulaires en culture

Le suivi vidéo des cellules souches au cours de leur culture a permis d'observer plusieurs divisions cellulaires. Certaines semblent normales et d'autres montrent des anomalies.

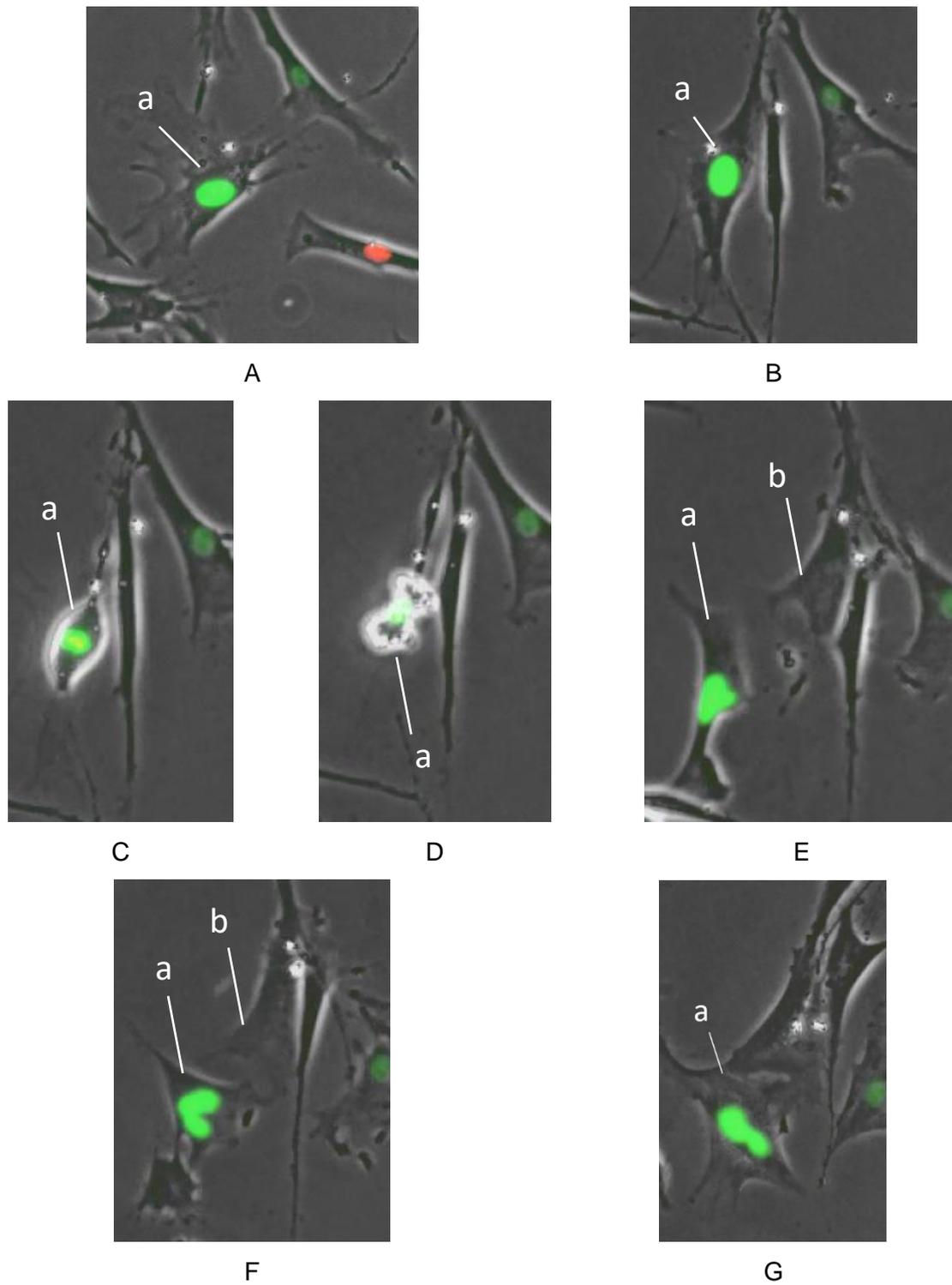


Figure 27 : Extraits de time lapse suivant une cellule en endomitose. La cellule notée « a » commence sa division en C. Elle se poursuit en D mais on peut observer en E que cette cellule ne se divise pas et aboutit à une cellule tétraploïde dont le contenu génétique est anormalement doublé. La cellule notée b est une cellule dont le noyau n'a pas été marqué. L'ordre alphabétique suit l'ordre chronologique. Les noyaux sont marqués avec des sondes CellLight™ Nucleus-GFP, BacMam 2.0.

