

CELLULES SOUCHES

Philippe Jourdon
Institut du Thorax
U-915 INSERM
Nantes

CELLULE SOUCHES

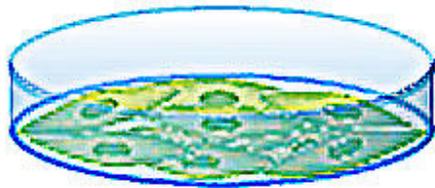
Elles se définissent par 2 critères spécifiques:

- 1) Auto-renouvellement**
- 2) Différentiation Cellulaire.**

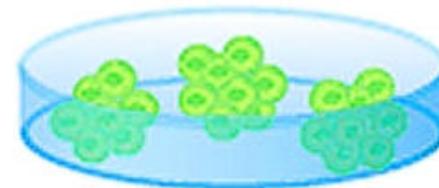
AUTO-RENOUVELLEMENT CELLULAIRE

C'est la capacité d'une cellule de se diviser à l'identique, et ceci pendant des périodes indéfinies.

Une telle propriété conduit à la formation d'un clone cellulaire.



**Ensemencement de cellules
souches isolées**



**Formation de clones
Constitués de cellules identiques**

DIFFERENCIATION CELLULAIRE

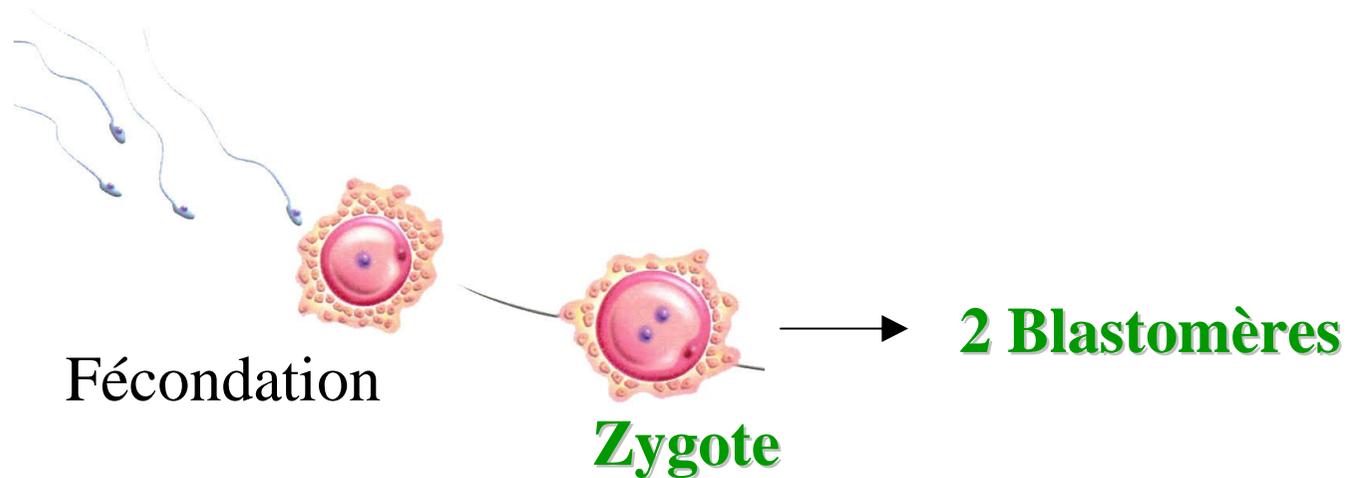
Différenciation Cellulaire: capacité d'une cellule de donner, dans un environnement défini, différents types cellulaires fonctionnels.

Selon leur potentiel de différenciation au cours du développement on distingue **4 catégories de cellules:**

- 1- Cellules totipotentes
- 2- Cellules pluripotentes
- 3- Cellules multipotentes
- 4- Cellules unipotentes

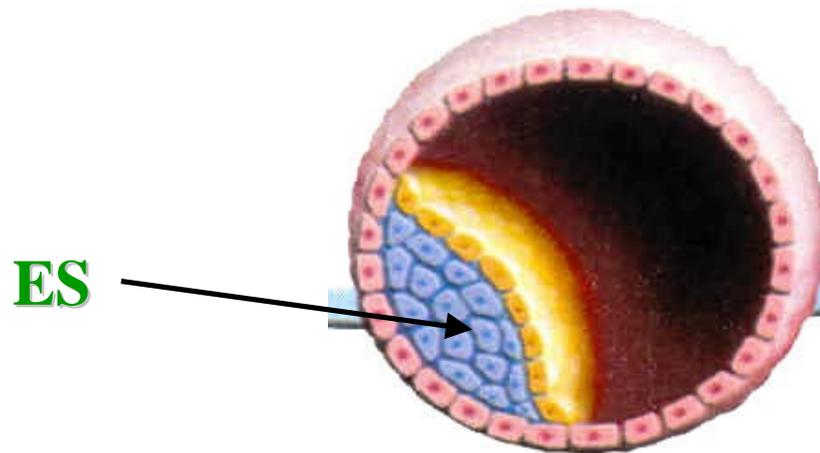
CELLULES TOTIPOTENTES

- Cellule pouvant donner tous les lignées cellulaires constituant un organisme y compris les cellules extra-embryonnaires.
- Chez les mammifères seul le **zygote** et les **blastomères issus de la première division cellulaire** sont des cellules totipotentes. Elles donnent naissance à l'embryon et ses annexes embryonnaires.



CELLULES PLURIPOTENTES

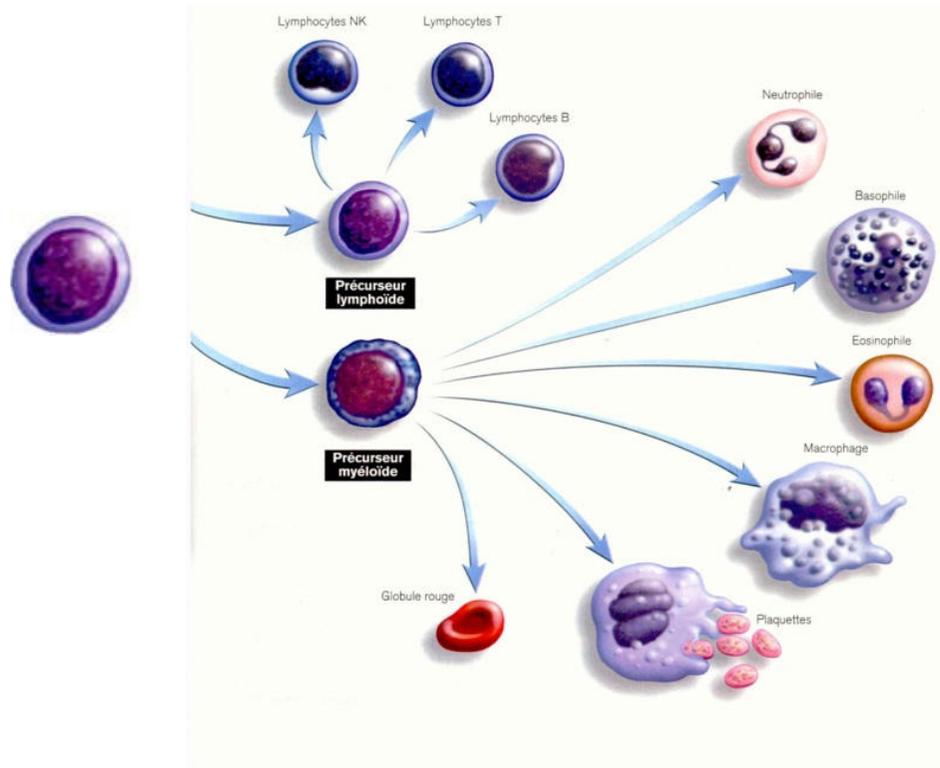
- Cellules pouvant donner tous les lignées cellulaires constituant un individu, mais pas les annexes embryonnaires.
- Cellules Souches Embryonnaires (ES)
- Cellules souches de la lignée germinale (EG).



Blastocyte

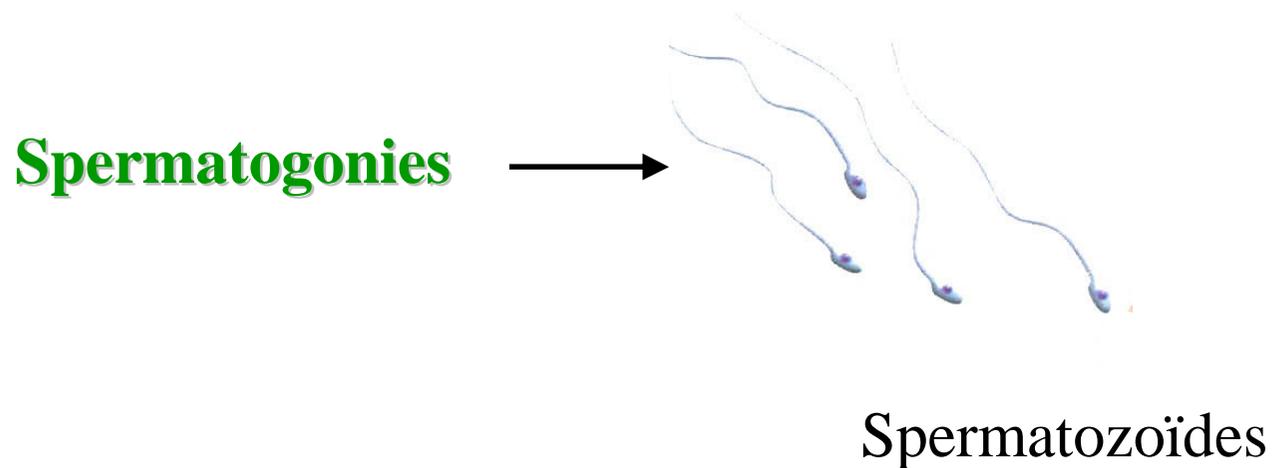
CELLULES MULTIPOTENTES

- Cellules pouvant donner les différents types de cellules spécialisées d'un lignage cellulaire donné.
- Exemple type: les Cellules Souches hématopoïétiques .



CELLULES UNIPOTENTES

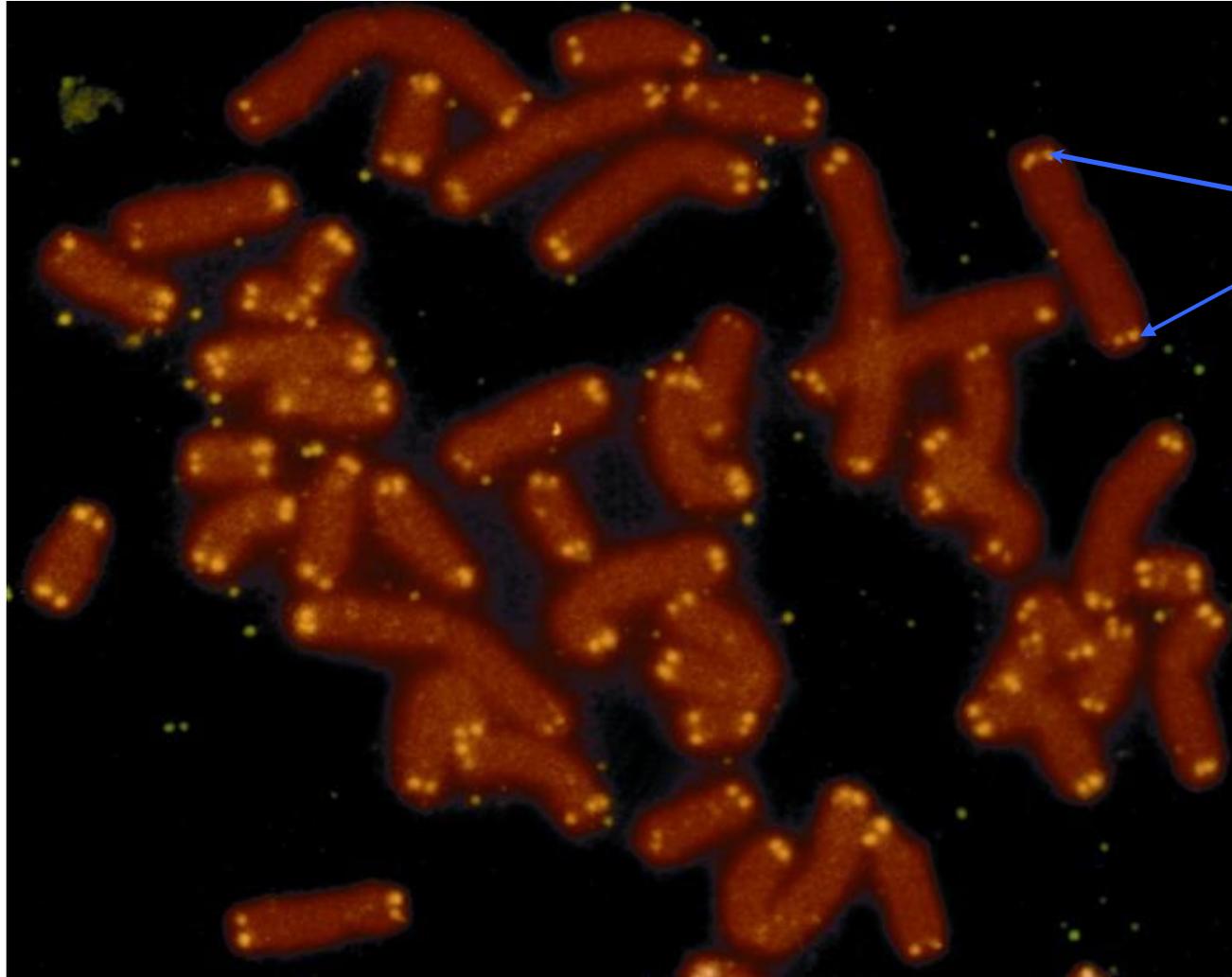
- Cellules pouvant donner un seul type de cellules spécialisées.
Les cellules souches, de par leurs critères, ne sont jamais unipotentes
- Exemple type: les spermatogonies ne se différencient qu'en spermatozoïdes .



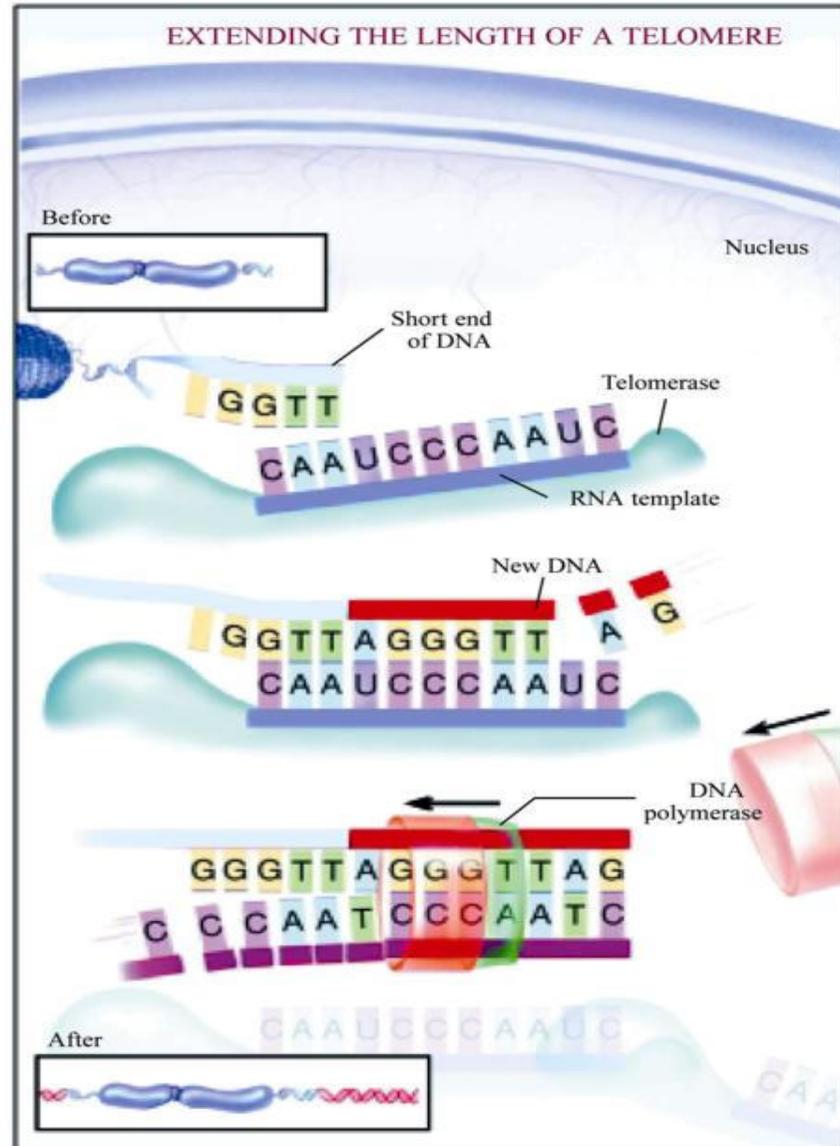
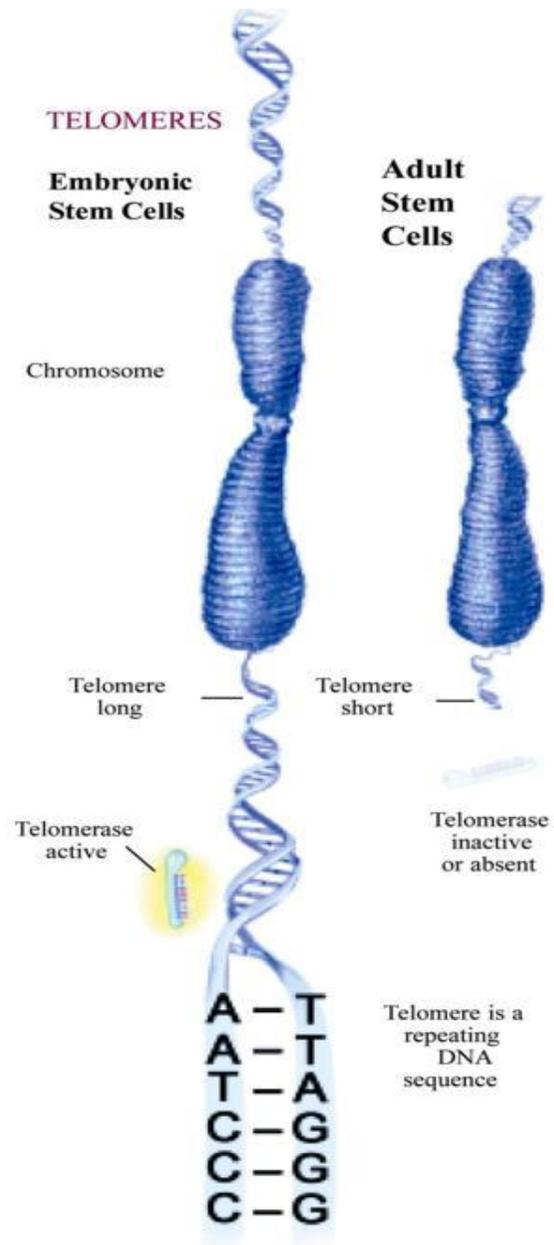
Facteurs intervenant dans l'autorenouvellement des cellules souches

- La longueur des télomères qui est dépendante de l'activité de la télomérase
- Environnement cellulaire des cellules souches: la niche cellulaire, qui secrète des facteurs intervenant dans des voies de signalisation des cellules souches (LIF, BMP ...).
- La présence de facteurs de transcriptions spécifiques (Oct4 et Nanog)

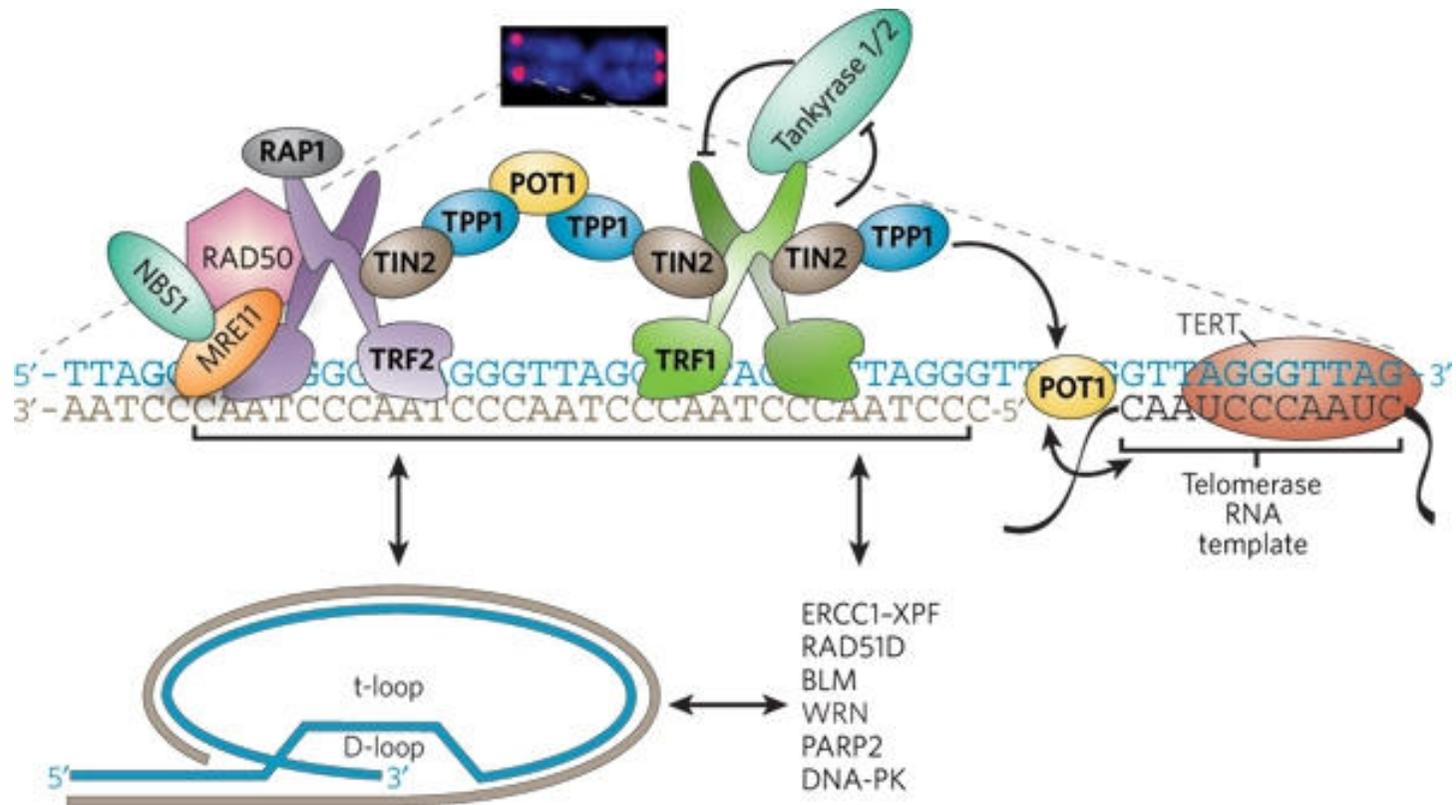
Mise en évidence des télomères



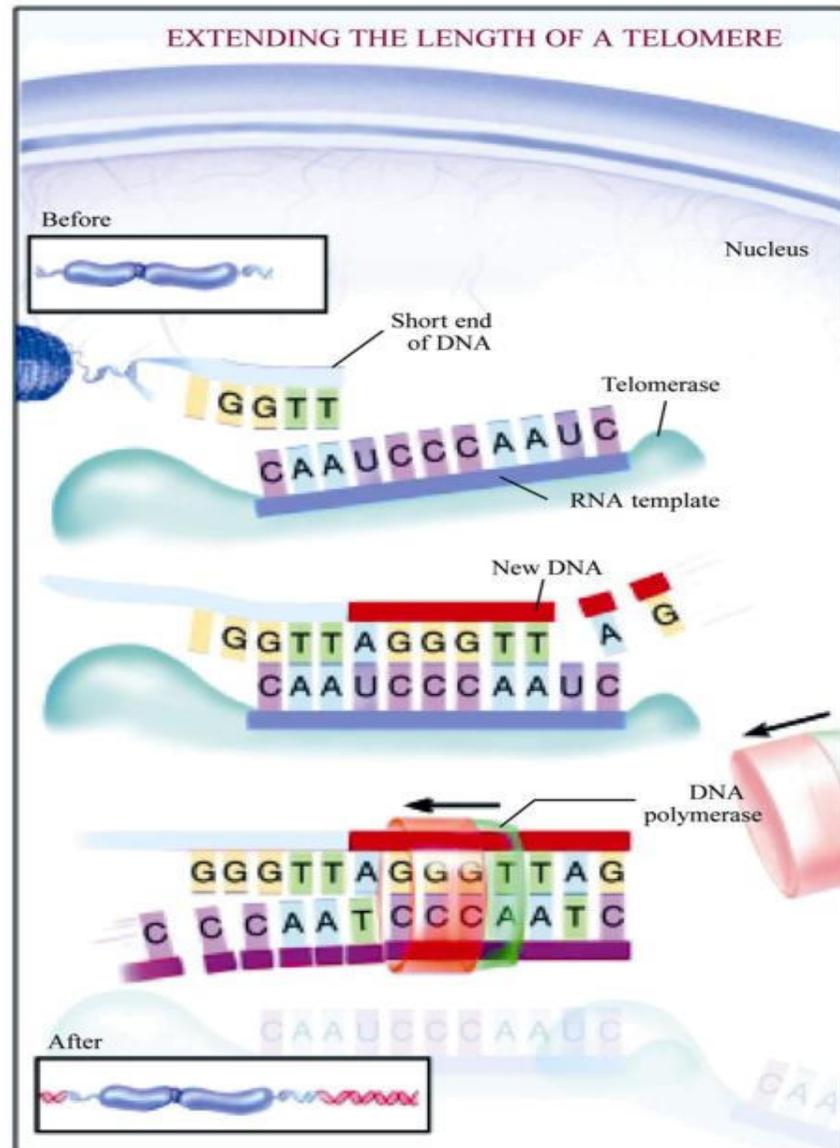
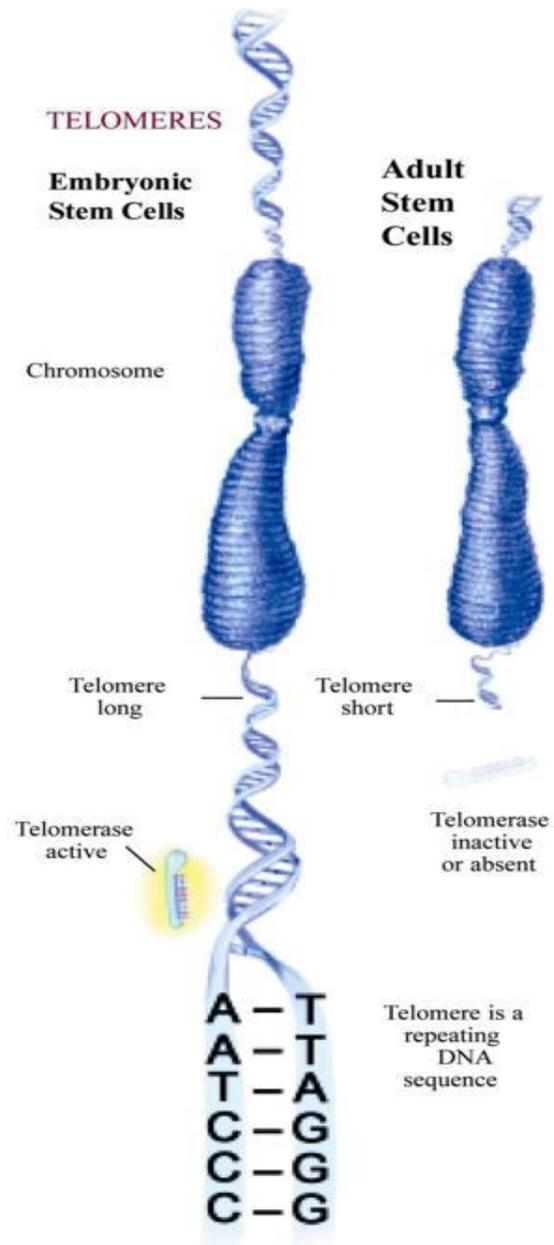
TELOMERES & TELOMERASES



