



**HAL**  
open science

## Cellules souches et différenciation

Marie-Hélène Perruchot

► **To cite this version:**

| Marie-Hélène Perruchot. Cellules souches et différenciation. Doctoral. France. 2023. hal-04145339

**HAL Id: hal-04145339**

**<https://hal.science/hal-04145339>**

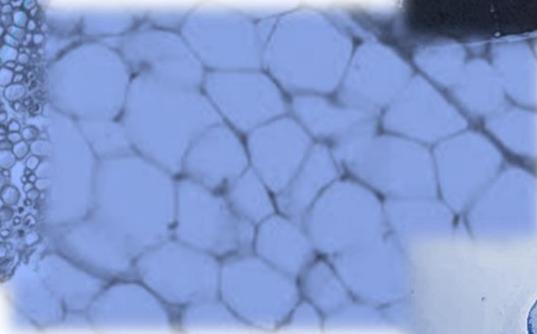
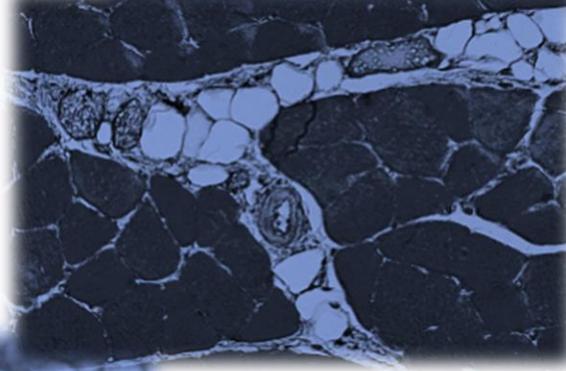
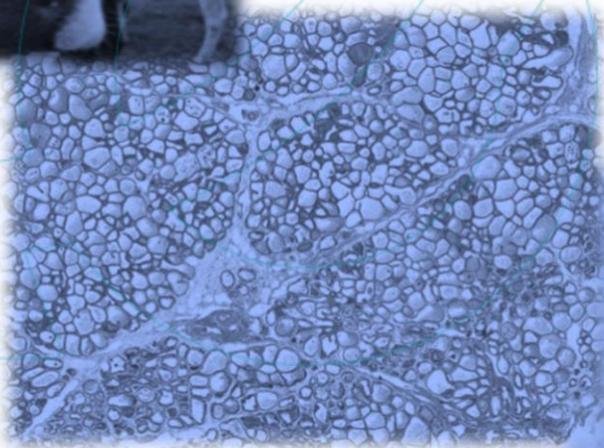
Submitted on 29 Jun 2023

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# CELLULES SOUCHES et DIFFERENCIATION

Marie-Hélène PERRUCHOT



# Cellules souches et différenciation

## Partie I

I- Le développement embryonnaire: de la cellule à l'organe

II- Les différentes catégories de cellules souches et la notion de plasticité cellulaire

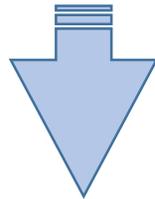
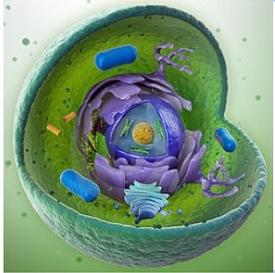
## Partie II

I- Etude de la plasticité mammaire pour l'identification de biomarqueurs d'une meilleure persistance de la lactation chez la vache laitière

II- Etude des cellules souches de muscle squelettique et de tissu adipeux de porc dans un contexte d'étude de la croissance

IV- De la cellule souche à la viande in vitro...en passant par les organoïdes

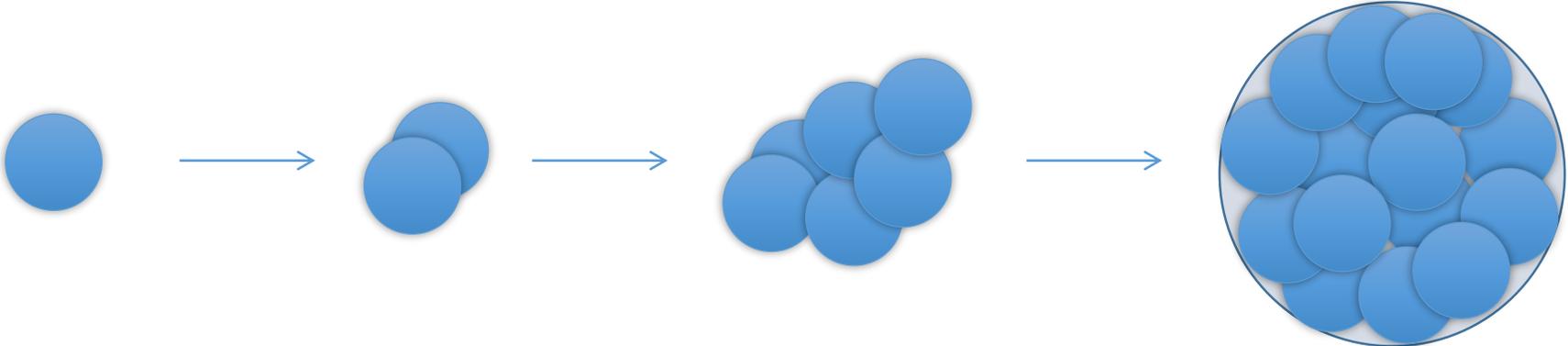
# Le développement du Corps Humain



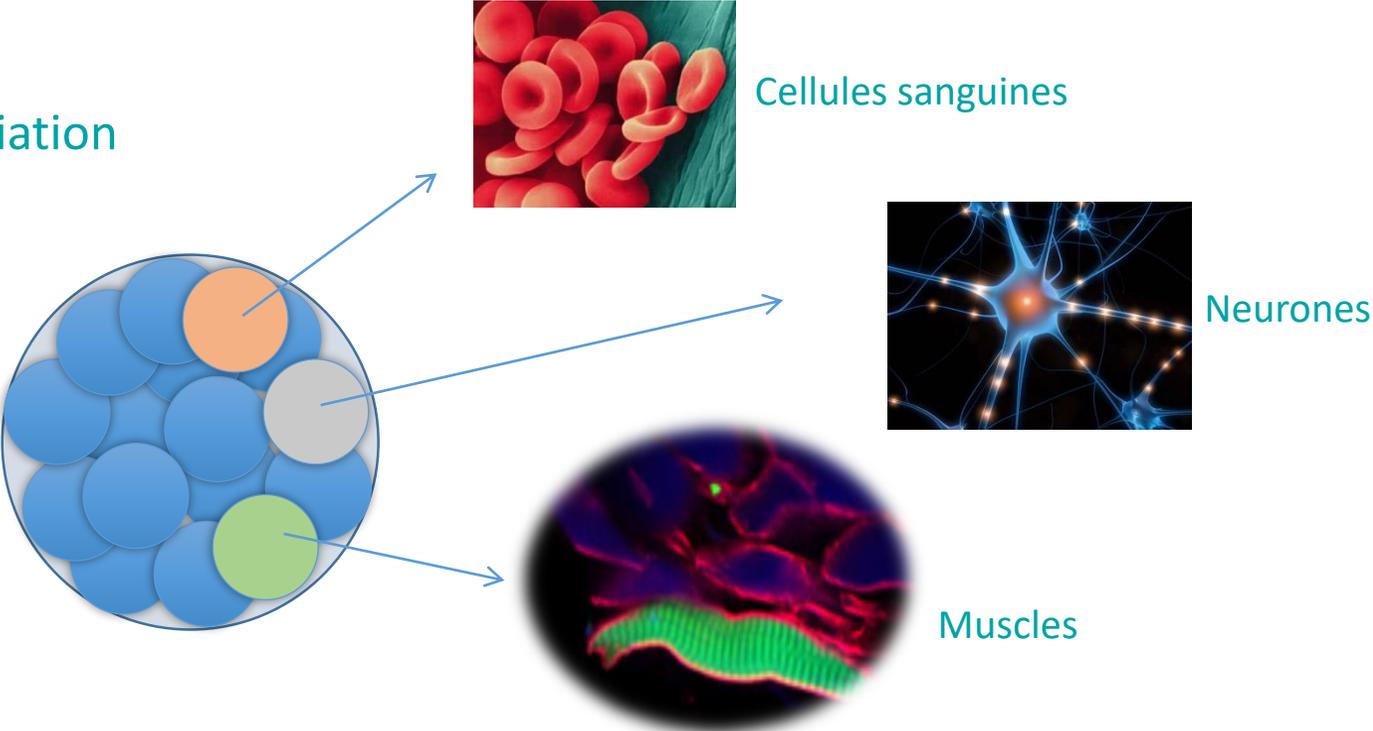
Comment un œuf / une cellule peut donner  
un organisme entier ?

# Le Développement Comporte 2 Evénements Clés

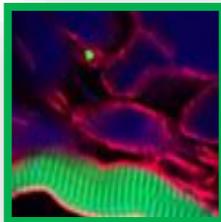
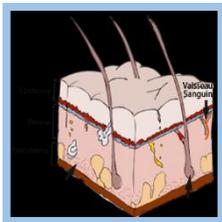
La croissance



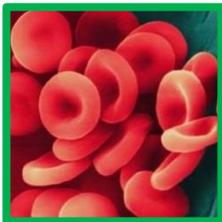
La différenciation



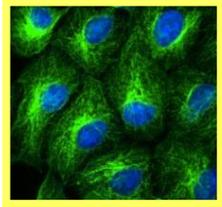
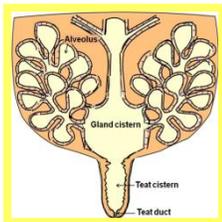
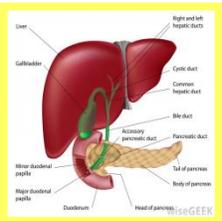
# La différenciation



Cellules nerveuses



Cellules sanguines

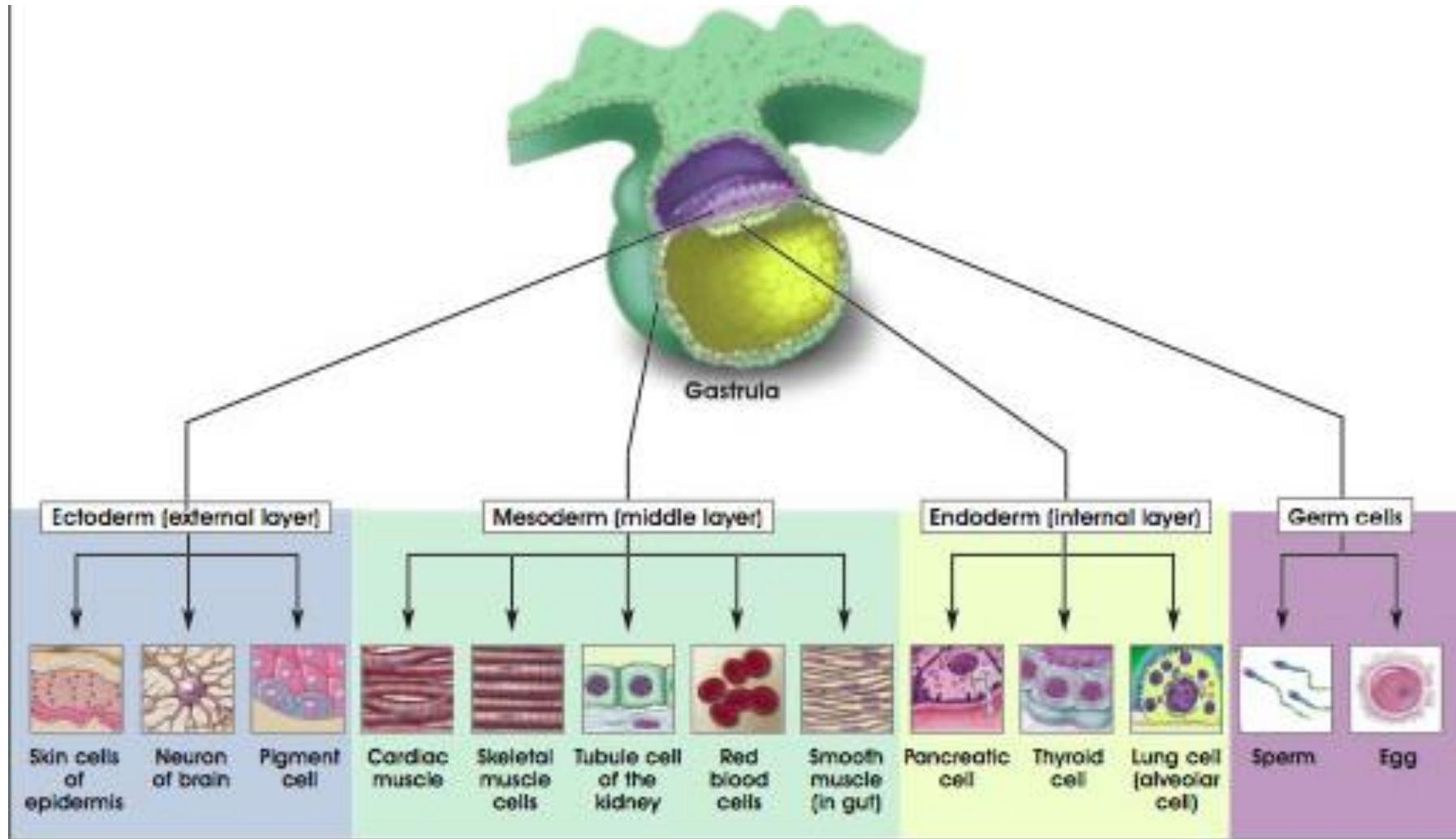


Cellules épithéliales mammaires

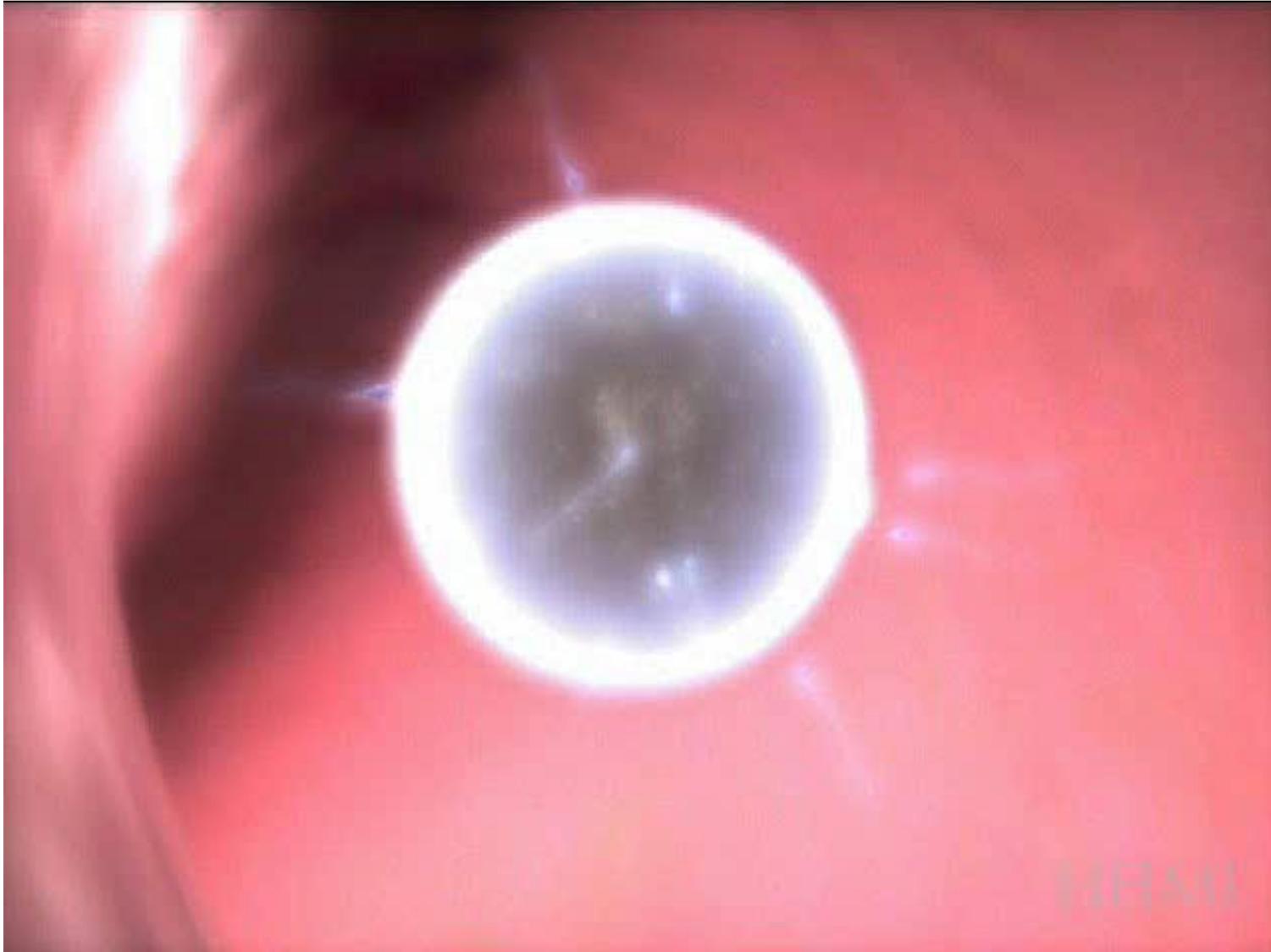
# Le Développement Embryonnaire humain



# Les feuilletts germinaux à la base des organes



# La différenciation et le devenir des cellules

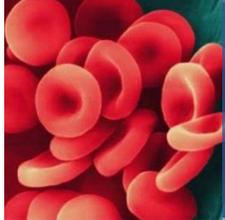


# Les cellules différenciées ne sont pas “statiques”

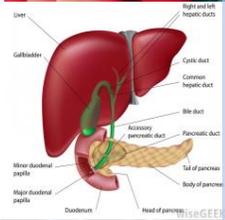
Les cellules sont en renouvellement constant !



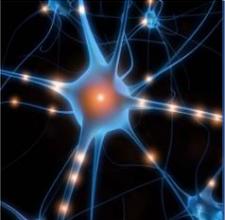
Les cellules intestinales: quelques jours



Les cellules sanguines: jusqu'à 10 semaines

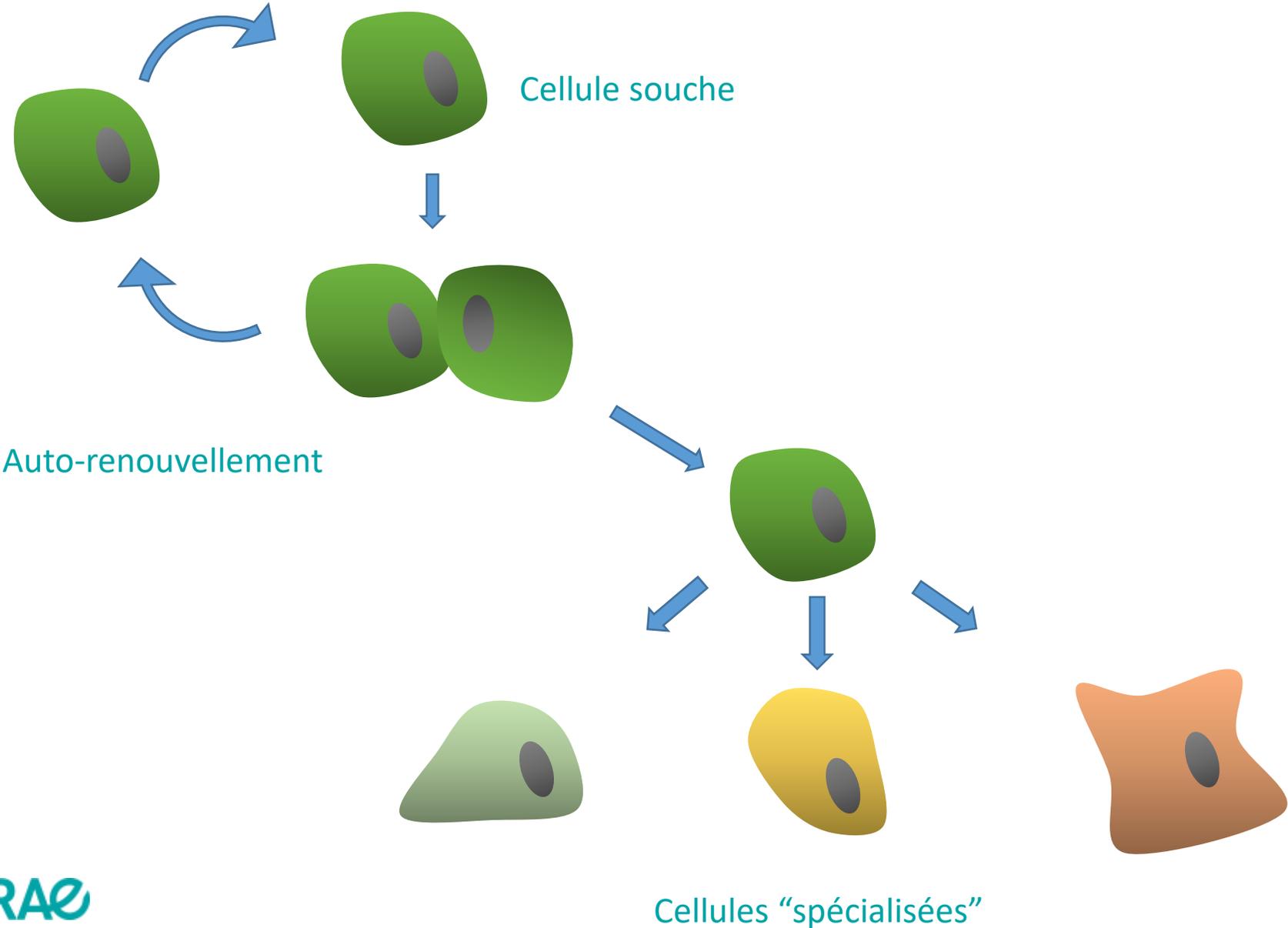


Les cellules pancréatiques: de qq mois à qq années



Les cellules nerveuses: quasi permanentes

# Les 2 propriétés essentielles des cellules souches



A microscopic image showing a cluster of several cells, likely stem cells, with a central cell that is larger and more prominent. The cells are surrounded by a light blue, textured background.