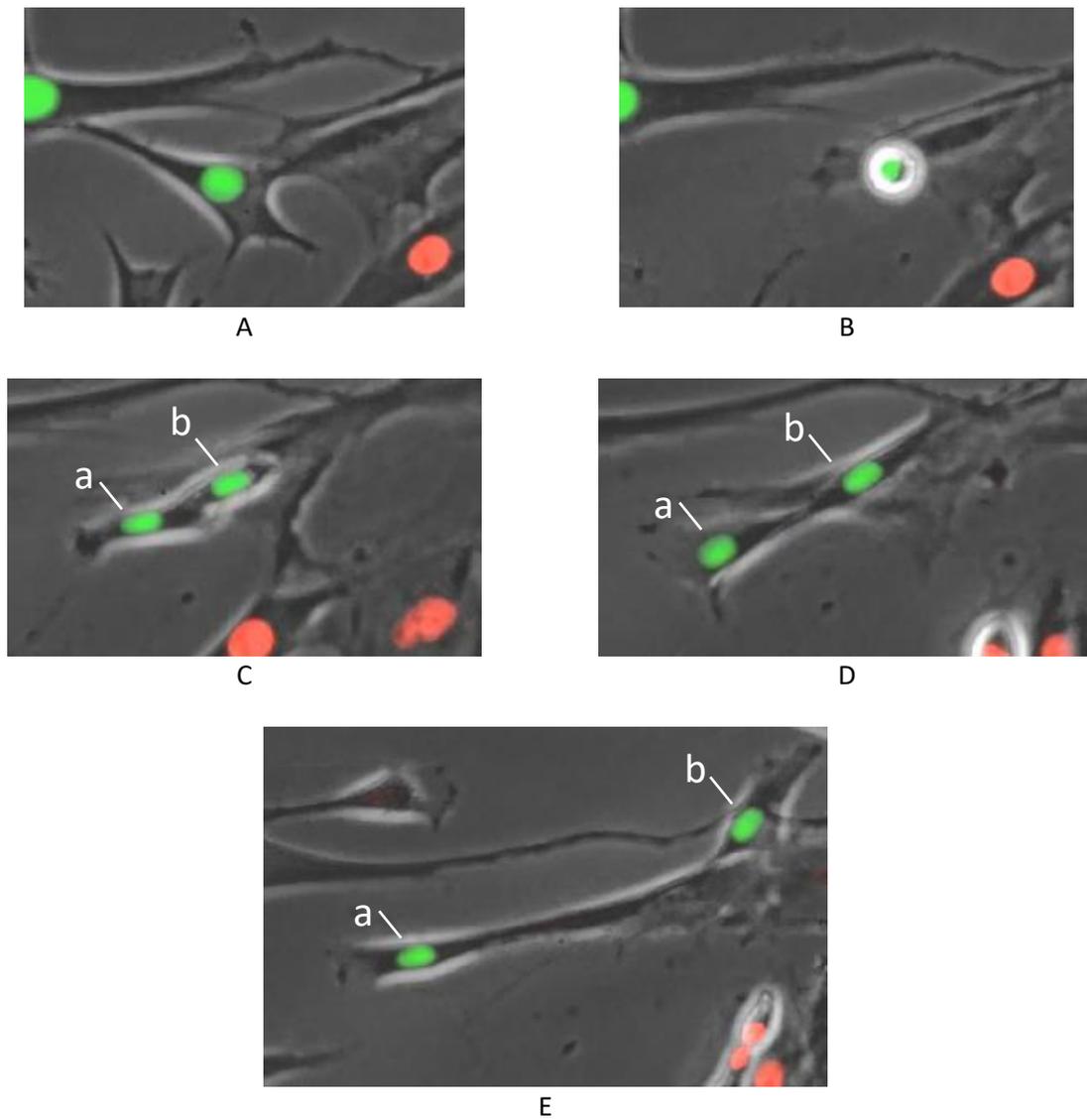


Figure 28 : Extraits de time lapse suivant une cellule en mitose. Dans ce cas, la division est normale et conduit à deux cellules filles notées a et b. L'ordre alphabétique suit l'ordre chronologique. Les noyaux sont marqués avec des sondes CellLight™ Nucleus-GFP, BacMam 2.0.

Nous pouvons observer dans la figure 27 que la cellule fille notée « a » a semblé récupérer les deux noyaux issus de la division cellulaire. Il serait alors envisageable que des cellules tétraploïdes apparaissent en culture suite à des erreurs lors de la division.

2.3. Discussion

➤ Création des sondes

Le type de culture cellulaire servant à l'obtention de chromosomes (cellules issues de culture de sang) et le protocole de microdissection étant déjà établi, notre étude a testé différents protocoles pour l'amplification du matériel génétique et le marquage des sondes.

Les sondes amplifiées par le kit GenomePlex® Single Cell Whole Genome Amplification Kit, réamplifiées par le kit GenomePlex® WGA Reamplification Kit et marquées par random priming grâce au kit BioPrime® ont donné les meilleurs résultats en termes de spécificité, de bruit de fond et de force de signal. Les méthodes utilisant le kit PicoPLEX® WGA et la DOP-PCR ont donc été abandonnées.

➤ Protocole de marquage des lames histologiques

En ce qui concerne la préparation des lames histologiques (tissus fixés au formol et inclus en paraffine), un temps de digestion à la pepsine de 30 minutes a été testé en comparaison à des temps allant de 2 à 15 minutes, déjà utilisés dans des travaux antérieurs. La proportion de cellules montrant deux signaux correspondant aux deux chromosomes sexuels est plus élevée avec un temps de digestion à la pepsine de 30 minutes, en comparaison avec des temps de digestion allant de 2 à 15 minutes. De plus, une durée de 30 minutes permet d'avoir moins d'auto-florescence tissulaire et de bruit de fond. Cette durée a été retenue pour les marquages des lames histologiques dans notre étude.

Sur les coupes histologiques de muscle de souris ayant reçu des ASC canines, le nombre de noyaux marqué est limité. De plus, la grande majorité des signaux correspondant aux cellules canines se situent à proximité du site d'injection. Ces observations sont favorables quant à la spécificité d'espèce des sondes. Il apparaît aussi possible de réaliser du « tracking » cellulaire par la méthode FISH, pour identifier les cellules après une xénogreffe.

Une des limites de l'étude des coupes histologiques est que sur certaines d'entre elles, provenant de souris et de chien, certaines cellules marquées ne présentent parfois qu'un signal correspondant à un des deux chromosomes sexuels de la cellule. Une des hypothèses serait que les coupes histologiques sont trop fines. En effet les coupes font 5 µm d'épaisseur alors que la taille du noyau est comprise entre 10 et 20 µm. Il est donc possible que les chromosomes ne soient pas compris dans la coupe.

Or, par la suite, le but est de sexer les cellules pour déterminer s'il s'agit de cellules souches administrées ou de cellules de l'hôte canin. Il sera donc indispensable de détecter les deux

signaux correspondant aux deux chromosomes pour savoir si la cellule est de phénotype XX ou XY. Une des solutions serait de tester des hybridations sur des coupes plus épaisses.

Une autre hypothèse serait la sonde n'ait pas suffisamment accès aux chromosomes à cause d'une digestion à la pepsine insuffisante. Un temps de digestion plus long, de 45 minutes, a aussi été testé mais les résultats étaient peu concluants à cause d'un faible signal de la sonde qui était alors produite par le kit PicoPLEX® WGA. Cependant, on peut noter que l'intégrité des tissus est conservée après 45 minutes d'action de la pepsine (peau de chien). Il serait intéressant de tester de nouveau une digestion de 45 minutes avec une autre sonde, produite grâce aux kits GenomePlex®.

➤ Etude de la stabilité chromosomique des ASC au cours de la culture

○ *Evolution de la proportion de cellules tétraploïdes au cours de la culture.*

La proportion de cellules tétraploïdes est croissante au cours des deux premiers passages pour atteindre une valeur de $10,4 \pm 2,1$ % pour les cellules issues du deuxième passage.

Les cellules issues du sixième passage ont été étudiées pour un seul individu. Les lames obtenues étant trop pauvres en métaphases, les données n'ont pas été exploitées. Cela serait intéressant de poursuivre le suivi de la proportion de cellules tétraploïdes sur un temps de culture plus long que P2 et sur un nombre d'individus suffisant.

Il semble judicieux d'utiliser la FISH sur les étalements de cellules pour mesurer les proportions de noyaux tétraploïdes. En effet, contrairement au G-banding, la FISH permet de repérer les cellules tétraploïdes même sur des noyaux condensés. Tous les noyaux peuvent donc faire l'objet de comptages et la récolte de cellules en division devient inutile. De plus, les signaux fluorescents permettent de repérer les cellules tétraploïdes rapidement. Pour ces raisons, la FISH permet d'avoir des échantillons plus larges tout en apportant un gain de temps non négligeable.

○ *Origine des tétraploïdies*

Deux hypothèses ont été explorées concernant l'origine des cellules tétraploïdes. La première étant que les cellules tétraploïdes se trouvent déjà dans le tissu natif, avant toute manipulation.

L'observation de coupes histologiques de tissu adipeux natif canin mâle et femelle a mis en évidence des cellules tétraploïdes. Des figures de tétraploïdies ont aussi été retrouvées sur des étalements de SVF qui sont des cellules n'ayant subi aucune étape de culture. Il est donc plausible que des cellules tétraploïdes se trouvent dans le tissu adipeux natif. Cependant, il

nous est impossible avec les techniques employées de confirmer ou d'infirmer que ces cellules soient bien des ASC. Il serait alors intéressant de trouver un marqueur permettant de différencier les ASC des autres cellules du tissu adipeux ou de la SVF étalée. Une autre solution serait de trouver une technique permettant d'isoler les ASC sans passer par une étape de culture. Cependant, les ASC sont actuellement isolées et identifiées grâce à leur capacité à se fixer sur le plastique *in vitro*.