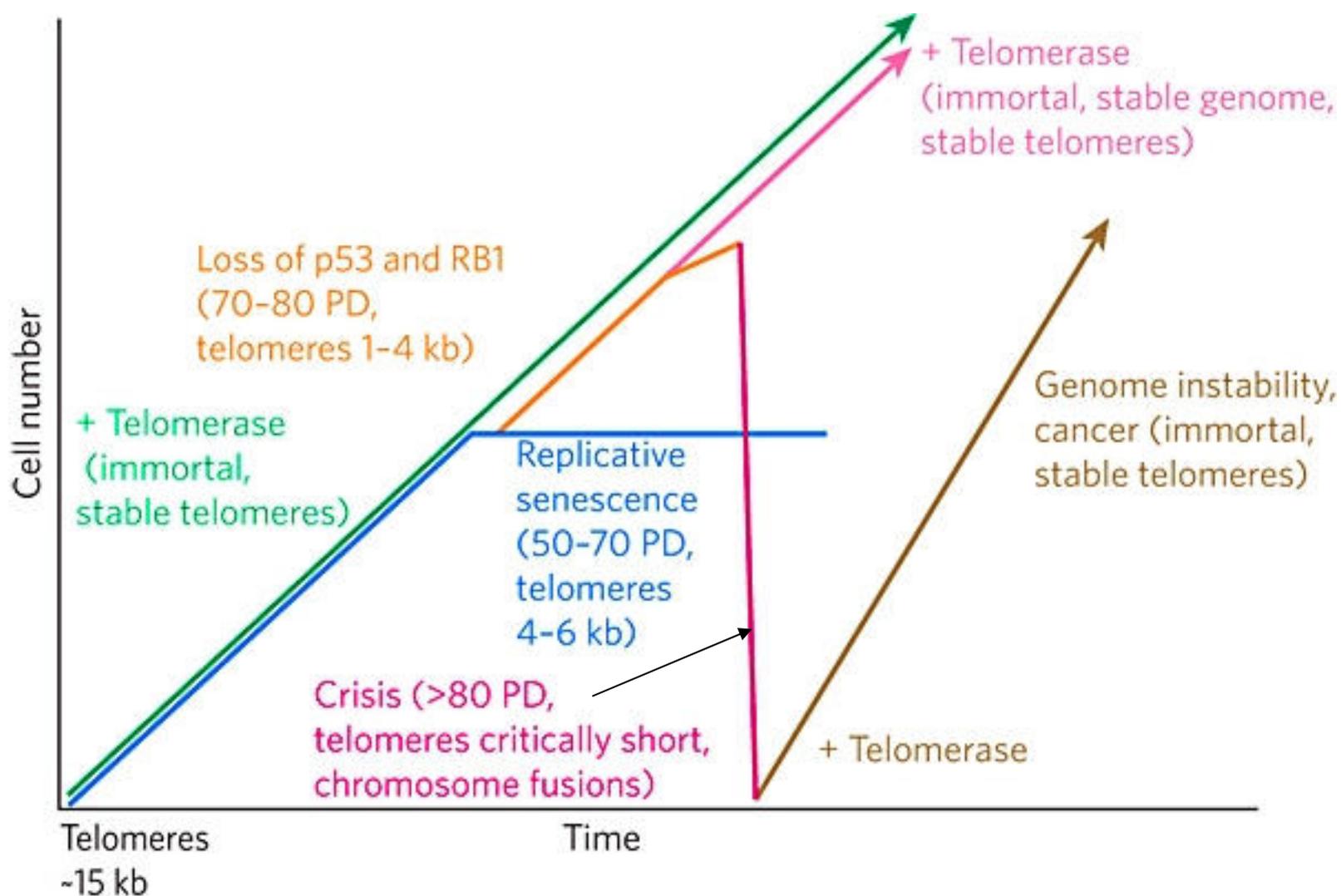
Agencement Protéique du télomère



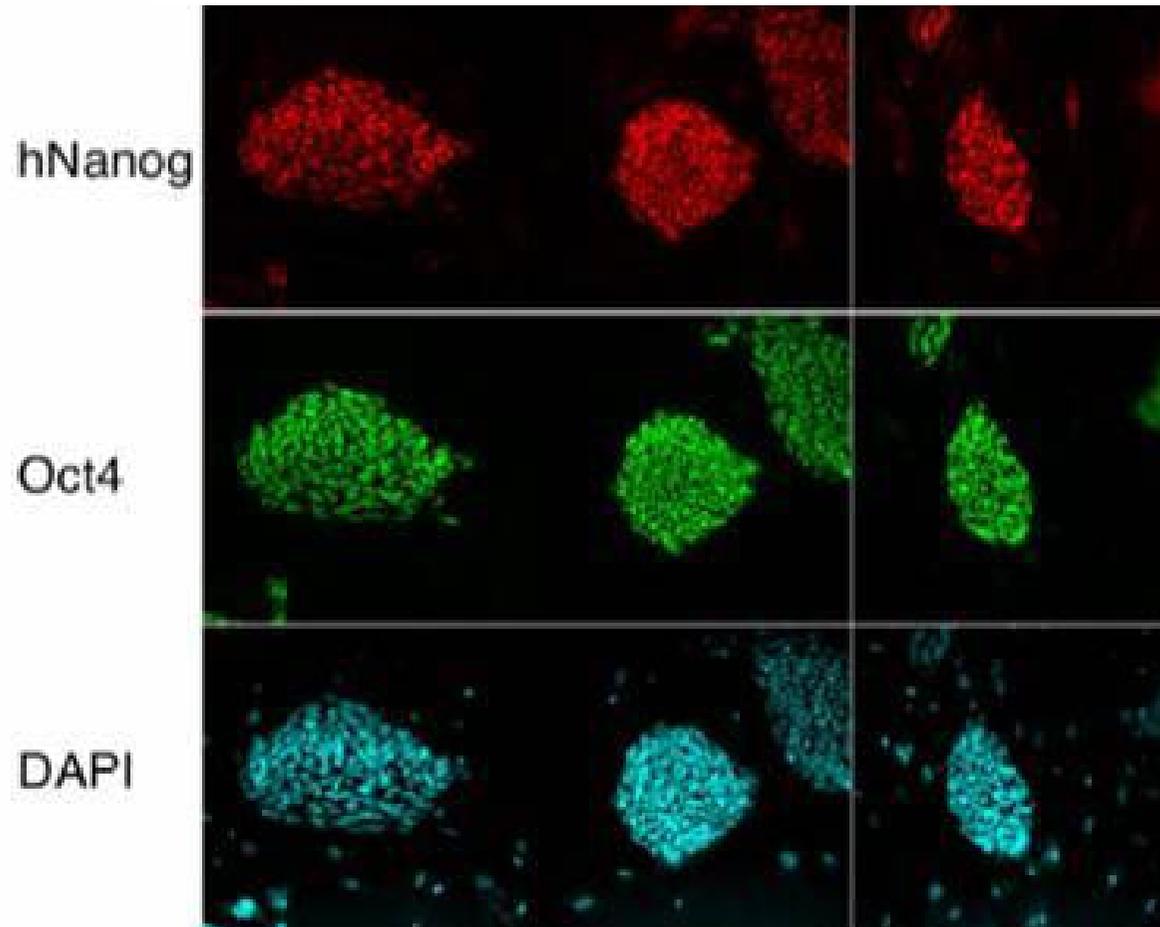
TELOMERES & TELOMERASES



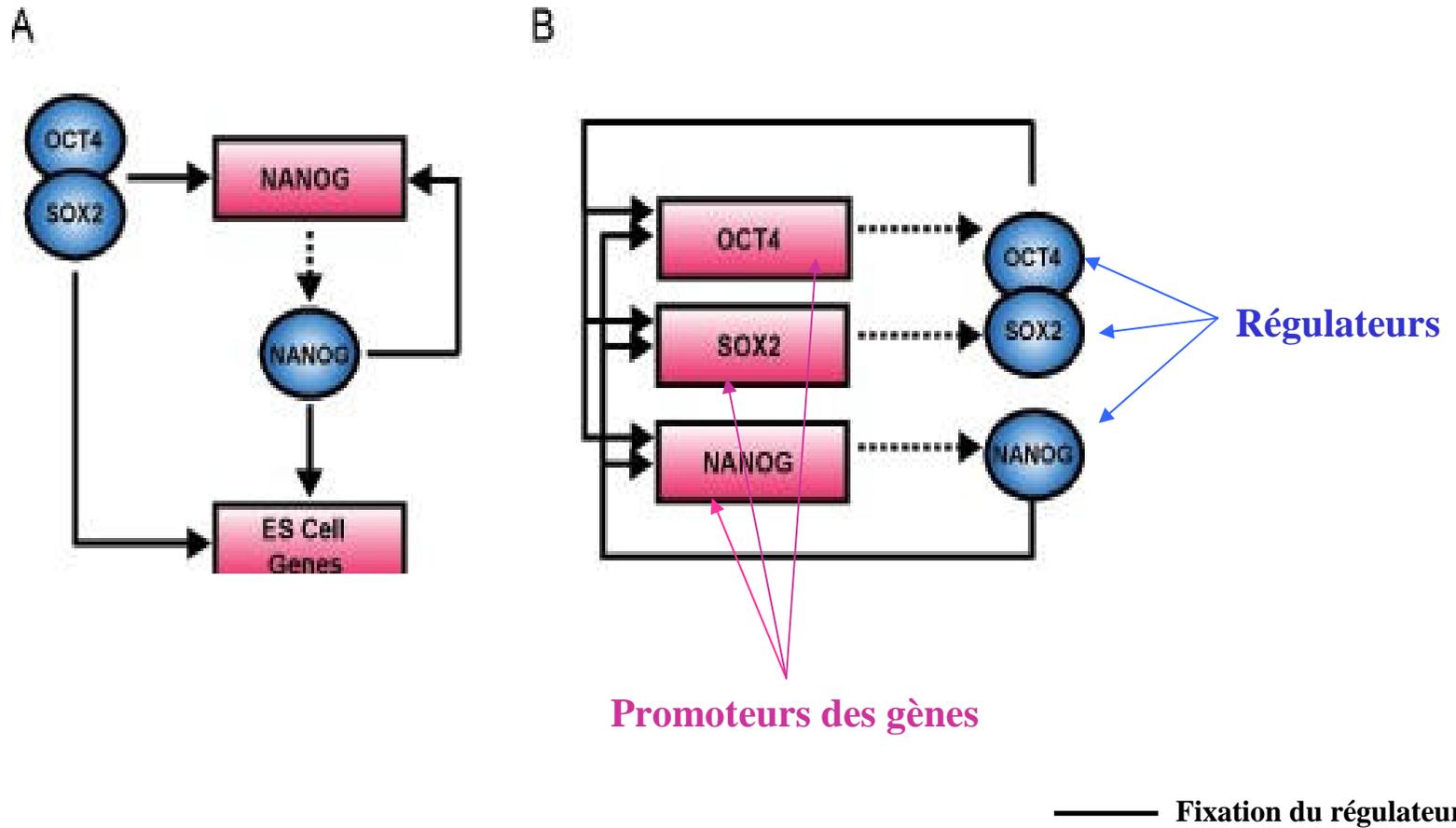
Longueur des télomères et devenir cellulaire



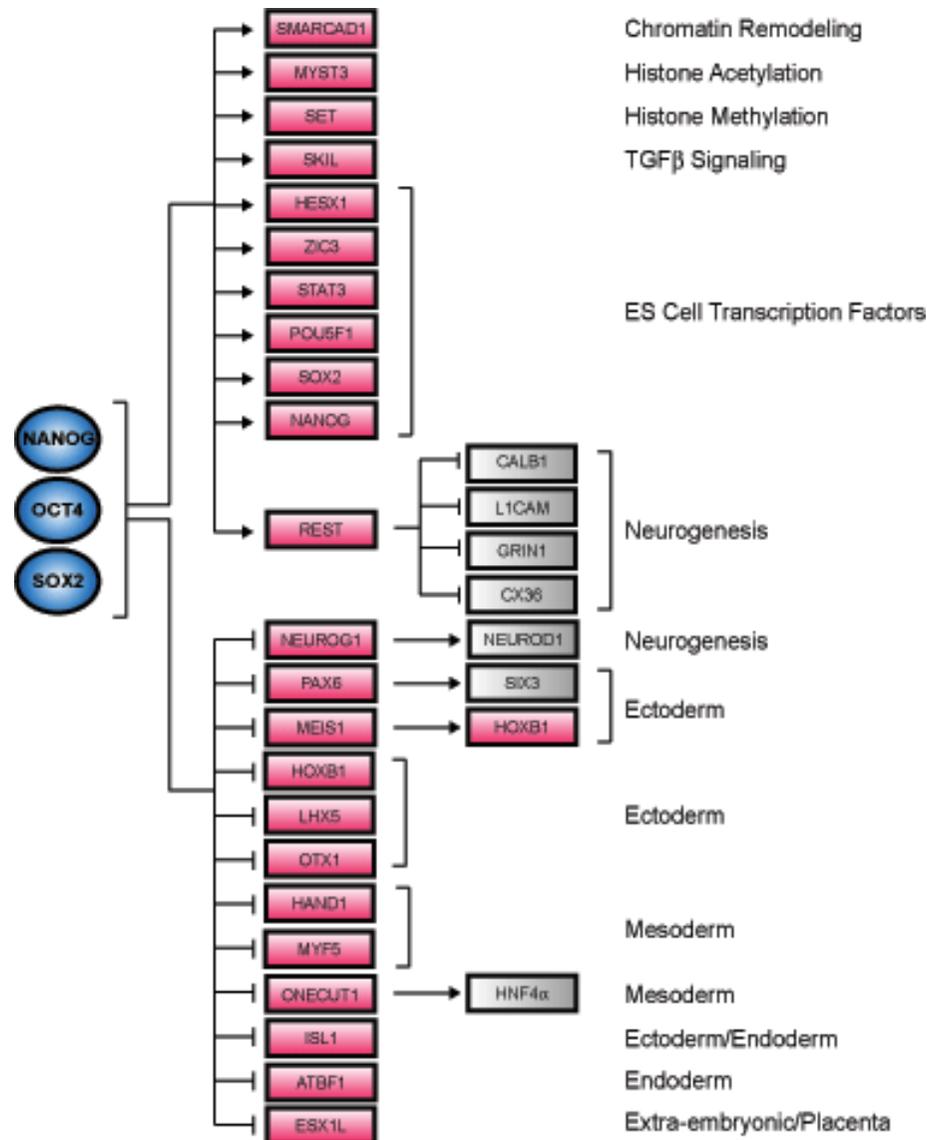
Co-expression de Nanog et Oct4 dans les ES humaines



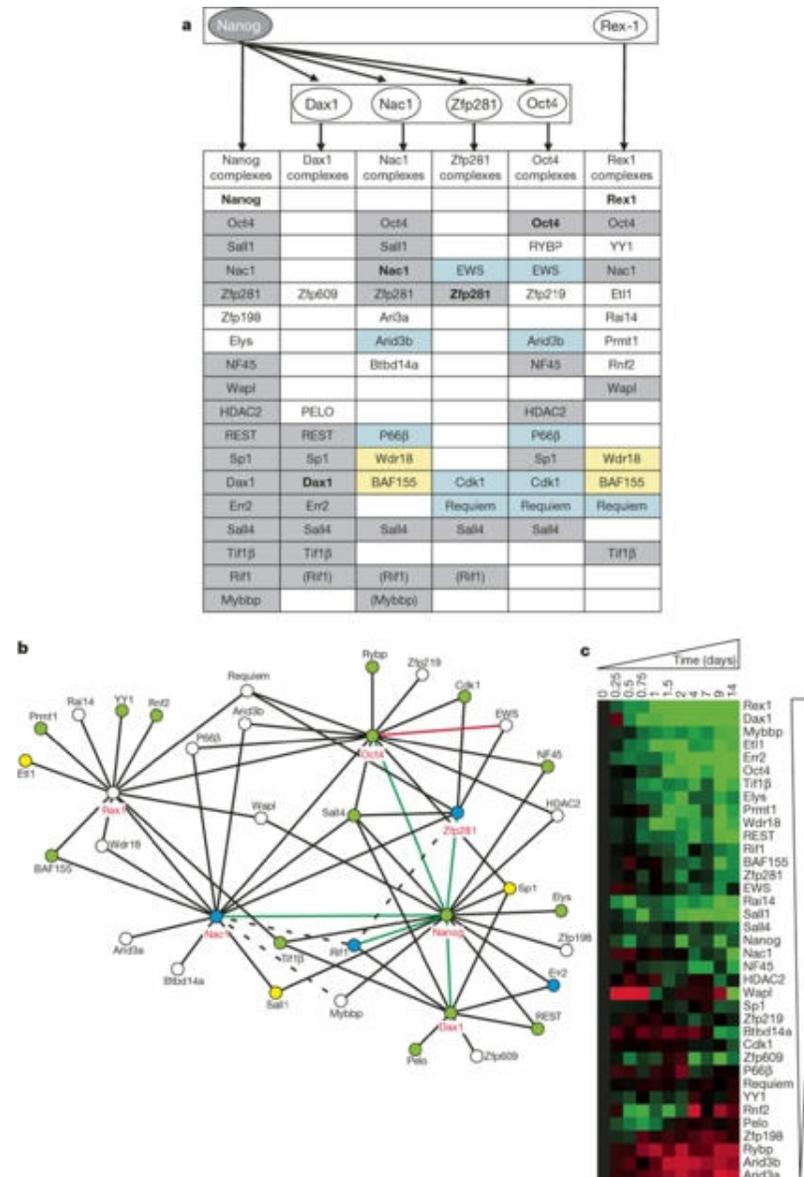
Boucles de régulation de OCT4, Sox2 et Nanog dans les ES



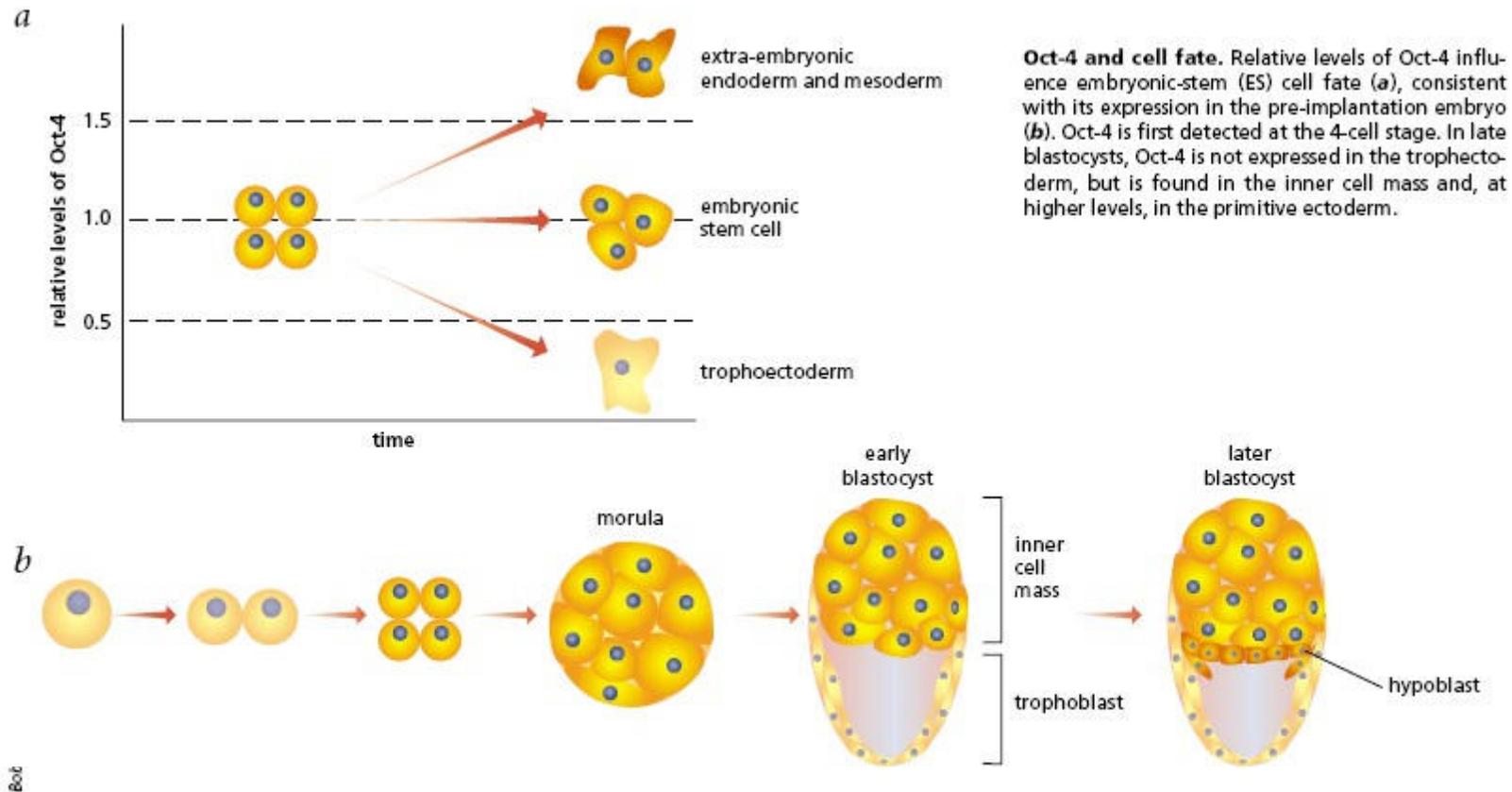
Réseau de régulation transcriptionnelle de NANOG, OCT4 et SOX2



Complexité du réseau protéique dépendant des facteurs de transcription dans les ES



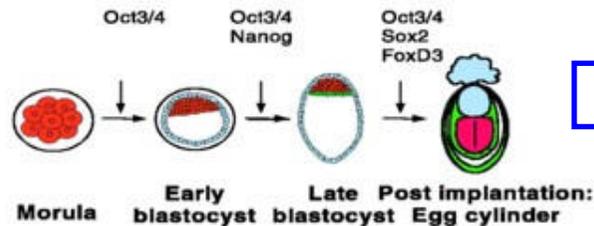
LE NIVEAU D'EXPRESSION DE Oct-4 INFLUENCE LE DEVENIR DES CELLULES ES



Oct-4 and cell fate. Relative levels of Oct-4 influence embryonic-stem (ES) cell fate (a), consistent with its expression in the pre-implantation embryo (b). Oct-4 is first detected at the 4-cell stage. In late blastocysts, Oct-4 is not expressed in the trophoectoderm, but is found in the inner cell mass and, at higher levels, in the primitive ectoderm.

Régulation de l'auto-renouvellement des ES murines par Oct3/4, Nanog. Rôle des voies de signalisation SMAD dépendant de BMP, JAK/STAT3 dépendant du LIF

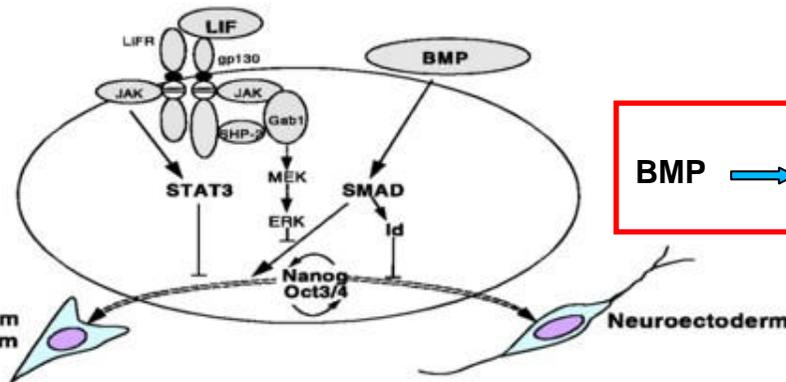
A



Apparition des facteurs de transcriptions

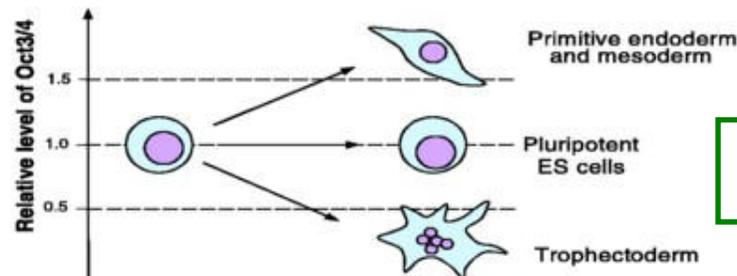
B

LIF → Bloque la différenciation in vitro



BMP → Favorise la différenciation mésodermique

C



Importance du taux de Oct 3/4 Dans le maintien de la pluripotence

**LES CELLULES SOUCHES
SONT IMPORTANTES**

PHYSIOLOGIE

MORPHOGENÈSE

RENOUVELLEMENT

RÉPARATION

RÉGÉNÉRATION

PATHOLOGIE

TUMEURS BÉNIGNES

TUMEURS MALIGNES (CANCER)

TOXICOLOGIE

THÉRAPEUTIQUE

PHARMACOLOGIE

THÉRAPIE CELLULAIRE

THÉRAPIE GÉNIQUE

LES DEUX TYPES de CELLULES SOUCHES

1) Cellules souches embryonnaires

2) Cellules souches adultes

CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES (ES)

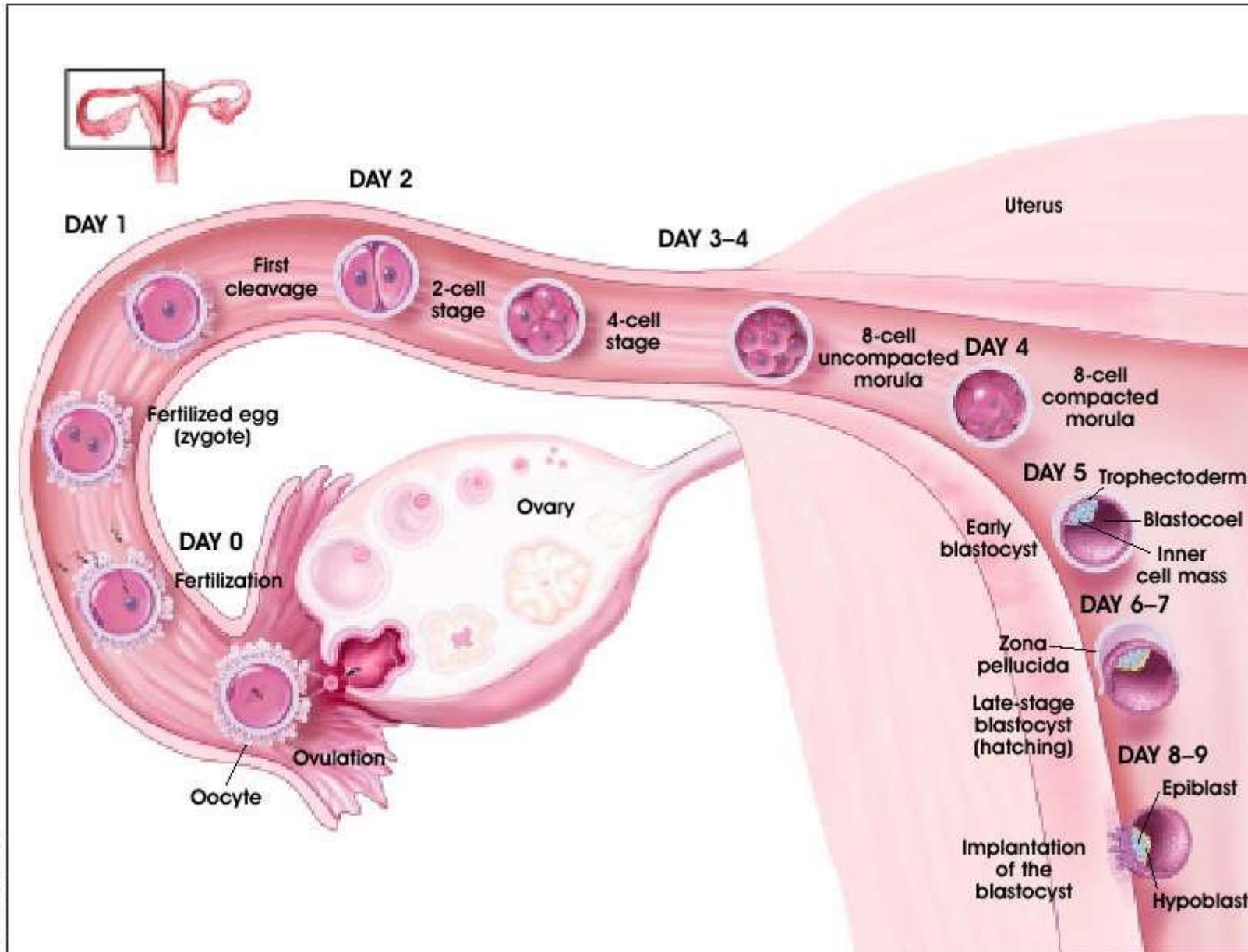


Figure A.2. Development of the Preimplantation Blastocyst in Humans.