# Les différentes catégories de cellules souches et la notion de plasticité cellulaire

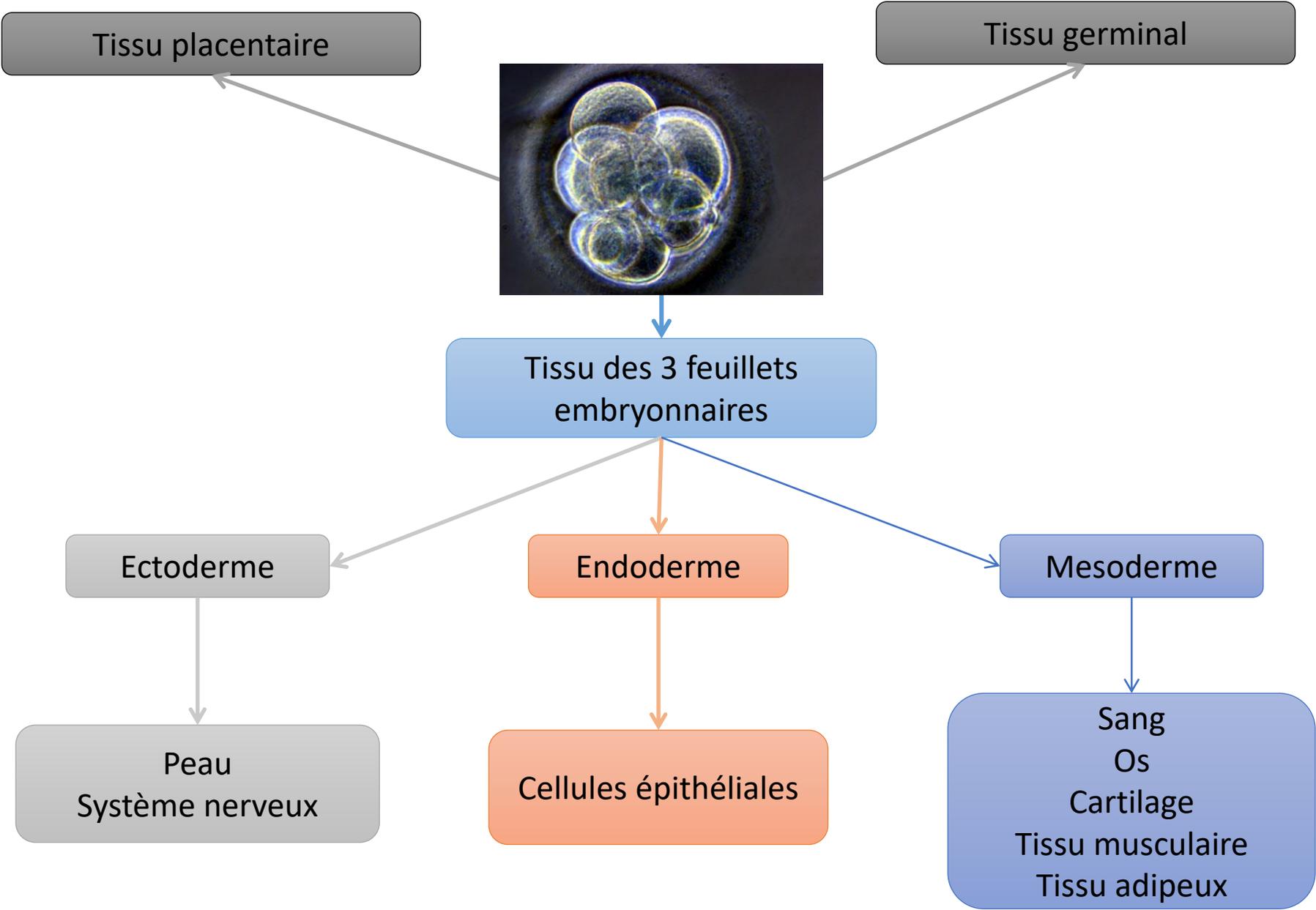
# Les cellules souches

Une cellule souche est une cellule indifférenciée capable:

- d'auto-renouvellement (multiplication à l'identique pour produire de nouvelles cellules souches)
- de se différencier en cellules matures (phénotypiques, morphologiques et fonctionnelles)

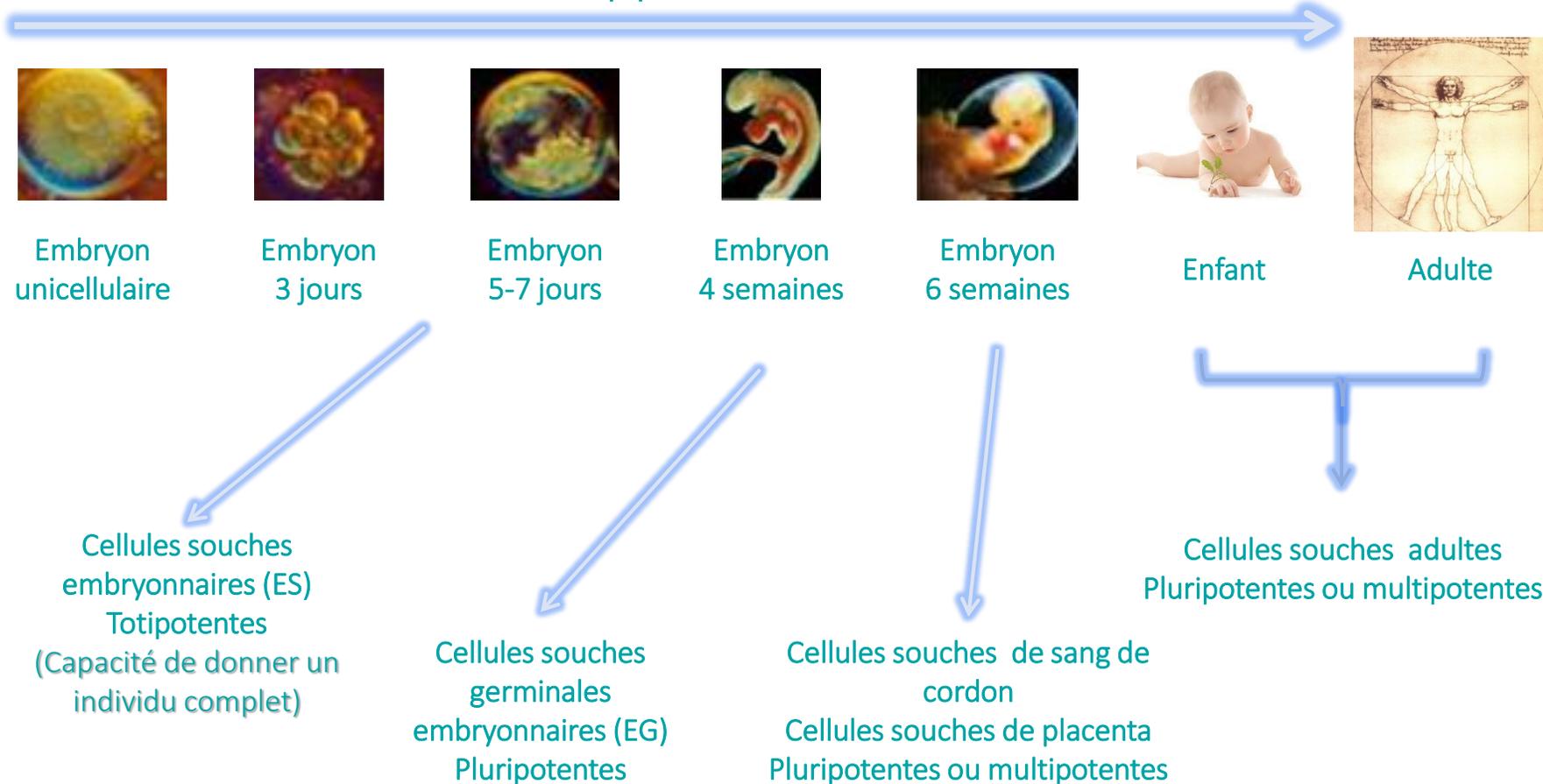


# Les cellules souches



# Les cellules souches

## Développement humain



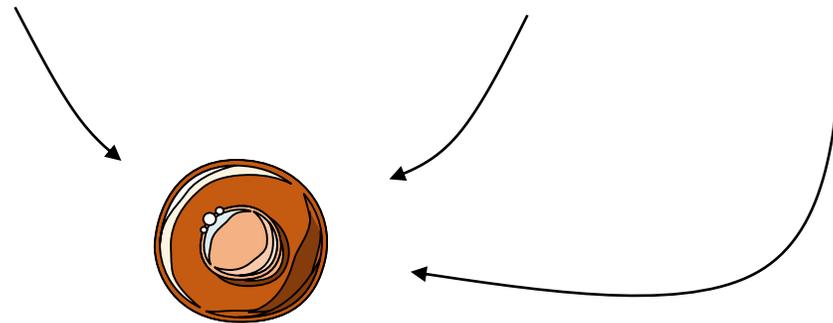
**Pluripotentes = Ne peuvent pas donner un individu complet**

**Multipotentes = Spécifiques d'un type de tissu**

# Les cellules souches

|                                  | Totipotentes   | Pluripotentes (ES)  | Multipotentes   | Progéniteurs (unipotentes)   | Précurseurs                            | Cellules matures   |
|----------------------------------|--|---|---|--|--|--|
| Site d'hébergement               | Issues des premières divisions de l'œuf fécondé jusqu'au J4  | Dans la masse interne de l'embryon au stade blastocyste (J5-J7 après la fécondation)  | Hébergées dans les tissus fœtaux, sang de cordon ou tissus adultes  | Hébergées dans les tissus fœtaux, sang de cordon ou tissus adultes             |  |  |
| Capacité de différenciation      | Pouvoir de donner naissance aux : <ul style="list-style-type: none"> <li>- 3 feuillets embryonnaires</li> <li>- Cellules germinales</li> <li>- Tissu placentaire</li> </ul> Capacité de donner un individu complet | Pouvoir de donner naissance aux : <ul style="list-style-type: none"> <li>- 3 feuillets embryonnaires</li> <li>- Cellules germinales</li> </ul> Ne peut pas donner un individu complet | Pouvoir de générer : <ul style="list-style-type: none"> <li>- Plusieurs types de cellules dans un tissu donné</li> </ul> Spécifiques d'un type de tissu | Pouvoir de générer un type de cellule<br><br>Spécifiques d'un type de cellules | Pouvoir de générer un type de cellules | Aucune   |
| Capacité de d'autorenouvellement |  |   |   |  |  |  |
| Capacité de prolifération        |  |   |   |  |  |  |
| Exemples                         |  |   | CS hématopoiétiques<br>CS neurales<br>Cellules Ovale  | Erythroblastes<br>Myéloblastes   |  | Monocytes,<br>Neutro<br>Cellules nerveuses<br>Cellules musculaires |

# Les origines des cellules souches



# Les cellules souches multipotentes adultes

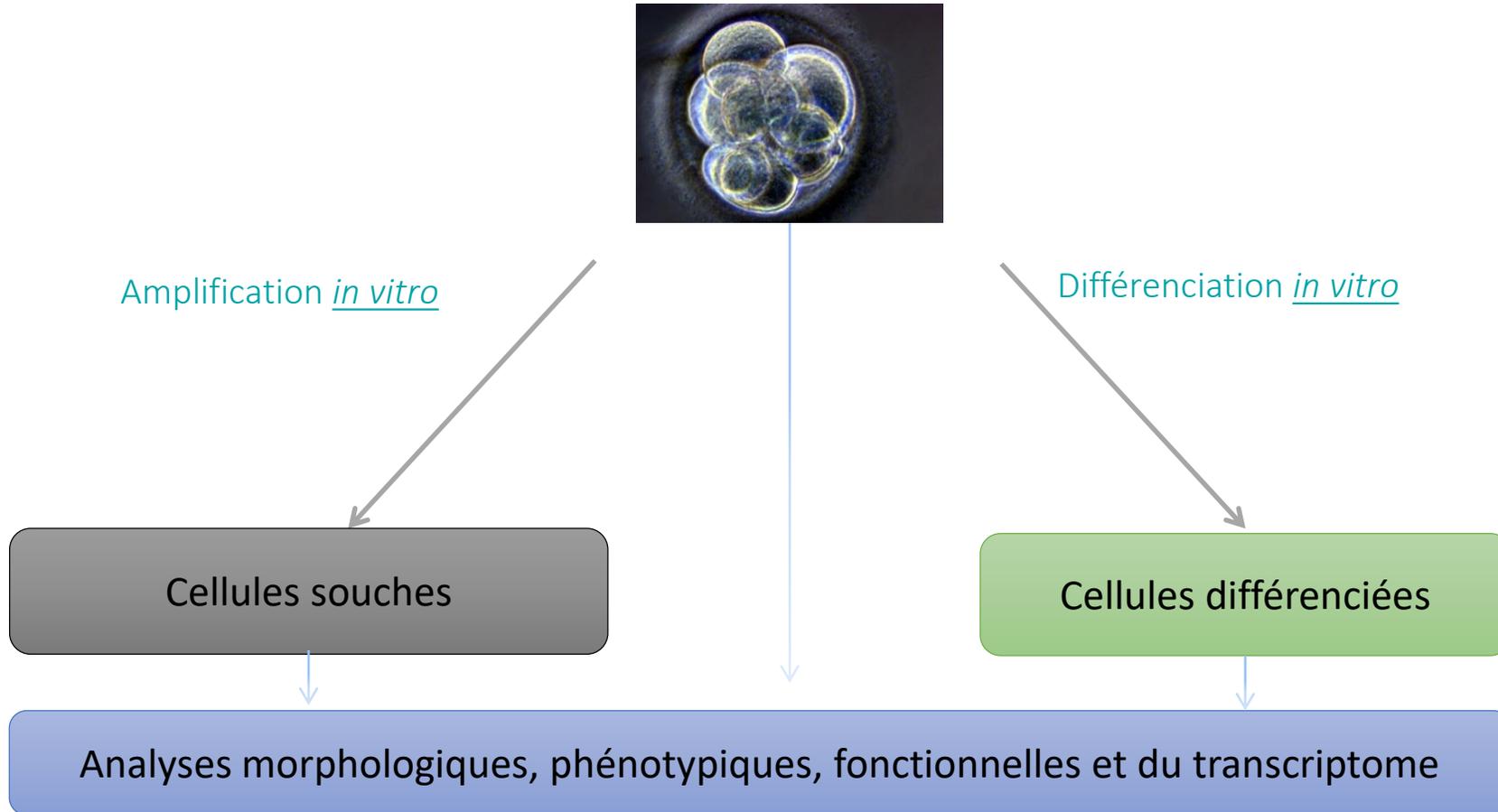
- Hébergent dans les tissus adultes et les tissus fœtaux
- Conservent des capacités d'auto-renouvellement
- Peuvent donner naissance à plusieurs types de cellules mature
- Sont déjà engagées dans un programme tissulaire spécifique



Assurer l'homéostasie des organes/tissus grâce à leurs propriétés d'auto-renouvellement et de différenciation

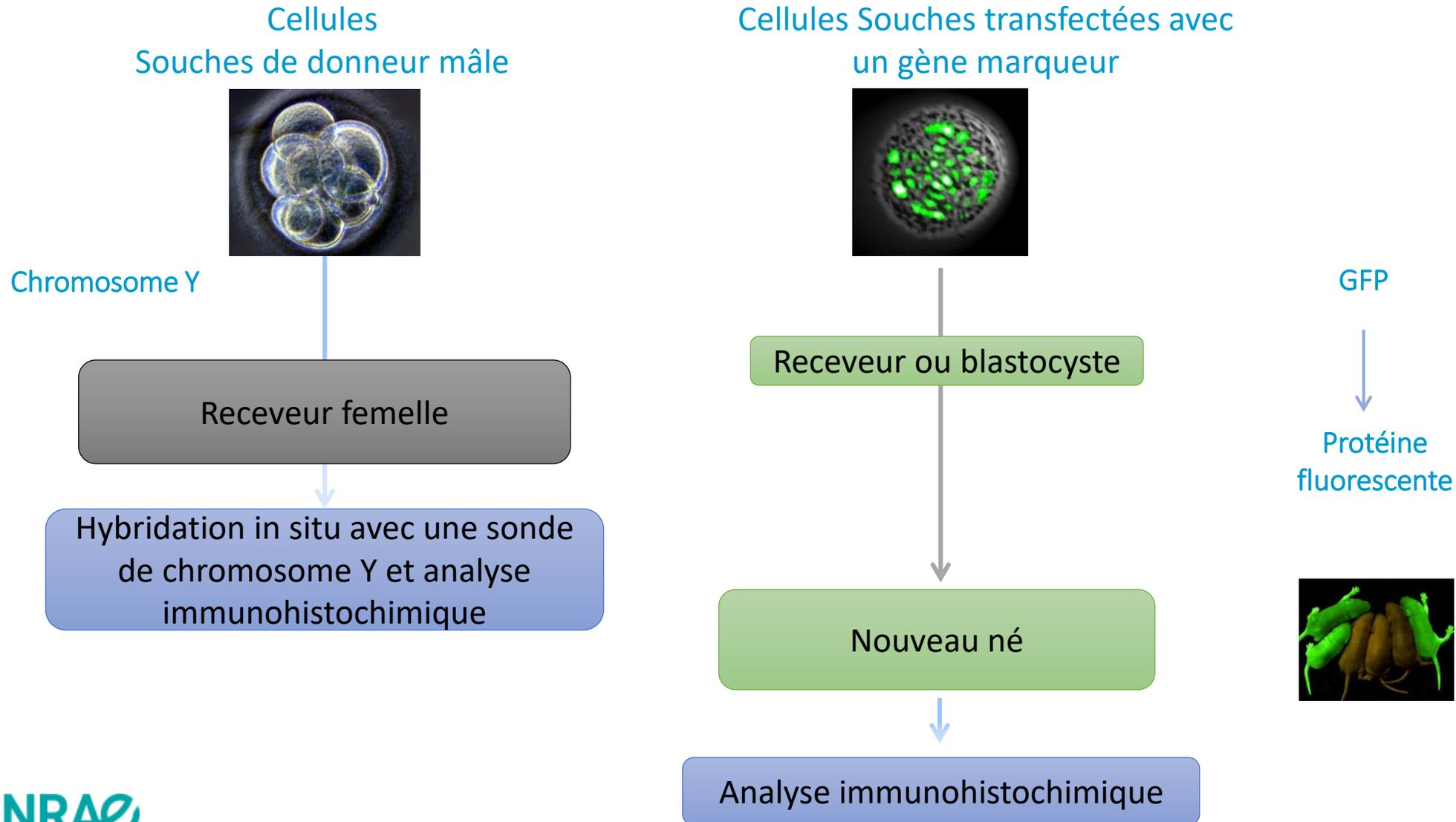
# Quelques méthodes pour étudier les cellules souches:

La méthode *in vitro*



# Quelques méthodes pour étudier les cellules souches:

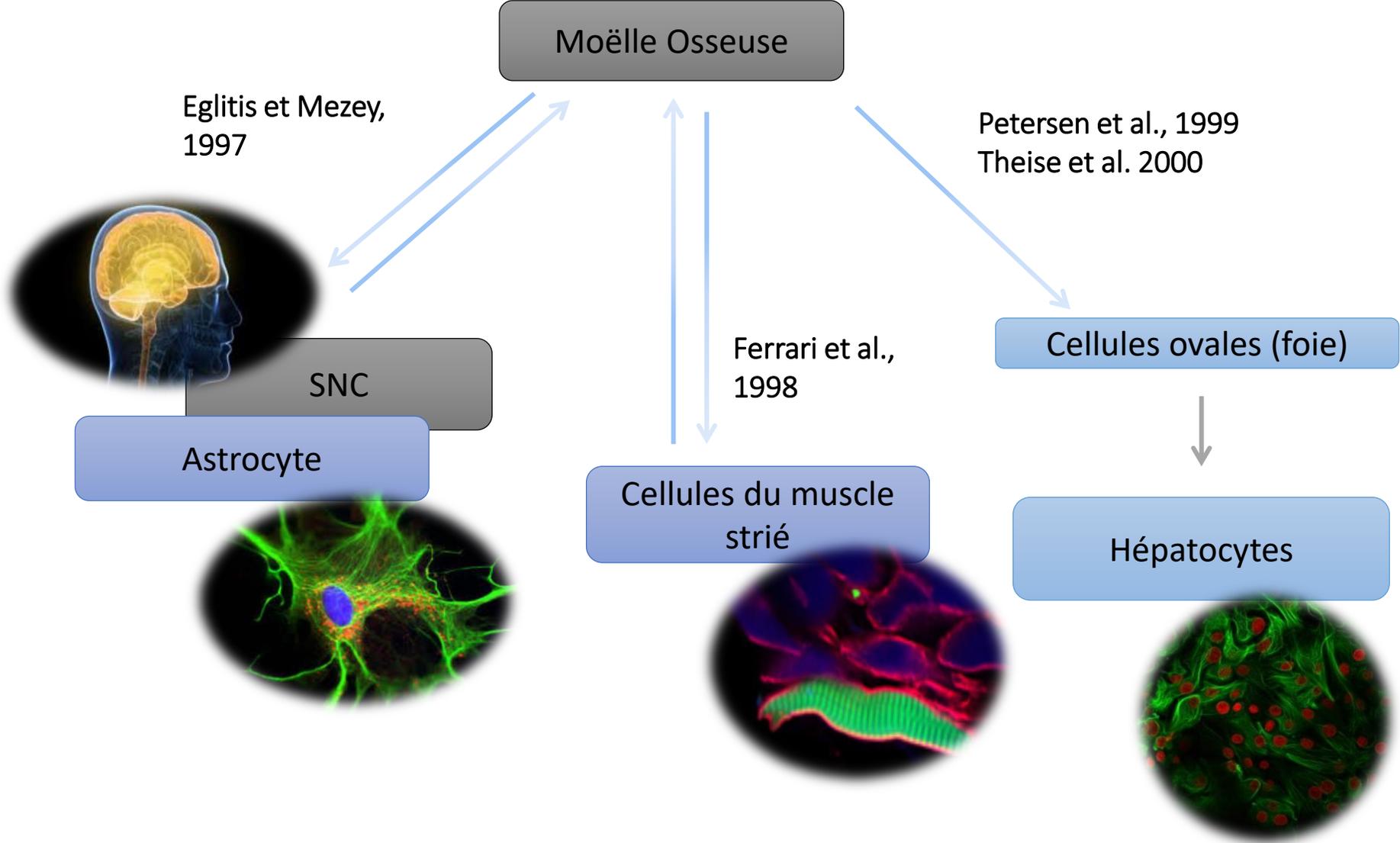
La méthode *in vivo*



# La plasticité des cellules souches



# La plasticité des cellules souches



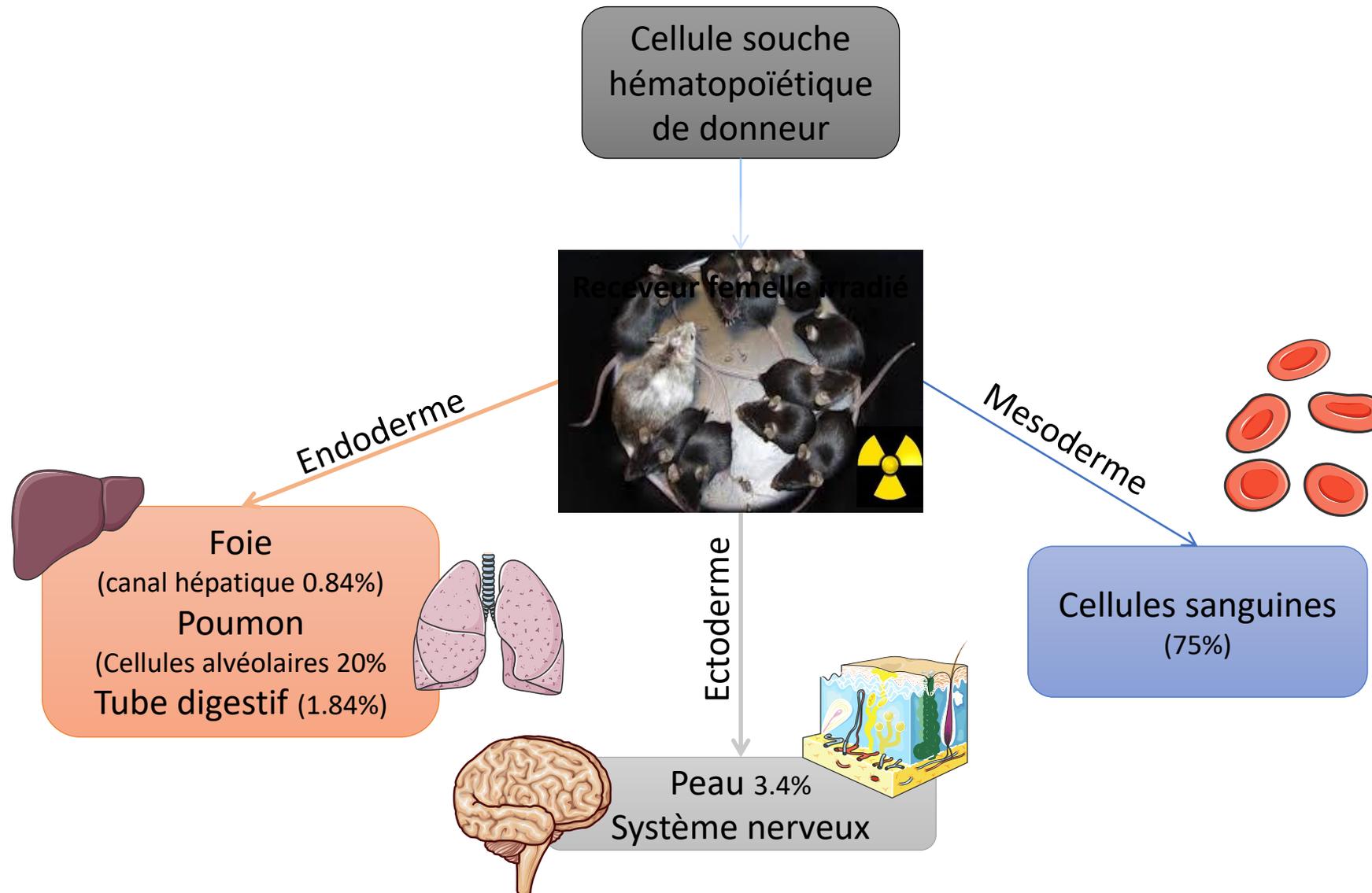
# Plasticité des cellules souches : définition

Catherine M. Verfaillie, Hematology, 2002, 384

« Une cellule souche adulte engagée dans un programme tissulaire spécifique donne naissance aux cellules matures d'un autre tissu que le tissu initial dans certaines conditions micro-environnementales »

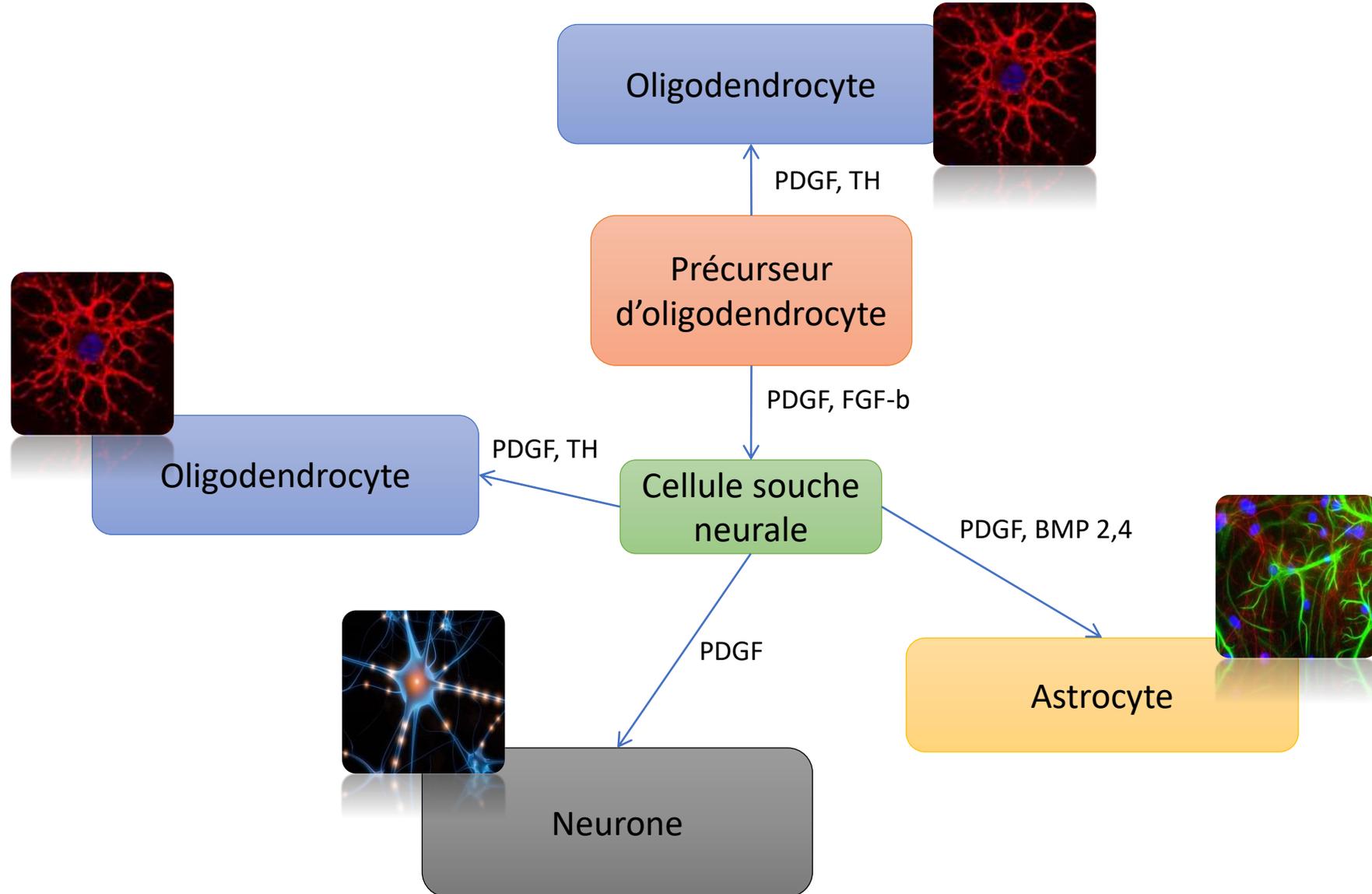
# La transdifférenciation

Krause, 2001, Cell, 105:363-377

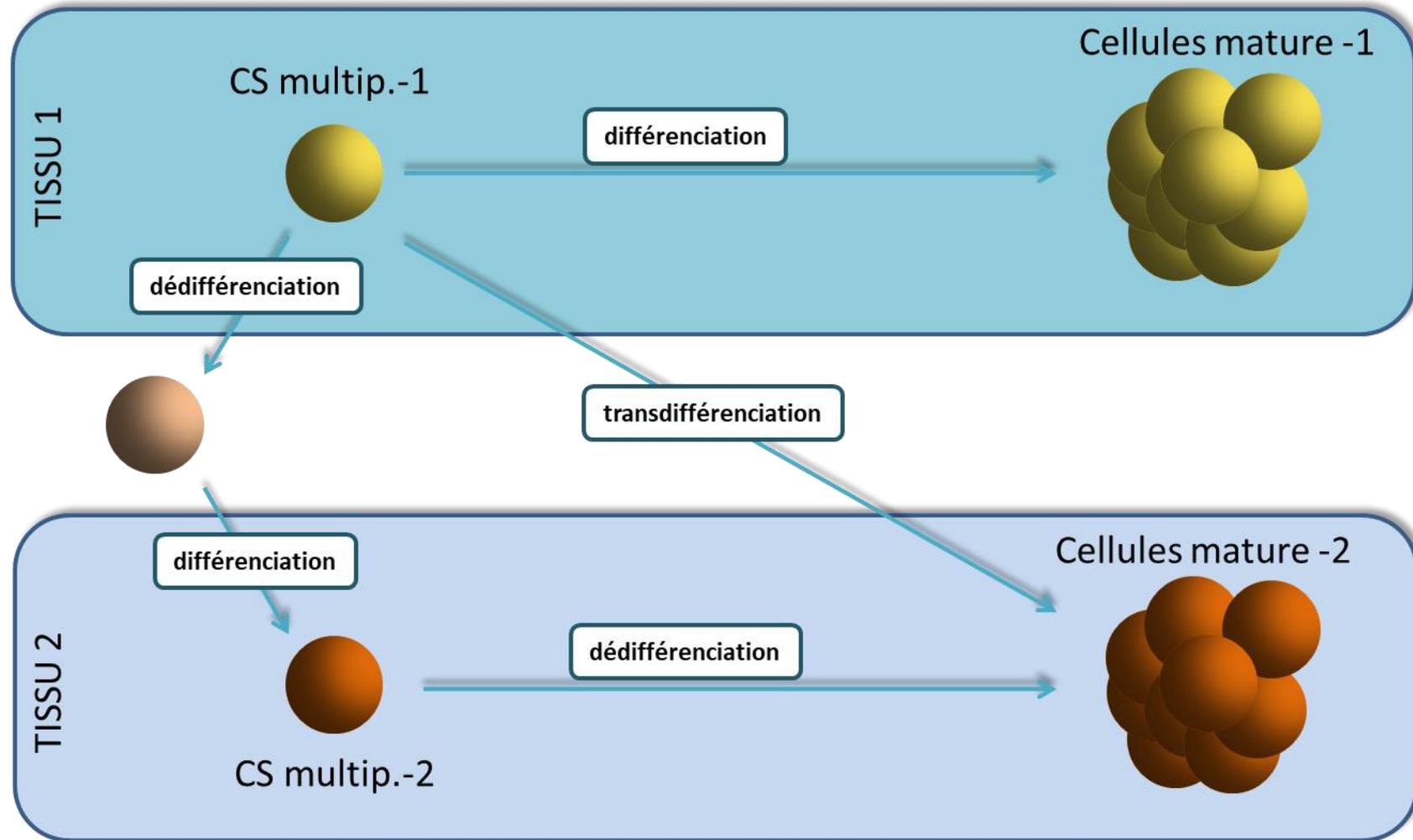


# La dédifférenciation

Kondo et Raff, 2000, Science, 289:1754



# La plasticité

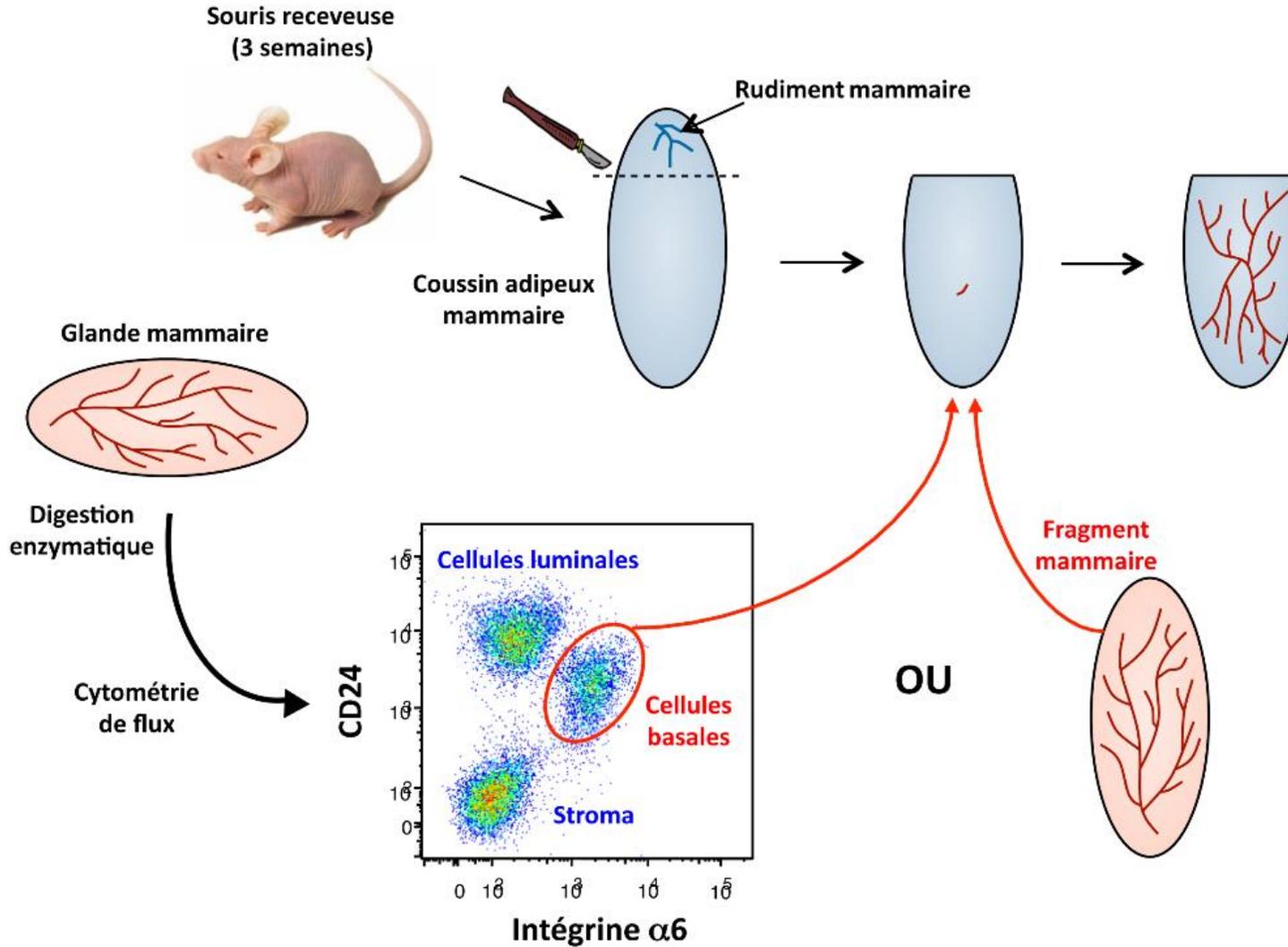




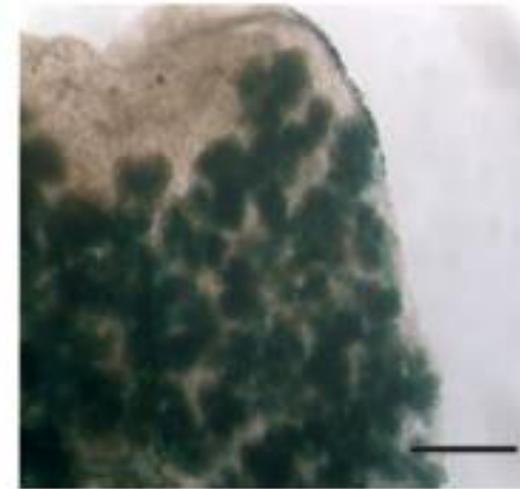
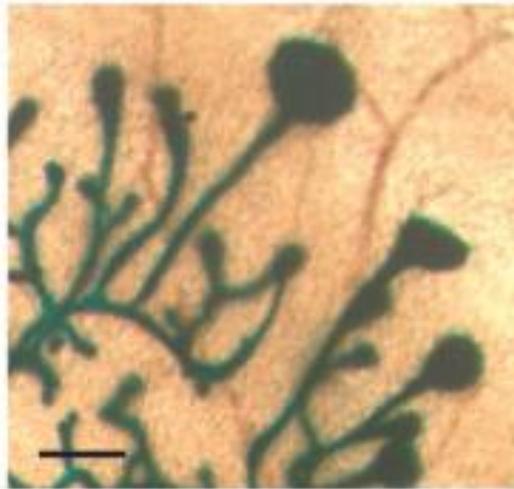
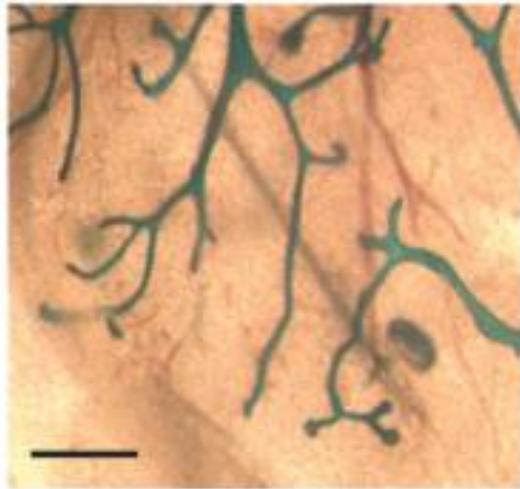
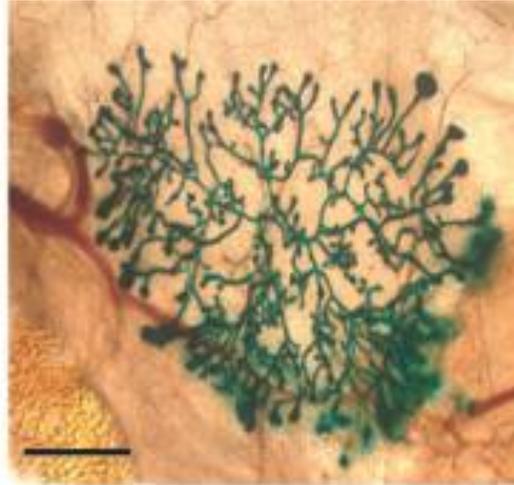
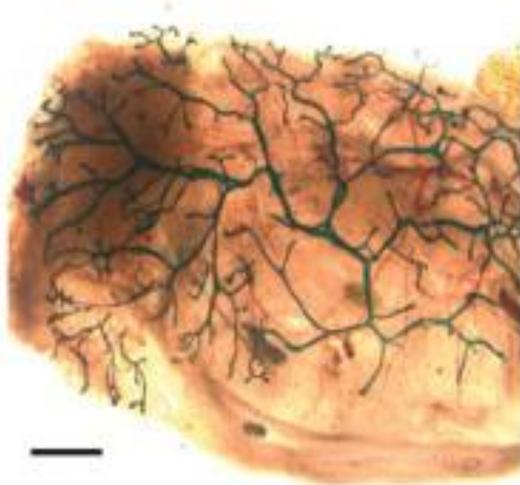
# Etude de la plasticité mammaire pour l'identification de biomarqueurs d'une meilleure persistance de la lactation chez la vache laitière