Il existe un avantage à utiliser des coupes histologiques de chiens mâles par rapport à des femelles. En effet, même si seuls deux chromosomes sont accessibles dans le plan de coupe, s'il s'agit de deux chromosomes X ou de deux chromosomes Y, il est possible de conclure quant à la tétraploïdie des cellules observées. Cela est impossible pour les coupes issues d'individus femelles pour lesquelles il faut avoir accès à trois chromosomes sexuels minimum pour conclure à une tétraploïdie. L'usage de coupes issues d'individus mâles permettraient pour la même raison d'avoir une idée plus précise de la proportion de cellules tétraploïdes au sein du tissu natif.

Cependant, il a été constaté que le signal du chromosome Y est plus difficile à repérer sur les coupes histologiques que celui du chromosome X. La couleur du signal est verte et est assez proche de l'auto fluorescence tissulaire, ce qui rend l'interprétation des signaux parfois difficile. Il semble difficile d'avoir recours à une autre couleur de signal. Les couleurs de fluorescence pouvant être utilisées pour la révélation sont limitées. La recherche de tétraploïdie sur des étalements de cellules montre ici plusieurs avantages. En effet, cette technique permet de s'affranchir de l'auto-fluorescence tissulaire et le noyau est observé dans sa totalité. Le signal du chromosome Y est plus facilement repérable. Il est donc plus rapide de repérer les cellules tétraploïdes.

La deuxième hypothèse explorée est celle selon laquelle les cellules tétraploïdes sont issues d'erreur de division au cours de la culture. Les séquences observées avec le EVOS® FL Auto Imaging System nous ont révélé des erreurs de division mitotique. De telles divisions, produisant des cellules filles avec un contenu génétique anormal, semblent être une origine possible pour les cellules polyploïdes.

Il serait intéressant de réaliser de nouvelles captures avec des cellules issues de différents passages pour vérifier si la fréquence de ce type d'évènements est plus élevée lors de passages tardifs. Cela pourrait être mis en relation avec le taux de cellules tétraploïdes croissant, observé lors du comptage de chromosomes sur métaphases.

Une autre hypothèse concernant la croissance du taux de cellules tétraploïdes est que les cellules tétraploïdes soient viables et donneraient deux cellules filles tétraploïdes à leur tour. Ce cas de figure n'a pas été observé lors des séquences vidéos acquises dans ce travail. Il serait alors intéressant de chercher à observer une division cellulaire d'ASC polyploïde afin d'évaluer le contenu génétique des cellules filles.

- *Conséquence des tétraploïdies sur l'usage des ASC*

Le rôle des cellules tétraploïdes n'est pas clairement élucidé dans la littérature. Cependant, plusieurs auteurs mettent en garde quant à l'usage de ce type de cellules en tant que médicament. La polyploïdie est considérée comme un critère de malignité et l'apparition de tumeur ne doit pas être négligée (Ueyama et al., 2012 ; Binato et al., 2012 ; Seon Young Kim et al., 2015 ; Jung-Ah Kim et al., 2015).

3. CONCLUSION

L'analyse de la littérature sur le sujet nous a permis de montrer, dans une première partie, l'importance du développement des cellules souches pour le développement de MTI dans de très nombreuses affections pour lesquelles les solutions thérapeutiques actuelles sont insuffisantes. Dans ces phases de développement thérapeutique innovant, il est important de pouvoir faire progresser de façon parallèle les données d'efficacité et les données de sécurité afin de garantir la translation jusqu'au marché du médicament, des thérapies à base de cellules souches.

Que ce soit pour l'efficacité ou la sécurité, la production de nouvelles données de biologie et de devenir des cellules souches après leur administration, notamment les ASC dans notre travail, sont conditionnées par l'utilisation d'outils technologiques appropriés et performants. C'est dans ce contexte qu'apparaît toute l'utilité de la cytogénétique. En effet il n'existe pas à l'heure actuelle de sondes de FISH spécifiques du chien.

Dans ce travail expérimental réalisé sur le site de l'ENVT, en collaboration étroite avec la plateforme de cytogénétique (Dr. A Pinton) et l'unité de recherche STROMALab (Dr. I. Raymond-Letron), ces sondes FISH ont été développées à façon puis leur efficacité a été validée, à la fois sur cytologie et sur lames histologiques.

La cytogénétique permet également d'explorer la stabilité génétique des cellules souches dans les tissus natifs et au cours des passages. Notre travail et les sondes FISH anti-chromosomes sexuels produites ont permis de montrer à la fois l'existence d'une fraction non négligeable de cellules binucléées dans les tissus natifs, mais aussi d'évaluer l'évolution de la polyploïdie en condition de culture, avec une augmentation avec le nombre de passages, pour les tissus et les ASC d'origine canine.

Ces données préliminaires ouvrent la voie à la prolongation des travaux, notamment sur un plus grand nombre d'échantillons, et ouvre la réflexion sur le rôle des cellules binucléées dans les tissus adipeux sous cutanés natifs. Ce travail démontre également l'apport des approches multidisciplinaires dans le domaine biomédical.

ANNEXES

Annexe 1 : Détails des produits utilisés dans notre étude

Produit	Nom / Composition	Référence
ADN compétiteur	Canine Hybloc DNA 1µg/µL : repetitive sequence fraction of genomic DNA from male canine spleen	APPLIED GENETICS LABORATORIES (REF. DHB Canine Hybloc DNA)
ADN de saumon	ADN de sperme de saumon soniqué (UltraPure™ Salmon Sperm DNA Solution)	INVITROGEN (REF. 15 632011)
Anticorps antidigoxigénine	Monoclonal Anti-Digoxin-FITC antibody produced in mouse clone DI-22 purified immunoglobulin, buffered aqueous solution.	SIGMA (REF. F3523)
Biotine	Biotin-16-dUTP	ROCHE (REF. 11228953 ou 11 093 070 910 50nmol;50µL)
BSA	Albumin bovine serum, fraction V, ≥96%	SIGMA (REF. A9647 50g)
Choc hypotonique	Sérum de veau nouveau-né dilué au 1/6 dans de l'eau distillée	DUTSCHER (REF. S0750-100 100ML)
Digoxigénine	Digoxigenin-dUTP, alkali-stable	ENZO (REF. ENZ-NUC113-0025 25nmol;1mM)
dNTP 10X	bases A, G, C et un peu T	
Formamide		SIGMA (REF. F9037)
Milieu culture n°1	DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (1X) [+] 1g/L D-Glucose [+] L-Glutamine [+] Pyruvate	GIBCO (REF.31885-023 500ML)
Milieu de culture n°2	F-12 Nut Mix (Ham) (1X) [+]L-Glutamine + 100mL sérum fœtal de veau + 6mL Antibiotique/ Antimycotique 100X	GIBCO (REF.21765-029 500ML) PAN BIOTECH (REF. 3301 - P100709) GIBCO (REF. 15240 - 096 20ML)
Milieu RPMI	RPMI Medium 1640 (1X) + GlutaMAX™ -I [+] 25mM HEPES	GIBCO (REF 72400 - 021 500ML)