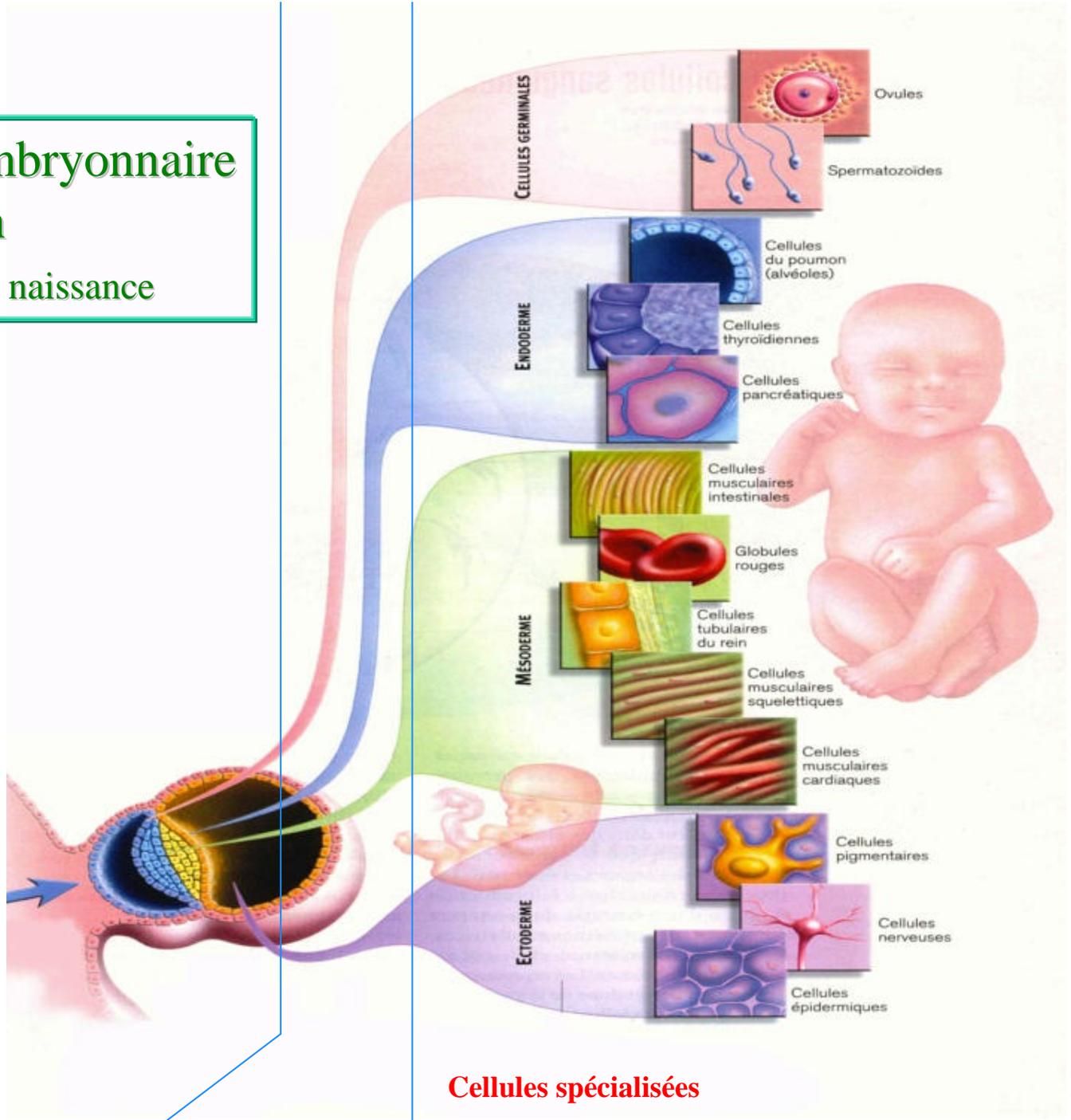
Développement Embryonnaire Humain

du Blastocyste à la naissance

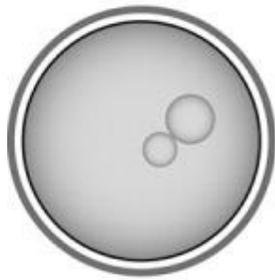
8-9 jours

Nidation

Cellules multipotentes



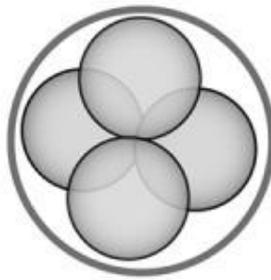
Cellules spécialisées



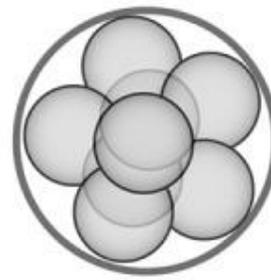
œuf fécondé



2 cellules



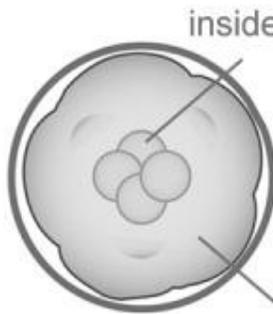
4 cellules



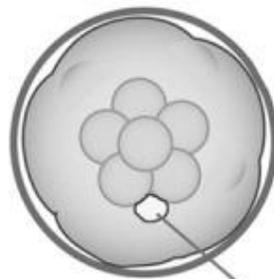
8 cellules



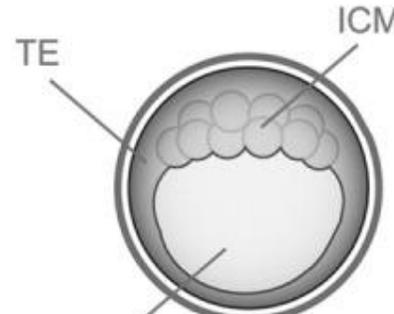
8 cellules compactes
Morula précoce



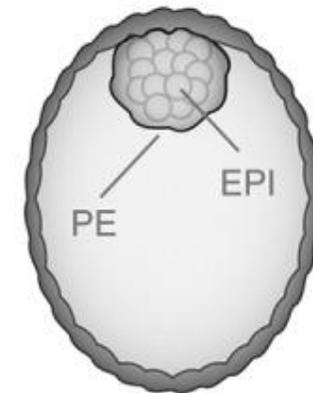
16-32 cellules
Morula



Morula tardive



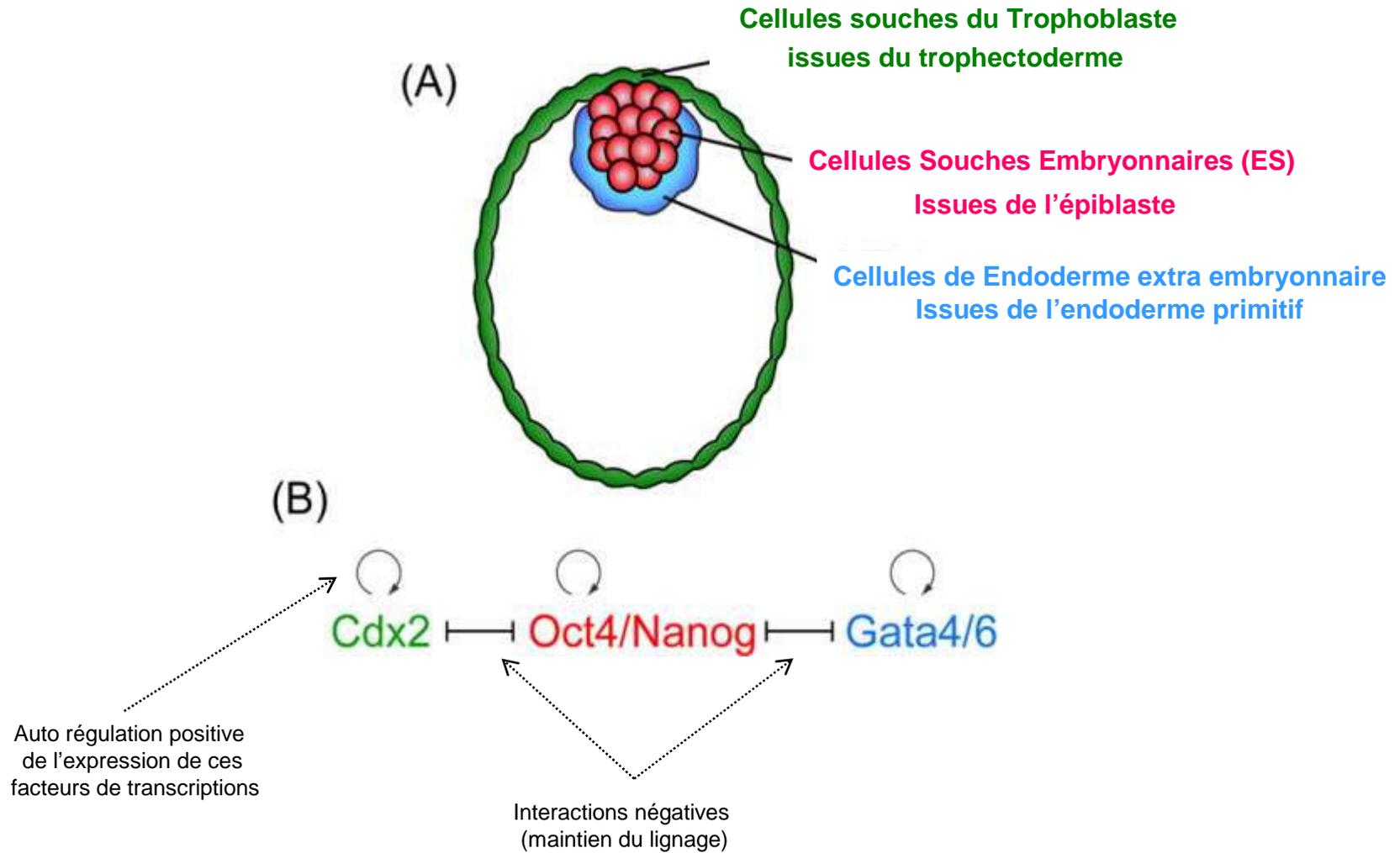
Blastocyste précoce



Blastocyste tardif

TE : Trophectoderme
 ICM : Masse des cellules internes
 EPI : Epiblaste
 PE : Endoderme primitif

Cellules souches du blastocyste

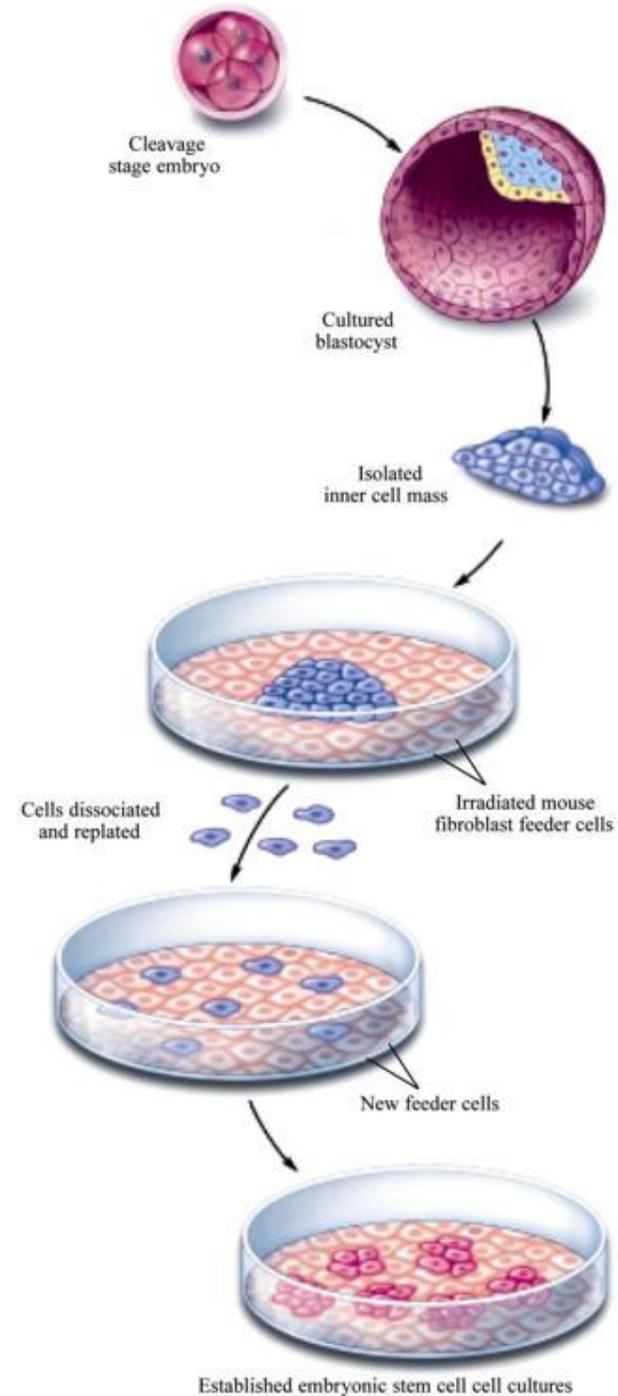


PROPRIETES DES CELLULES ES

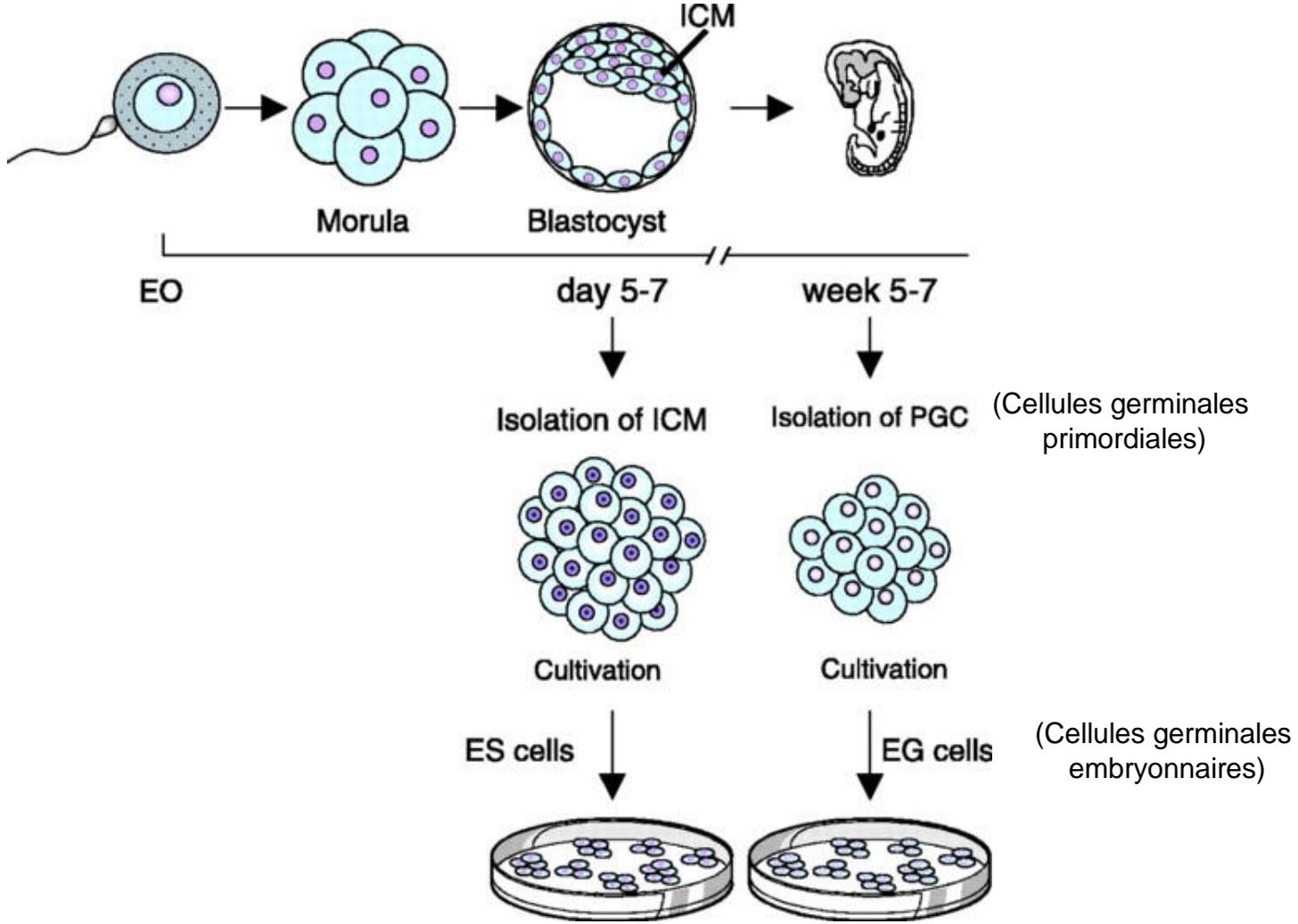
- 1. Origine blastocyttaire (IMC)**
- 2. Autorenewement sans différenciation**
- 3. Expriment le facteur de transcription Oct-4 (responsable du caractère prolifératif des ES sans différenciation)**
- 4. Maintien d'un caryotype stable**
- 5. Pluripotentes**
- 6. Intégration dans tous les types de tissus fœtaux au cours du développement (formation de chimères)**
- 7. Capables de coloniser la lignée germinale**
- 8. Elles sont clonogéniques**
- 9. La prolifération ou la différenciation peuvent être induites**
- 10. Absence de « Check point » G1 dans le cycle cellulaire (ES principalement en phase S du cycle cellulaire, pas de stimulus externe requis pour initier la replication d'ADN)**
- 11. Absence d'inactivation du chromosome X (à l'inverse de ce qui est observé dans les cellules somatiques de mammifères femelles)**

ETABLISSEMENT D'UNE LIGNÉE DE CELLULES ES

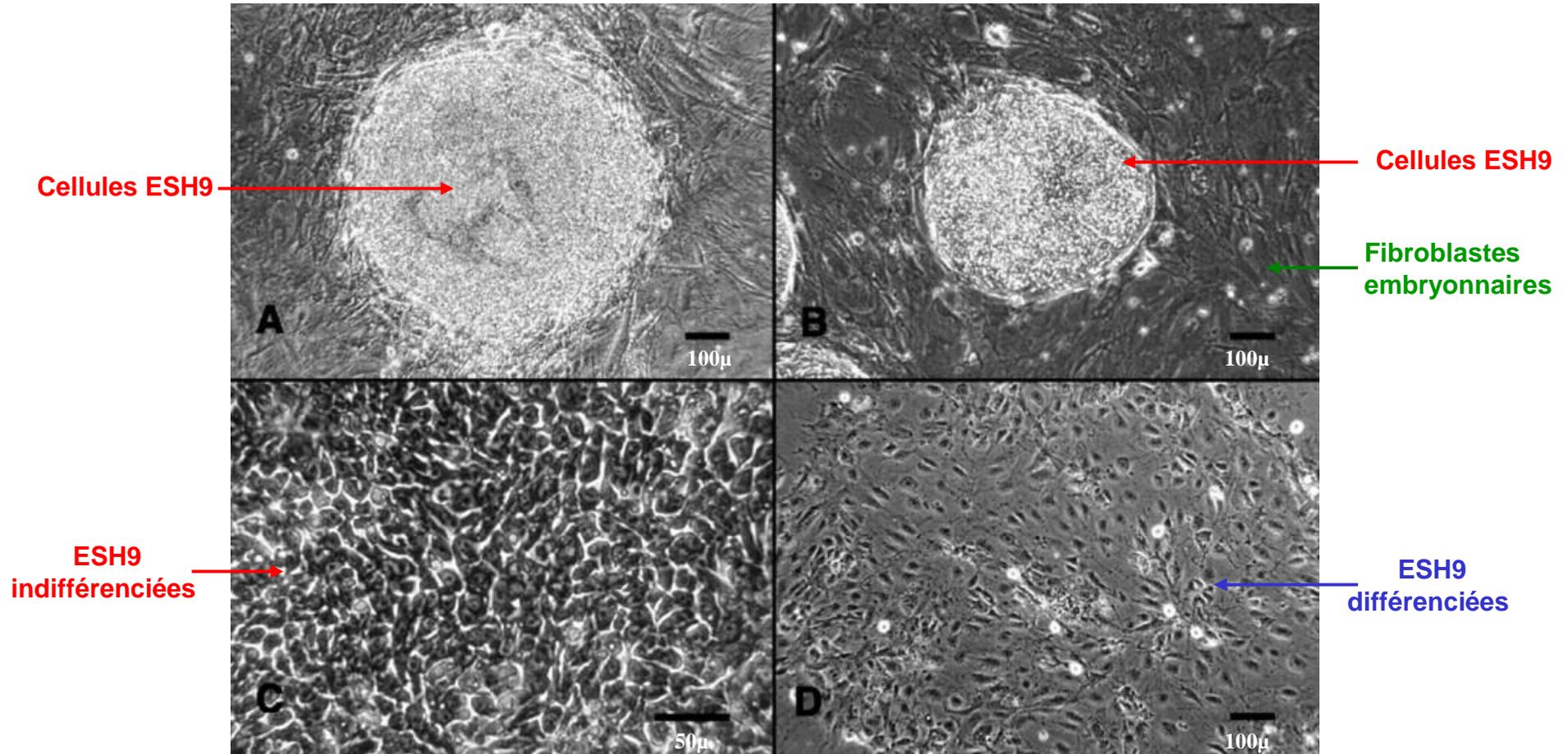
Rôle important des cellules nourricières et du milieu de culture (LIF) pour maintenir la prolifération en absence totale de différenciation.



Etablissement in vitro de lignées de cellules ES et EG humaines pluripotentes



Cellules souches embryonnaires humaines



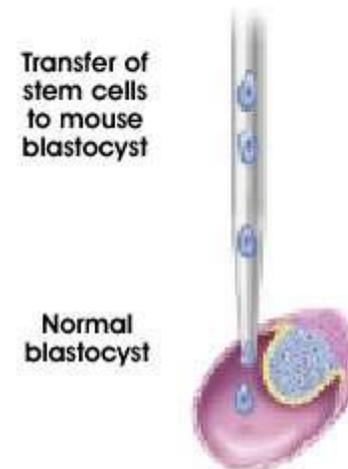
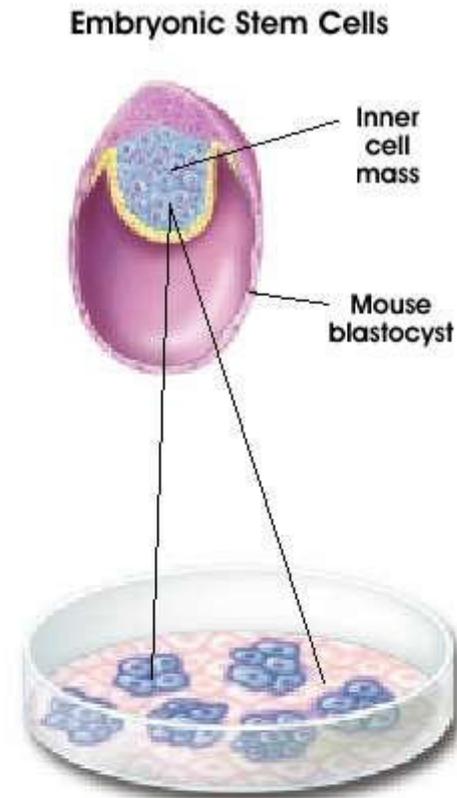
LIGNEES de CELLULES ES DISPONIBLES

- Murines
- Singe
- Homme (29 lignées établies)

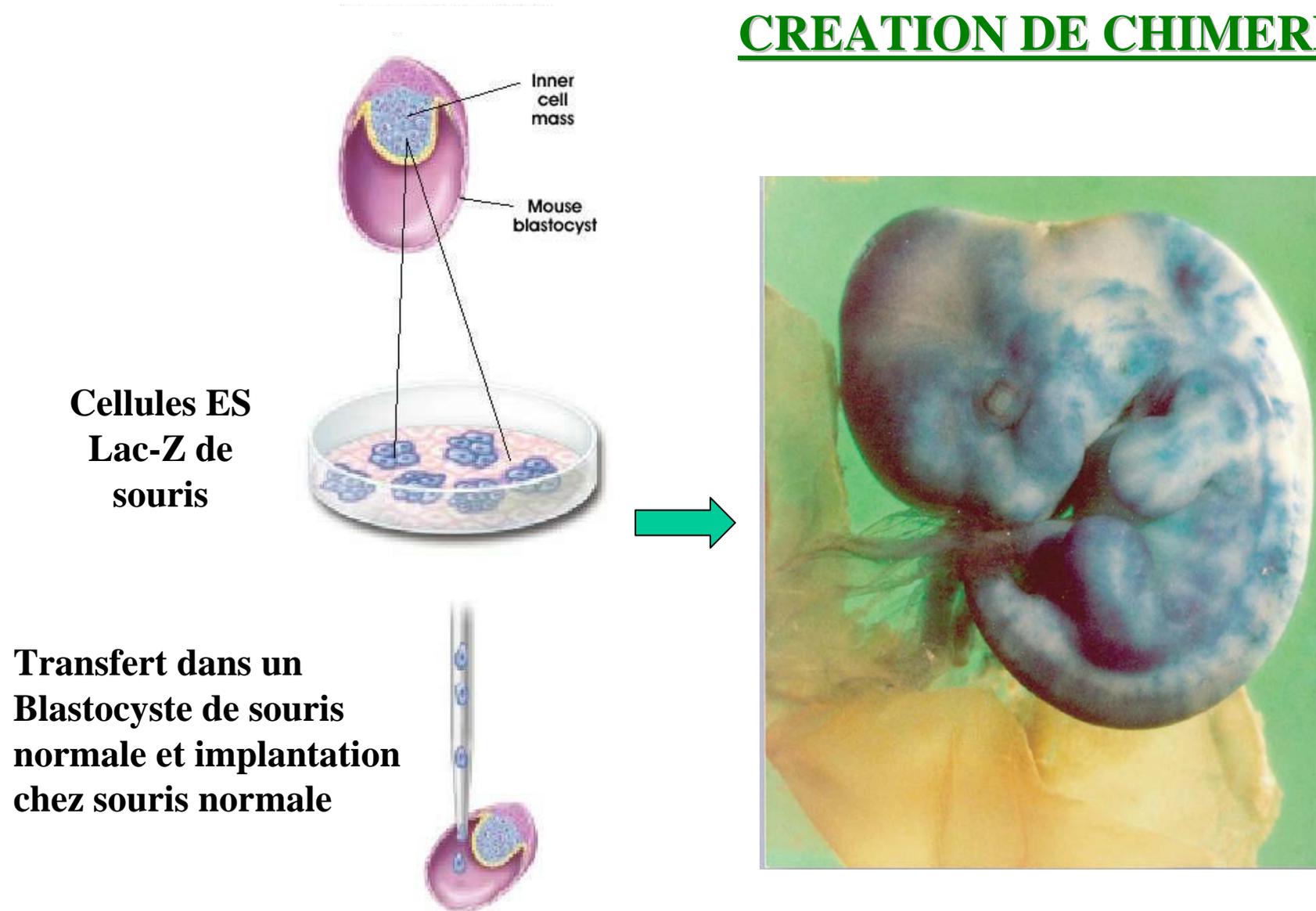
CONTRÔLE DE LA PLURIPOTENCE DES ES

3 méthodes expérimentales:

1. Création de chimères
2. Induction de tératomes
3. Différenciation in vitro

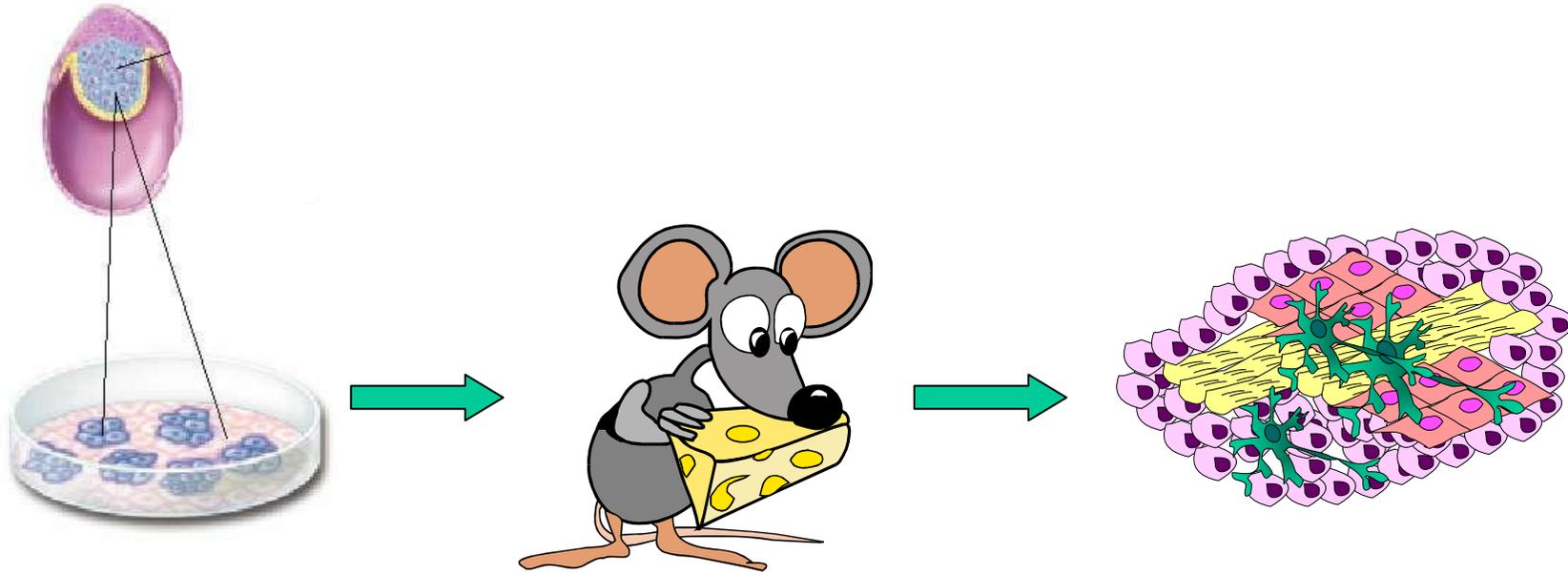


CREATION DE CHIMERES

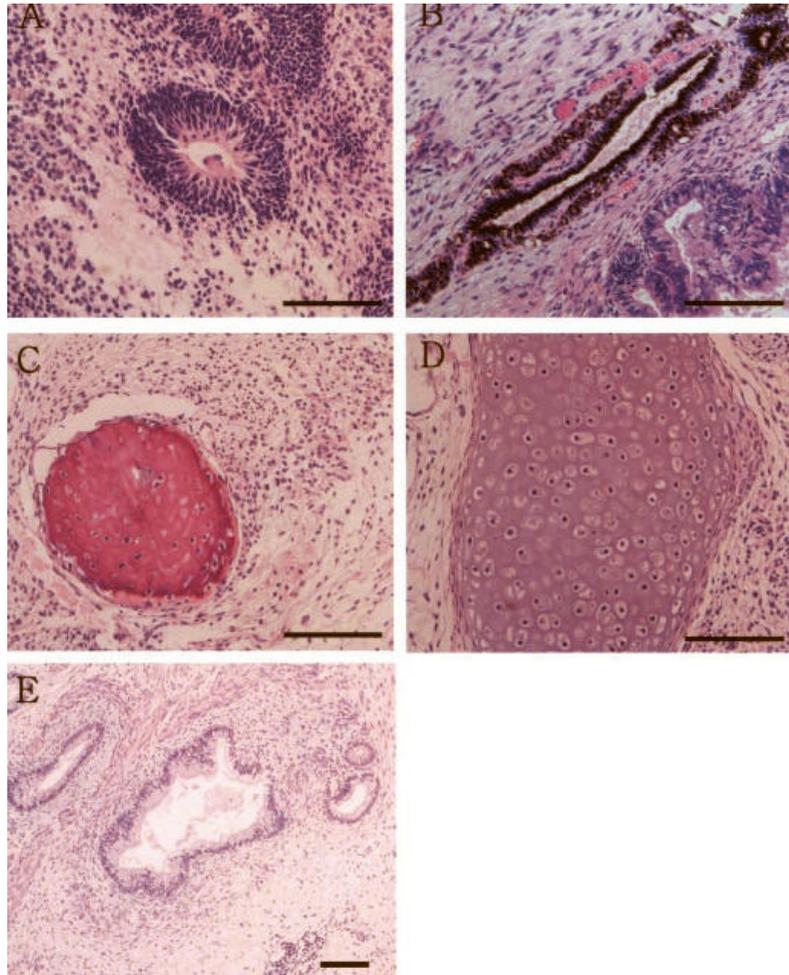


A.Smith, Annu Rev Cell Dev Biol. (2001), 17, 435

INDUCTION DE TERATOMES



Tératomes induits par injection de cellules souches humaines chez la souris SCID



Teratomas formed by humanSCNT ES cells In the testes of SCID mice at 12 weeks after injection.

Neuroepithelial rosette (A), pigmented retinal epithelium (B), ostoid island showing bony differentiation (C), cartilage (D), and glandular epithelium with smooth muscle and connective tissues (E). Scale bar, 100m.

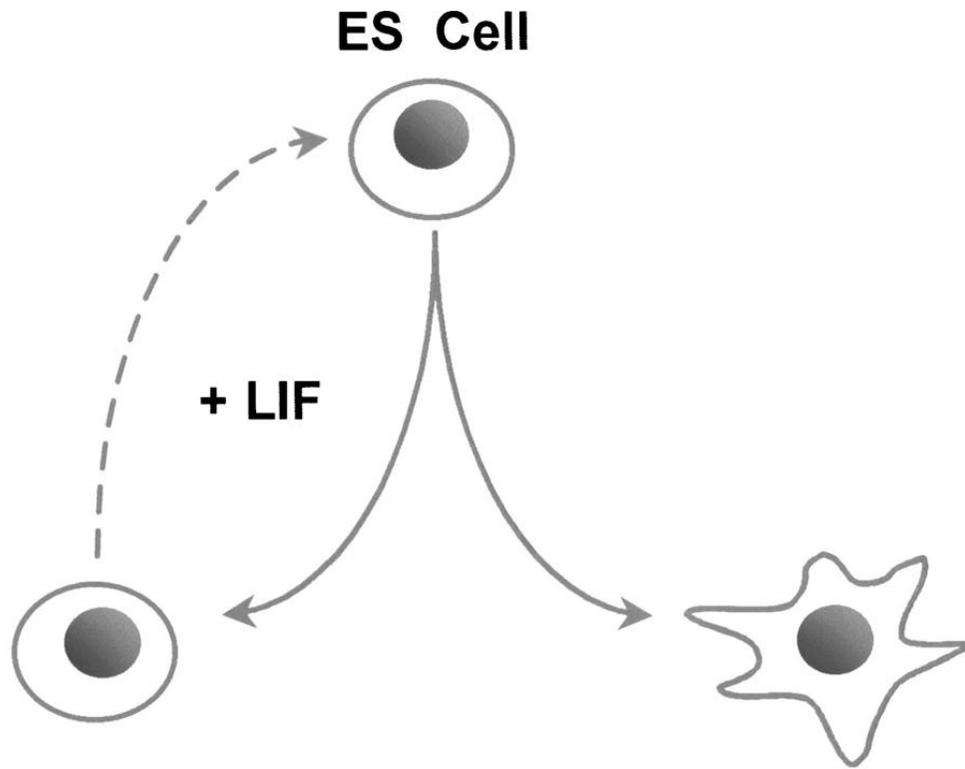
SCIENCE VOL 303 12 MARCH 2004

MARQUEURS des CELLULES ES

- 1) **Marqueurs de surface**, antigènes glycolipidiques : Stage-Specific Embryonic Antigen (SSEA)
 - SSEA1 : ES murines exclusivement
 - SSEA3 et SSEA4 : ES murines – ES Primates et ES humaines

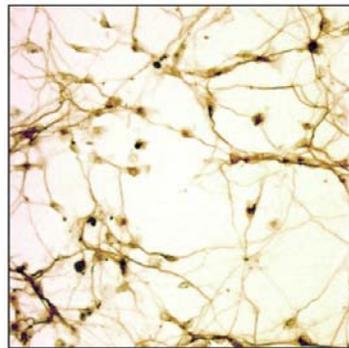
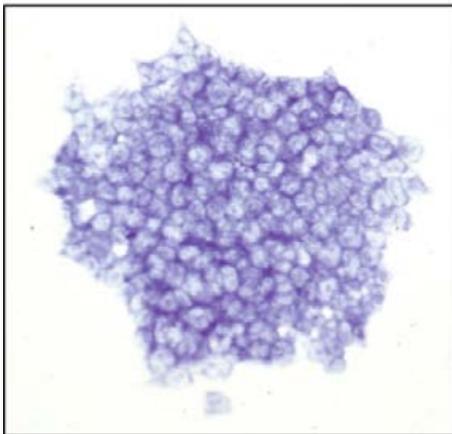
- 2) **Phosphatase Alkaline**

- 3) **Marqueurs spécifiques de pluripotence :**
 - Oct-4
 - Rex 1
 - Crypto

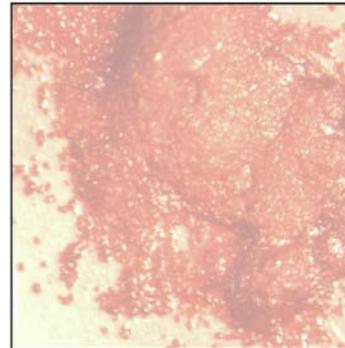


SELF-RENEWAL

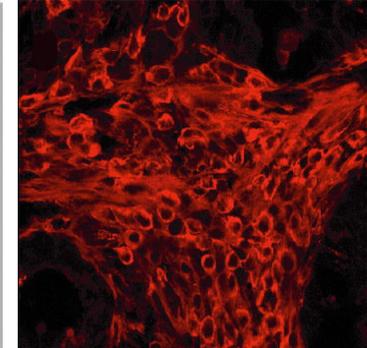
DIFFERENTIATION



ECTODERM

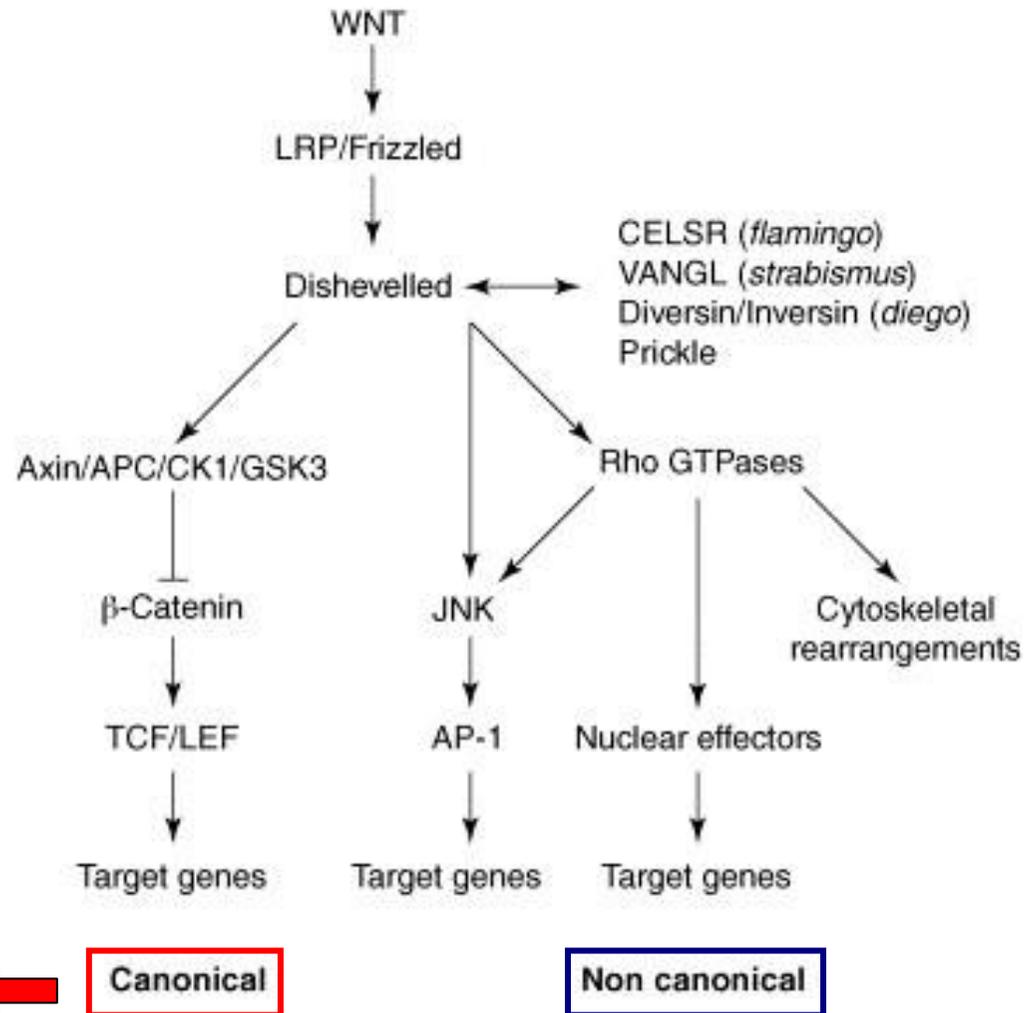
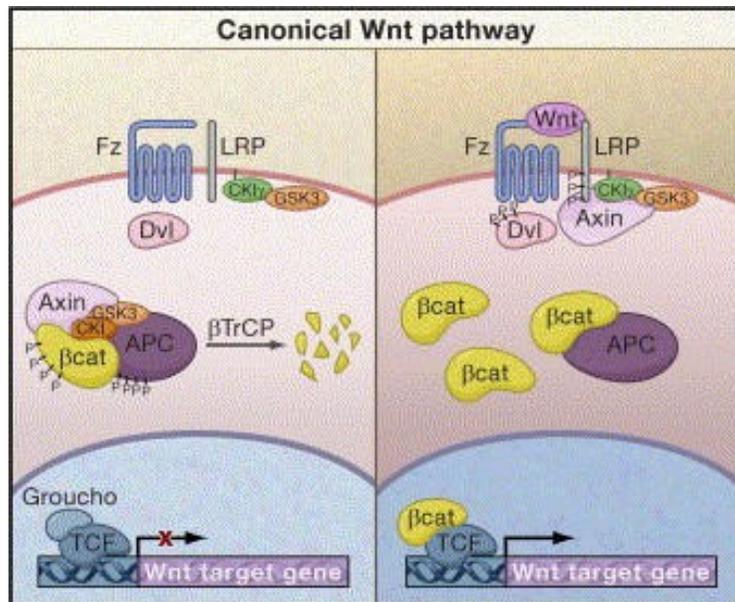
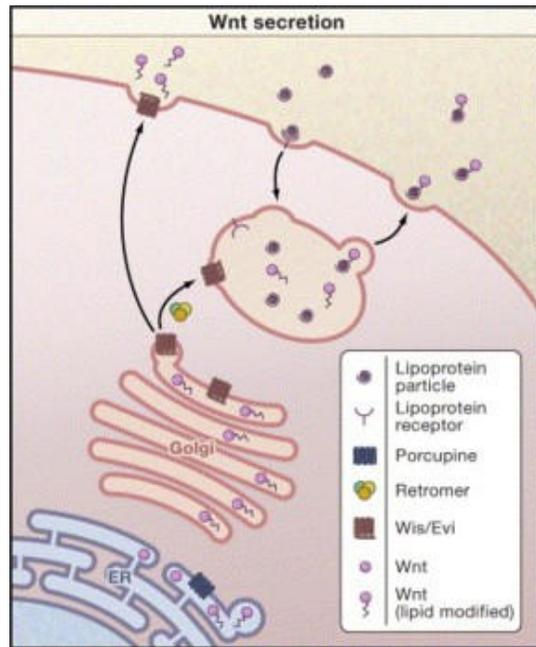


MESODERM

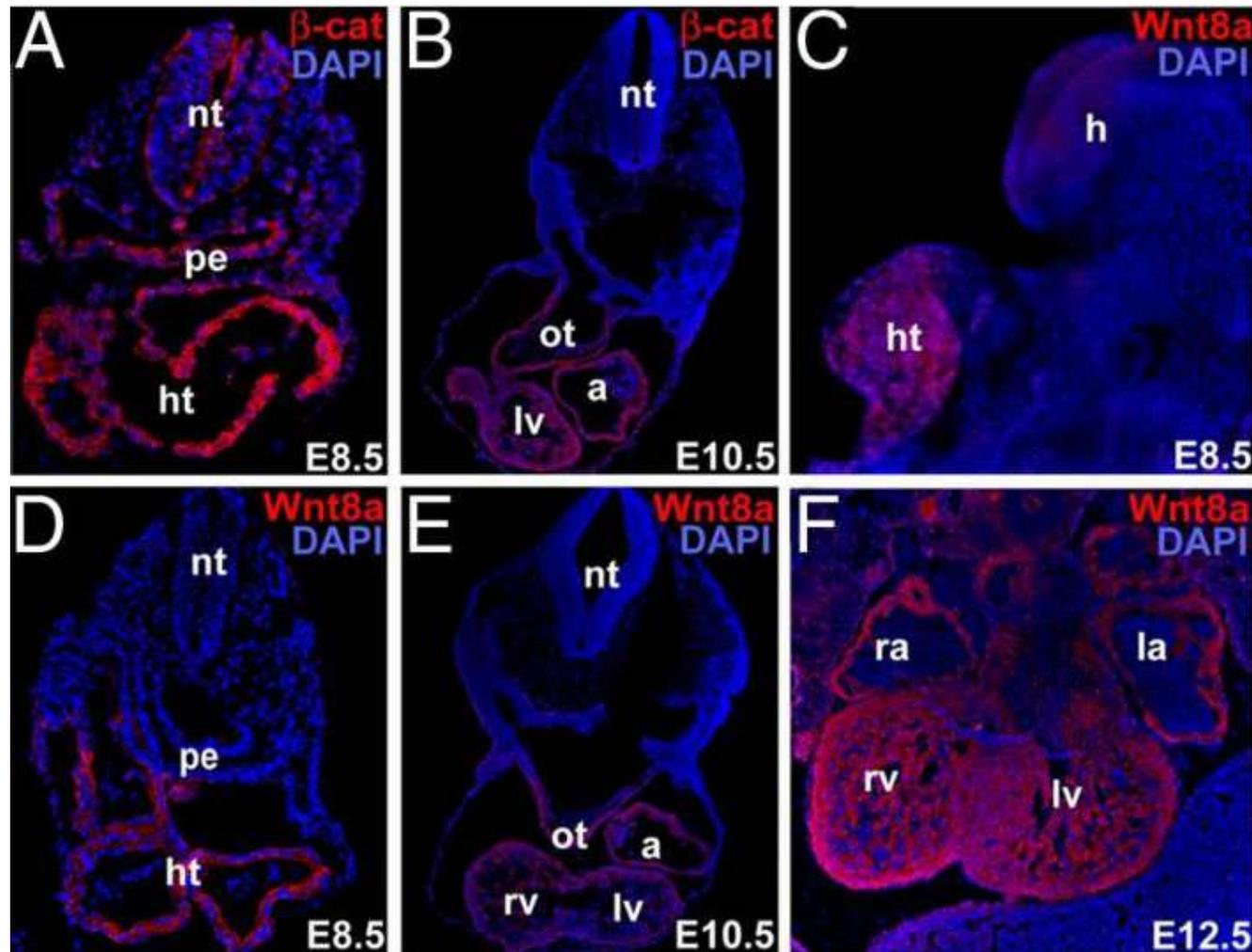


ENDODERM

Voies de signalisation de Wnt

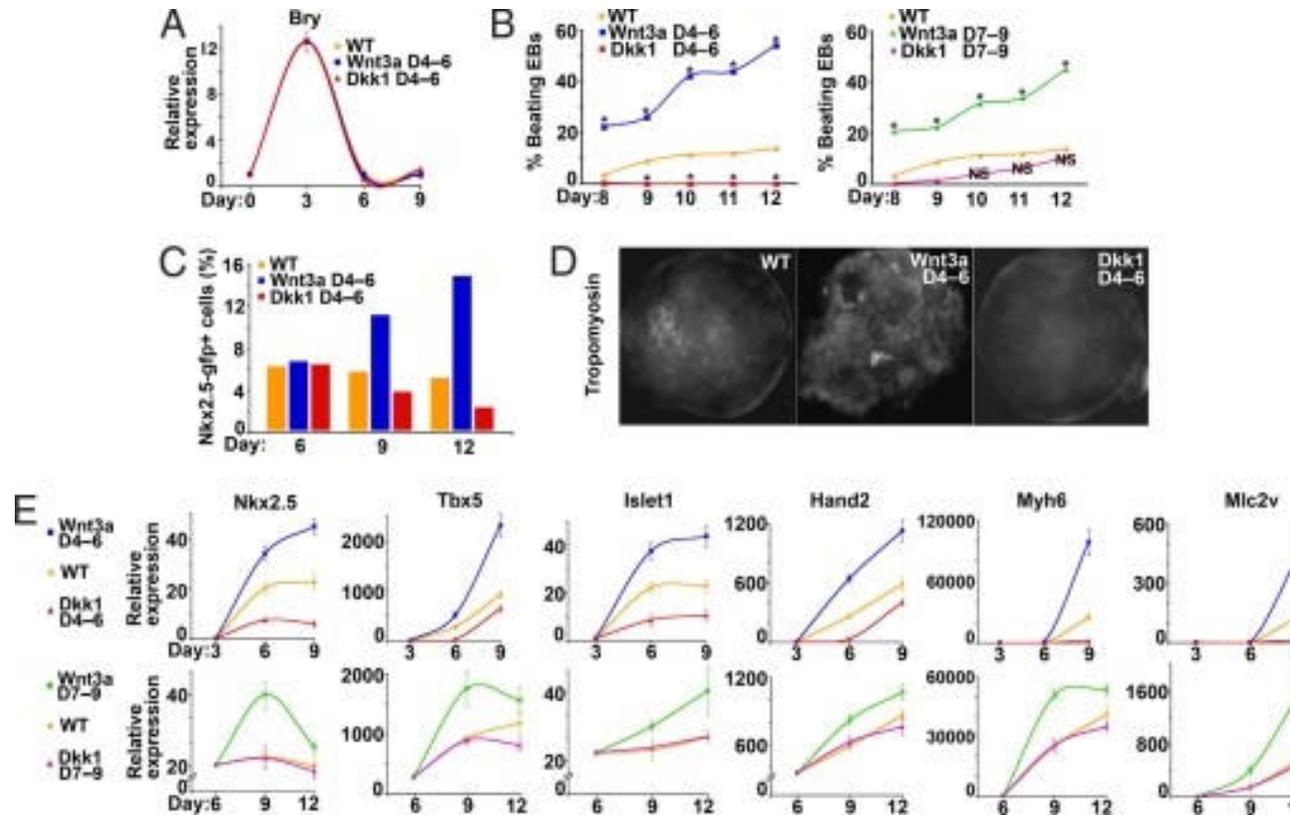


Wnt/ β -catenin dans le cœur embryonnaire



(A and B) Immunohistochemistry of mouse embryos for β -catenin protein (β -cat, red) at E8.5 (A) and E10.5 (B). (C) Lateral view of whole-mount immunostained E8.5 mouse embryo for Wnt8a (red) protein expression. (D–F) Immunohistochemistry with antibodies against Wnt8a (red) at E8.5 (D), E10.5 (E), and E12.5 (F). DAPI (blue) was used to counterstain the nuclei. All cryosections were transverse. a, atria; h, head; ht, heart tube; la, left atrium; lv, left ventricle; nt, neural tube; ot, outflow tract; pe, pharyngeal region of foregut endoderm; ra, right atrium; and rv, right ventricle.

Canonical Wnt régule l'expansion et la différenciation cardiaque des cellules ES



(A) Brachyury expression profiles, determined by quantitative real-time PCR (qPCR), of undifferentiated ESCs on day 0 and EBs harvested on days 3, 6, and 9 after early Wnt3a or Dkk-1 treatment compared with control. (B) Beating EBs grown in suspension were counted from days 8 to 12. Percentage of beating EBs after early (days 4–6) or late (days 7–9) treatment with Wnt3a or Dkk-1. Asterisks indicate significant difference in beating percentage of treatment groups versus untreated EBs ($P < 0.01$). (C) Percentage of Nkx2.5-gfp+ cells at days 6, 9, and 12 in untreated EBs or those treated with Wnt3a or Dkk1 from days 4–6. (Bars represent percent of Nkx2.5-gfp+ cells from 4×10^4 cells analyzed). (D) Immunohistochemistry of day12 EBs with anti-Tropomyosin. (E) Cardiac gene expression after early (days 4–6, *Upper*) or late (days 7–9, *Lower*) treatment with Wnt3a or Dkk-1. EBs were harvested on days 3, 6, and 9 (early treatment) or 6, 9, and 12 (late treatment). Fold change in expression of all indicated genes (y axis) in EBs with respect to undifferentiated ESCs was assessed by qPCR. NS, not significant. * , $P < 0.01$.