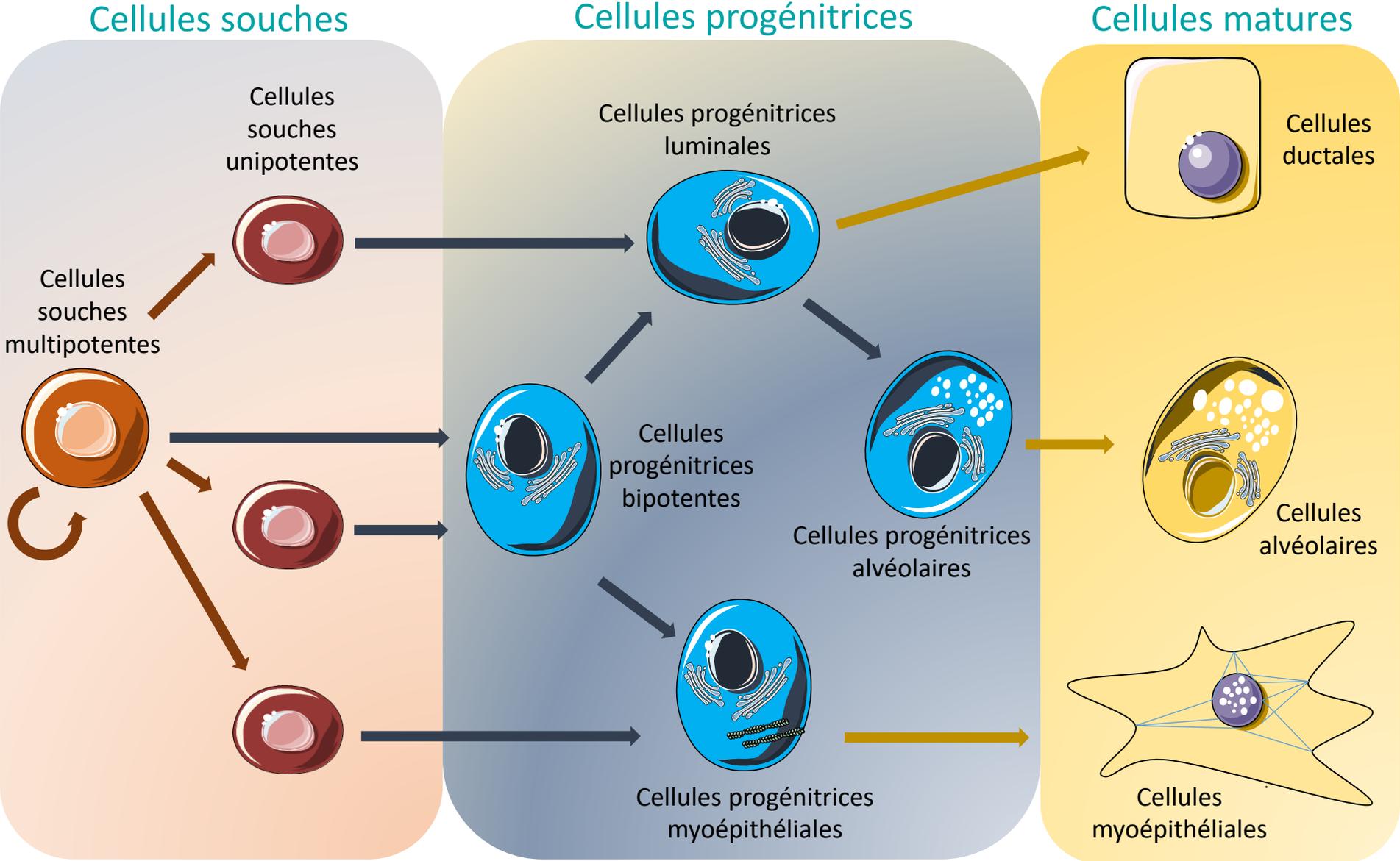
# Les cellules souches mammaires

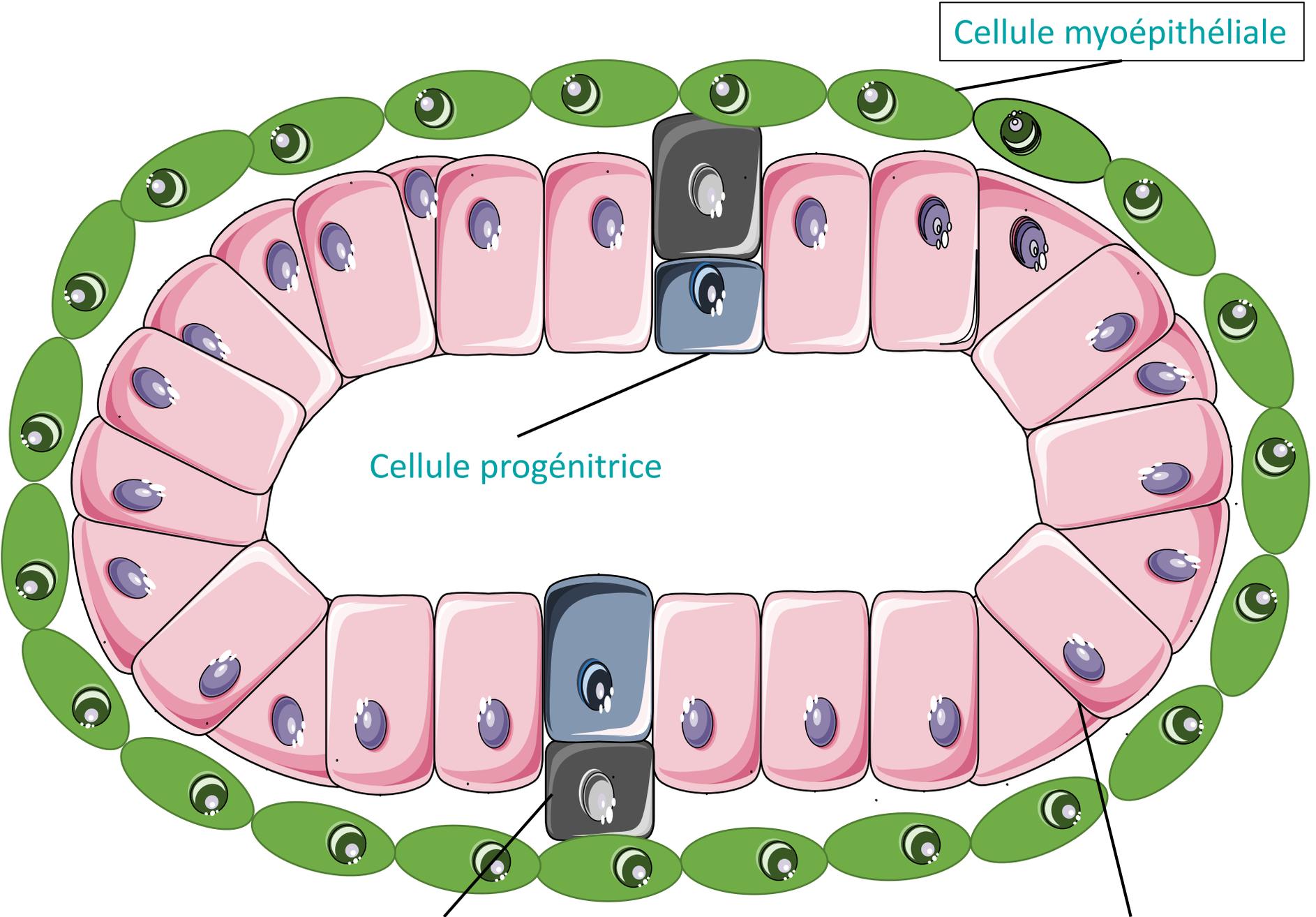


# Les cellules souches mammaires



# Différenciation progressive





Cellule myoépithéliale

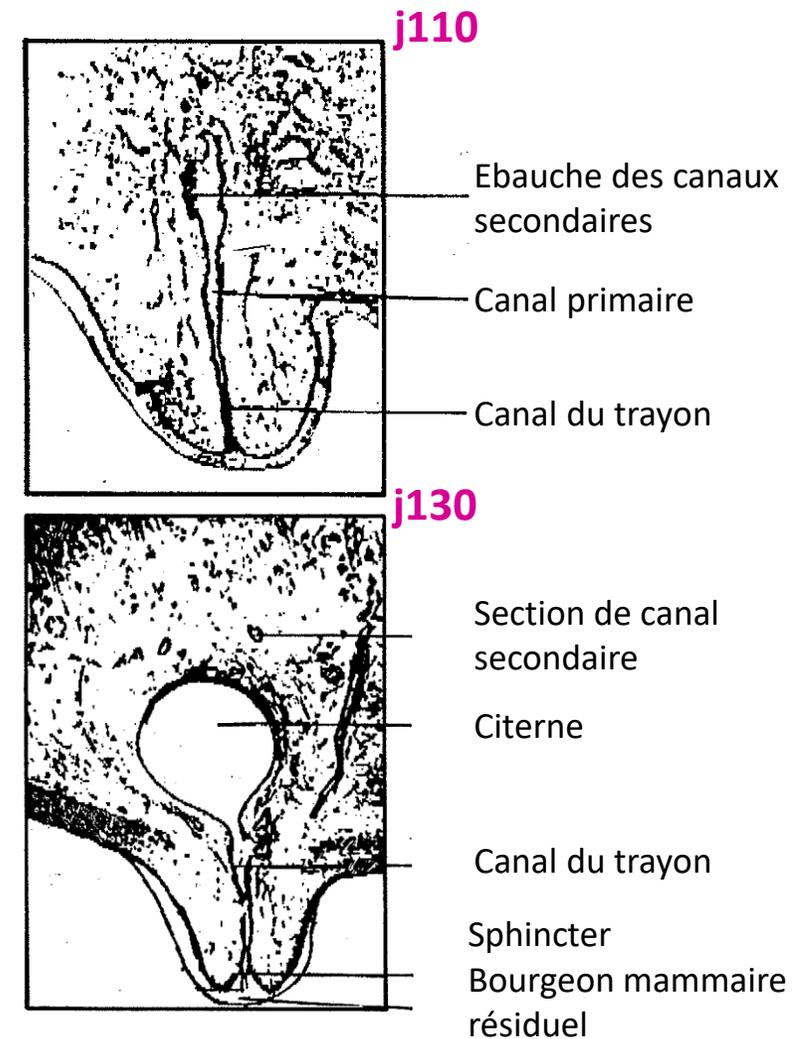
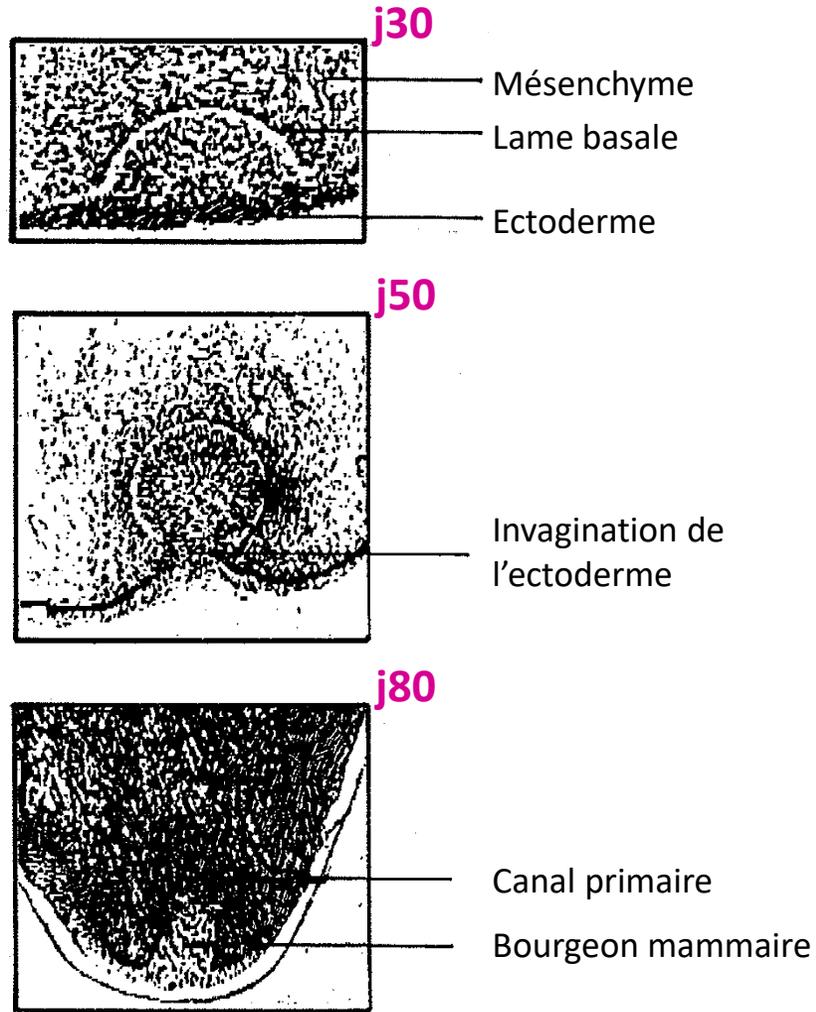
Cellule progénitrice

Cellule souche

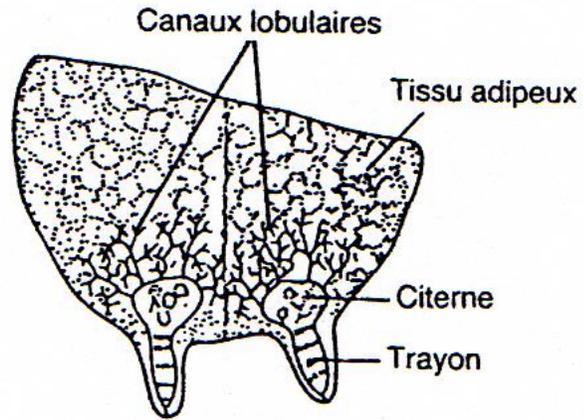
Cellule luminale

# La différenciation et le devenir des cellules:

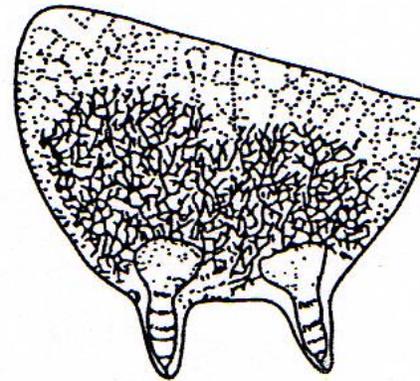
## Exemple de la glande mammaire



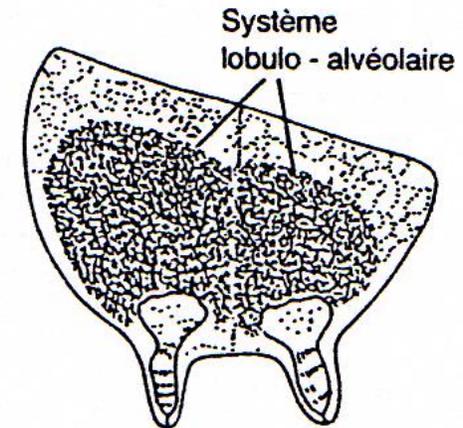
# Mise en place des canaux et du système lobulo-alvéolaire:



Juste avant la puberté

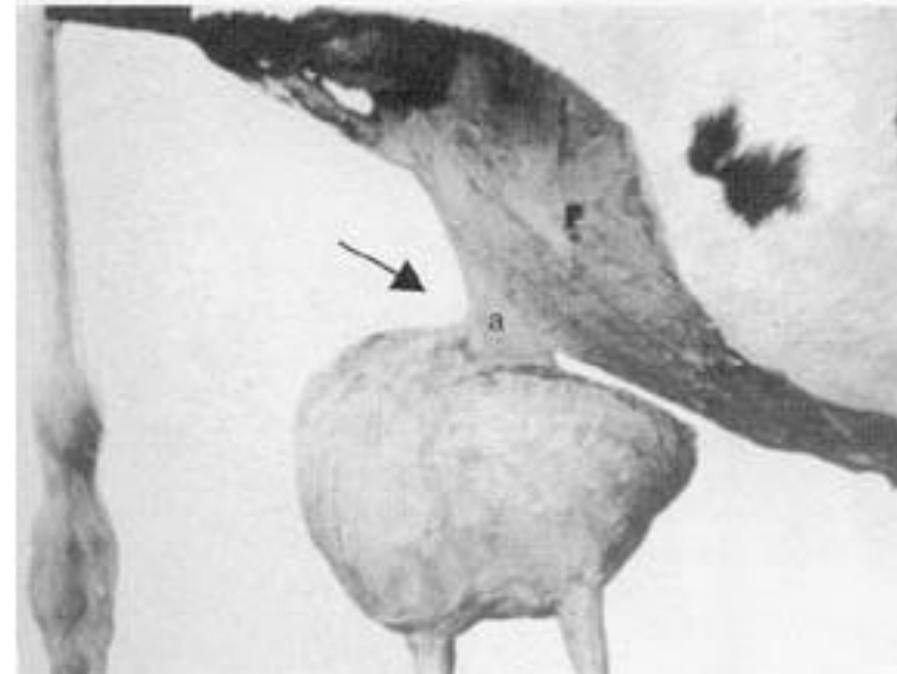
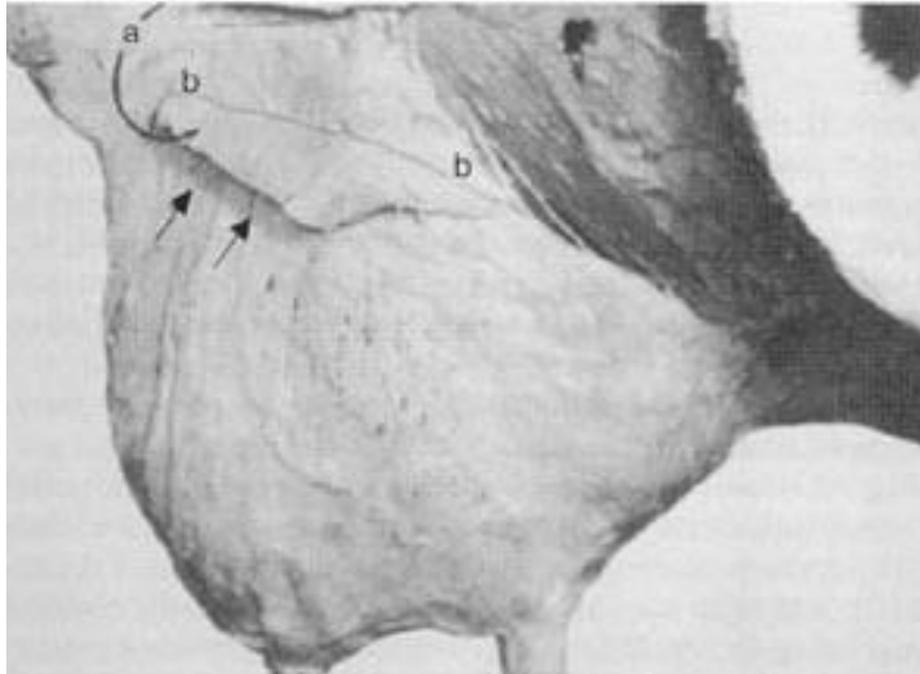