PBS	DPBS 1X : Dulbecco's Phosphate Buffered Saline [-] CaCl ₂ [-]MgCl ₂	GIBCO (REF. 14190-094 500ML)
Primers 2,5 X pour PCR	séquence amorce CCGACTCGAGNNNNNATGTGG	EUROBIO (oligonucléotide référence 8018201367-000100)
Solution de "PBT"	Flacon de 500mL de DPBS 1x + 500µL de Tween 20 + 0,75g de BSA (Bovine Serum Albumin)	Cf. PBS, Tween 20 et BSA
Solution de "Tween"	Flacon de 500mL de DPBS 1x + 500µL de Tween 20	Cf. PBS, Tween 20
Solution de Colchicine	15mg de colchicine + 40mL d'eau stérile	SIGMA (REF. C-9754 1G)
Solution de Pokeweed	5mg de Pokeweed (Lectin from <i>Phytolacca americana</i>) + 20mL d'eau stérile	SIGMA (REF. L8777 5MG)
Solution SSC 0,4X	UltraPure™ 20X SSC BUFFER diluée 50 fois	
Solution SSC 2X	UltraPure™ 20X SSC BUFFER diluée 10 fois	
Streptavidine	Streptavidin, Alexa Fluor® 594	LIFE TECHNOLOGIES (REF. S32356)
Trypsine	TRYPsin 1 : 250	PAN™ BIOTECH GmbH (REF.P10-025100P 100g)
Tween 20	Polyéthylène glucol sorbitan monolaurate, polyoxyéthylènesorbitan monolaurate	SIGMA (REF.P1379 500ML)
UltraPure™ 20X SSC BUFFER	3.0 M NaCl, 0.3M Sodium Citrate, pH 7.0 +/- 0.1 (20X concentrate)	INVITROGEN (REF.15557-036)
Vectashield	Vectashield with DAPI	VECTOR LABORATORIES (REF.H-1200)
Solution d'hybridation	Contient de la formamide	SIGMA (H7782 6ML)

BIBLIOGRAPHIE (logiciel Zotero)

A. SOMOZA, Rodrigo et J. RUBIO, Francisco, 2012. Cell Therapy Using Induced Pluripotent Stem Cells or Somatic Stem Cells: This is the Question. In : *Current Stem Cell Research & Therapy*. 1 avril 2012. Vol. 7, n° 3, p. 191-196. DOI 10.2174/157488812799859865.

AHMADBEIGI, N., SHAFIEE, A., SEYEDJAFARI, E., GHEISARI, Y., VASSEI, M., AMANPOUR, S., AMINI, S., BAGHERIZADEH, I. et SOLEIMANI, M., 2011. Early spontaneous immortalization and loss of plasticity of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells: Immortalization of rabbit mesenchymal stem cells. In : *Cell Proliferation*. février 2011. Vol. 44, n° 1, p. 67-74. DOI 10.1111/j.1365-2184.2010.00731.x.

BAIRD, Aeg, BARSBY, T. et GUEST, D. J., 2015. Derivation of Canine Induced Pluripotent Stem Cells. In : *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*. août 2015. Vol. 50, n° 4, p. 669-676. DOI 10.1111/rda.12562.

BELLOTTI, C., STANCO, D., RAGAZZINI, S., ROMAGNOLI, L., MARTELLA, E., LAZZATI, S., MARCHETTI, C., DONATI, D. et LUCARELLI, E., 2013. Analysis of the Karyotype of Expanded Human Adipose-Derived Stem Cells for Bone Reconstruction of the Maxillo-Facial Region. In : *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*. 1 janvier 2013. Vol. 26, n° 1_suppl, p. 3-9. DOI 10.1177/03946320130260S102.

BIANCO, Paolo, 2014. "Mesenchymal" Stem Cells. In : *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 11 octobre 2014. Vol. 30, n° 1, p. 677-704. DOI 10.1146/annurev-cellbio-100913-013132.

BINATO, R., DE SOUZA FERNANDEZ, T., LAZZAROTTO-SILVA, C., DU ROCHER, B., MENCALHA, A., PIZZATTI, L., BOUZAS, L. F. et ABDELHAY, E., 2012. Stability of human mesenchymal stem cells during in vitro culture: considerations for cell therapy. In : *Cell Proliferation*. 16 novembre 2012. Vol. 46, n° 1, p. 10-22. DOI 10.1111/cpr.12002.

BORGONOVO, Tamara, SOLAREWICZ, Maria Marlene, VAZ, Isadora May, DAGA, Debora, REBELATTO, Carmen Lúcia Kuniyoshi, SENEGAGLIA, Alexandra Cristina, RIBEIRO, Enilze, CAVALLI, Iglénir João et BROFMAN, Paulo Slud, 2015. Emergence of clonal chromosomal alterations during the mesenchymal stromal cell cultivation. In : *Molecular Cytogenetics* [en ligne]. 1 décembre 2015. Vol. 8. [Consulté le 18 juin 2019]. DOI 10.1186/s13039-015-0197-5. Disponible à l'adresse : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4666177/>.

BORGONOVO, Tamara, VAZ, Isadora May, SENEGAGLIA, Alexandra Cristina, REBELATTO, Carmen Lucia Kuniyoshi et BROFMAN, Paulo Roberto Slud, 2014. Genetic evaluation of mesenchymal stem cells by G-banded karyotyping in a Cell Technology Center. In : *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2014. Vol. 36, n° 3, p. 202-207. DOI 10.1016/j.bjhh.2014.03.006.

BOURIN, PHILIPPE, BUNNELL, BRUCE A., CASTEILLA, LOUIS, DOMINICI, MASSIMO, KATZ, ADAM J., MARCH, KEITH L., REDL, HEINZ, RUBIN, J. PETER, YOSHIMURA, KOTARO et GIMBLE, JEFFREY M., 2013. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics (IFATS) and Science and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). In : *Cytotherapy*. juin 2013. Vol. 15, n° 6, p. 641-648. DOI 10.1016/j.jcyt.2013.02.006.

BUSSCHE, Leen et VAN DE WALLE, Gerlinde R., 2014. Peripheral Blood-Derived Mesenchymal Stromal Cells Promote Angiogenesis via Paracrine Stimulation of Vascular Endothelial Growth Factor Secretion in the Equine Model. In : *Stem Cells Translational Medicine*. décembre 2014. Vol. 3, n° 12, p. 1514-1525. DOI 10.5966/sctm.2014-0138.

CAMARGO, Fernando D, GREEN, Rahshaana, CAPETENAKI, Yassemi, JACKSON, Kathyjo A et GOODELL, Margaret A, 2003. Single hematopoietic stem cells generate skeletal muscle through myeloid intermediates. In : *Nature Medicine*. décembre 2003. Vol. 9, n° 12, p. 1520-1527. DOI 10.1038/nm963.

CAO, Juan, HOU, Shike, DING, Hui, LIU, Ziquan, SONG, Meijuan, QIN, Xiaojing, WANG, Xue, YU, Mengyang, SUN, Zhiguang, LIU, Jinyang, SUN, Shuli, XIAO, Peixin, LV, Qi et FAN, Haojun, 2016. In Vivo Tracking of Systemically Administered Allogeneic Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Normal Rats through Bioluminescence Imaging. In : *Stem Cells International*. 2016. Vol. 2016, p. 3970942. DOI 10.1155/2016/3970942.

CARVALHO, Armando de Mattos, BADIAL, Peres Ramos, ÁLVAREZ, Luis Emiliano Cisneros, YAMADA, Ana Lucia Miluzzi, BORGES, Alexandre Secorun, DEFFUNE, Elenice, HUSSNI, Carlos Alberto et GARCIA ALVES, Ana Liz, 2013. Equine tendonitis therapy using mesenchymal stem cells and platelet concentrates: a randomized controlled trial. In : *Stem Cell Research & Therapy*. 22 juillet 2013. Vol. 4, n° 4, p. 85. DOI 10.1186/scrt236.