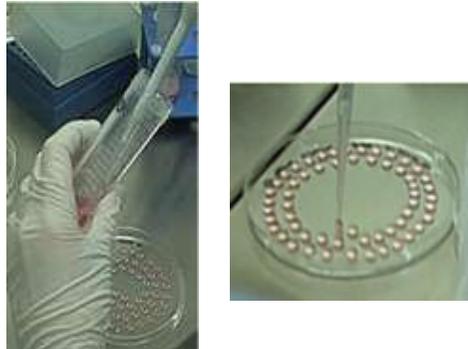
Types cellulaires produits in vitro à partir des ES

Type cellulaire

References

Endoderme sac vitellin	Doetschman et al. 1985
Mésoderme sac vitellin	Doetschman et al. 1985
Cellules hématopoïétiques	Doetschman et al. 1985, Nakano et al. 1996 Nishikawa et al. 1998, Wiles & Keller 1991
Précurseurs Lymphoïdes	Potocnik et al. 1994
Mast cell	Tsai et al. 2000
Cellules dendritiques	Fairchild et al. 2000
Cellules endothéliales	Risau et al. 1988, Yamashita et al. 2000
Cardiomyocyte	Doetschman et al. 1985, Maltsev et al. 1993
Musculaires striées	Rohwedel 1994
Muscle lisse	Yamashita et al. 2000
Adipocyte	Dani et al. 1997
Osteoblaste	Buttery et al. 2001
Chondrocyte	Kramer et al. 2000
Kératinocyte	Bagutti et al. 1996, Yamashita et al. 2000
Neurones	Bain 1995, Strubing et al. 1995
Astrocytes	Fraichard et al. 1995
Oligodendrocyte	Brustle et al. 1999, Liu et al. 2000

DIFFERENCIATION DES ES



Day -1

ES prolifération



Day 0

Hanging drop Culture



Day 1

EBs Formation



*2 days of
Hanging drop
cultures*



Day 2

EBs cultured in suspension



*EB at 5 days after
inducing differentiation*



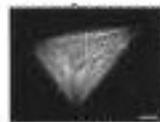
Day 5

Plating of EBs on gelatin coated dishes



Day 7

Spontaneously beating cardiomyocytes



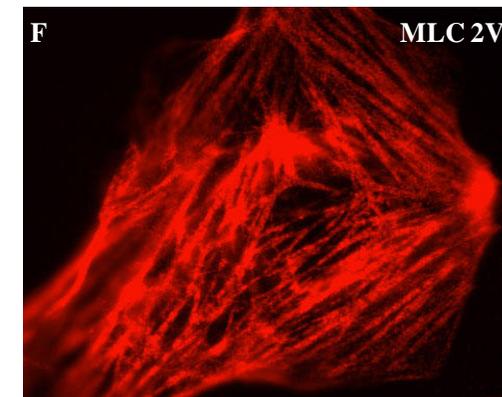
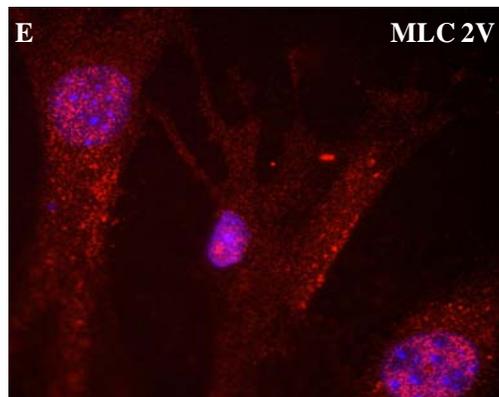
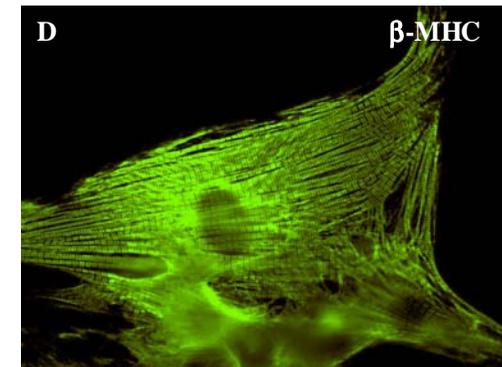
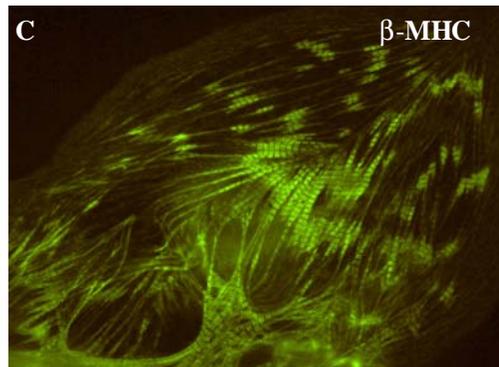
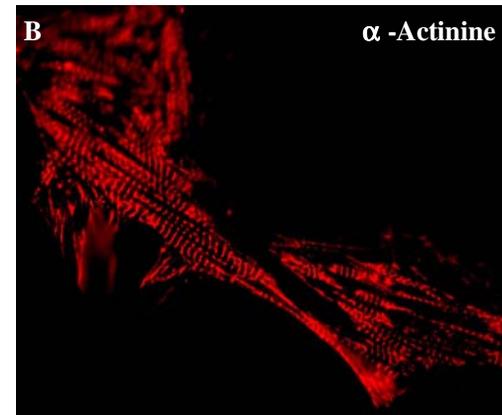
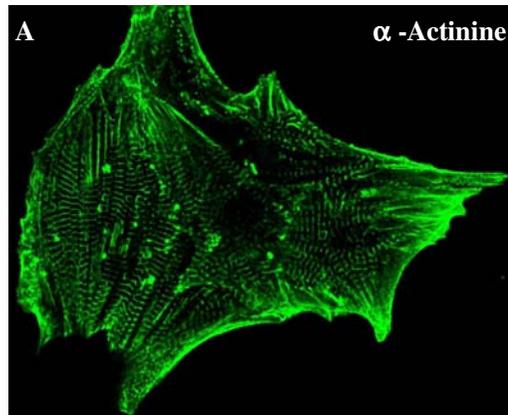
**Enzymatic isolation and
purification of the
cardiomyocytes
(Percoll gradient)**



Day 12

11 jours de différenciation

15 jours de différenciation



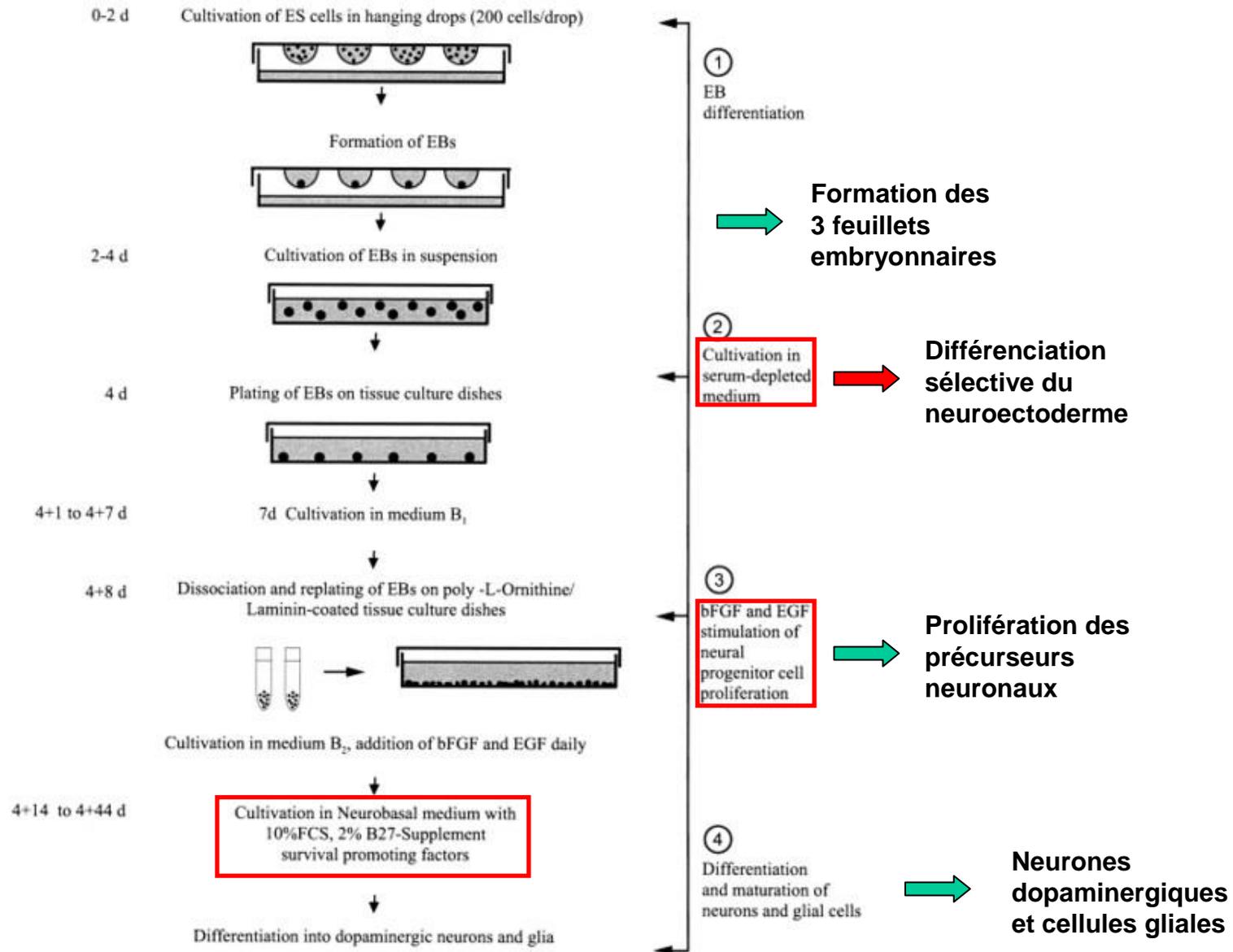
DIFFERENCIATION IN VITRO

Cellules ES + LIF  Autorenewement

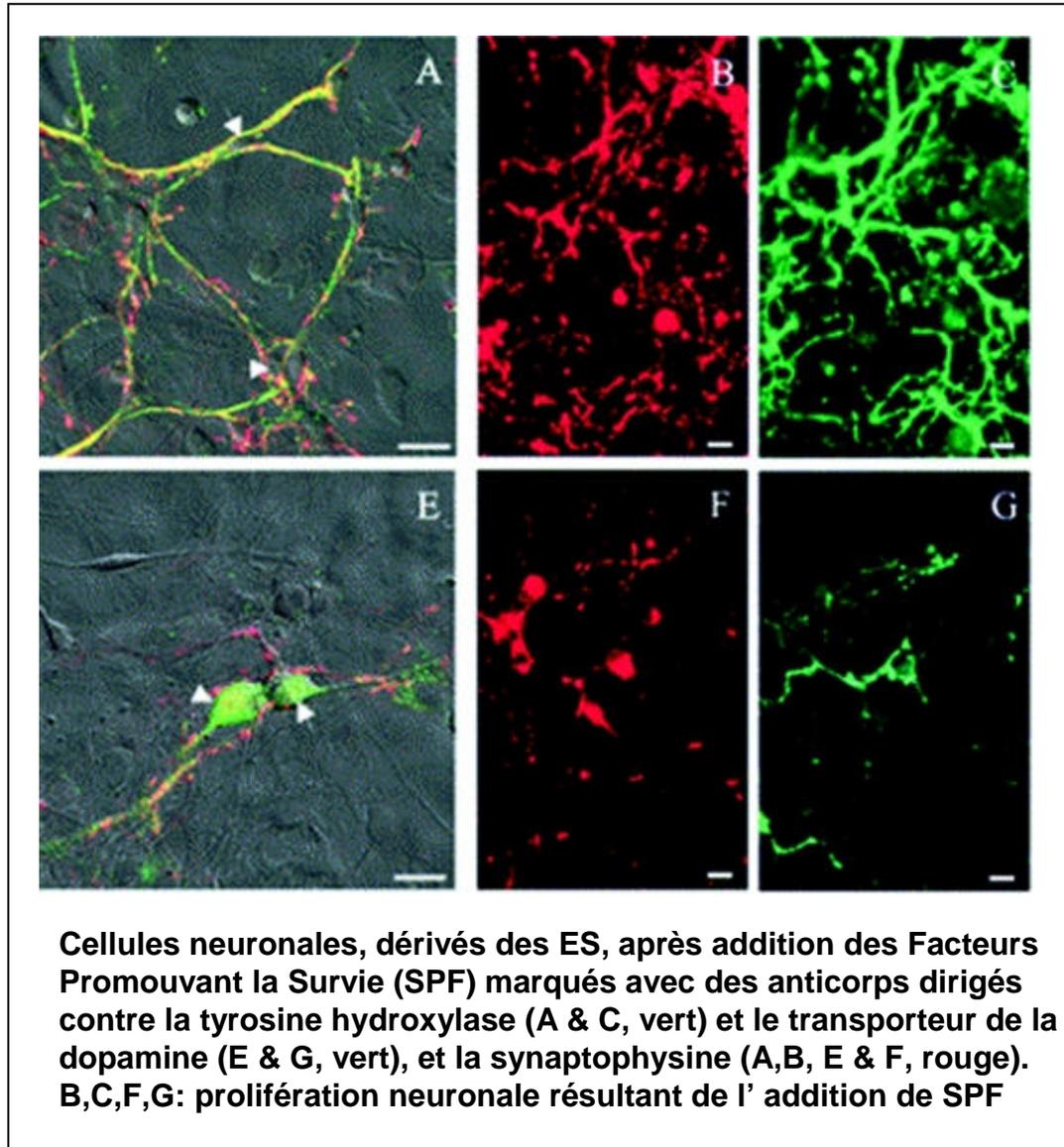
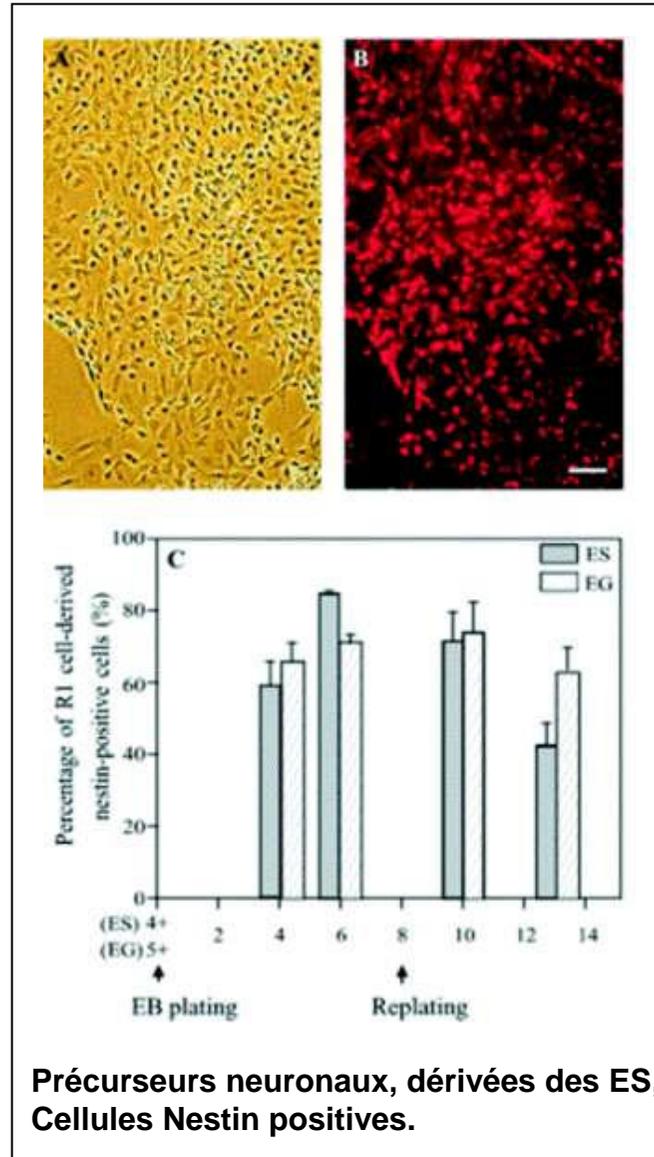
Cellules ES - LIF  Differentiation

La différenciation peut être spontanée ou induite vers une population cellulaire particulière par addition de facteurs spécifiques dans le milieu.

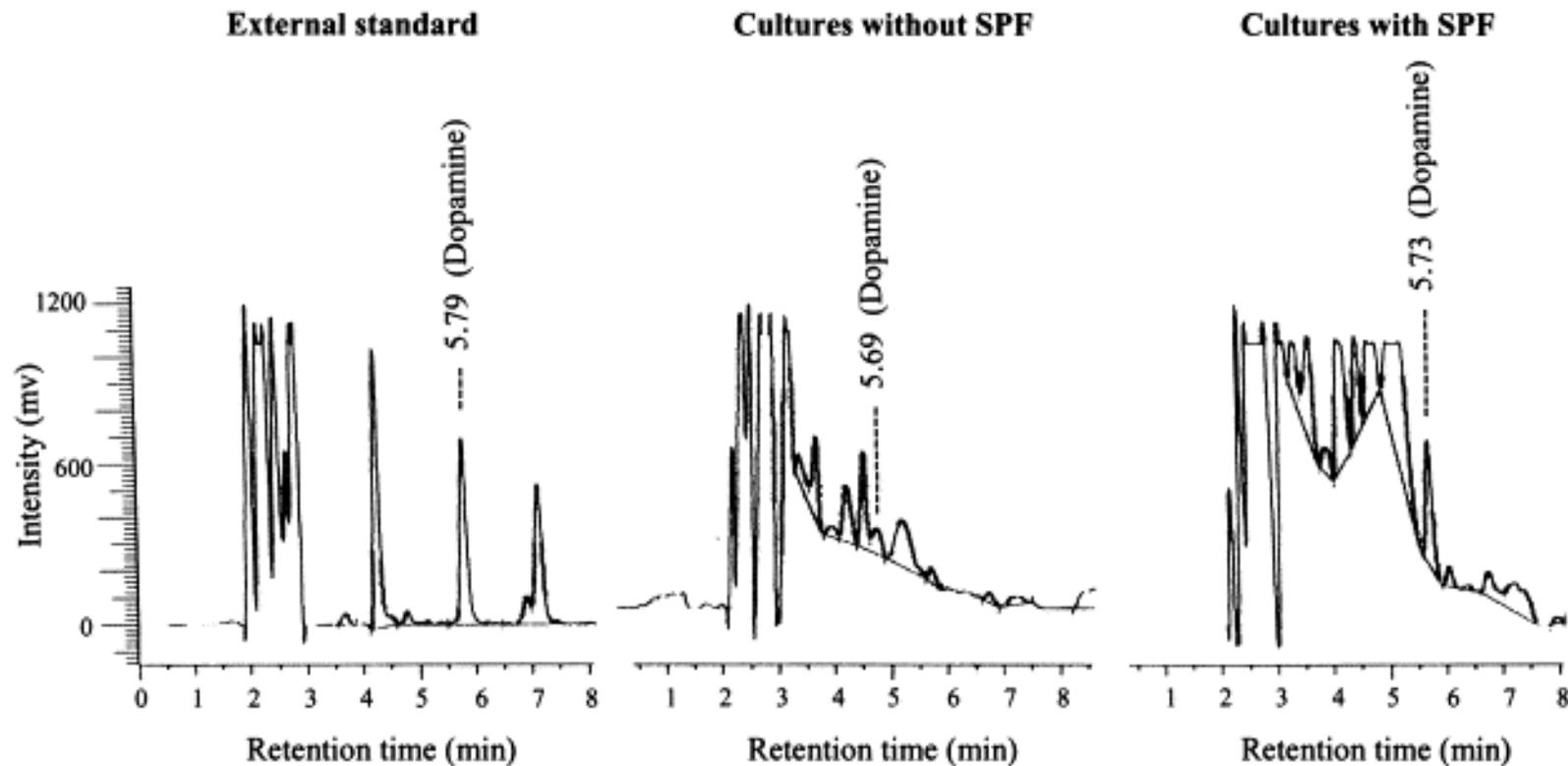
Différenciation *in vitro* des ES en neurones et cellules gliales: rôle des facteurs extracellulaires dans l'orientation de la différenciation



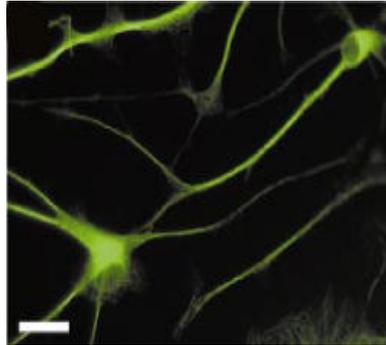
Caractérisation des Neurones dérivés des ES murines



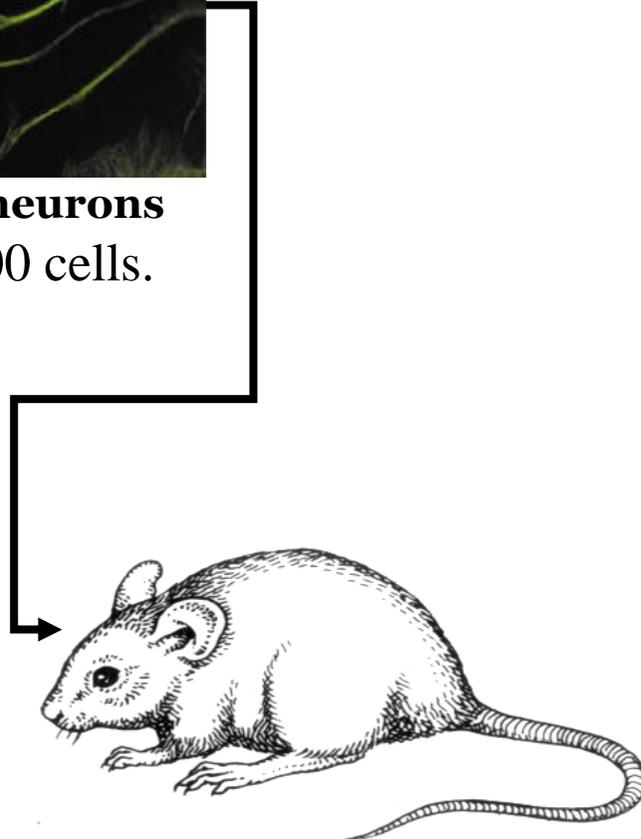
Effets des survival-promoting factors (SPF) sur les niveaux intracellulaires de dopamine dans les cultures neuronales dérivées des ES



Exemple: greffe des neurones (1)

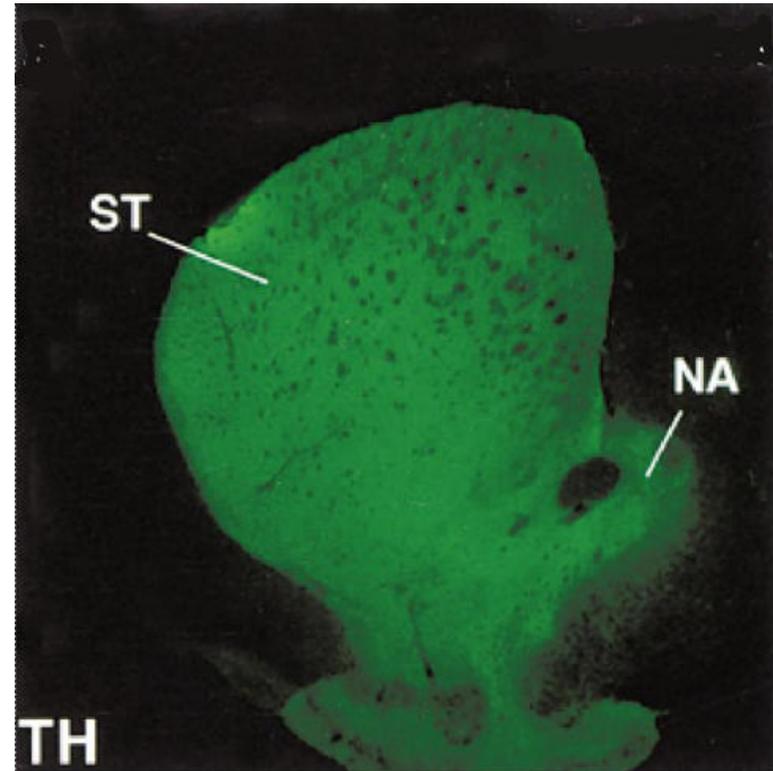


TH + neurons
400,000 cells.

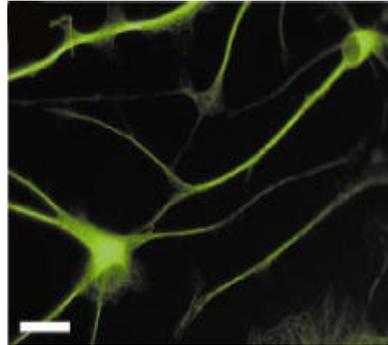


6 'OHDA-treated mouse
graft within the striatum 3 days after lesion

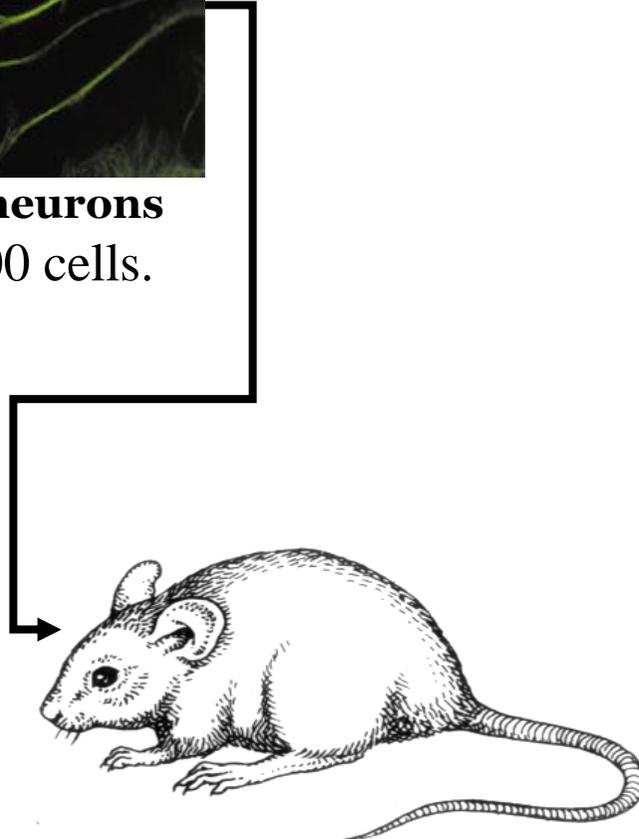
before lesion with 6 'OHDA



Exemple: greffe des neurones (2)

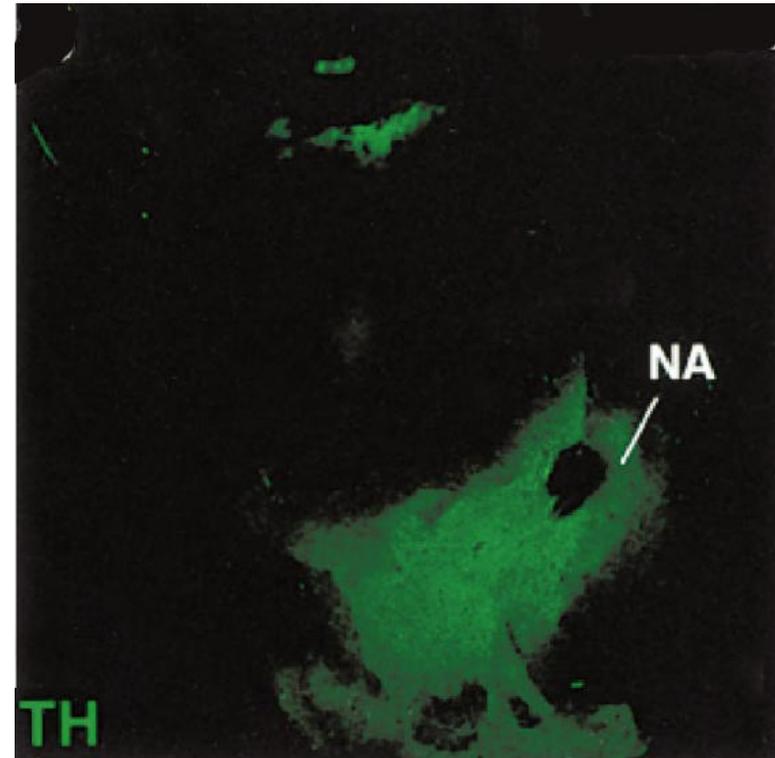


TH + neurons
400,000 cells.

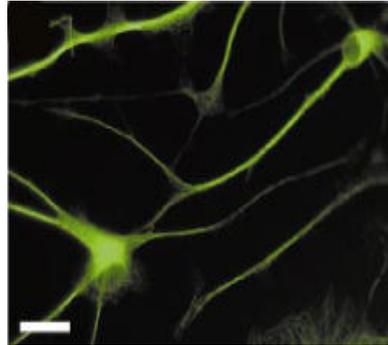


6 'OHDA-treated mouse
graft within the striatum 3 days after lesion

after lesion



Exemple: greffe des neurones (3)

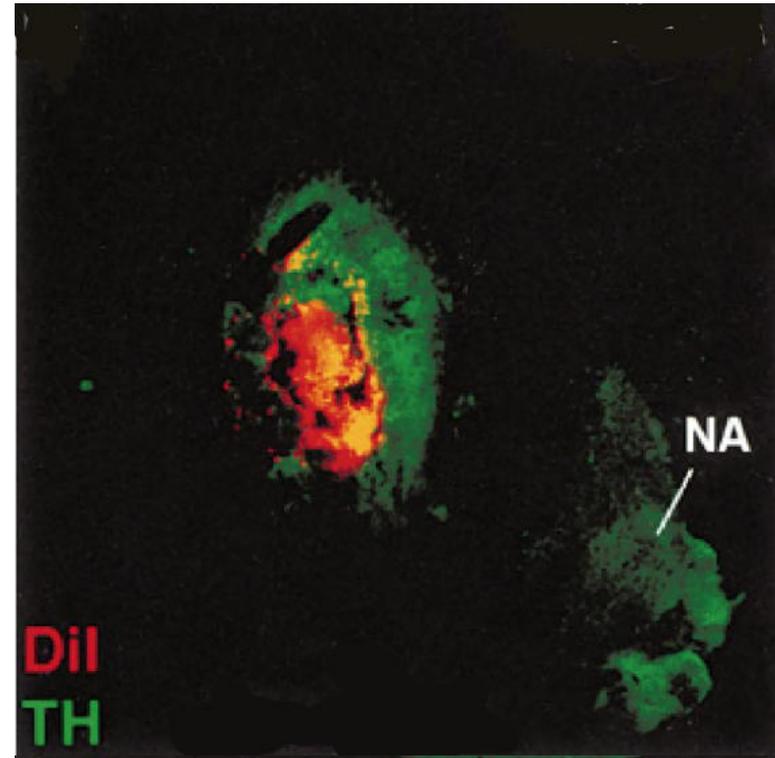


TH + neurons
400,000 cells.