Après la puberté

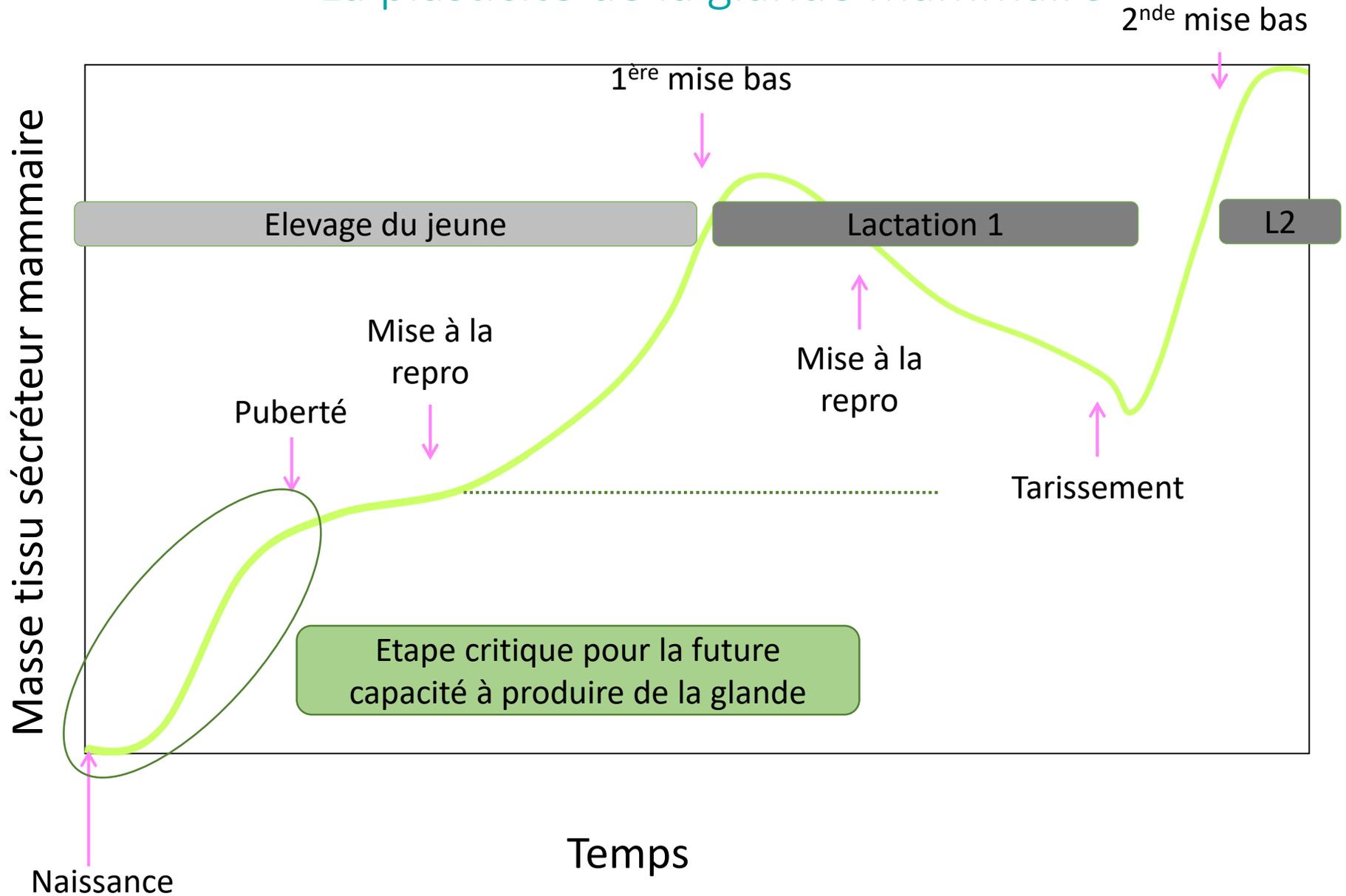


Au cours de la gestation

# La différenciation et le devenir des cellules: Exemple de la glande mammaire



# La plasticité de la glande mammaire

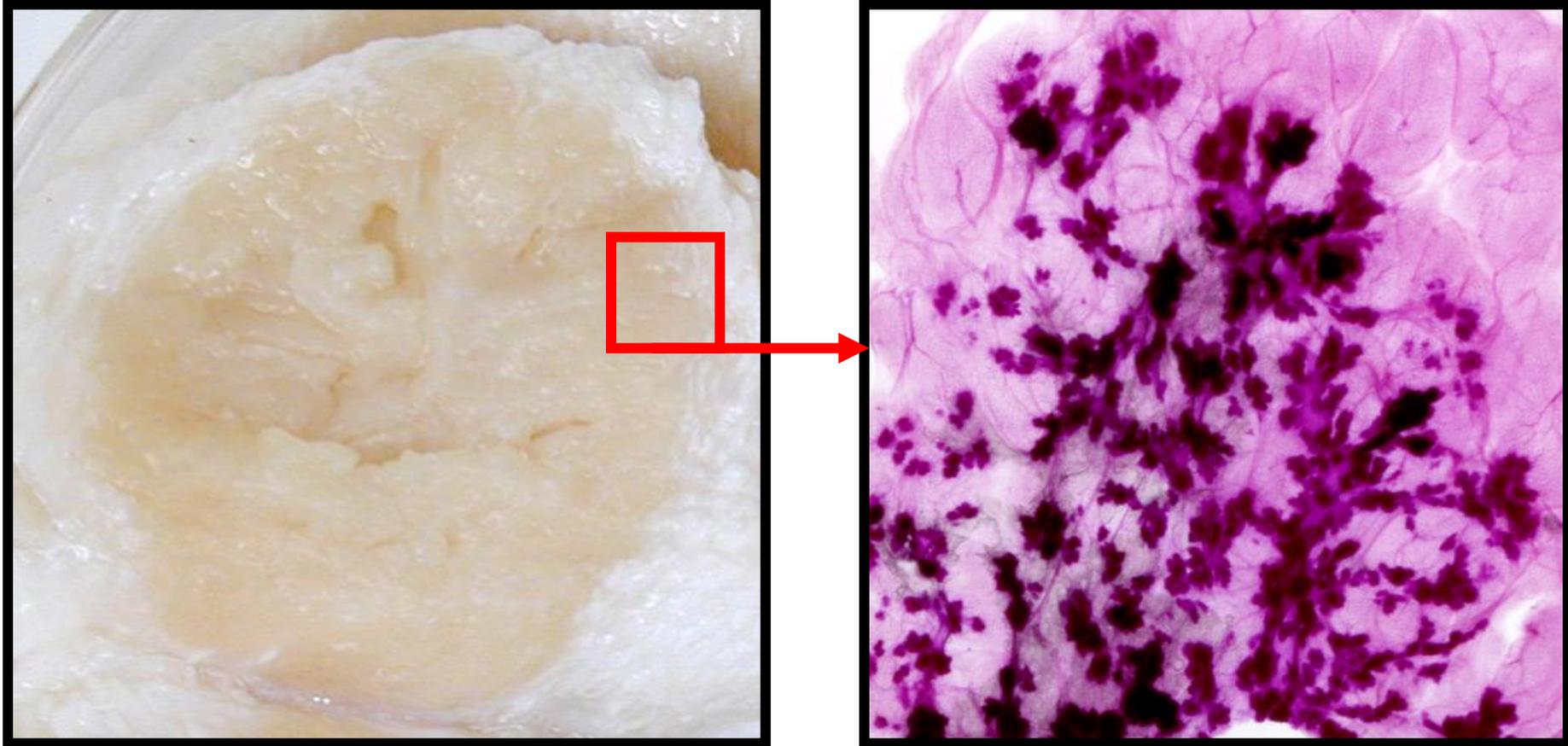


# « Terminal Duct Units » chez les ruminants

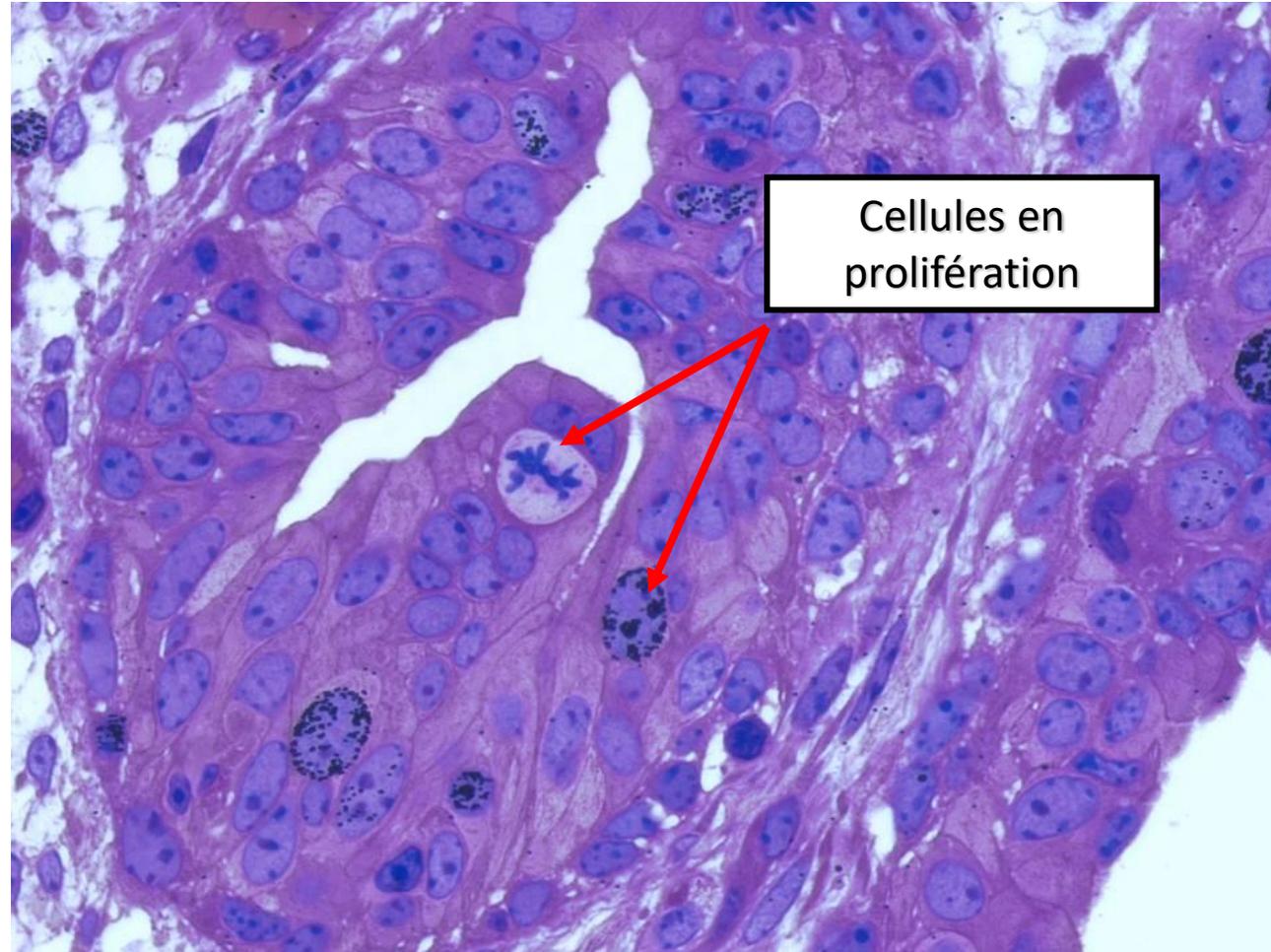
- ✎ Très ramifiées
- ✎ Absence de lumière centrale
- ✎ Entourées de tissu stromal dense
- ✎ Très rarement en contact avec les adipocytes



## Le parenchyme mammaire bovin:



# Dynamique cellulaire au sein de la glande mammaire



Taux moyen de prolifération / jour: 0.3%

Taux moyen d'apoptose / jour: 0.56%



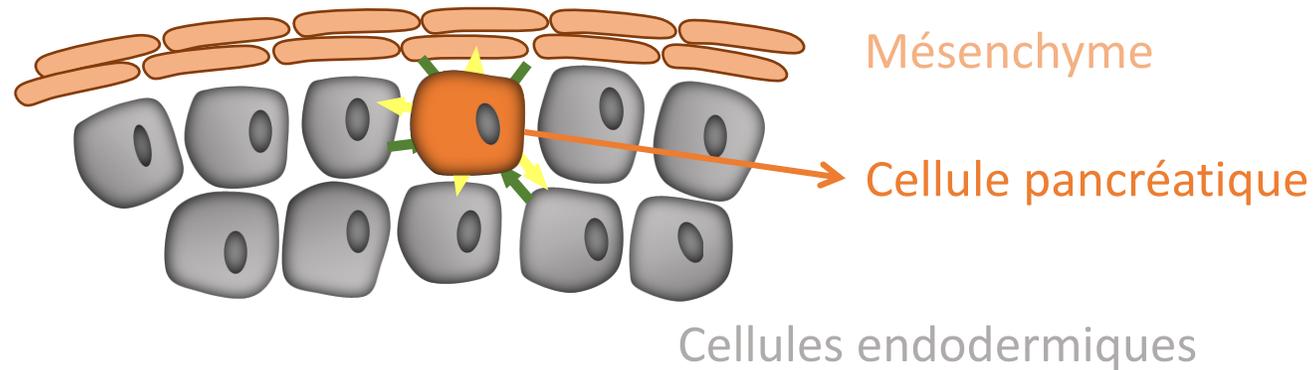
Taux de renouvellement cellulaire au cours d'une lactation: 50%

# Qu'est ce qui détermine le devenir des cellules ?

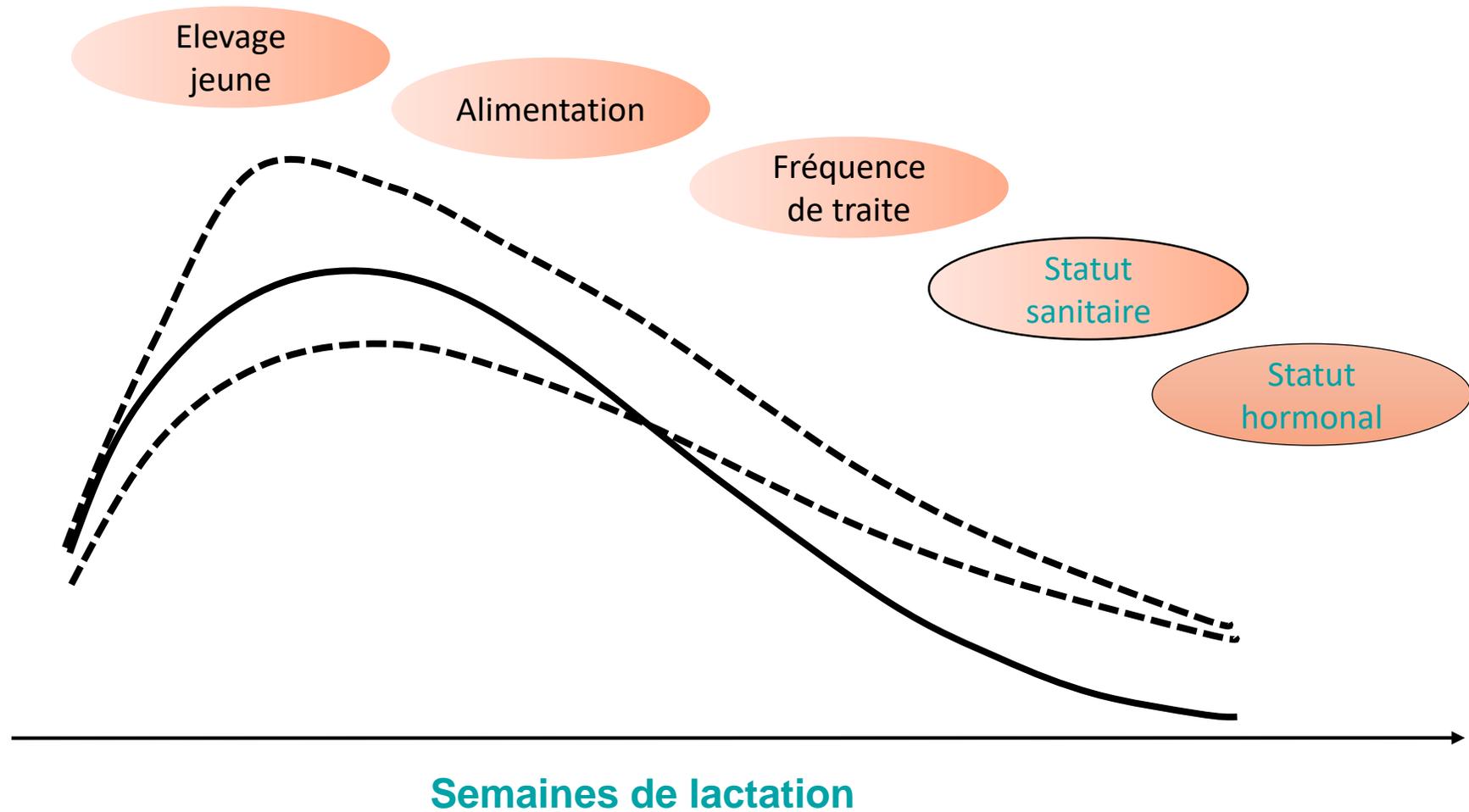
Facteurs cytoplasmiques



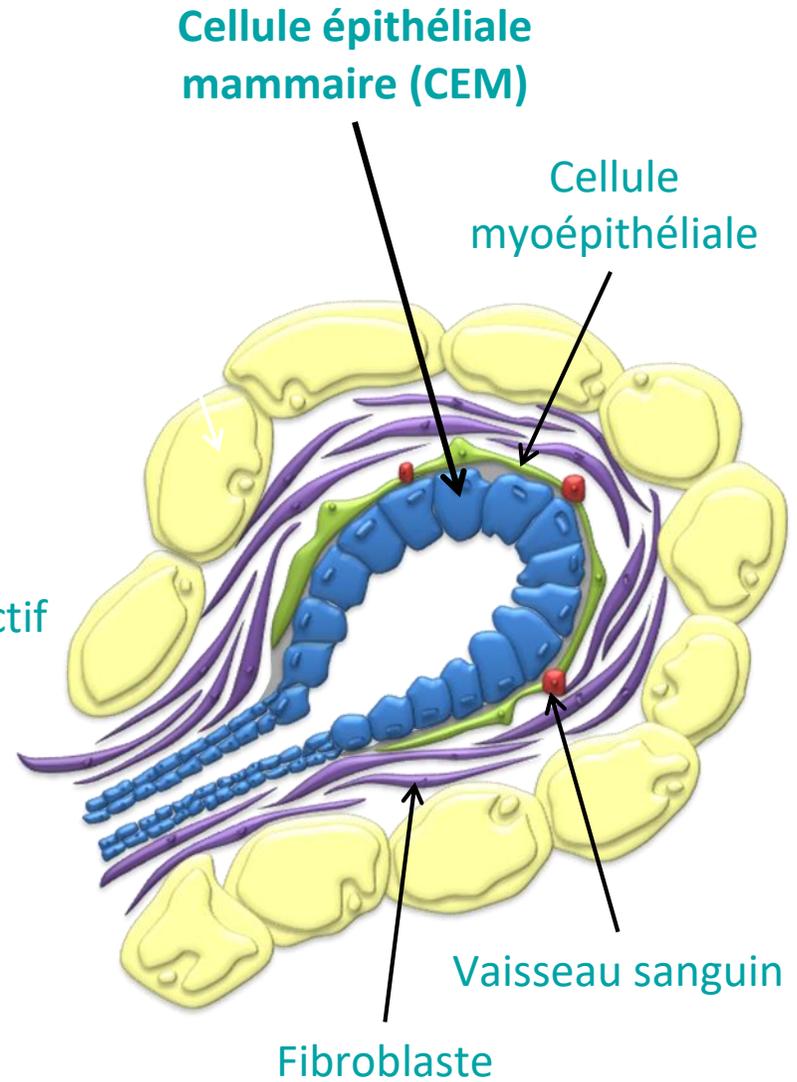
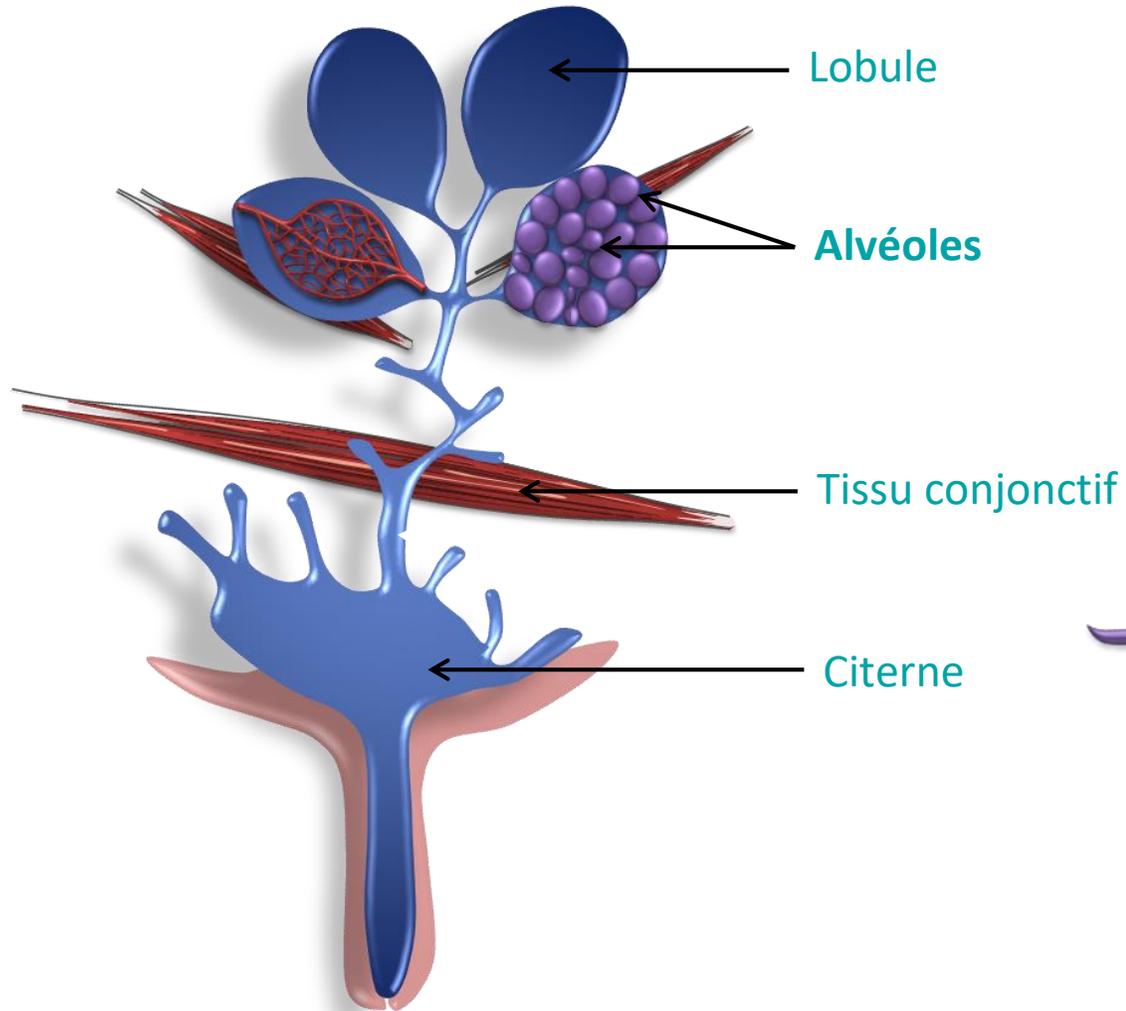
Interactions cellules-cellules