CHEUNG, Sau W et BI, Weimin, 2018. Novel applications of array comparative genomic hybridization in molecular diagnostics. In : *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 3 juin 2018. Vol. 18, n° 6, p. 531-542. DOI 10.1080/14737159.2018.1479253.

CINTI, S., 2005. The adipose organ. In : *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. juillet 2005. Vol. 73, n° 1, p. 9-15. DOI 10.1016/j.plefa.2005.04.010.

COMMISSIONER, Office of the, 2019. FDA Warns About Stem Cell Therapies. In : *FDA* [en ligne]. 9 avril 2019. [Consulté le 14 mars 2020]. Disponible à l'adresse : <http://www.fda.gov/consumers/consumer-updates/fda-warns-about-stem-cell-therapies>.

CRESPO-DIAZ, Ruben, BEHFAR, Atta, BUTLER, Greg W., PADLEY, Douglas J., SARR, Michael G., BARTUNEK, Jozef, DIETZ, Allan B. et TERZIC, Andre, 2011. Platelet Lysate Consisting of a Natural Repair Proteome Supports Human Mesenchymal Stem Cell Proliferation and Chromosomal Stability. In : *Cell Transplantation*. juillet 2011. Vol. 20, n° 6, p. 797-812. DOI 10.3727/096368910X543376.

DA SILVA MEIRELLES, L., 2006. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. In : *Journal of Cell Science*. 9 mai 2006. Vol. 119, n° 11, p. 2204-2213. DOI 10.1242/jcs.02932.

DARIOLLI, Rafael, BASSANEZE, Vinicius, NAKAMUTA, Juliana Sanajotti, OMAE, Samantha Vieira, CAMPOS, Luciene Cristina Gastalho et KRIEGER, Jose E., 2013. Porcine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells retain their proliferative characteristics, senescence, karyotype and plasticity after long-term cryopreservation. In : *PloS One*. 2013. Vol. 8, n° 7, p. e67939. DOI 10.1371/journal.pone.0067939.

DE BAKKER, Evelien, VAN RYSSEN, Bernadette, DE SCHAUWER, Catharina et MEYER, Evelyne, 2013. Canine mesenchymal stem cells: state of the art, perspectives as therapy for dogs and as a model for man. In : *The Veterinary Quarterly*. décembre 2013. Vol. 33, n° 4, p. 225-233. DOI 10.1080/01652176.2013.873963.

DOMINICI, M., LE BLANC, K., MUELLER, I., SLAPER-CORTENBACH, I., MARINI, F.C, KRAUSE, D.S., DEANS, R.J., KEATING, A., PROCKOP, D.J. et HORWITZ, E.M., 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. In : *Cytotherapy*. 2006. Vol. 8, n° 4, p. 315-317. DOI 10.1080/14653240600855905.

- DULAK, Józef, SZADE, Krzysztof, SZADE, Agata, NOWAK, Witold et JÓZKOWICZ, Alicja, 2015. Adult stem cells: hopes and hypes of regenerative medicine. In : *Acta Biochimica Polonica*. 2015. Vol. 62, n° 3, p. 329-337. DOI 10.18388/abp.2015_1023.
- ESKES, Chantra, BOSTRÖM, Ann-Charlotte, BOWE, Gerhard, COECKE, Sandra, HARTUNG, Thomas, HENDRIKS, Giel, PAMIES, David, PITON, Alain et ROVIDA, Costanza, 2017. Good cell culture practices & in vitro toxicology. In : *Toxicology in Vitro*. décembre 2017. Vol. 45, p. 272-277. DOI 10.1016/j.tiv.2017.04.022.
- FERREIRA, Reginaldo Justino, IRIODA, Ana Carolina, CUNHA, Ricardo Correa, FRANCISCO, Julio Cesar, GUARITA-SOUZA, Luiz Cesar, SRIKANTH, Garikipati Venkata Naga, NITYANAND, Soniya, ROSATI, Roberto, CHACHQUES, Juan Carlos et DE CARVALHO, Katherine Athayde Teixeira, 2012. Controversies about the chromosomal stability of cultivated mesenchymal stem cells: their clinical use is it safe? In : *Current Stem Cell Research & Therapy*. septembre 2012. Vol. 7, n° 5, p. 356-363.
- FILIOLI URANIO, M., VALENTINI, L., LANGE-CONSIGLIO, A., CAIRA, M., GUARICCI, A. C., L'ABBATE, A., CATACCIO, C. R., VENTURA, M., CREMONESI, F. et DELL'AQUILA, M. E., 2011. Isolation, proliferation, cytogenetic, and molecular characterization and in vitro differentiation potency of canine stem cells from foetal adnexa: A comparative study of amniotic fluid, amnion, and umbilical cord matrix. In : *Molecular Reproduction and Development*. mai 2011. Vol. 78, n° 5, p. 361-373. DOI 10.1002/mrd.21311.
- FROELICH, Katrin, MICKLER, Johannes, STEUSLOFF, Gudrun, TECHNAU, Antje, RAMOS TIRADO, Mario, SCHERZED, Agmal, HACKENBERG, Stephan, RADELOFF, Andreas, HAGEN, Rudolf et KLEINSASSER, Norbert, 2013. Chromosomal aberrations and deoxyribonucleic acid single-strand breaks in adipose-derived stem cells during long-term expansion in vitro. In : *Cytotherapy*. juillet 2013. Vol. 15, n° 7, p. 767-781. DOI 10.1016/j.jcyt.2012.12.009.
- GARCIA-MARTINEZ, Jorge, BAKKER, Bjorn, SCHUKKEN, Klaske M, SIMON, Judith E et FOIJER, Floris, 2016. Aneuploidy in stem cells. In : *World Journal of Stem Cells*. 26 juin 2016. Vol. 8, n° 6, p. 216-222. DOI 10.4252/wjsc.v8.i6.216.
- GOLPANIAN, Samuel, WOLF, Ariel, HATZISTERGOS, Konstantinos E. et HARE, Joshua M., 2016. Rebuilding the Damaged Heart: Mesenchymal Stem Cells, Cell-Based Therapy, and Engineered Heart Tissue. In : *Physiological Reviews*. juillet 2016. Vol. 96, n° 3, p. 1127-1168. DOI 10.1152/physrev.00019.2015.
- HENEGARIU, Octavian, HEEREMA, Nyla A., WRIGHT, Lisa Lowe, BRAY-WARD, Patricia, WARD, David C. et VANCE, Gail H., 2001. Improvements in cytogenetic slide preparation: Controlled chromosome spreading, chemical aging and gradual denaturing. In : *Cytometry*. 2001. Vol. 43, n° 2, p. 101-109. DOI 10.1002/1097-0320(20010201)43:2<101::AID-CYTO1024>3.0.CO;2-8.
- HOFFMAN, Andrew M. et DOW, Steven W., 2016. Concise Review: Stem Cell Trials Using Companion Animal Disease Models: Stem Cell Trials in Companion Animal Diseases. In : *STEM CELLS*. juillet 2016. Vol. 34, n° 7, p. 1709-1729. DOI 10.1002/stem.2377.
- HURET, Jean-Loup, AHMAD, Mohammad, ARSABAN, Mélanie, BERNHEIM, Alain, CIGNA, Jérémy, DESANGLES, François, GUIGNARD, Jean-Christophe, JACQUEMOT-PERBAL, Marie-Christine, LABARUSSIAS, Maureen, LEBERRE, Vanessa, MALO, Anne, MOREL-PAIR, Catherine, MOSSAFA, Hossein, POTIER, Jean-Claude, TEXIER, Guillaume, VIGUIÉ, Franck, YAU CHUN WAN-SENON, Sylvie, ZASADZINSKI, Alain et DESSEN, Philippe, 2012. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology in 2013. In : *Nucleic Acids Research*. 17 novembre 2012. Vol. 41, n° D1, p. D920-D924. DOI 10.1093/nar/gks1082.