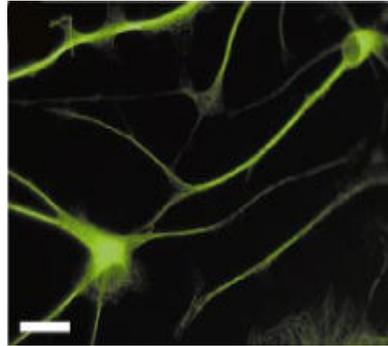


6 'OHDA-treated mouse
graft within the striatum 3 days after lesion

3 days post grafting



Exemple: greffe des neurones (4)

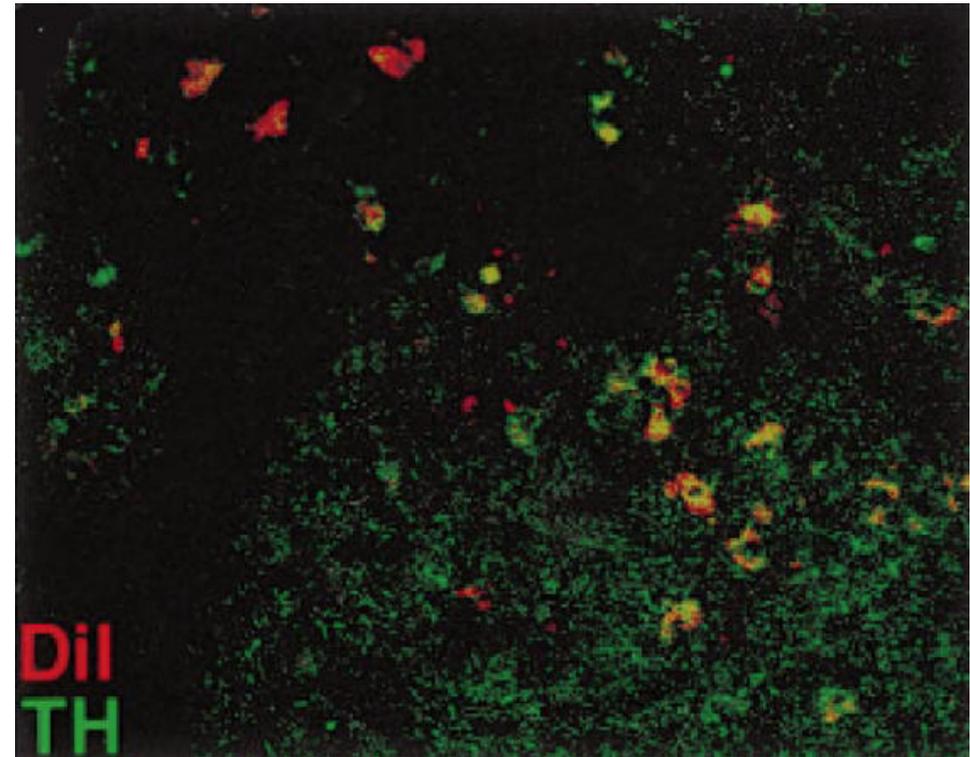


TH + neurons
400,000 cells.



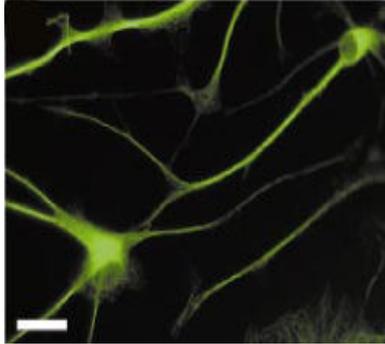
6 'OHDA-treated mouse
graft within the striatum 3 days after lesion

14 days post grafting

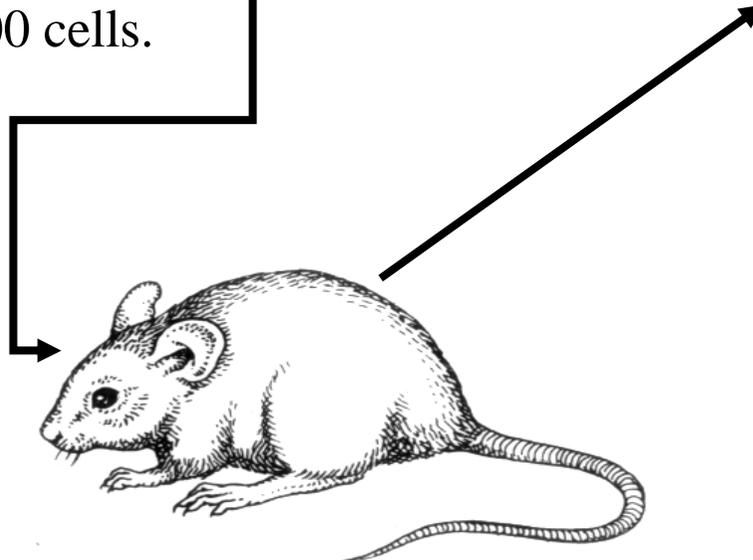


8% DiI +/ TH +

Exemple: greffe des neurones (5)

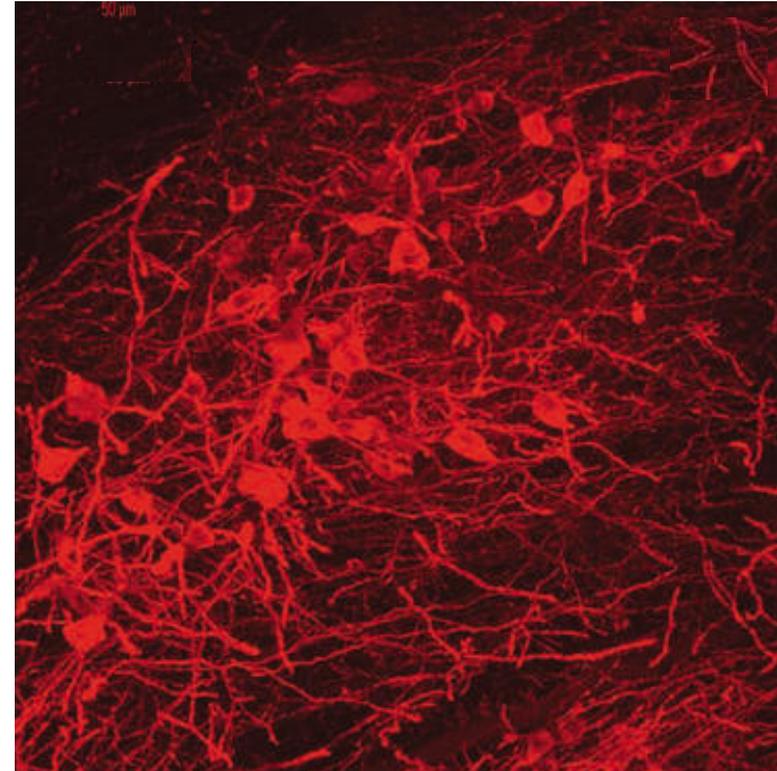


**TH + Nurr1-expressing
neurons**
400,000 cells.



6 'OHDA-treated rat
graft within the striatum 3 days after lesion

4-8 weeks after engraftment



Grefe de cardiomyocytes dérivés des ES restore la fonction contractile du myocarde infarci

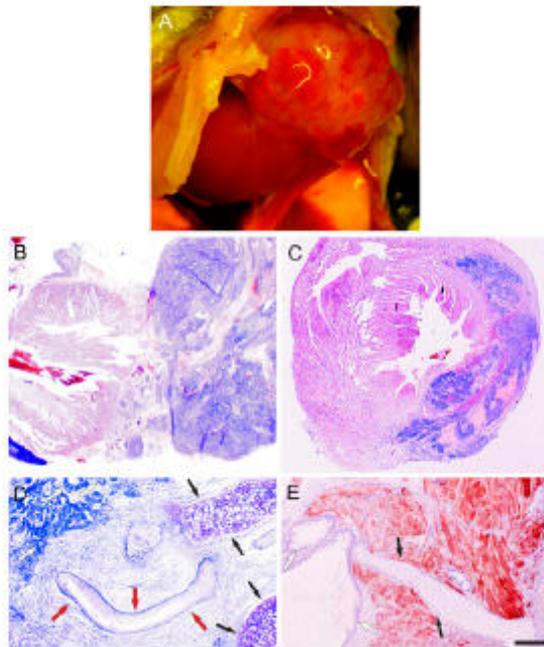
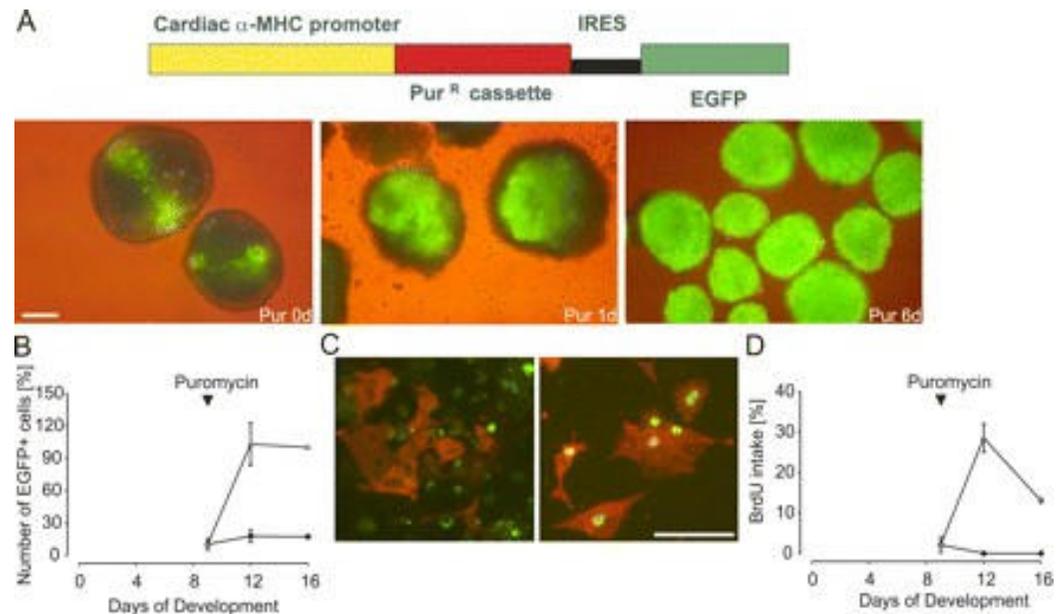
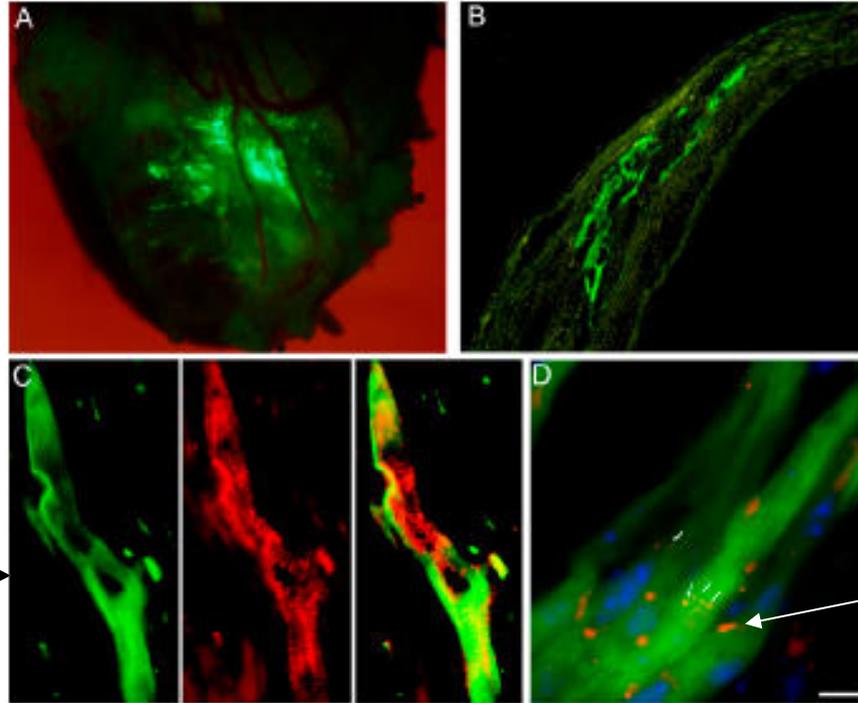


Figure 2. Teratoma formation after injection of undifferentiated ES cells and cut-out beating areas into the infarcted heart. (A) Opened mouse chest in situ. In the apical part of the heart, a large tumor mass was seen 68 d after injecting 10^5 cells obtained from EGFP⁺-beating areas of EBs. (B) Periodic acid Schiff-stained cross sections of this tumor showed exophytic tumor growth. (C) Mouse heart 31 d after injecting 10^5 undifferentiated ES cells. Hematoxylin and eosin staining of cross sections in this heart revealed intracardiac tumor distribution. (D) Periodic acid Schiff staining evidenced cartilaginous (closed arrows), squamous (red arrows), and glandular (open arrows) differentiation. (E) Combined desmin (red) and toluidine blue staining proved differentiated cartilage (closed arrows), mucous glandular (open arrows), and red-stained muscle tissue. Bars: (B and C) 250 μ m; (D and E) 150 μ m.



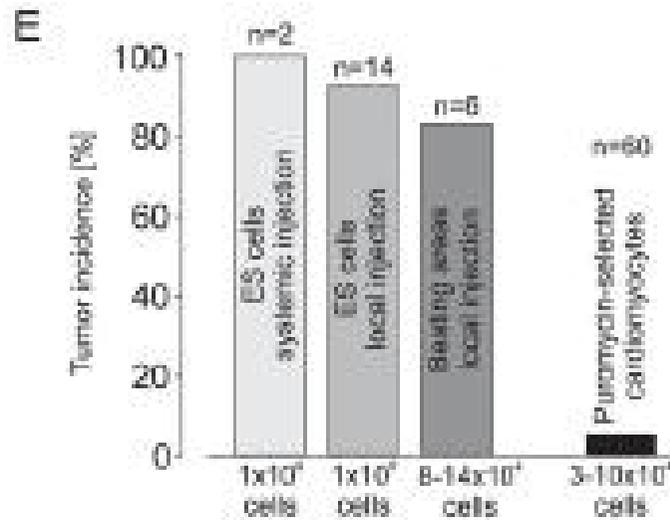
Greffon de cardiomyocytes marqués avec EGF dans cœur ischemié (40 jours après injection des cardiomyocytes



cardiomyocytes visibles dans section du cœur 60 jours après injection

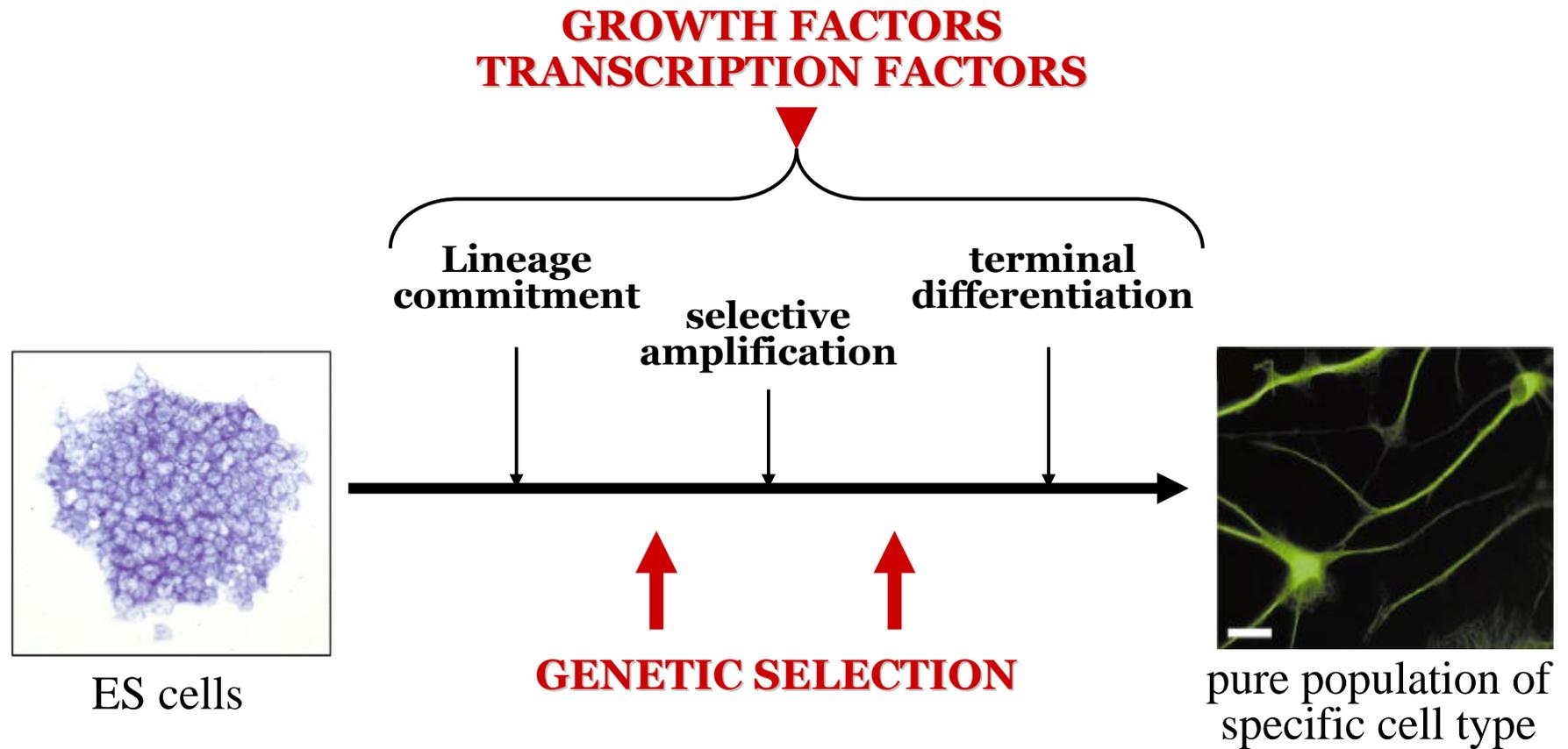
Marquage positif de α -actinine des cardiomyocytes EGF transplantés

Formation de connexions intercellulaires. Marquage de la Connexine 43



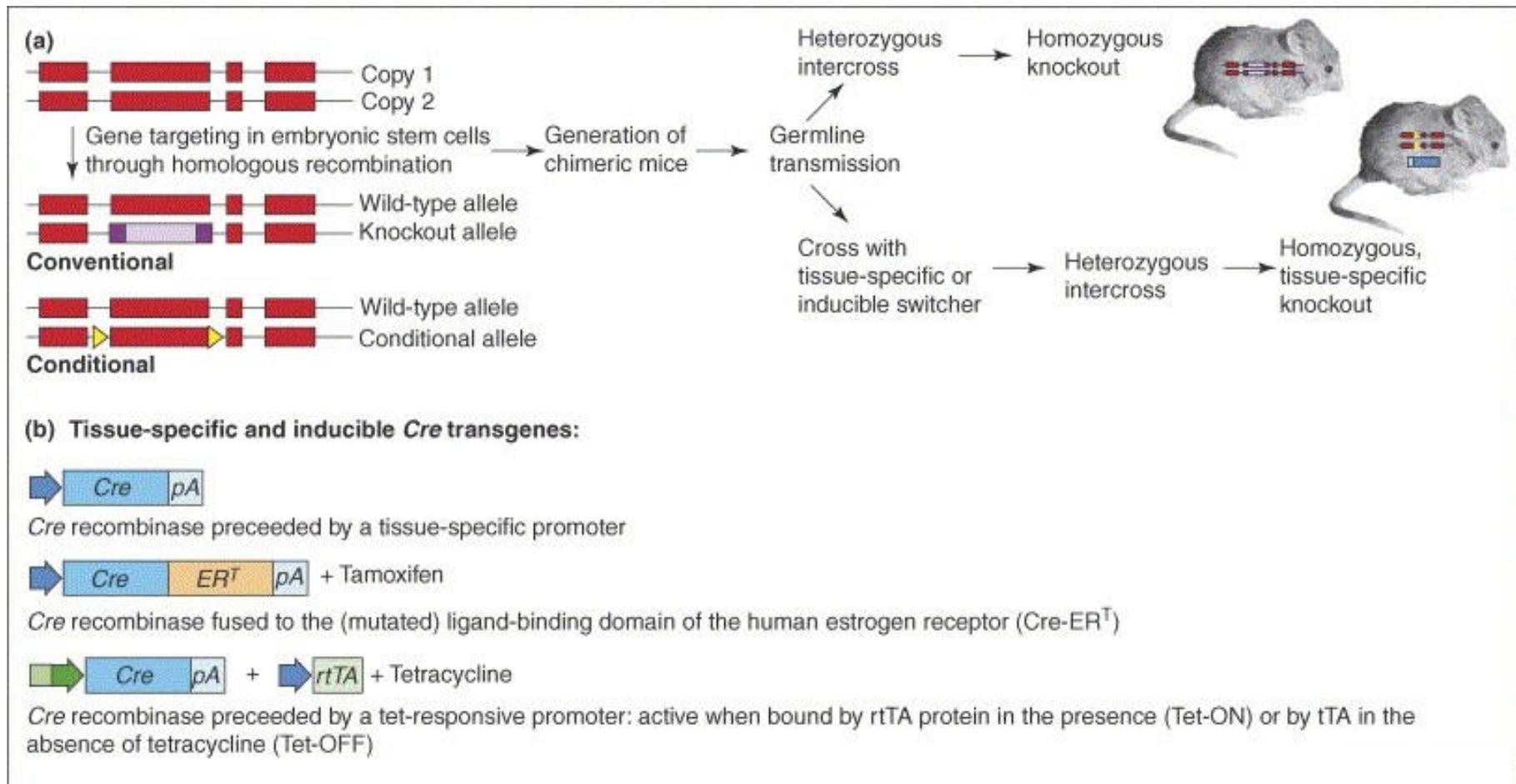
Incidence tumorale extrêmement faible après 5 mois, liée à la présence de ES indifférenciées lors injection

Contrôle de la différenciation des cellules ES en une population cellulaire définie

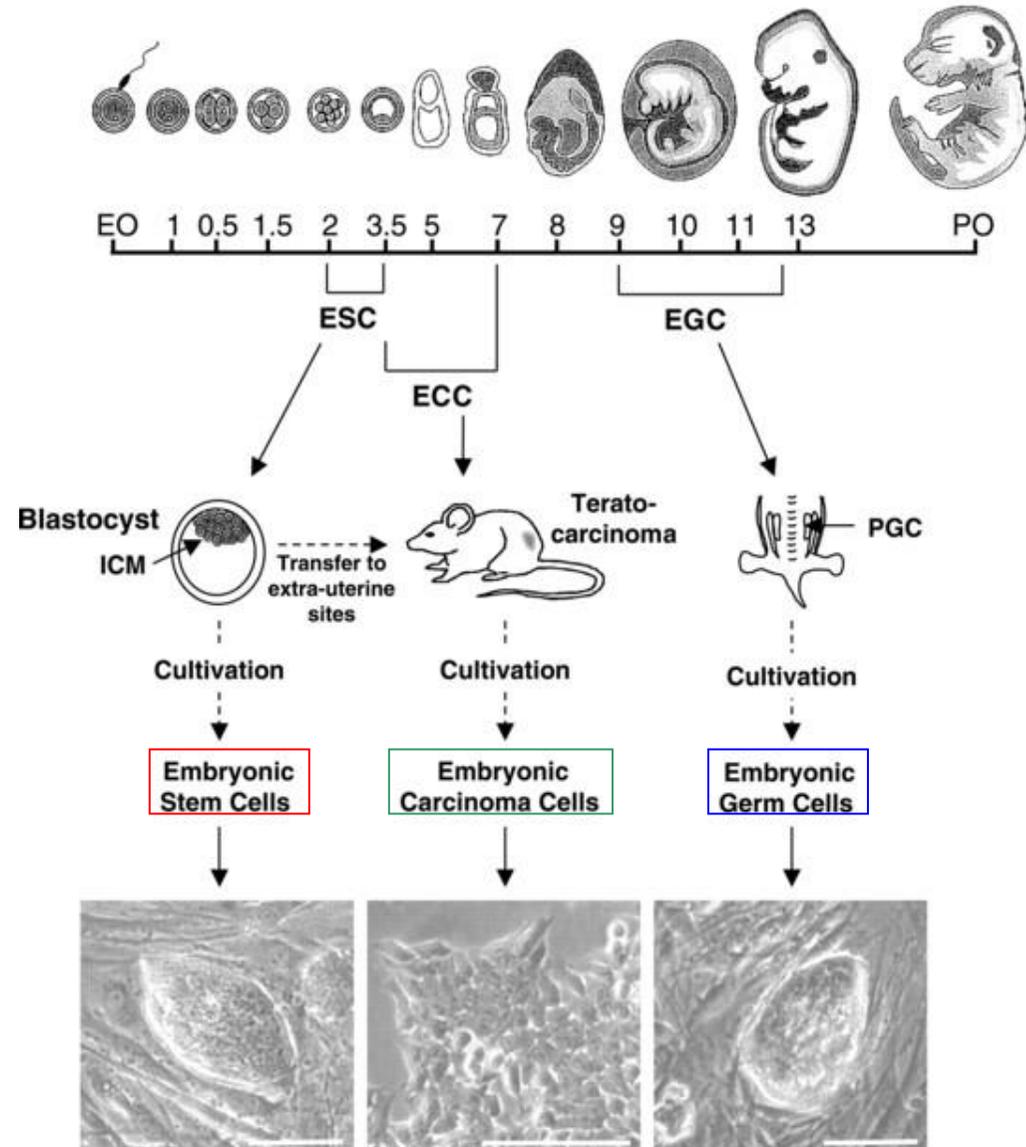


ES & cellules dérivées de ES	Site de la transplantation
Cardiomyocytes (m)	Myocardium of dystrophic mice
RA-induced GABAergic neurons (m)	Rat striatum: integration
Neural progenitors (m)	Embryonic rat ventricles Rat striatum: integration Mouse cerebrum: integration
FACS-sorted postmitotic neurons (m)	Telencephalic vesicle of embryonic rat: integration
Glial precursors (m)	Myelin-deficient rat (Pelizaeus-Merzbacher disease): integration and function
RA-induced neurons (m)	Injured rat spinal cord: function
Motor neurons (m)	Chicken spinal cord: integration and muscle innervation
Midbrain dopaminergic neurons (m)	Parkinson rat model: function
Neural progenitors (h)	Mouse brain ventricles Neonatal mouse brain: integration
Insulin-producing cells (m)	Streptozotocin-treated diabetic mice: normalization of blood glucose levels
Hepatocytes (m)	Mice with CCl₄ intoxicated liver damage: regeneration
Hematopoietic precursors (m)	Irradiated mice: myeloid and lymphoid engraftment Streptozotocin-treated diabetic mice: normalization of blood glucose levels
Undifferentiated mES cells	Spleen of immunosuppressed nude mice
Undifferentiated hES cells	Immunocompromised mice, Somites of chick embryos (E1.5-2d), Infarcted myocardium of rats