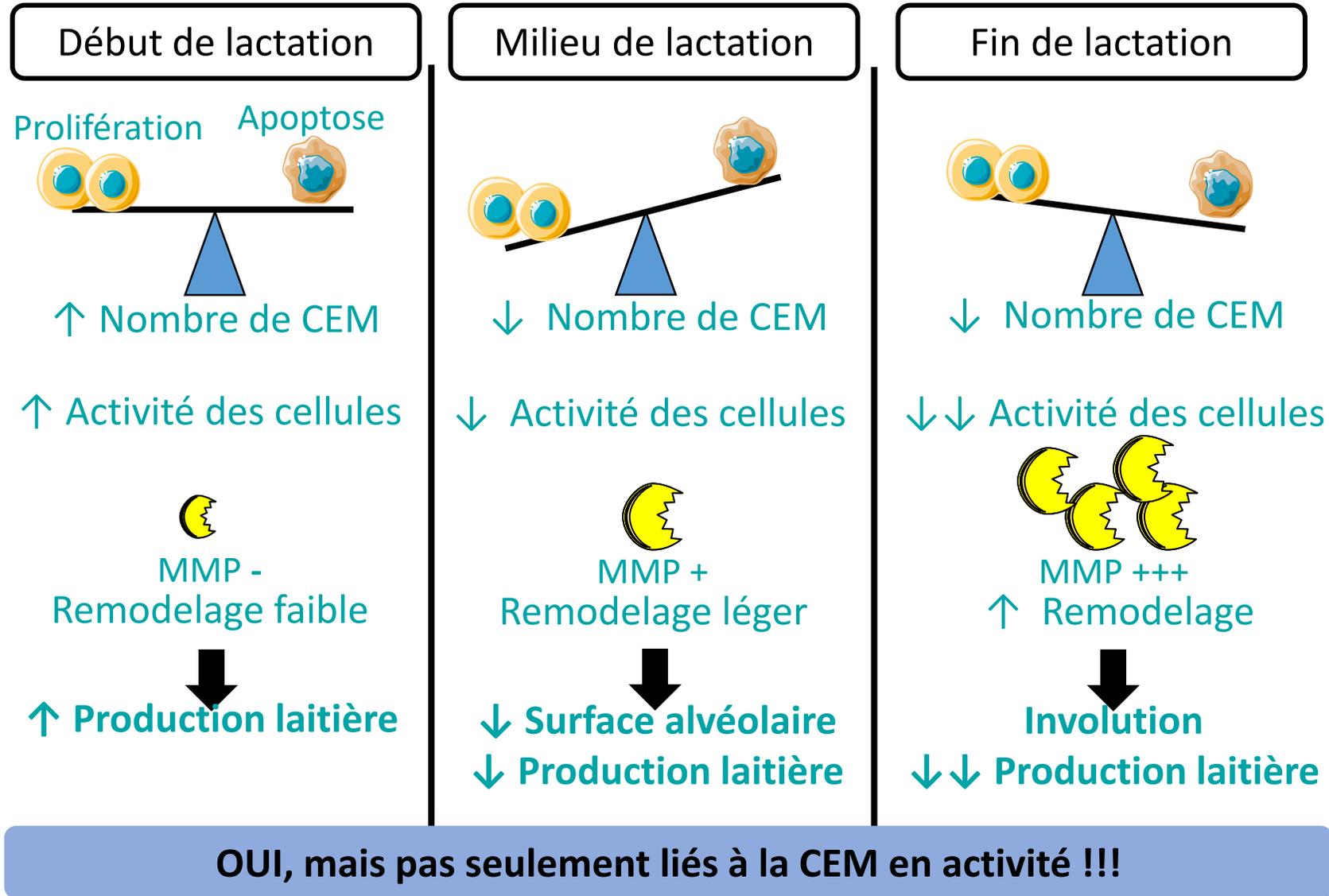
# La courbe de lactation est le reflet du potentiel de production



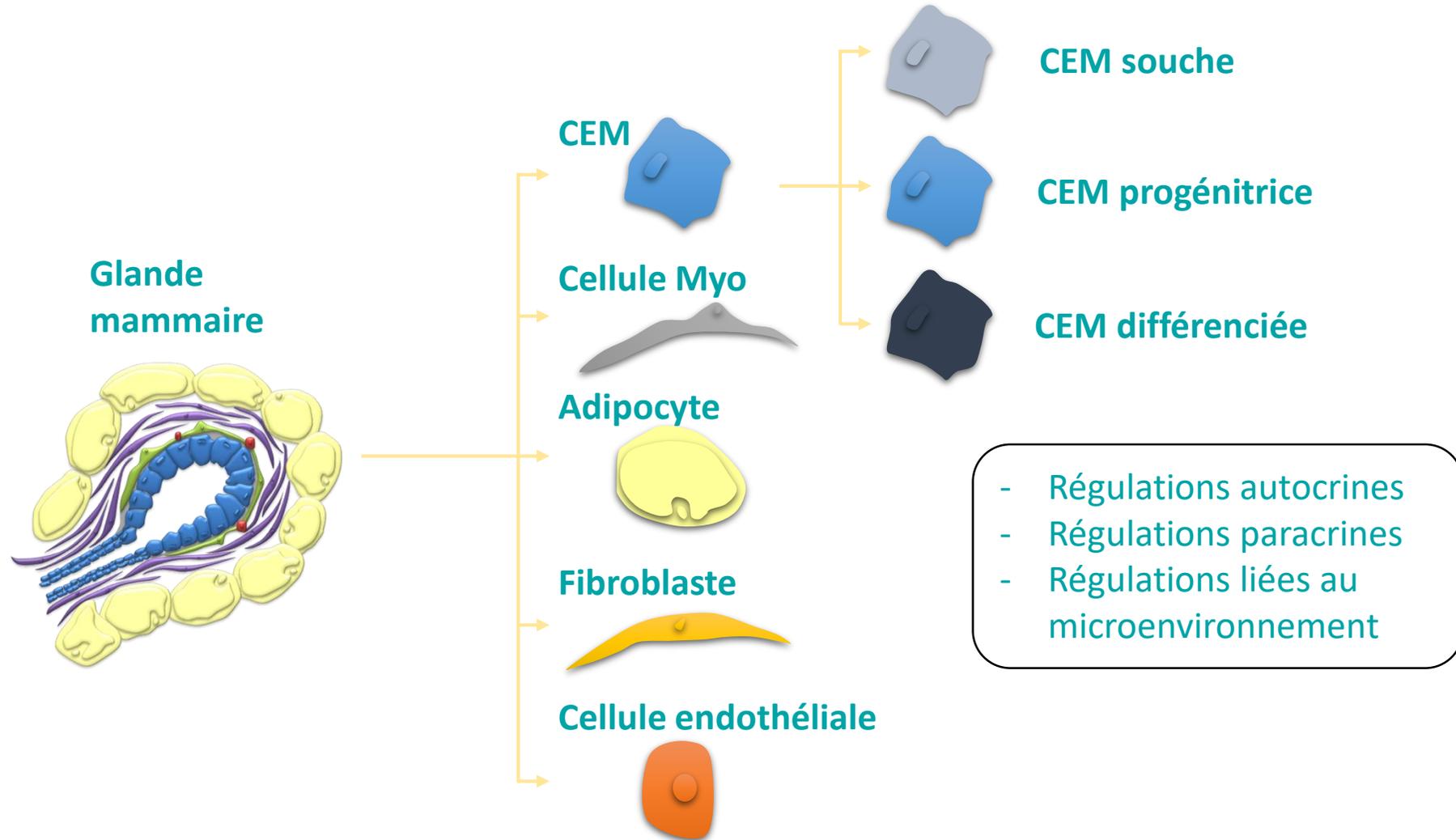
# Anatomie de la glande mammaire adulte



# Paramètres déterminant la quantité de lait



# « Composition » cellulaire de la glande mammaire



**Importance de la plasticité cellulaire au sein de la glande dans le contrôle de la persistance de la lactation**

# Objectifs du projet

1- Caractérisation de marqueurs de surface spécifiques des différents types cellulaires présents au sein de la glande mammaire chez la vache laitière.

2- Phénotyper ces différents types cellulaires chez la vache laitière au cours d'un cycle de lactation afin d'étudier la répartition de ces cellules mammaires en lien avec un stade physiologique et un statut hormonal précis.

# Caractérisation de bio-marqueurs spécifiques

**Cellules épithéliales:**

CD49f + EpCAM+ CD24+ CD133-

**Cellules myoépithéliales:**

CD49f + CD90+ CD24-

**Cellules souches:**

CD49f +++ EpCAM- CD24-

**Cellules progénitrices:**

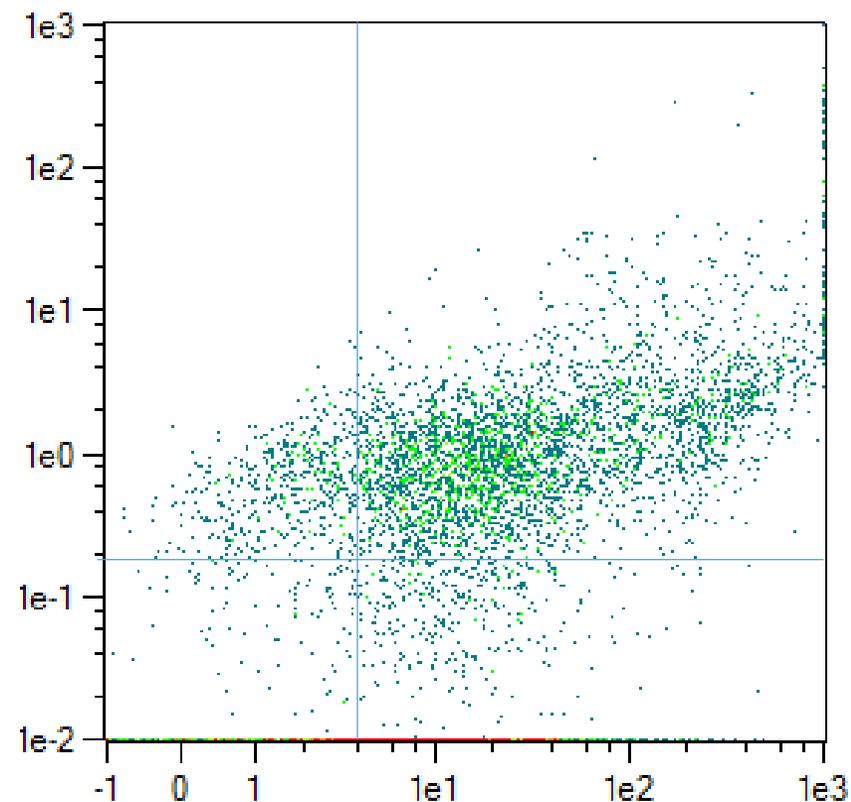
CD49f + EpCAM+ CD24+ CD133+

**Fibroblastes:**

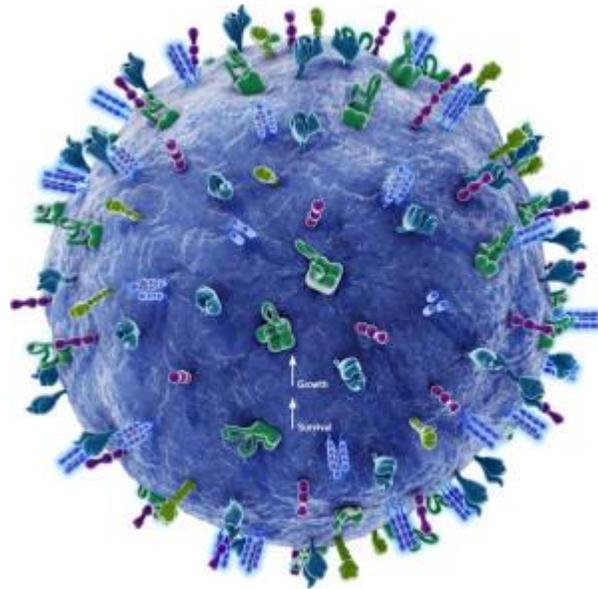
FGFR

**Cellules sanguines:**

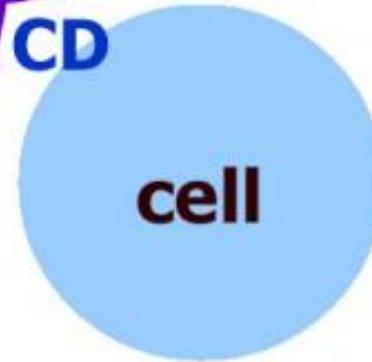
CD45



# Caractérisation de bio-marqueurs spécifiques



**antibody**



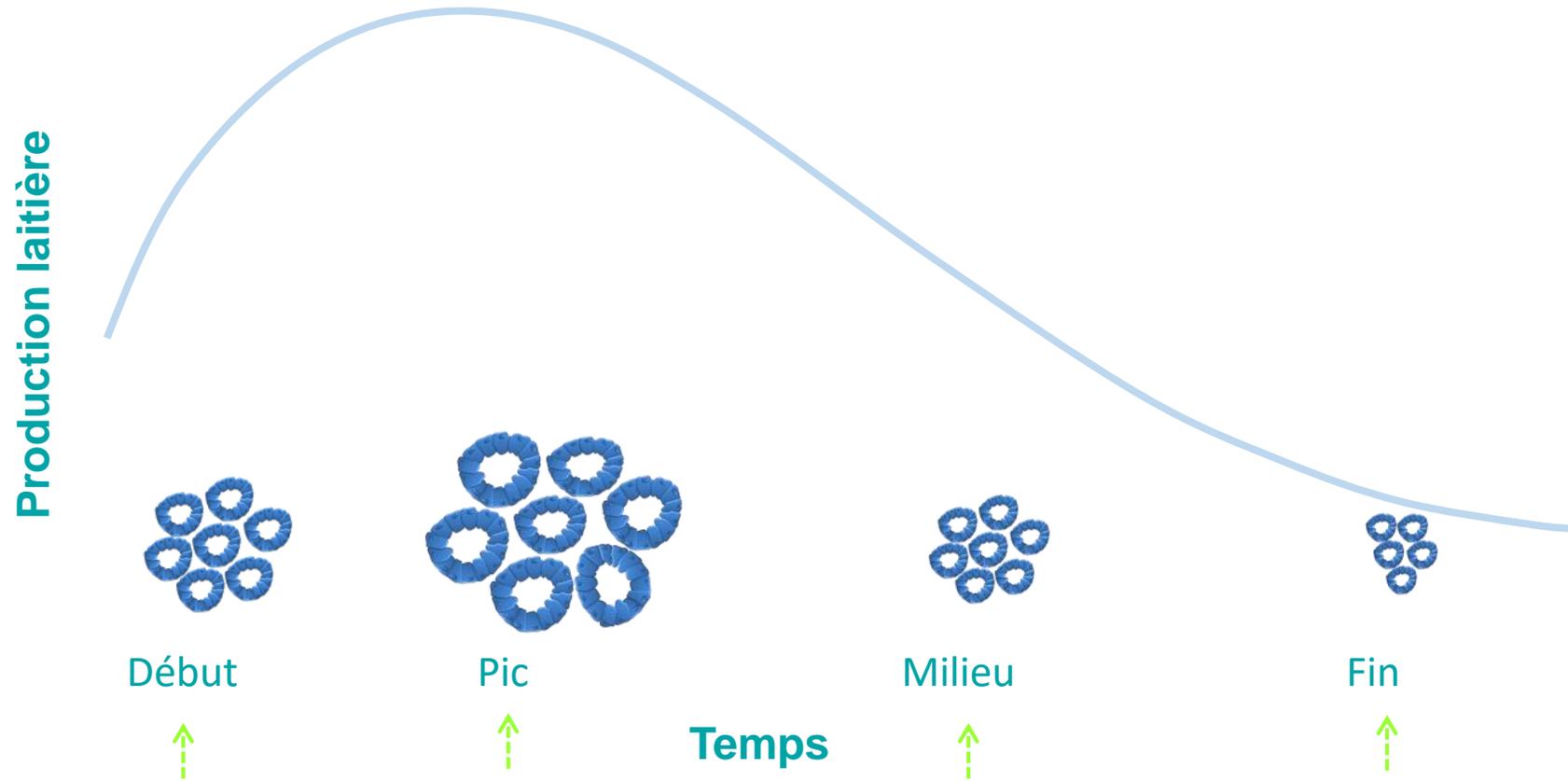


Star CellBio

presents

FLOW CYTOMETRY

# Phénotypage cellulaire de la glande mammaire au cours de la lactation



1- Déterminer les proportions des différents types cellulaires

2- Etudier le rôle de l'environnement hormonal sur le phénotype des CEM

# Développement de nouveaux modèles *in vitro*: création de nouvelles lignées cellulaires

## - Contexte:

Evolution des techniques *in vitro* (immortalisation ...)

Etude des interactions cellulaires (co-culture)

Système de culture 3D mimant une alvéole mammaire

## - Outils *in vitro* à disposition:

Cellules MAC-T

Cellules BME-UV1

CEM bovines transformées...

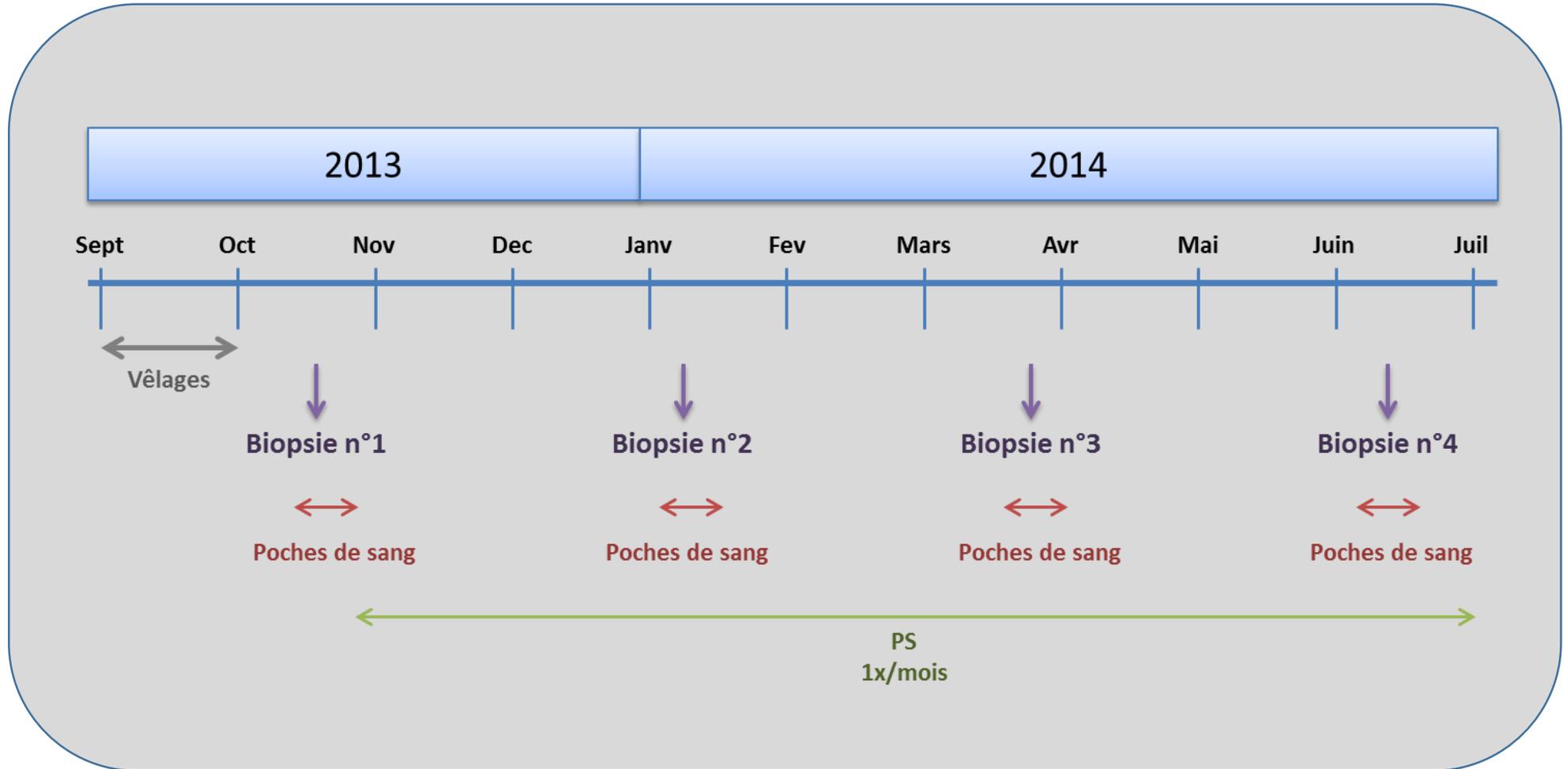
## - Contraintes:

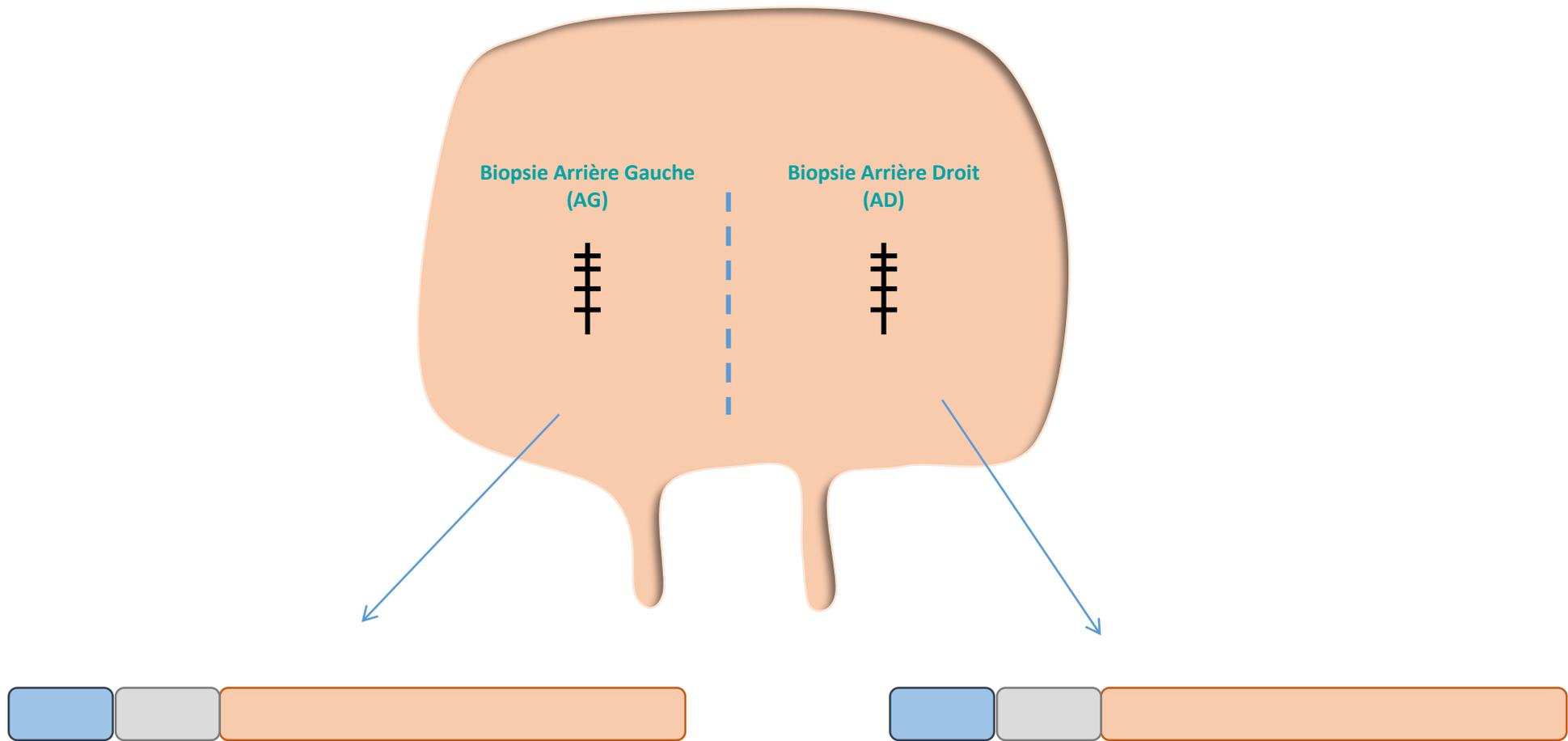
Origine et phénotype mal connus

Réponses différentes à des traitements hormonaux

**Créer des lignées cellulaires permettant de décrire différents états physiologiques en gardant les propriétés phénotypiques des cellules**

# Protocole (soumis au comité d'éthique le 07/07/2013)





Histologie

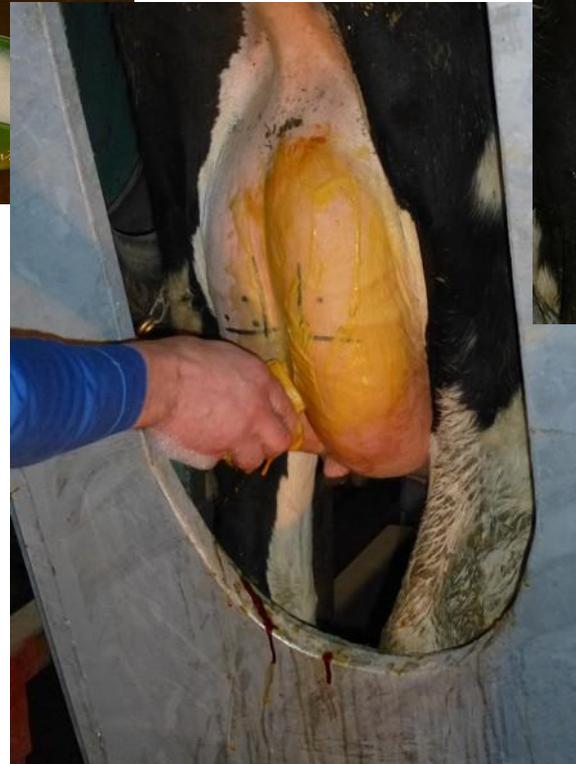


Biologie moléculaire (ARN)

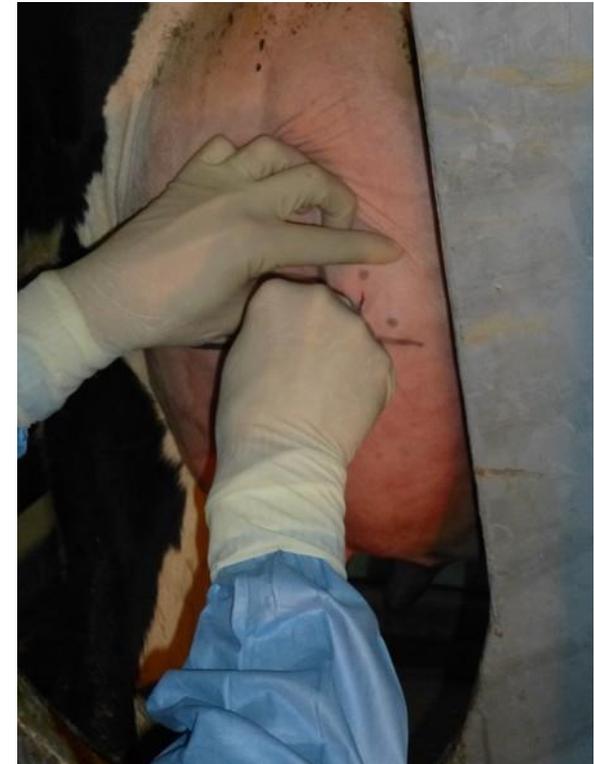


Phénotypage cellulaire (digestion, cytométrie ...)

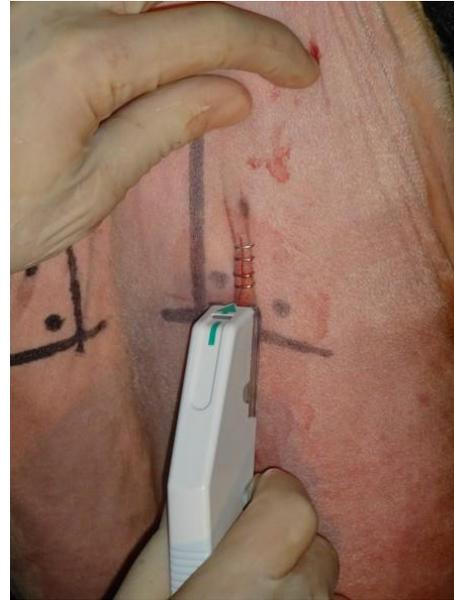
# Prélèvement de tissu par biopsie



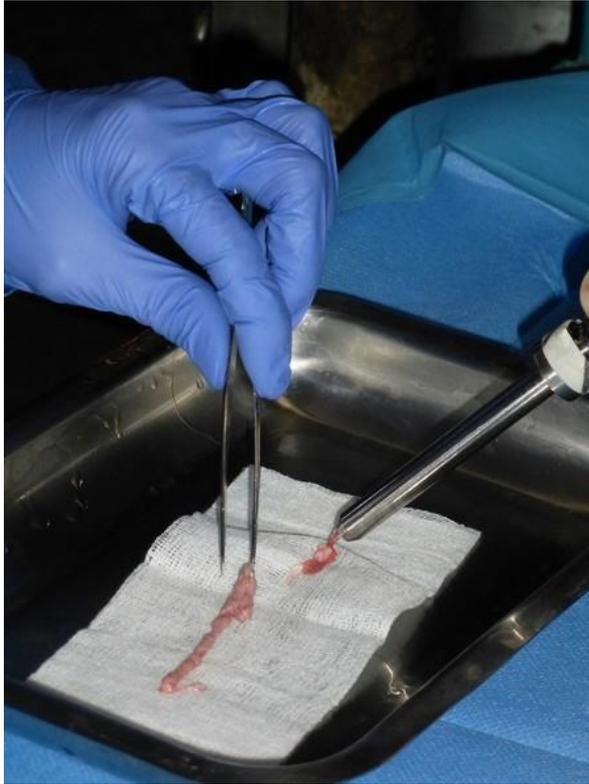
# Prélèvement de tissu par biopsie



# Prélèvement de tissu par biopsie



# Prélèvement de tissu par biopsie



# Prélèvement de tissu par biopsie

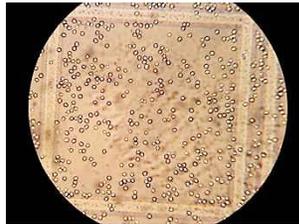
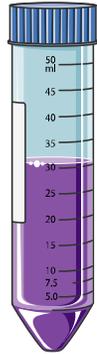


# Dissociation cellulaire



# Tri cellulaire

Suspension  
cellulaire



Tri cellulaire par  
billes magnétiques



CD 49f



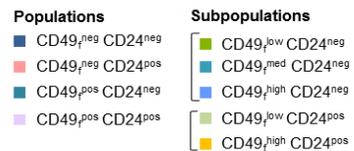
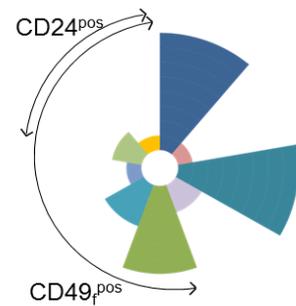
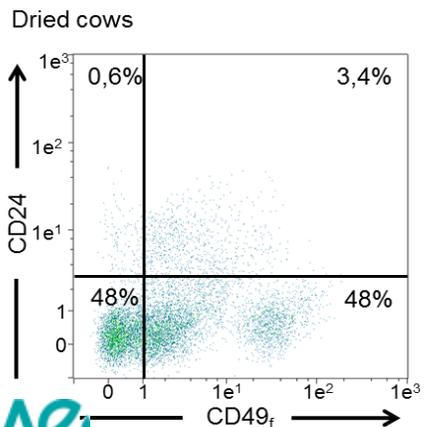
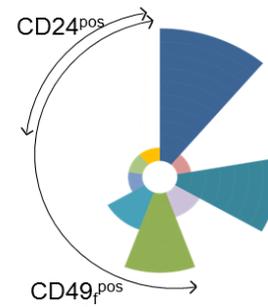
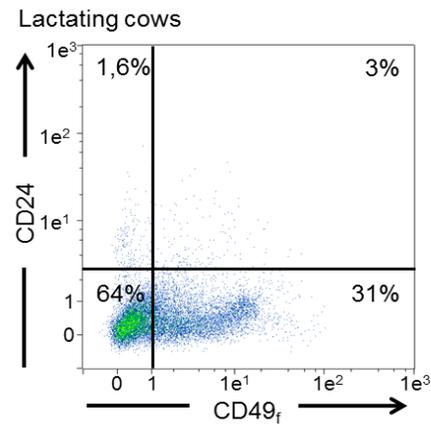
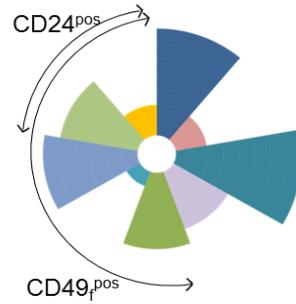
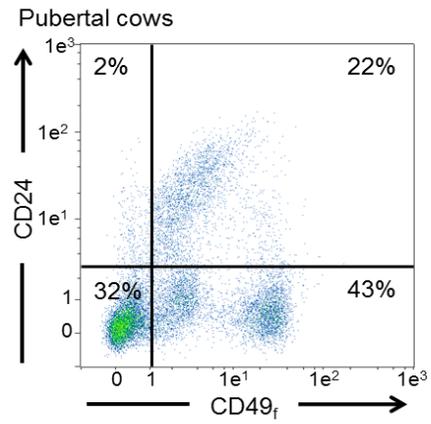
CD 90



CD 56

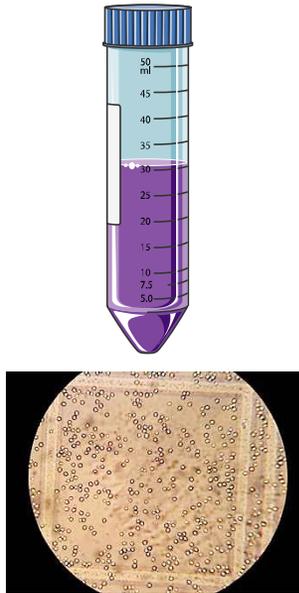
# Tri cellulaire





# Tri cellulaire

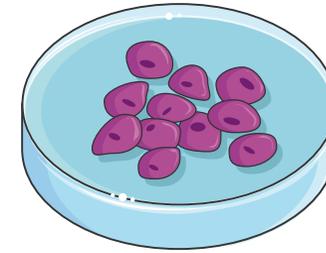
Suspension  
cellulaire



Tri cellulaire par  
billes magnétiques



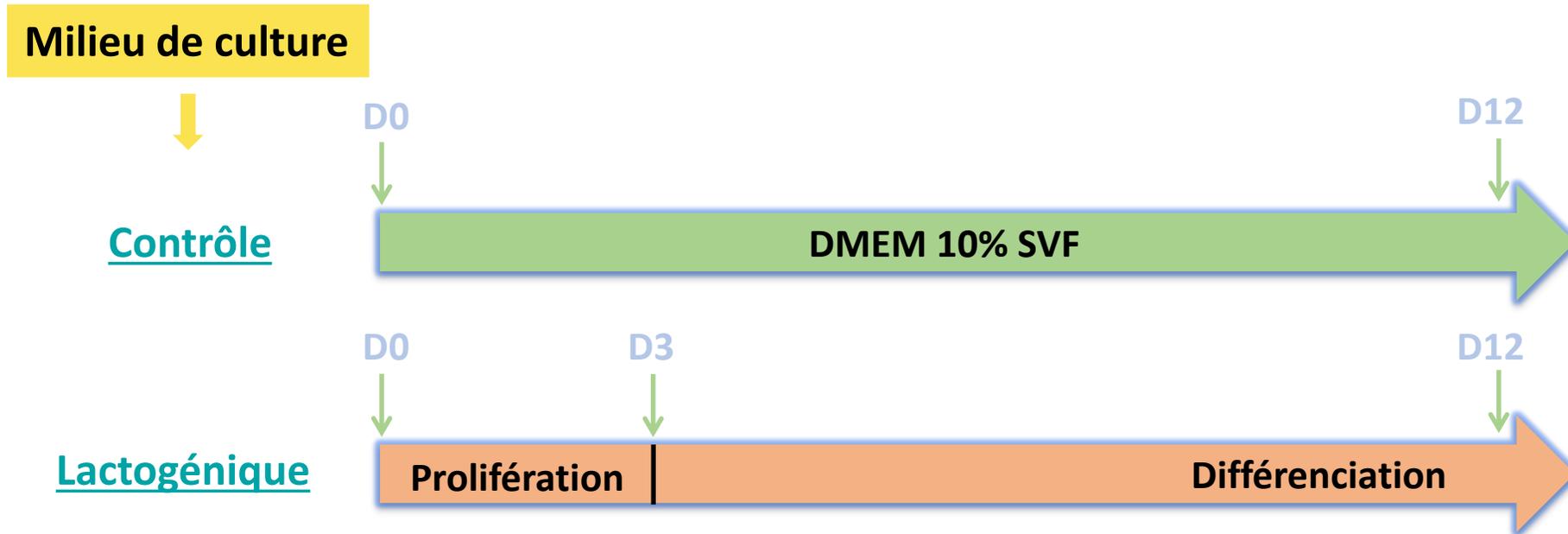
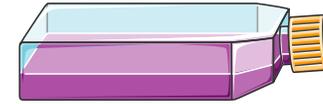
Culture  
cellulaire



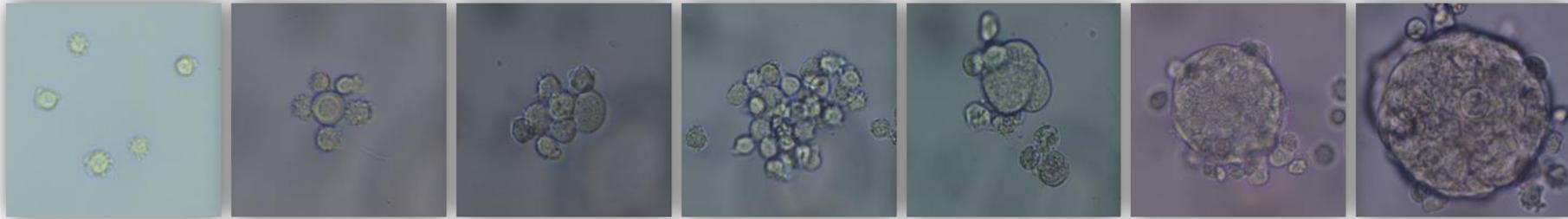
Prolifération

Différenciation

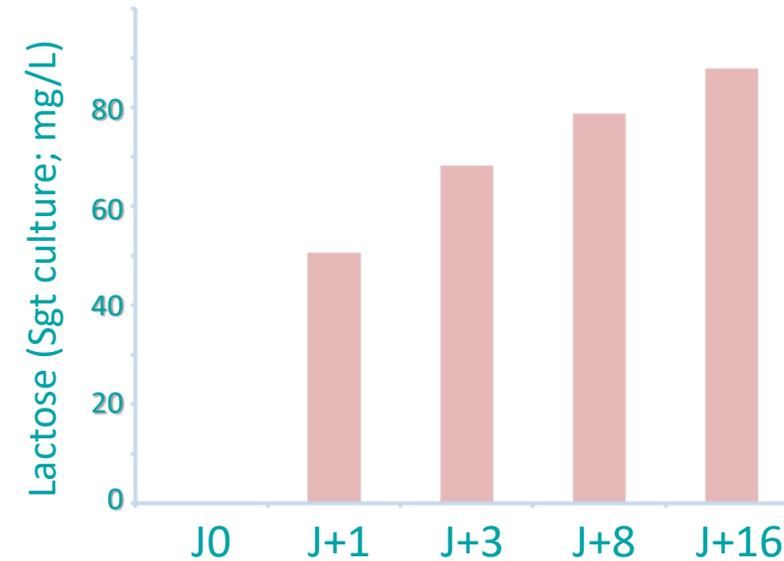
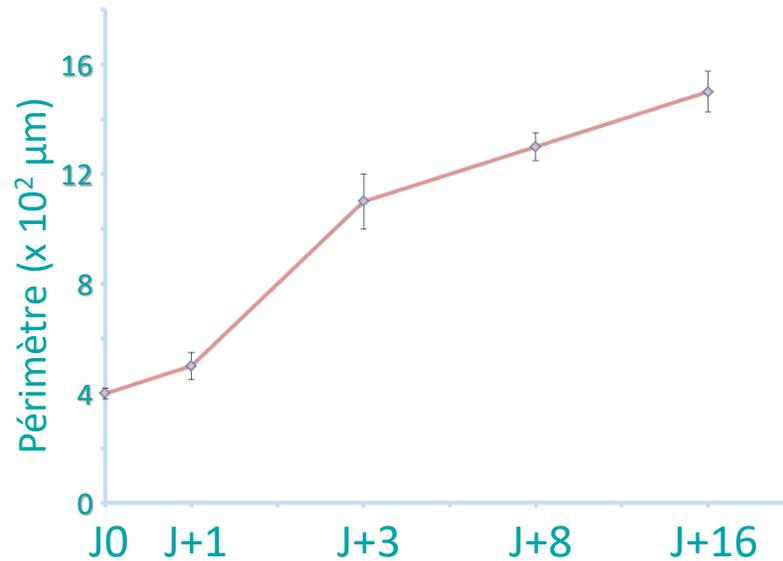
# Conditions de culture cellulaire



# Développement de nouveaux modèles *in vitro*: les mammosphères



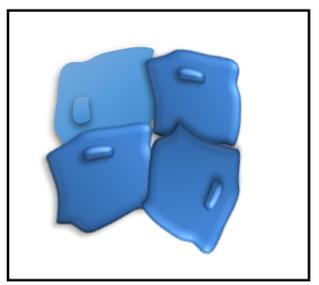
Cellules BMEC cultivées en plaque ULA



« Mimer » *in vitro* la glande mammaire pour des études fines  
et le développement de modèles de co-culture

# Développement de la culture des cellules épithéliales en mammosphères (3D)

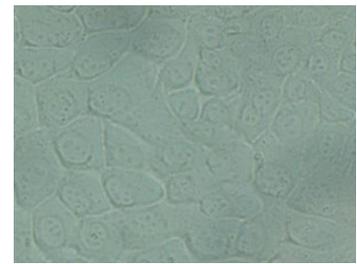
## Culture adhérente (2D)



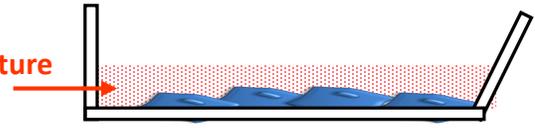
Vue de haut



Culture primaire BMEC

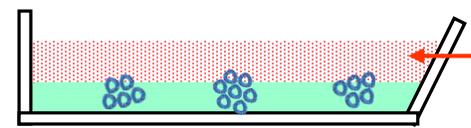


Milieu de culture



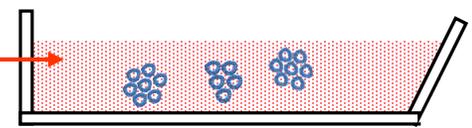
## Nouveaux supports de culture pour la formation de mammosphères