JE, Hyeon Jeong, KIM, Min Gu et KWON, Hyuck Joon, 2017. Bioluminescence Assays for Monitoring Chondrogenic Differentiation and Cartilage Regeneration. In : *Sensors (Basel, Switzerland)* [en ligne]. 6 juin 2017. Vol. 17, n° 6. [Consulté le 18 juin 2019]. DOI 10.3390/s17061306. Disponible à l'adresse : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5492100/>.

KANG, Min Hee et PARK, Hee Myung, 2014. Evaluation of adverse reactions in dogs following intravenous mesenchymal stem cell transplantation. In : *Acta Veterinaria Scandinavica*. 21 mars 2014. Vol. 56, n° 1, p. 16. DOI 10.1186/1751-0147-56-16.

KEMP, Kevin, WILKINS, Alastair et SCOLDING, Neil, 2014. Cell fusion in the brain: two cells forward, one cell back. In : *Acta Neuropathologica*. novembre 2014. Vol. 128, n° 5, p. 629-638. DOI 10.1007/s00401-014-1303-1.

KIM, Jung-Ah, IM, Kyong Ok, PARK, Si Nae, KWON, Ji Seok, KIM, Seon Young, OH, Keunhee, LEE, Dong-Sup, KIM, Min Kyung, KIM, Seong Who, JANG, Mi, LEE, Gene, OH, Yeon-Mok, LEE, Sang Do et LEE, Dong Soon, 2015. Cytogenetic heterogeneity and their serial dynamic changes during acquisition of cytogenetic aberrations in cultured mesenchymal stem cells. In : *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. juillet 2015. Vol. 777, p. 60-68. DOI 10.1016/j.mrfmmm.2015.04.003.

KIM, Seon Young, IM, Kyongok, PARK, Si Nae, KWON, Jiseok, KIM, Jung-Ah, CHOI, Qute, HWANG, Sang Mee, HAN, Sung-Hee, KWON, Sunghoon, OH, Il-Hoan et LEE, Dong Soon, 2015. Asymmetric Aneuploidy in Mesenchymal Stromal Cells Detected by In Situ Karyotyping and Fluorescence In Situ Hybridization: Suggestions for Reference Values for Stem Cells. In : *Stem Cells and Development*. janvier 2015. Vol. 24, n° 1, p. 77-92. DOI 10.1089/scd.2014.0137.

KOUVIDI, Elisavet, STRATIGI, Aikaterini, BATSALI, Aristeia, MAVROUDI, Irene, MASTRODEMOU, Semeli, XIMERI, Maria, PAPADAKI, Helen A. et PONTIKOGLOU, Charalampos G., 2016. Cytogenetic evaluation of mesenchymal stem/stromal cells from patients with myelodysplastic syndromes at different time-points during ex vivo expansion. In : *Leukemia Research*. avril 2016. Vol. 43, p. 24-32. DOI 10.1016/j.leukres.2016.02.007.

LEE, Andrew S., XU, Dan, PLEWS, Jordan R., NGUYEN, Patricia K., NAG, Divya, LYONS, Jennifer K., HAN, Leng, HU, Shijun, LAN, Feng, LIU, Junwei, HUANG, Mei, NARSINH, Kazim H., LONG, Charles T., DE ALMEIDA, Patricia E., LEVI, Benjamin, KOOREMAN, Nigel, BANGS, Charles, PACHARINSAK, Cholawat, IKENO, Fumiaki, YEUNG, Alan C., GAMBHIR, Sanjiv S., ROBBINS, Robert C., LONGAKER, Michael T. et WU, Joseph C., 2011. Preclinical Derivation and Imaging of Autologously Transplanted Canine Induced Pluripotent Stem Cells. In : *Journal of Biological Chemistry*. 16 septembre 2011. Vol. 286, n° 37, p. 32697-32704. DOI 10.1074/jbc.M111.235739.

LEMAITRE, Mathieu, MONSARRAT, Paul, BLASCO-BAQUE, Vincent, LOUBIÈRES, Pascale, BURCELIN, Rémy, CASTEILLA, Louis, PLANAT-BÉNARD, Valérie et KÉMOUN, Philippe, 2017. Periodontal Tissue Regeneration Using Syngeneic Adipose-Derived Stromal Cells in a Mouse Model. In : *Stem Cells Translational Medicine*. 2017. Vol. 6, n° 2, p. 656-665. DOI 10.5966/sctm.2016-0028.

LIN, Huan-Ting, OTSU, Makoto et NAKAUCHI, Hiromitsu, 2013. Stem cell therapy: an exercise in patience and prudence. In : *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 5 janvier 2013. Vol. 368, n° 1609, p. 20110334. DOI 10.1098/rstb.2011.0334.

LLUIS, Frederic et COSMA, Maria Pia, 2010. Cell-fusion-mediated somatic-cell reprogramming: a mechanism for tissue regeneration. In : *Journal of Cellular Physiology*. avril 2010. Vol. 223, n° 1, p. 6-13. DOI 10.1002/jcp.22003.

LLUÍS, Frederic, PERDIGUERO, Eusebio, NEBREDÀ, Angel R. et MUÑOZ-CÁNOVES, Pura, 2006. Regulation of skeletal muscle gene expression by p38 MAP kinases. In : *Trends in Cell Biology*. janvier 2006. Vol. 16, n° 1, p. 36-44. DOI 10.1016/j.tcb.2005.11.002.

MARKOSKI, Melissa Medeiros, 2016. Advances in the Use of Stem Cells in Veterinary Medicine: From Basic Research to Clinical Practice. In : *Scientifica* [en ligne]. 2016. [Consulté le 18 juin 2019]. Disponible à l'adresse : <https://www.hindawi.com/journals/scientifica/2016/4516920/>.

MARTINELLO, T., BRONZINI, I., MACCATROZZO, L., MOLLO, A., SAMPAOLESI, M., MASCARELLO, F., DECAMINADA, M. et PATRUNO, M., 2011. Canine adipose-derived-mesenchymal stem cells do not lose stem features after a long-term cryopreservation. In : *Research in Veterinary Science*. août 2011. Vol. 91, n° 1, p. 18-24. DOI 10.1016/j.rvsc.2010.07.024.

MEZA-ZEPEDA, Leonardo A., NOER, Agate, DAHL, John Arne, MICCI, Francesca, MYKLEBOST, Ola et COLLAS, Philippe, 2008. High-resolution analysis of genetic stability of human adipose tissue stem cells cultured to senescence. In : *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. avril 2008. Vol. 12, n° 2, p. 553-563. DOI 10.1111/j.1582-4934.2007.00146.x.

MINONZIO, Greta, CORAZZA, Mattia, MARIOTTA, Luca, GOLA, Mauro, ZANZI, Michele, GANDOLFI, Eugenio, DE FAZIO, Domenico et SOLDATI, Gianni, 2014. Frozen adipose-derived mesenchymal stem cells maintain high capability to grow and differentiate. In : *Cryobiology*. 1 octobre 2014. Vol. 69, n° 2, p. 211-216. DOI 10.1016/j.cryobiol.2014.07.005.