Utilisation des ES pour l'établissement de lignées murines transgéniques



Origine des lignées de cellules souches embryonnaires murines pluripotentes

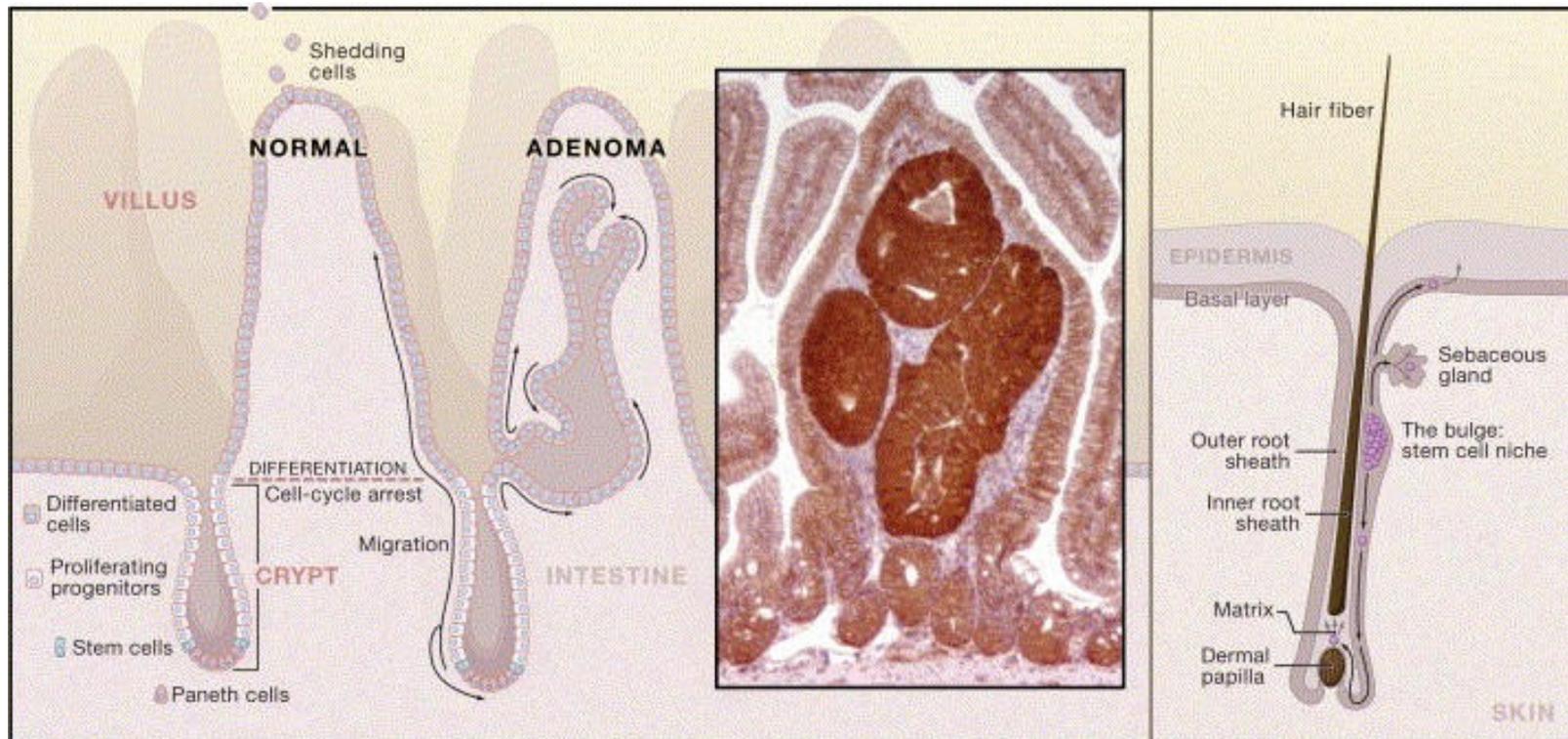


CELLULES SOUCHES ADULTES

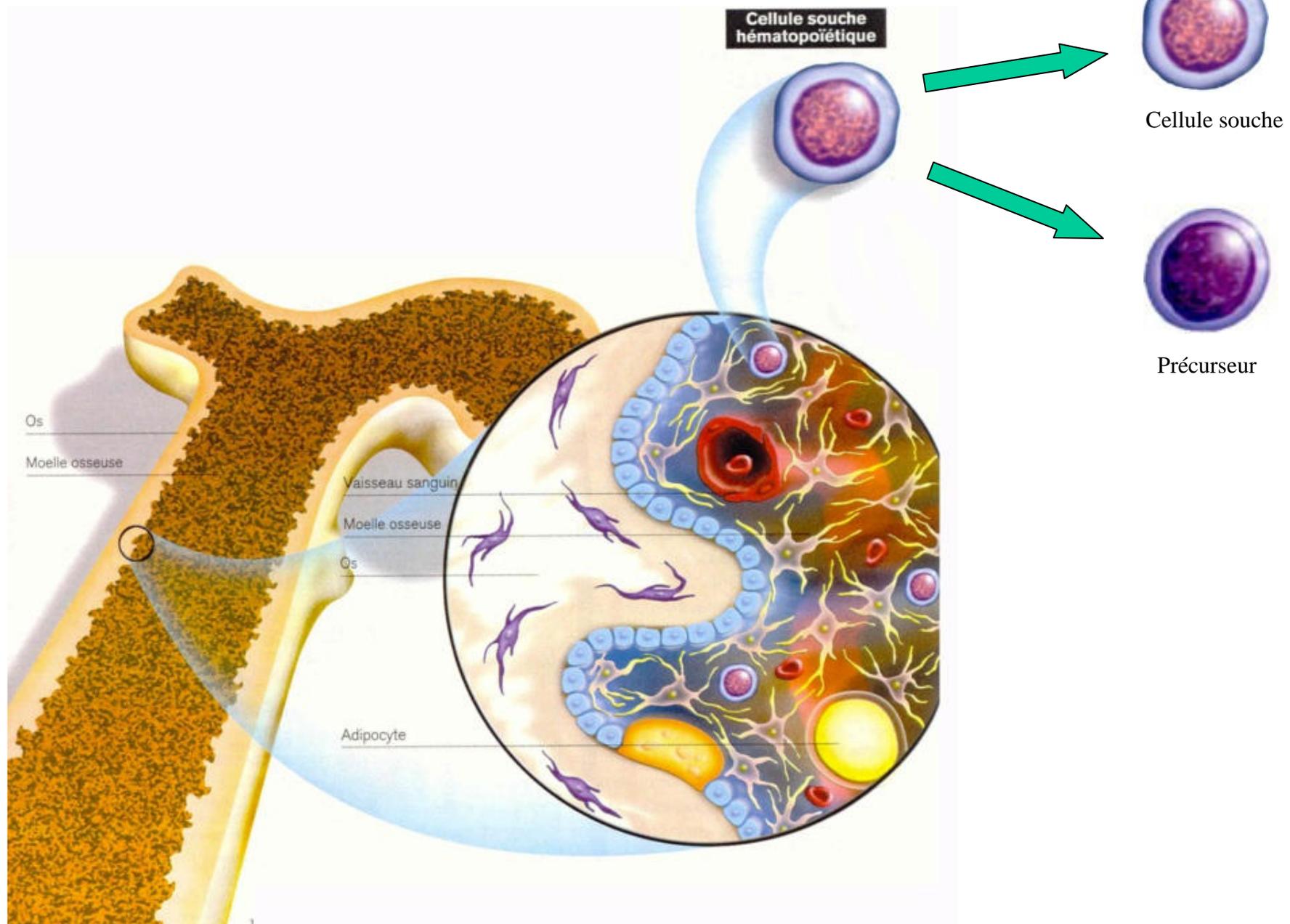
LES CELLULES SOUCHES ADULTES DANS QUELS TISSUS ?

1. Moelle osseuse
2. Système nerveux central : Crête Neurale SNC de fœtus, Zone subventriculaire, Zone ventriculaire, Hippocampe
3. Muscle squelettique
4. Pancréas
5. Foie
6. Sang circulant
7. Pulpe dentaire
8. Vaisseaux sanguins
9. Épithélium de la peau
10. Système digestif
11. Rétine
12. Cornée
13. Tissu gras
14. Cœur

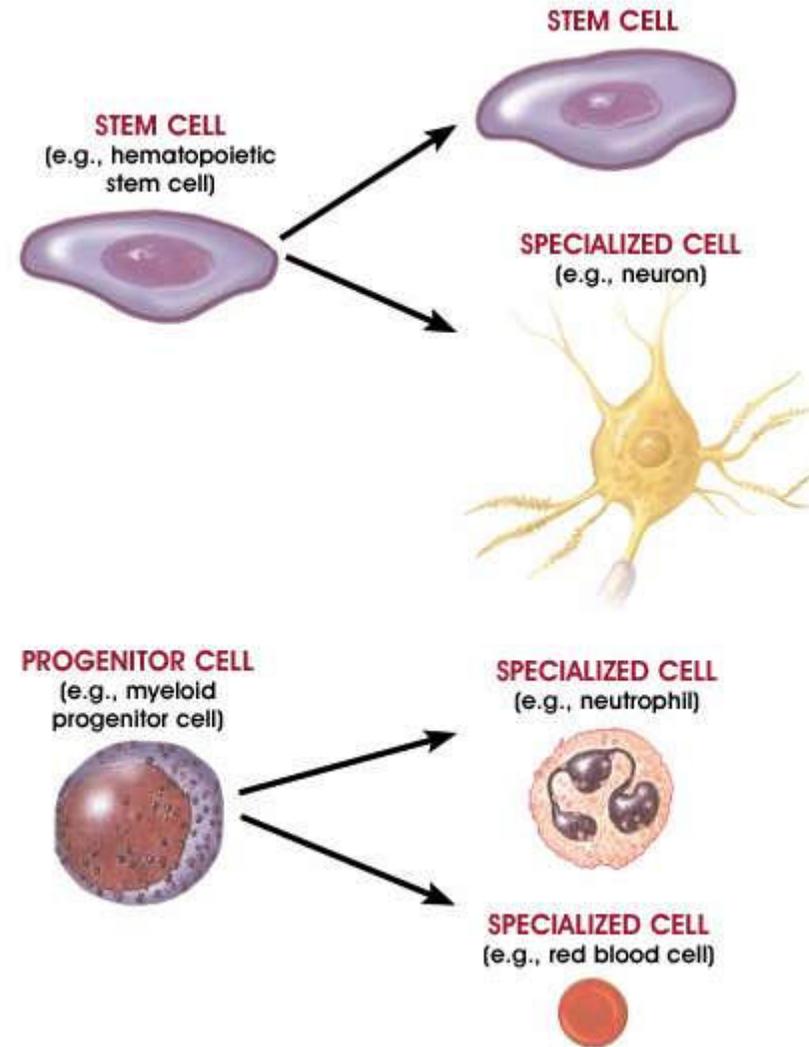
Cellules souches adultes intestinales et capillaires



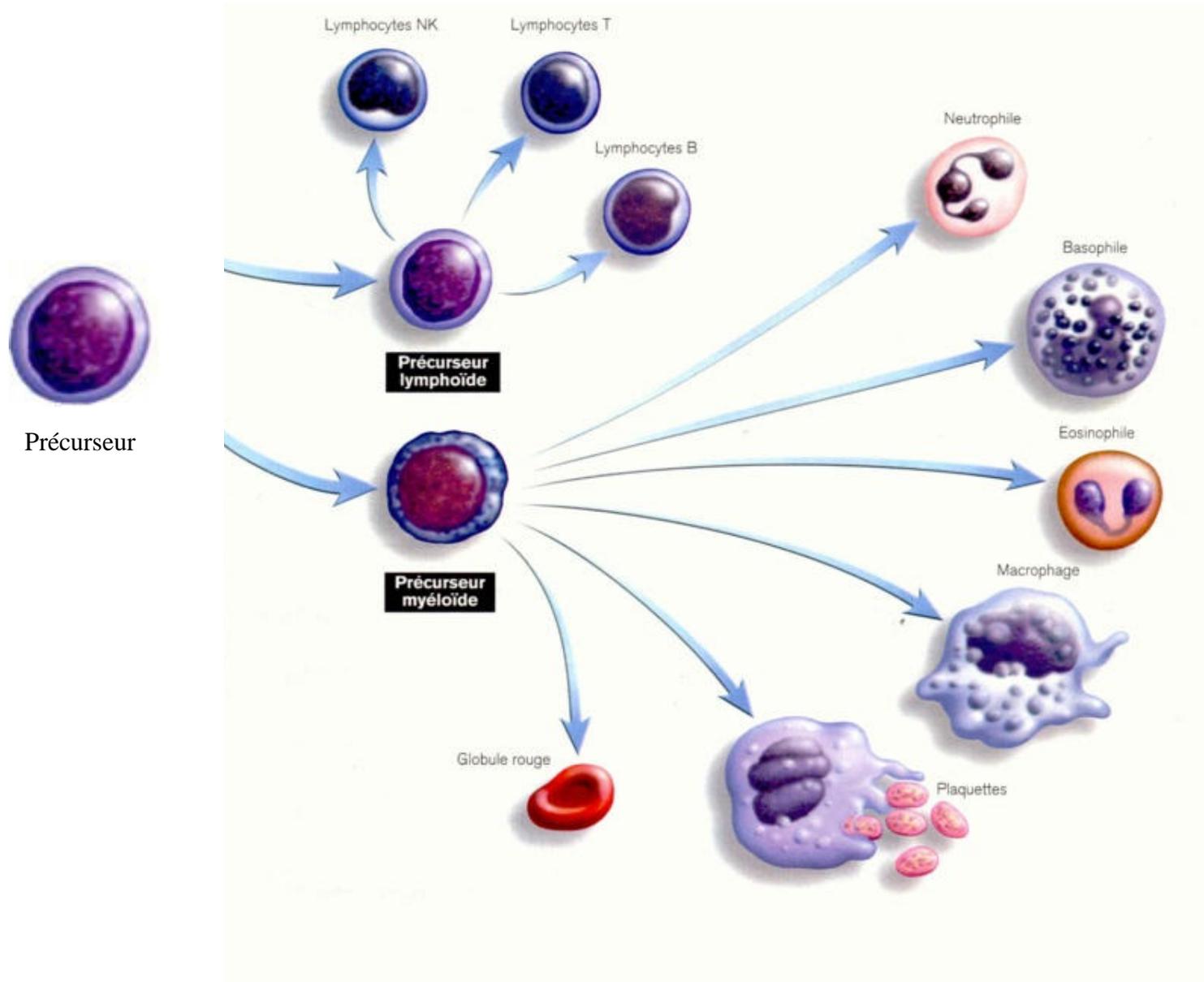
Cellules souches hématopoïétiques



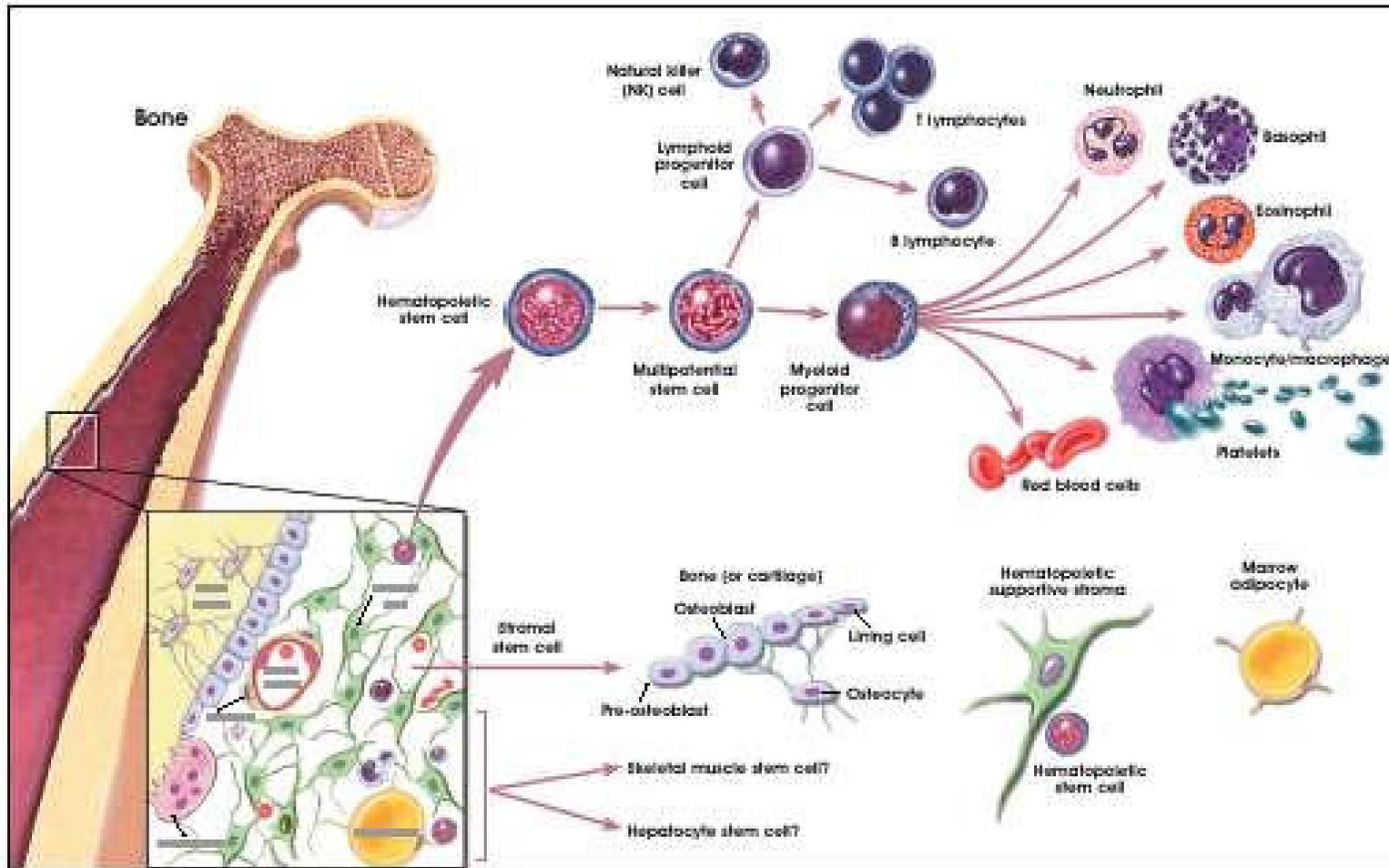
Distinction entre Précurseur & cellule souche



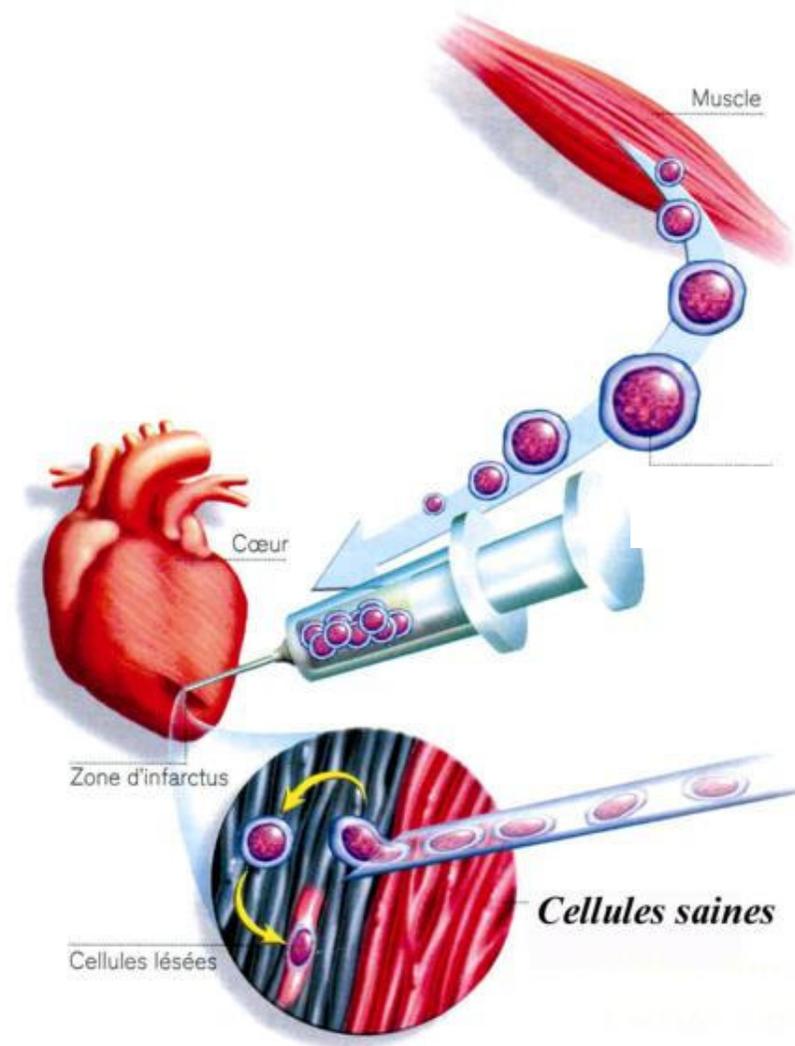
Précurseurs hématopoïétiques



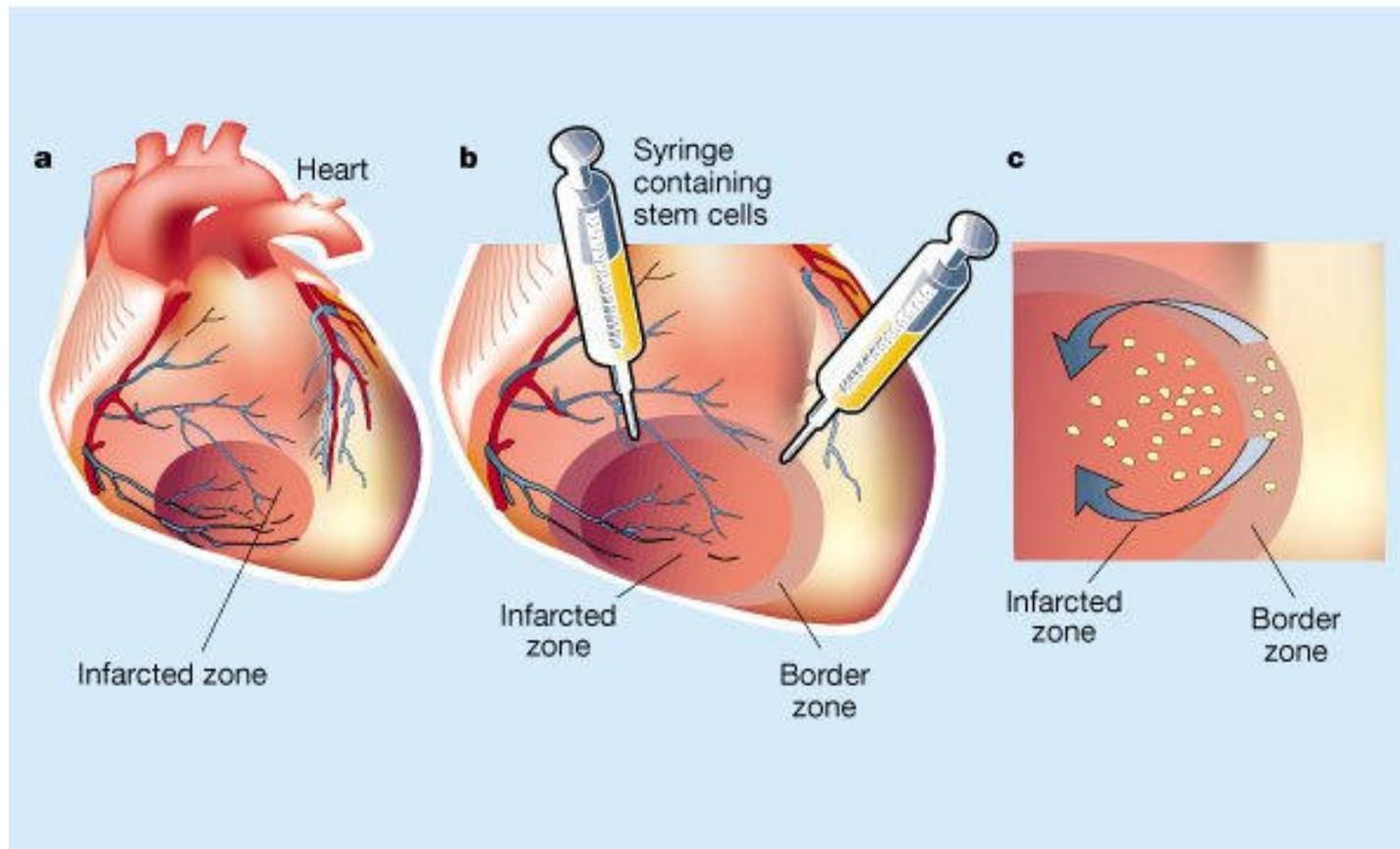
LES DEUX TYPES DE CELLULES SOUCHES DE LA MOELLE OSSEUSE



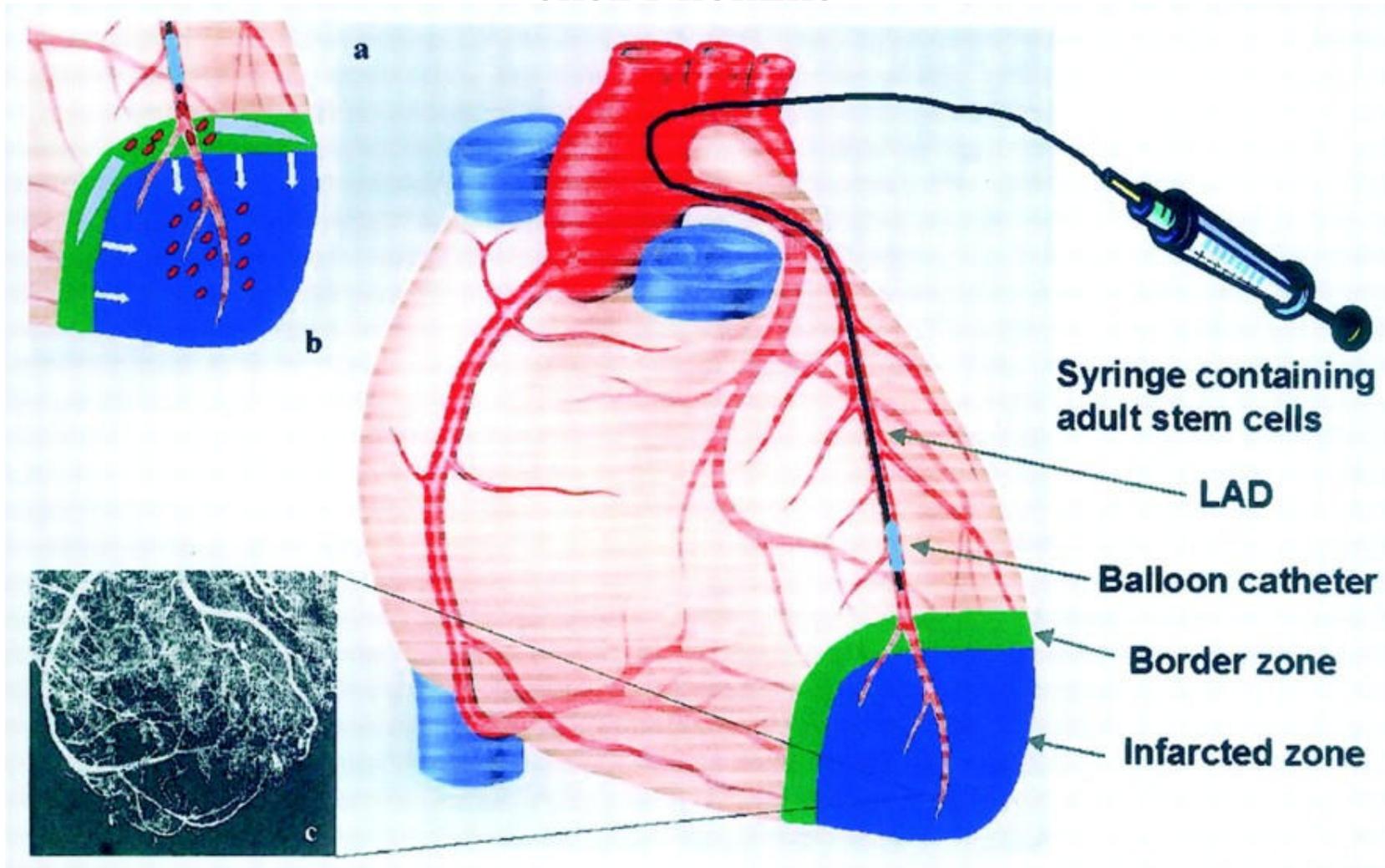
Régression de la zone bordante par injection de myoblastes chez l'Humain



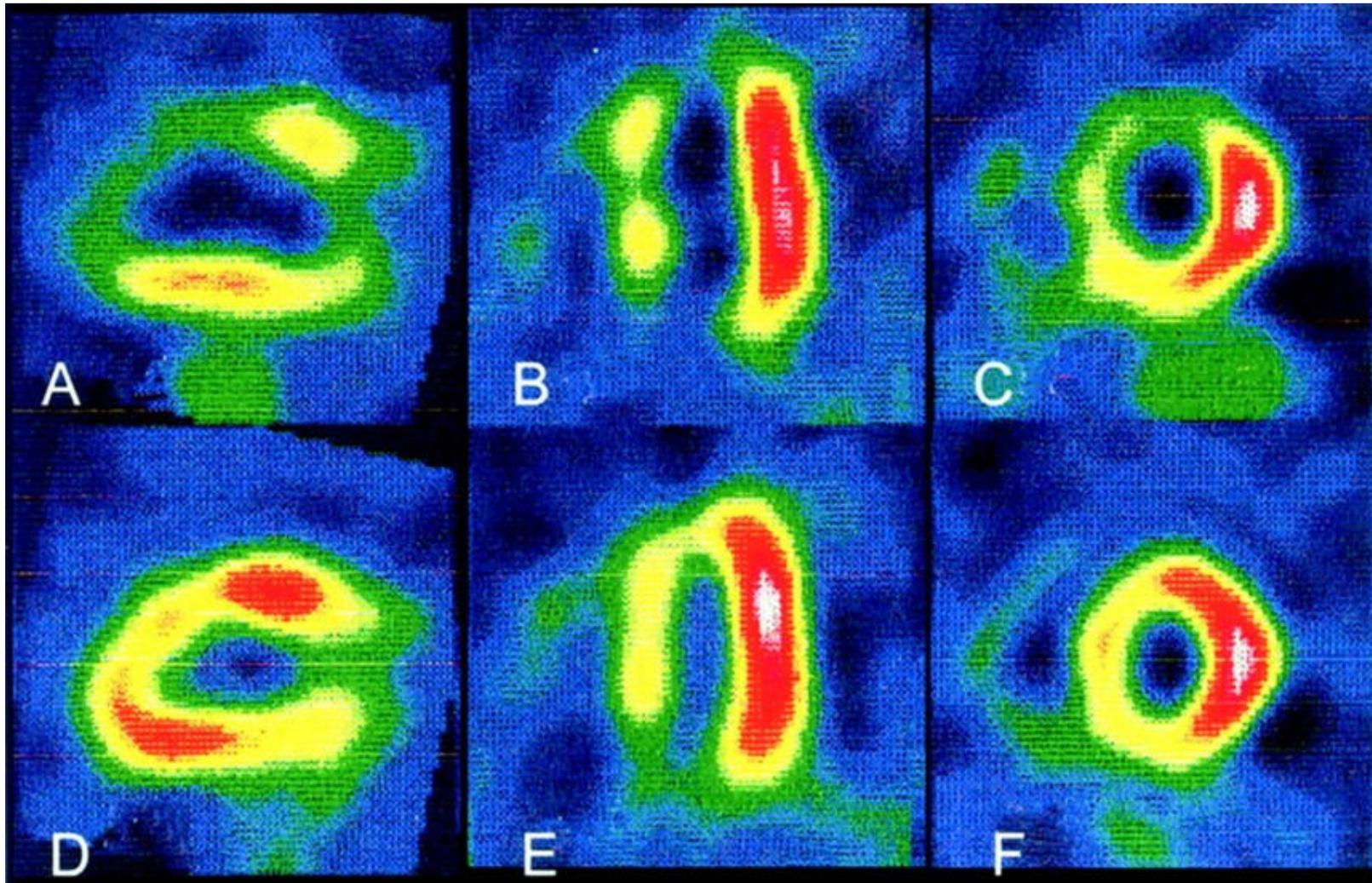
Régénération du myocarde infarcté par les cellules de la moelle osseuse chez la souris



Régénération du myocarde infarcté par les cellules de la moelle osseuse chez l'homme



. (Circulation. 2002;106:1913-1918.)