### Système de culture 3D mimant une alvéole mammaire

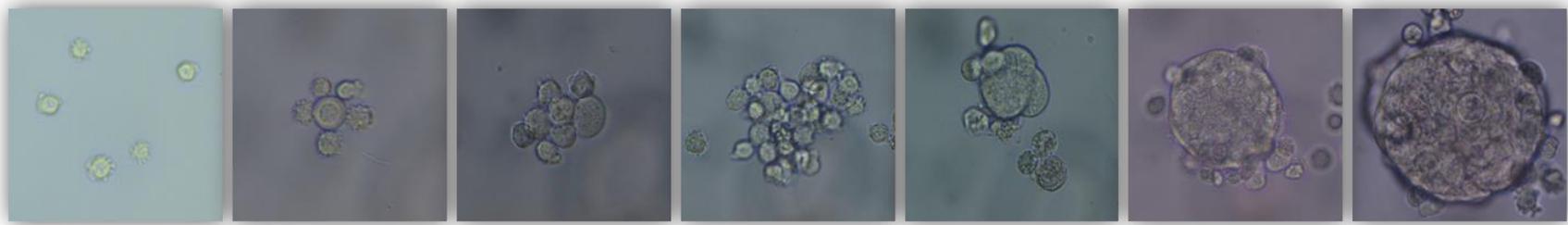


MATRIGEL

Milieu de culture

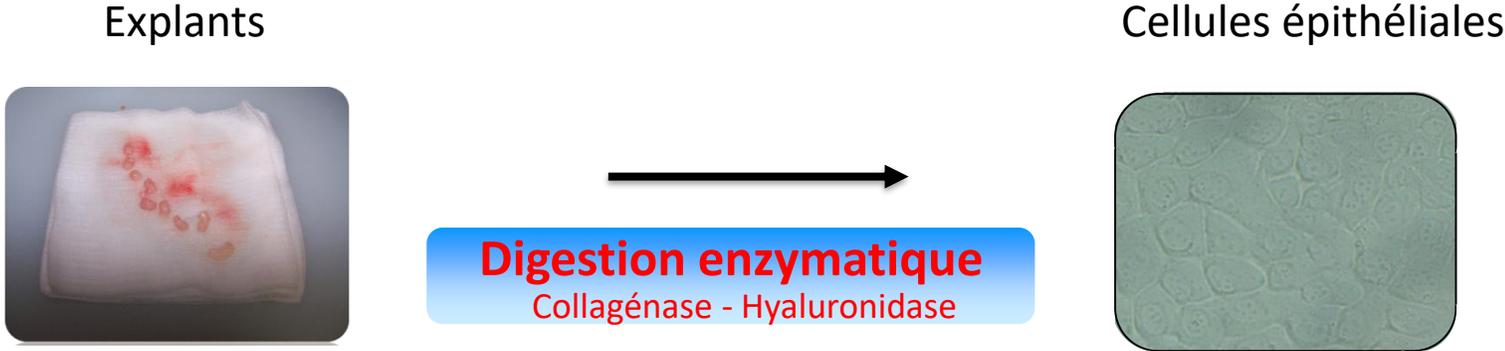


ULA (Ultra Low Attachment)



# Développement de la culture des cellules épithéliales en mammosphères (3D)

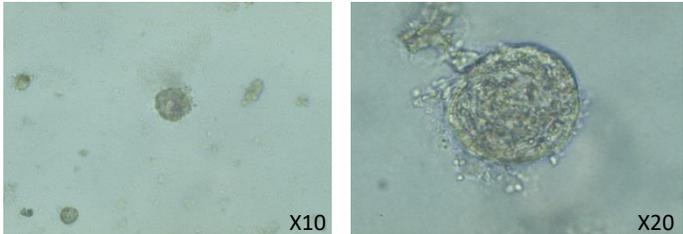
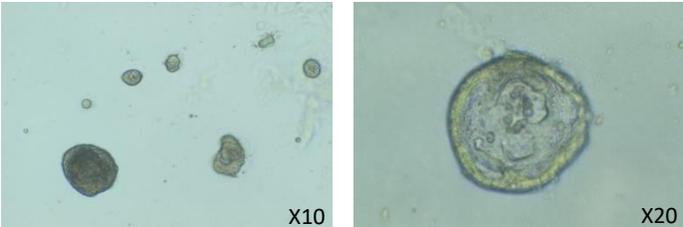
## Les cellules épithéliales issues de culture primaire



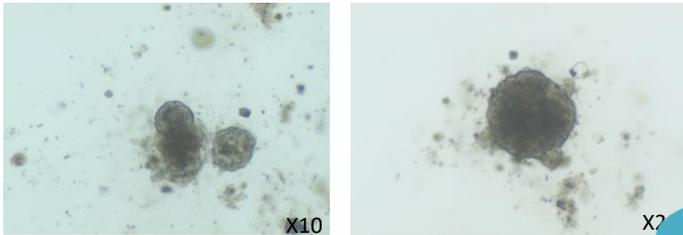
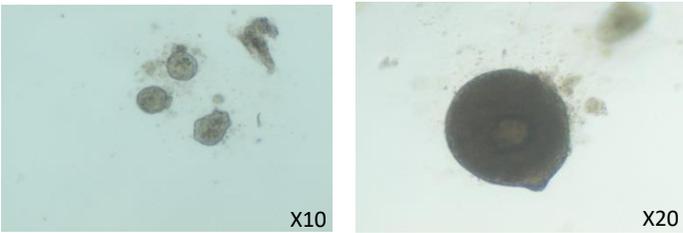
Cellules épithéliales - Glande Mammaire Vache

Cellules épithéliales - Glande Mammaire Truie

Matrigel

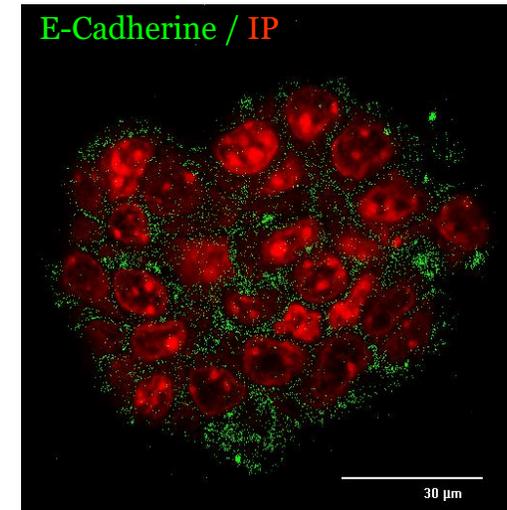
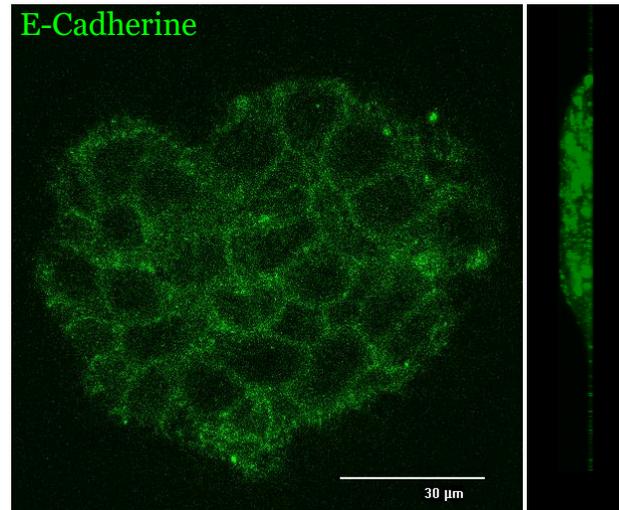
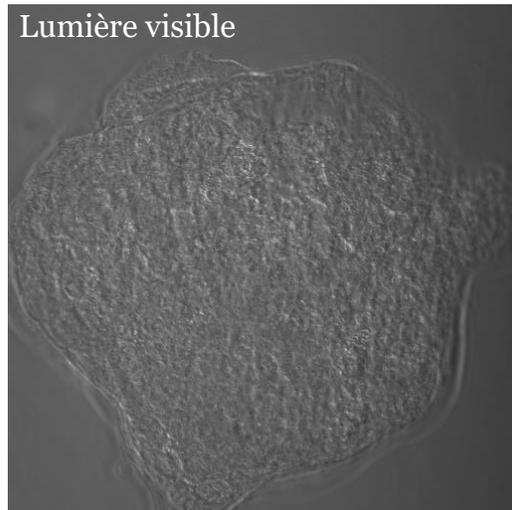
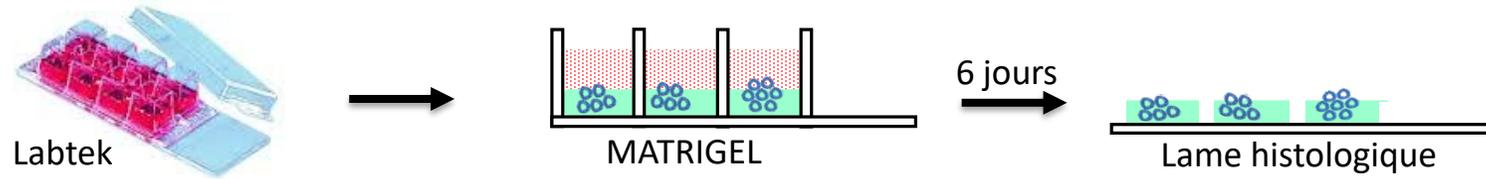


ULA



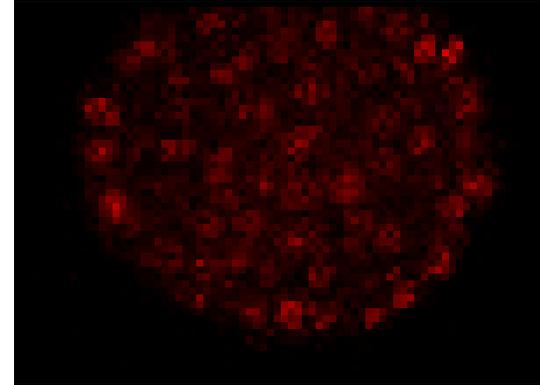
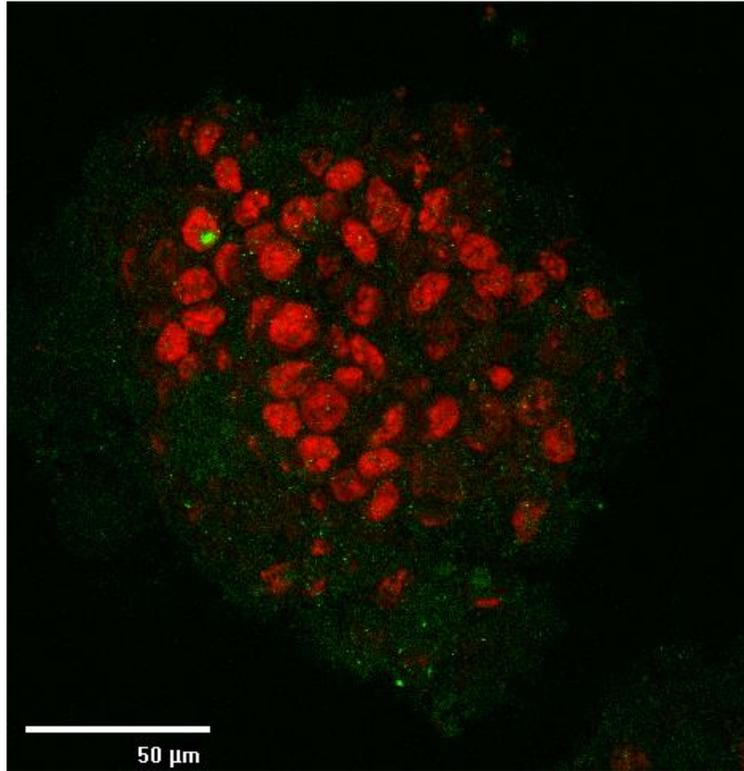
# Développement de la culture des cellules épithéliales en mammosphères (3D)

## Les mammosphères visualisées en microscopie par ImmunoHistologie

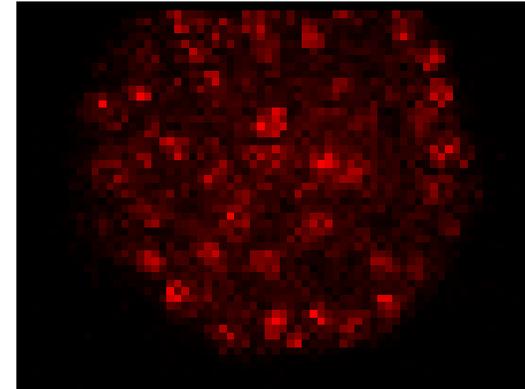


# Développement de la culture des cellules épithéliales en mammosphères (3D)

CDH-1 / IP

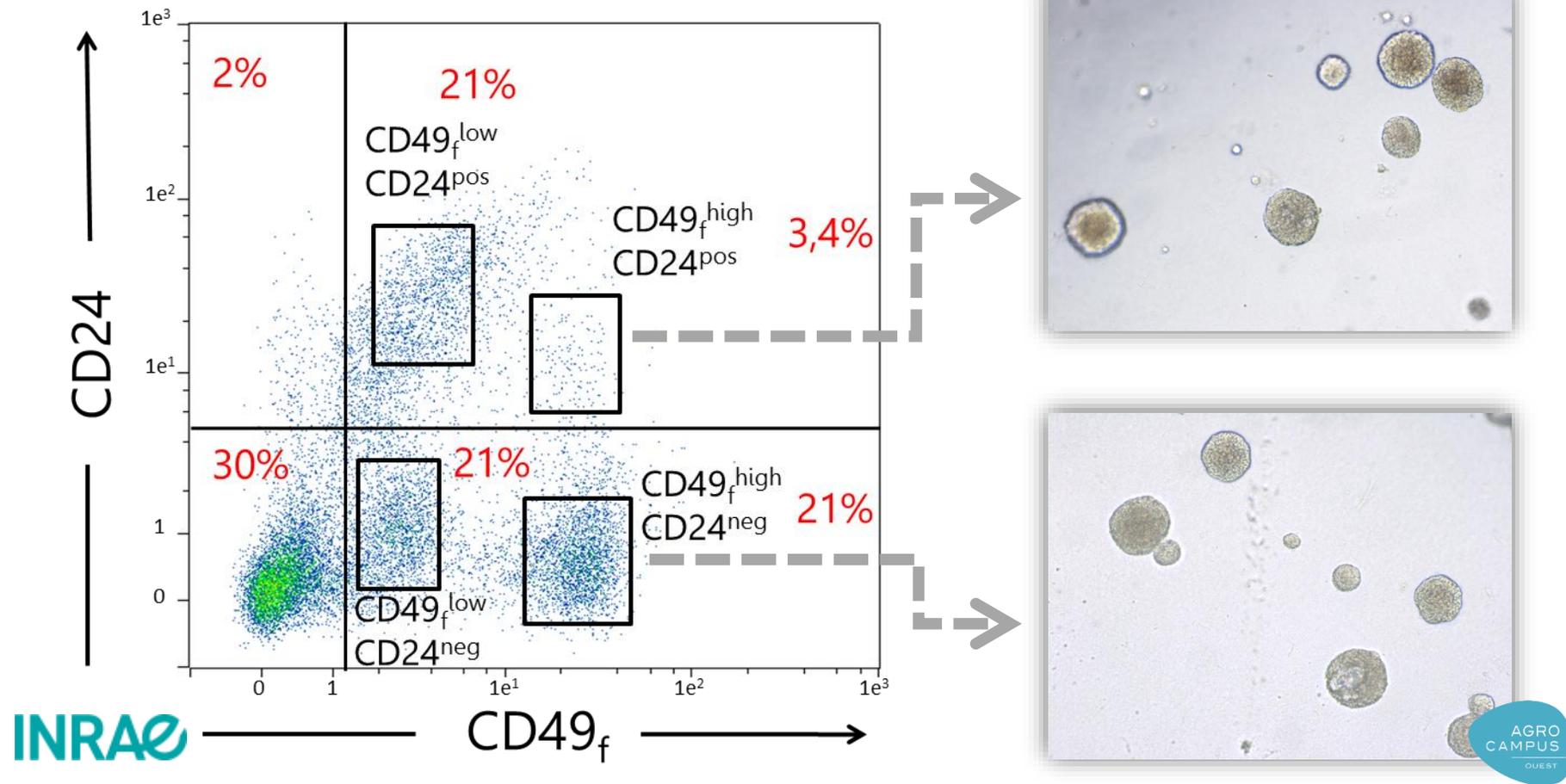


IP



IP

# Tri cellulaire et test de fonctionnalité des populations cellulaires



## Utilisation des mammosphères

**Test de fonctionnalité des cellules après tri**

**Transplantation de mammosphères dans des souris nude  
Balb/c AnNRj-Foxn1nu/nu**

## Utilisation de culture primaire

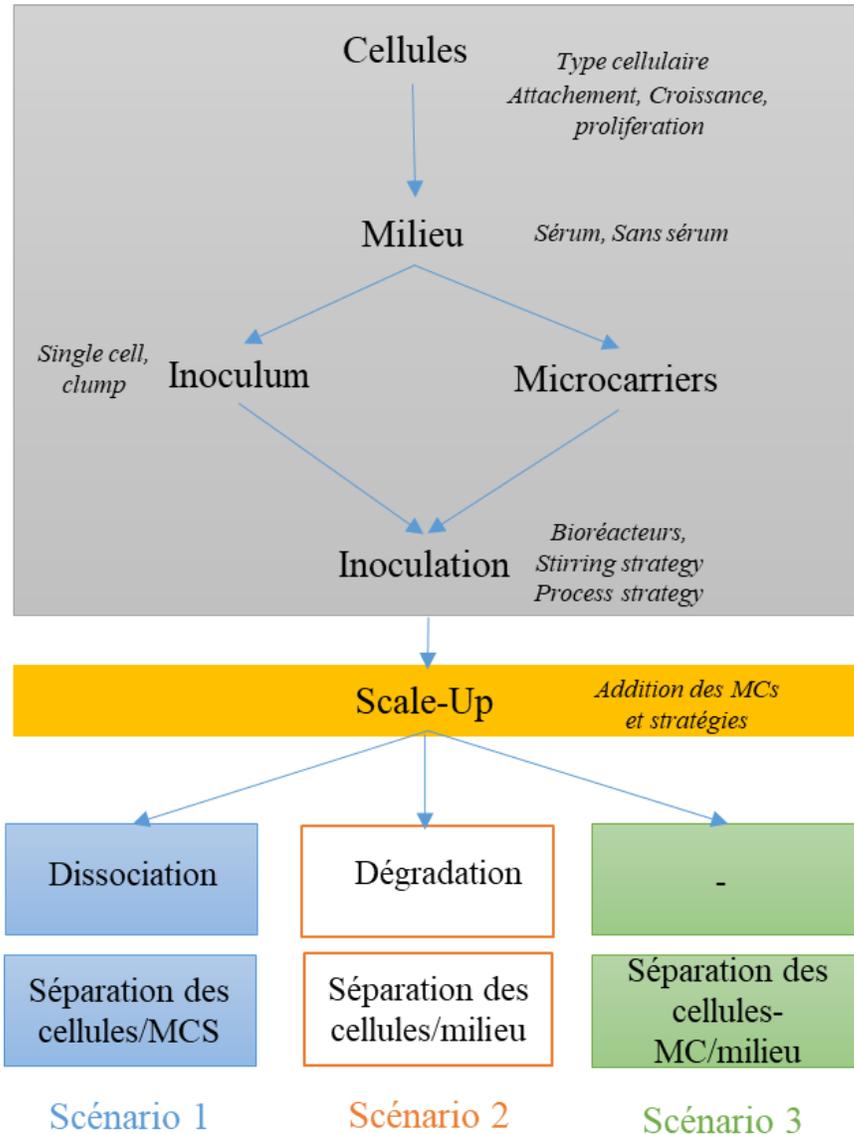
**Reflet du stade de lactation**

**Fonctionnalité proche de l'in vivo**

# Utilisation des modèles in vitro de tissus musculaires pour l'étude des animaux d'élevage et perspectives d'application

- i) la caractérisation approfondie des progéniteurs myogéniques dans un large éventail d'espèces, notamment le Porc, la volaille et le Poisson pour étudier la notion de diversité cellulaire résidente dans les tissus ;
- ii) une meilleure compréhension des dérégulations affectant les progéniteurs myogéniques chez les espèces de production ;
- iii) l'étude de l'impact de la vaccination sur la croissance et la composante inflammatoire chez les animaux d'élevage
- iv) la mise à disposition d'un modèle d'étude pour le processus de maturation de la viande.

# La viande *in vitro*



Scénario 1, les MS (micro supports) sont utilisés comme substrats temporaires pour l'expansion des Cellules Souches et doivent être retirés à la fin du processus. Il existe deux conditions préalables importantes dans ce cas, à savoir la nécessité pour les MS de fournir un rendement de détachement élevé et une séparation facile des cellules.

Scénario 2, les MS servent également de substrat temporaire pour l'expansion des CS mais ils peuvent être dégradés lors d'une étape préalable. Dans ce cas, l'étape de dissociation peut être remplacée par une étape de dégradation du MS pour obtenir une suspension cellulaire unique.

Scénario 3, les MS sont composés de matériaux comestibles et peuvent donc être intégrés dans le produit final. Ils doivent être ici conformes aux réglementations pour une utilisation en tant qu'ingrédient ou additif alimentaire.

Bodiou V, Moutsatsou P, Post MJ (2020) Microcarriers for upscaling cultured meat production. *Front Nutr* 7:10. doi: 10.3389/fnut.2020.00010

# De la cellule souche à la viande *in vitro*