MINTEER, Danielle, MARRA, Kacey G. et RUBIN, J. Peter, 2012. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells: Biology and Potential Applications. In : WEYAND, Birgit, DOMINICI, Massimo, HASS, Ralf, JACOBS, Roland et KASPER, Cornelia (éd.), *Mesenchymal Stem Cells - Basics and Clinical Application I* [en ligne]. Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg. p. 59-71. [Consulté le 1 juillet 2019]. ISBN 978-3-642-35670-4. Disponible à l'adresse : http://link.springer.com/10.1007/10_2012_146.

MIURA, Masako, MIURA, Yasuo, PADILLA-NASH, Hesed M., MOLINOLO, Alfredo A., FU, Baojin, PATEL, Vyomesh, SEO, Byoung-Moo, SONOYAMA, Wataru, ZHENG, Jenny J., BAKER, Carl C., CHEN, Wanjun, RIED, Thomas et SHI, Songtao, 2006. Accumulated Chromosomal Instability in Murine Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Leads to Malignant Transformation. In : *STEM CELLS*. avril 2006. Vol. 24, n° 4, p. 1095-1103. DOI 10.1634/stemcells.2005-0403.

MULERIS, Martine, 1996. *Hybridation in situ en cytogénétique moléculaire: principes et techniques*. Paris : Tec & Doc-Lavoisier. ISBN 978-2-7430-0154-4.

NIKITINA, Victoria, ASTRELINA, Tatiana, NUGIS, Vladimir, OSTASHKIN, Aleksandr, KARASEVA, Tatiana, DOBROVOLSKAYA, Ekaterina, USUPZHANOVA, Dariya, SUCHKOVA, Yulia, LOMONOSOVA, Elena, RODIN, Sergey, BRUNCHUKOV, Vitaliy, LAUK-DUBITSKIY, Stanislav, BRUMBERG, Valentin, MACHOVA, Anastasia, KOBZEVA, Irina, BUSHMANOV, Andrey et SAMOILOV, Aleksandr, 2018. Clonal chromosomal and genomic instability during human multipotent mesenchymal stromal cells long-term culture. In : CIMINI, Daniela (éd.), *PLOS ONE*. 12 février 2018. Vol. 13, n° 2, p. e0192445. DOI 10.1371/journal.pone.0192445.

ORR, Bernardo, GODEK, Kristina M. et COMPTON, Duane, 2015. Aneuploidy. In : *Current Biology*. juin 2015. Vol. 25, n° 13, p. R538-R542. DOI 10.1016/j.cub.2015.05.010.

PAN, Qiuwei, FOURASCHEN, Suomi MG, DE RUITER, Petra E, DINJENS, Winand NM, KWEKKEBOOM, Jaap, TILANUS, Hugo W et VAN DER LAAN, Luc JW, 2014. Detection of spontaneous tumorigenic transformation during culture expansion of human mesenchymal stromal cells. In : *Experimental Biology and Medicine*. janvier 2014. Vol. 239, n° 1, p. 105-115. DOI 10.1177/1535370213506802.

PITTINGER, Mark F., DISCHER, Dennis E., PÉAULT, Bruno M., PHINNEY, Donald G., HARE, Joshua M. et CAPLAN, Arnold I., 2019. Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. In : *npj Regenerative Medicine*. décembre 2019. Vol. 4, n° 1, p. 22. DOI 10.1038/s41536-019-0083-6.

POLCHERT, David, SOBINSKY, Justin, DOUGLAS, Gw, KIDD, Martha, MOADSIRI, Ada, REINA, Eduardo, GENRICH, Kristyn, MEHROTRA, Swati, SETTY, Suman, SMITH, Brett et BARTHOLOMEW, Amelia, 2008. IFN-gamma activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft versus host disease. In : *European Journal of Immunology*. juin 2008. Vol. 38, n° 6, p. 1745-1755. DOI 10.1002/eji.200738129.

SANSREGRET, Laurent et SWANTON, Charles, 2017. The Role of Aneuploidy in Cancer Evolution. In : *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. janvier 2017. Vol. 7, n° 1, p. a028373. DOI 10.1101/cshperspect.a028373.

SCHRECK, Rhona R. et DISTÈCHE, Christine M., 2001. Chromosome Banding Techniques. In : HAINES, Jonathan L., KORF, Bruce R., MORTON, Cynthia C., SEIDMAN, Christine E., SEIDMAN, J.G. et SMITH, Douglas R. (éd.), *Current Protocols in Human Genetics* [en ligne]. Hoboken, NJ, USA : John Wiley & Sons, Inc. p. hg0402s00. [Consulté le 6 mars 2020]. ISBN 978-0-471-14290-4. Disponible à l'adresse : <http://doi.wiley.com/10.1002/0471142905.hg0402s00>.

SCHROCK, E., DU MANOIR, S., VELDMAN, T., SCHOELL, B., WIENBERG, J., FERGUSON-SMITH, M. A., NING, Y., LEDBETTER, D. H., BAR-AM, I., SOENKSEN, D., GARINI, Y. et RIED, T., 1996. Multicolor Spectral Karyotyping of Human Chromosomes. In : *Science*. 26 juillet 1996. Vol. 273, n° 5274, p. 494-497. DOI 10.1126/science.273.5274.494.

SMITH, R. K. W., KORDA, M., BLUNN, G. W. et GOODSHIP, A. E., 2003. Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. In : *Equine Veterinary Journal*. janvier 2003. Vol. 35, n° 1, p. 99-102.

SOLTER, Davor, 2006. From teratocarcinomas to embryonic stem cells and beyond: a history of embryonic stem cell research. In : *Nature Reviews Genetics*. avril 2006. Vol. 7, n° 4, p. 319-327. DOI 10.1038/nrg1827.

STULTZ, Brian G., MCGINNIS, Kathleen, THOMPSON, Elaine E., LO SURDO, Jessica L., BAUER, Steven R. et HURSH, Deborah A., 2016. Chromosomal stability of mesenchymal stromal cells during in vitro culture. In : *Cytotherapy*. mars 2016. Vol. 18, n° 3, p. 336-343. DOI 10.1016/j.jcyt.2015.11.017.

TAKAHASHI, Kazutoshi et YAMANAKA, Shinya, 2006. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. In : *Cell*. août 2006. Vol. 126, n° 4, p. 663-676. DOI 10.1016/j.cell.2006.07.024.

TOBITA, Morikuni et UYSAL, Cagri A., 2013. Periodontal tissue regeneration by combined implantation of adipose tissue-derived stem cells and platelet-rich plasma in a canine model. - PubMed - NCBI. In : [en ligne]. 2013. [Consulté le 18 juin 2019]. Disponible à l'adresse : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23849975>.

TORRICELLI, Paola, FINI, Milena, FILARDO, Giuseppe, TSCHON, Matilde, PISCHEDDA, Mario, PACORINI, Alessandra, KON, Elizaveta et GIARDINO, Roberto, 2011. Regenerative medicine for the treatment of musculoskeletal overuse injuries in competition horses. In : *International Orthopaedics*. octobre 2011. Vol. 35, n° 10, p. 1569-1576. DOI 10.1007/s00264-011-1237-3.

TOSCA, Lucie, FERAUD, Olivier, MAGNIEZ, Aurélie, BAS, Cécile, GRISCELLI, Frank, BENNACEUR-GRISCELLI, Annelise et TACHDJIAN, Gérard, 2015. Genomic instability of human embryonic stem cell lines using different passaging culture methods. In : *Molecular Cytogenetics* [en ligne]. 23 avril 2015. Vol. 8. [Consulté le 18 juin 2019]. DOI 10.1186/s13039-015-0133-8. Disponible à l'adresse : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4456787/>.

UEYAMA, Hanae, HORIBE, Tomohisa, HINOTSU, Shiro, TANAKA, Tomoaki, INOUE, Takeomi, URUSHIHARA, Hisashi, KITAGAWA, Akira et KAWAKAMI, Koji, 2012. Chromosomal variability of human mesenchymal stem cells cultured under hypoxic conditions. In : *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. janvier 2012. Vol. 16, n° 1, p. 72-82. DOI 10.1111/j.1582-4934.2011.01303.x.

VAAGS, Andrea K., ROSIC-KABLAR, Suzana, GARTLEY, Cathy J., ZHENG, Yan Zhen, CHESNEY, Alden, VILLAGÓMEZ, Daniel A.F., KRUTH, Stephen A. et HOUGH, Margaret R., 2009. Derivation and Characterization of Canine Embryonic Stem Cell Lines with In Vitro and In Vivo Differentiation Potential. In : *Stem Cells*. février 2009. Vol. 27, n° 2, p. 329-340. DOI 10.1634/stemcells.2008-0433.

VANDENBERGHE, Aurélie, BROECKX, Sarah Y., BEERTS, Charlotte, SEYS, Bert, ZIMMERMAN, Marieke, VERWEIRE, Ineke, SULS, Marc et SPAAS, Jan H., 2015. Tenogenically Induced Allogeneic Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Proximal Suspensory Ligament Desmitis in a Horse. In : *Frontiers in Veterinary Science* [en ligne]. 22 octobre 2015. Vol. 2. [Consulté le 14 avril 2020]. DOI 10.3389/fvets.2015.00049. Disponible à l'adresse : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4672201/>.

VISWANATHAN, S., SHI, Y., GALIPEAU, J., KRAMPERA, M., LEBLANC, K., MARTIN, I., NOLTA, J., PHINNEY, D.G. et SENSEBE, L., 2019. Mesenchymal stem versus stromal cells: International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT®) Mesenchymal Stromal Cell committee position statement on nomenclature. In : *Cytotherapy*. octobre 2019. Vol. 21, n° 10, p. 1019-1024. DOI 10.1016/j.jcyt.2019.08.002.

WALKER, Mr, PATEL, Kk et STAPPENBECK, Ts, 2009. The stem cell niche. In : *The Journal of Pathology*. janvier 2009. Vol. 217, n° 2, p. 169-180. DOI 10.1002/path.2474.

WANG, Y., HUSO, D.L., HARRINGTON, J., KELLNER, J., JEONG, D.K., TURNEY, J. et MCNIECE, I.K., 2005. Outgrowth of a transformed cell population derived from normal human BM mesenchymal stem cell culture. In : *Cytotherapy*. 2005. Vol. 7, n° 6, p. 509-519. DOI 10.1080/14653240500363216.

WEIMANN, James M., CHARLTON, Carol A., BRAZELTON, Timothy R., HACKMAN, Robert C. et BLAU, Helen M., 2003. Contribution of transplanted bone marrow cells to Purkinje neurons in human adult brains. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 18 février 2003. Vol. 100, n° 4, p. 2088-2093. DOI 10.1073/pnas.0337659100.

WEISSMAN, Irving L., 2000. Stem Cells. In : *Cell*. janvier 2000. Vol. 100, n° 1, p. 157-168. DOI 10.1016/S0092-8674(00)81692-X.

ZIMMERLIN, Ludovic, DONNENBERG, Albert D., RUBIN, J. Peter, BASSE, Per, LANDRENEAU, Rodney J. et DONNENBERG, Vera S., 2011. Regenerative Therapy and Cancer: *In Vitro* and *In Vivo* Studies of the Interaction Between Adipose-Derived Stem Cells and Breast Cancer Cells from Clinical Isolates. In : *Tissue Engineering Part A*. janvier 2011. Vol. 17, n° 1-2, p. 93-106. DOI 10.1089/ten.tea.2010.0248.

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 **PLOYON Sophie** intitulée « **Cellules souches mésenchymateuses canines issues du tissu adipeux : développement de sondes spécifiques des chromosomes sexuels X et Y en FISH et études de la stabilité chromosomique** » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 12/11/2020
Enseignant-chercheur de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
Professeure Isabelle RAYMOND-LETRON



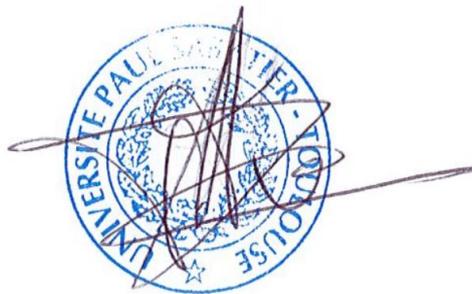
Vu :
Le Président du jury
Professeur Jean-Christophe PAGES



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



Mme PLOYON Sophie
a été admis(e) sur concours en : 2015
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.



TITRE : Cellules souches mésenchymateuses canines issues du tissu adipeux : développement de sondes spécifiques des chromosomes sexuels X et Y en FISH et études de la stabilité chromosomique

RESUMÉ :

Les cellules souches mésenchymateuses font l'objet de recherches pour le développement de médicaments de thérapie innovante. Les cellules souches mésenchymateuses dérivées du tissu adipeux (ASC) présentent de nombreux avantages dont une accessibilité de la source tissulaire et une mise en culture aisée. Elles se différencient aussi en de nombreux types cellulaires. Des sondes ciblant les chromosomes sexuels ont été produites pour suivre les ASC canines après xénotransplantation par méthode FISH (Fluorescent in situ Hybridization). La stabilité chromosomique des ASC a été étudiée en culture. Une proportion croissante de cellules tétraploïdes a été observée au cours du temps. Deux origines ont été explorées : la présence de cellules tétraploïdes dans le tissu natif et des divisions anormales *in vitro*. Connaître le devenir des ASC une fois injectées et suivre leur stabilité avant emploi sont des étapes indispensables pour évaluer la biodistribution, l'efficacité et la sécurité des cellules souches utilisées en tant que médicament de thérapie innovante.

MOTS CLÉS : ASC, Cellules souches mésenchymateuses, chien, cytogénétique, Hybridation *in situ*

TITLE: Canine mesenchymal stem cells derived from adipose tissue : FISH tracking tool development and chromosomal stability studies

ABSTRACT:

Stem cells are the subject of searches to obtain advanced therapy medicinal. Adipose-derived mesenchymal stem cells (ASC) offer numerous advantages, such as easy accessibility and cultivation. They also can differentiate to important lineages. Probes targetting sexual chromosomes were produced to track canine ASC once injected into a canine model by the FISH (Fluorescent in situ Hybridization) method. The chromosomal stability of ASC was studied in cultivation. An increasing ratio of tetraploid cells were observed over the culture time. Two origins were explored : tetraploid cells presence in native tissue and abnormal divisions *in vitro*. Tracking the ASC once injected and following their stability before their use are essential steps to assess the biodistribution, the efficiency and the safety of stem cells used as advances therapy medicinal.

KEY WORDS: ASC, mesenchymal stem cells, canine, cytogenetic, *in situ* Hybridization