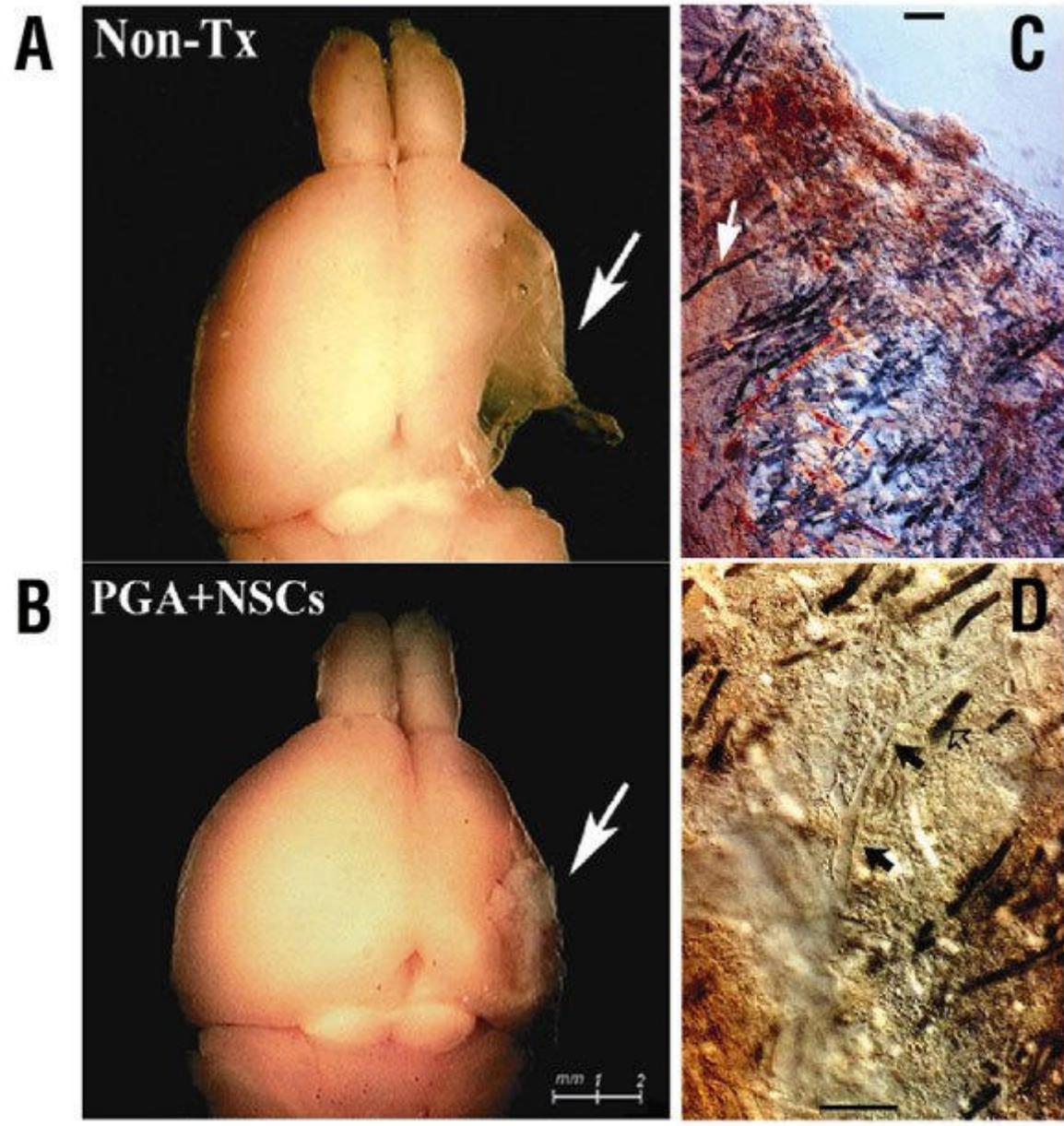
Amélioration de la perfusion ventriculaire(Jaune) après transplantation de cellules de la moelle osseuse.

Avant transplantation = A, B, C. Après Transplantation = D, E, F

Régénération du cerveau par
les cellules de la moelle osseuse
chez la souris

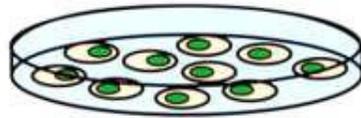


The injured brain interacts reciprocally with neural stem cells supported by scaffolds to reconstitute lost tissue *Nature Biotechnology* 20, 1111 - 1117 (2002)



Les espoirs de la recherche sur les cellules souches

Identification de produits, de cibles et tests, pharmacologiques



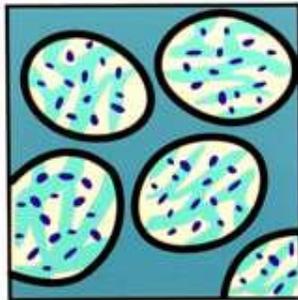
Etude de la différenciation cellulaire

Compréhension prévention et traitement des défauts congénitaux

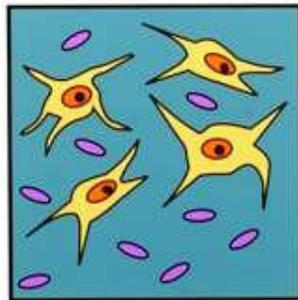
Culture de Cellules souches pluripotentes

Tests de toxicité

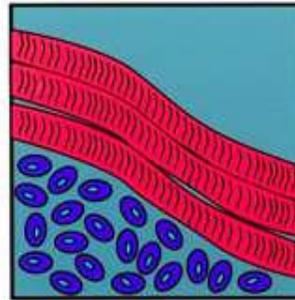
Tissus / cellules pour la transplantation



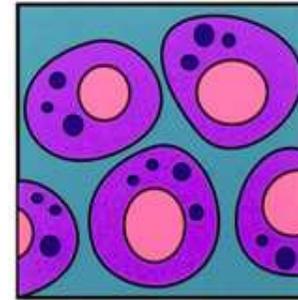
Moelle osseuse pour la leucémie & chimiothérapie



Cellules nerveuses pour maladie de Parkinson et d'Alzheimer



Cellules cardiaques pour les cardiopathies



Cellules des îlots pancréatiques pour le diabète



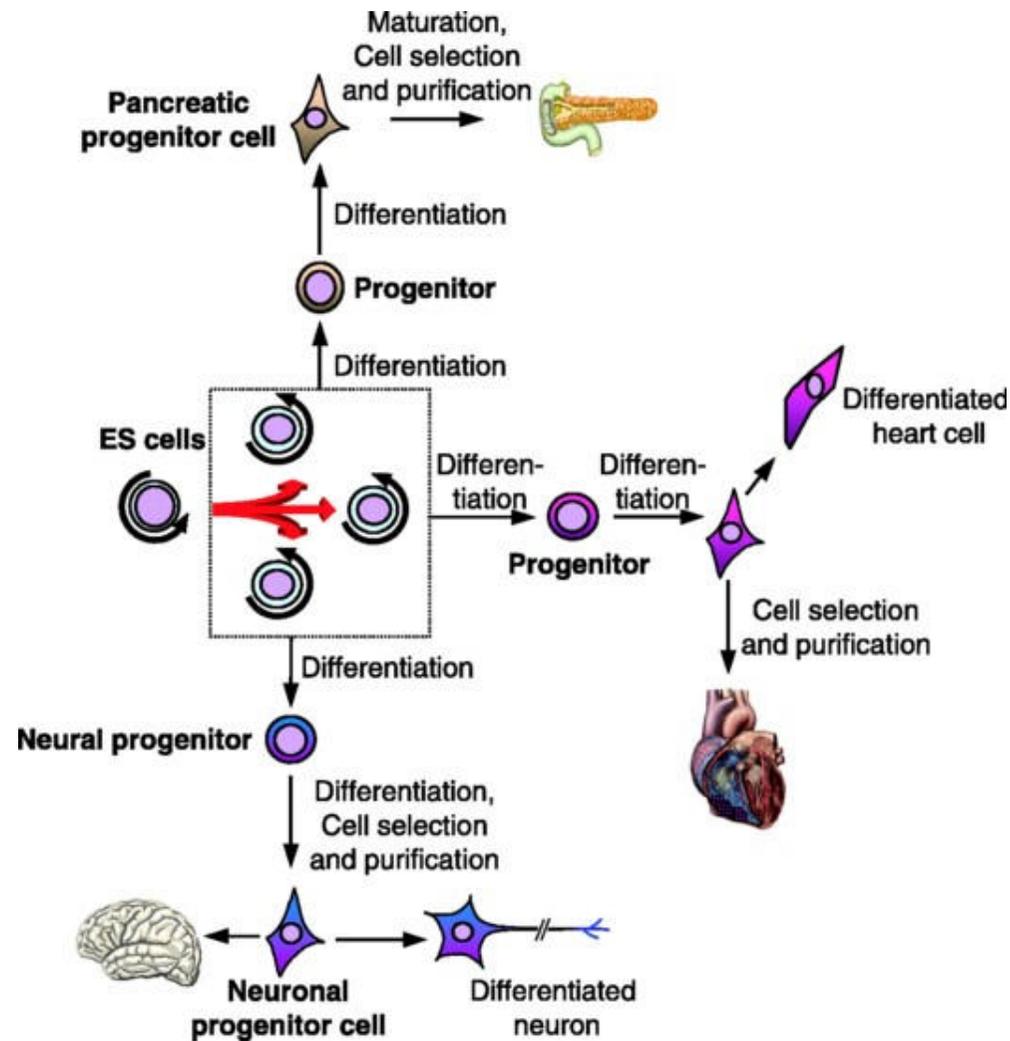
?

Maladies pouvant bénéficier des recherches sur les cellules souches

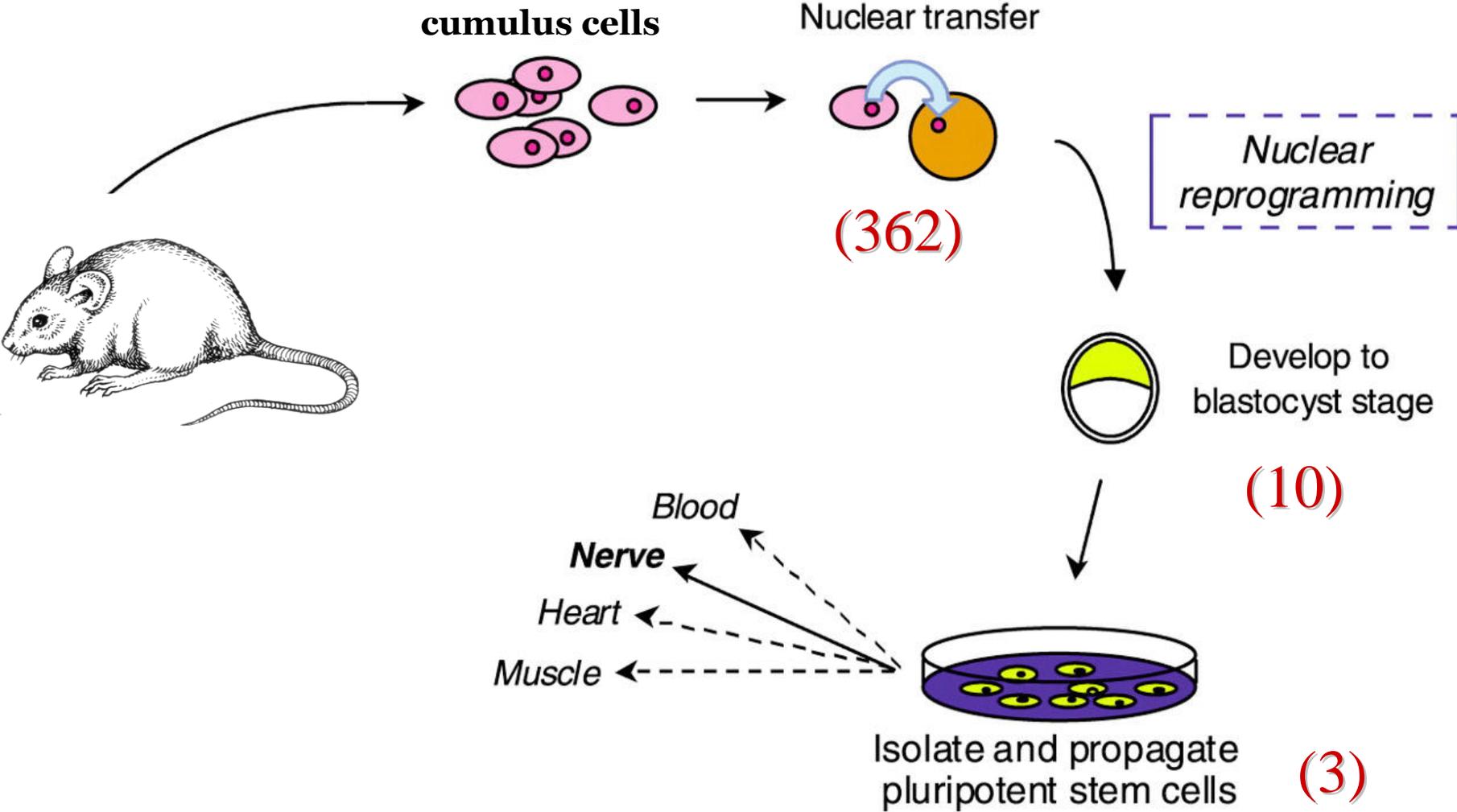
Atteintes	Nombre de patients aux USA
Maladies Cardiovasculaires	58 Millions
Maladies Auto-immunes	30 Millions
Diabète	16 Millions
Ostéoporose	10 Millions
Cancer	8.2 Millions
Maladie d' Alzheimer	4 Millions
Maladie de Parkinson	1,5 Millions
Brûlures graves	0,3 Millions
Traumatismes de la Moelle épinière	0,25 Millions
Défauts congénitaux	150,000 (par an)
Total	128,4 Millions

Data from the Patients' Coalition for Urgent Research, Washington, DC (Perry, *Science* 287: 1423, 2000)

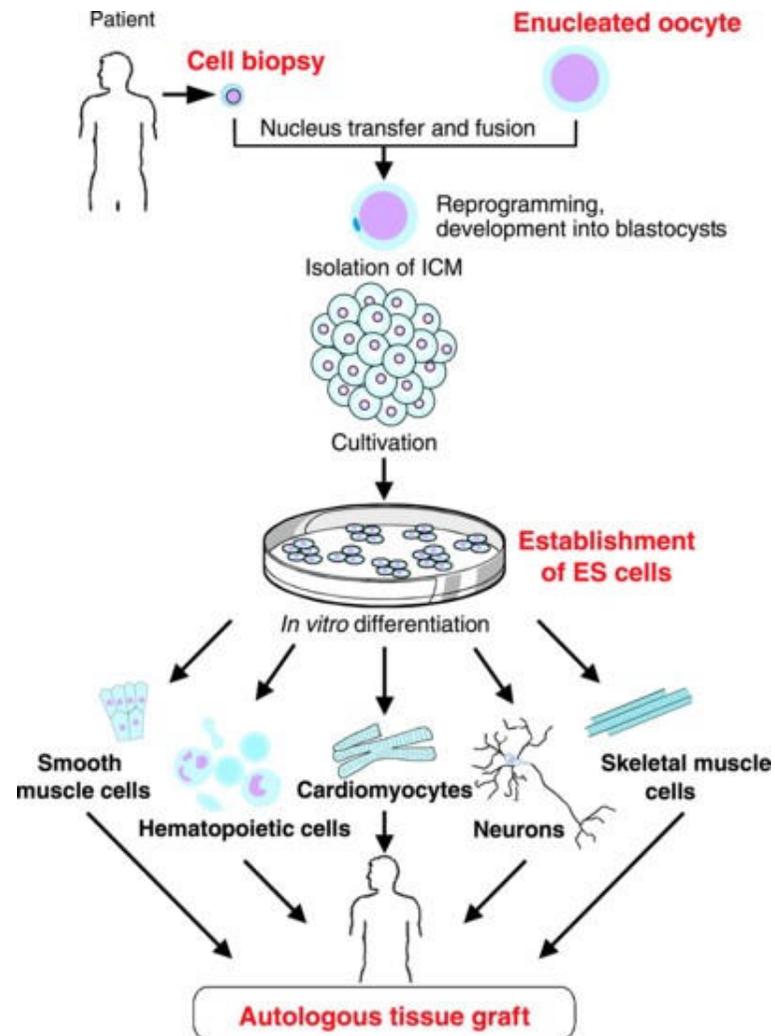
stratégies de thérapies cellulaires à partir des cellules ES



Thérapie cellulaire après transfert nucléaire (clonage thérapeutique)



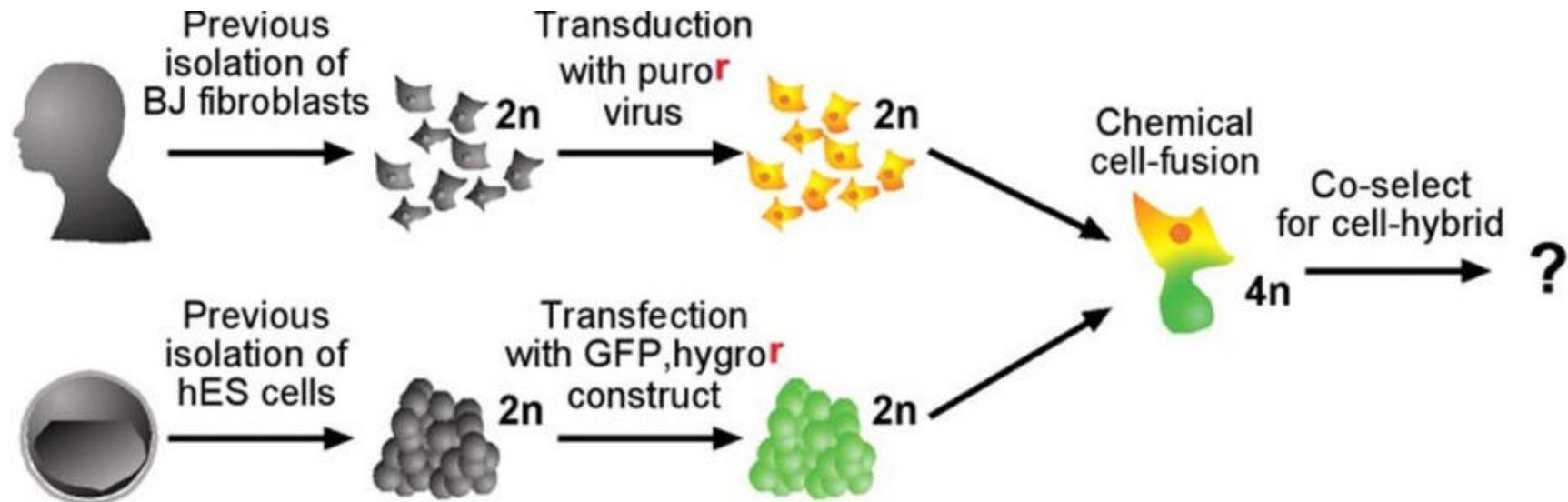
Clonage thérapeutique humain: greffons tissulaires autologues



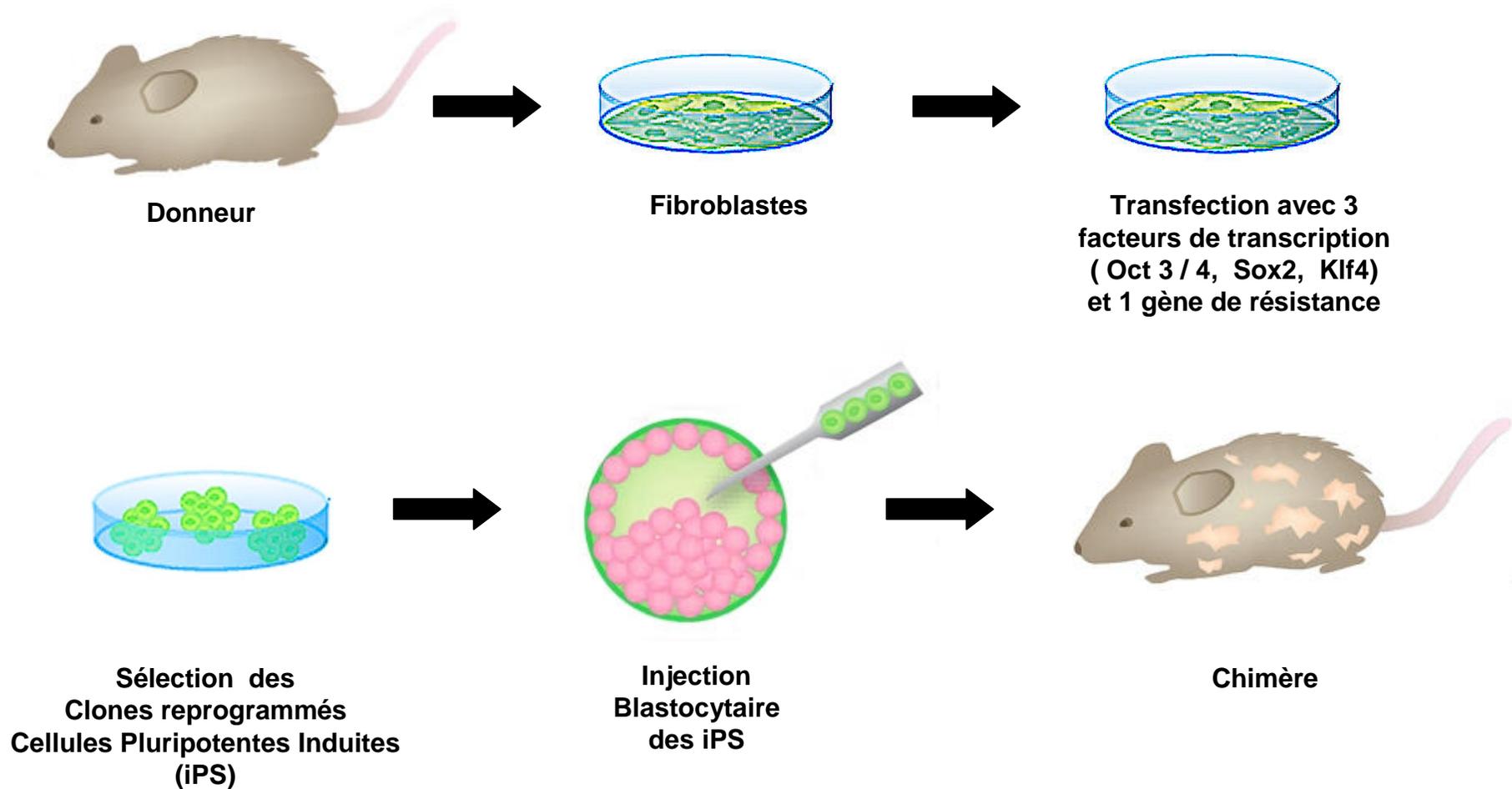
Nuclear Reprogramming of Somatic Cells After Fusion with Human Embryonic Stem Cells

SCIENCE - 26 AUGUST 2005, VOL 1370, 309, 1369-1373

Human embryonic stem (hES) cells were fused with human fibroblasts, resulting in hybrid cells that maintain a stable tetraploid DNA content and have morphology, growth rate, and antigen expression patterns characteristic of hES cells. Differentiation of hybrid cells in vitro and in vivo yielded cell types from each embryonic germ layer. Analysis of genome-wide transcriptional activity, reporter gene activation, allele-specific gene expression, and DNA methylation showed that the somatic genome was reprogrammed to an embryonic state. These results establish that hES cells can reprogram the transcriptional state of somatic nuclei and provide a system for investigating the underlying mechanisms.

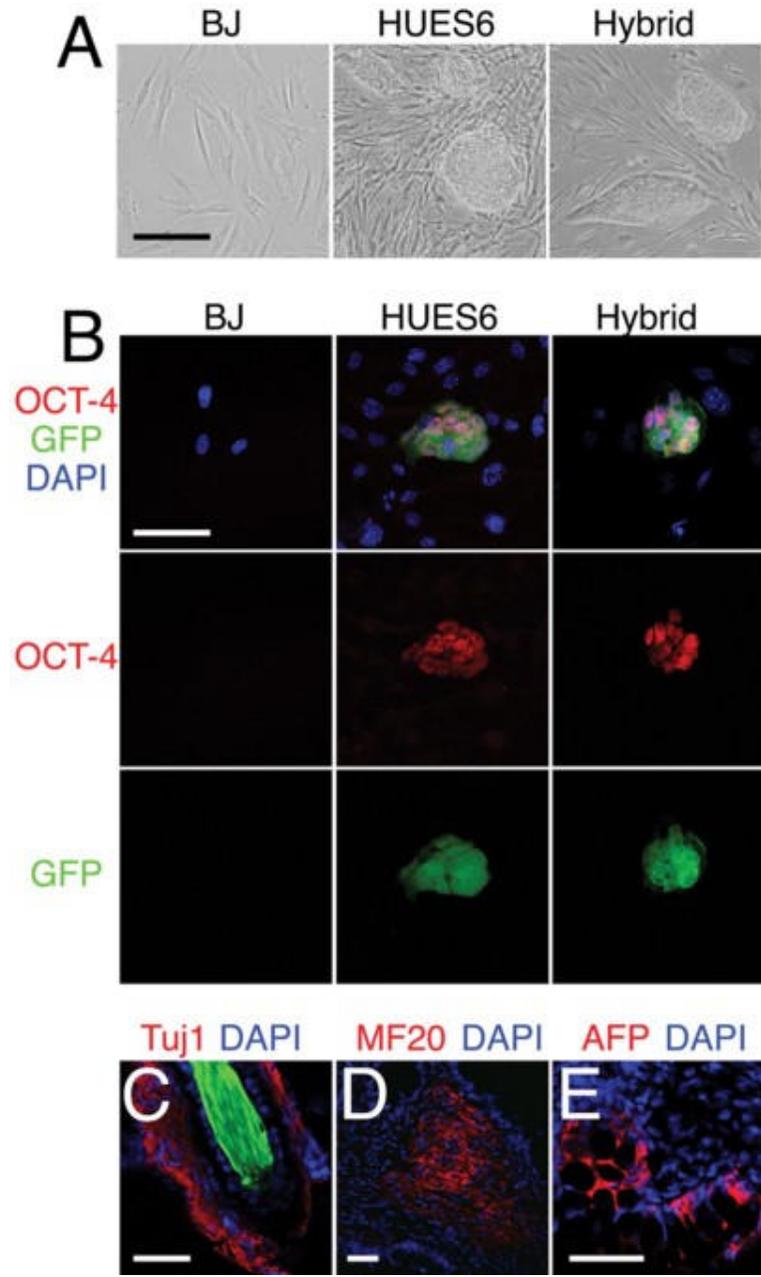


Reprogrammation de cellules somatiques en cellules pluripotentes



Takahashi, K. & Yamanaka, S. (2006) Cell 126, 663–676.

Nakagawa, M. et al. Nat. Biotechnol. (2008) 26, 101–106.



CONCLUSIONS

- ES permettent d'étudier in vitro et au niveau moléculaire les mécanismes régissant le développement normal ou pathologique des différents organes à des stades embryonnaires très précoces.

- La capacité de différenciation des cellules souches font de ces cellules un vivier cellulaire important pour la thérapie cellulaire de remplacement et l'étude des mécanismes régissant une pathologie génétique.

- La reprogrammation de cellules somatiques correspond à un axe de recherche qui offre des perspectives importantes:
 - dans le domaine de la connaissance des mécanismes moléculaires impliqués dans les dysfonctionnements d'ordre génétique aboutissant à une pathologie
 - dans le domaine de la thérapie cellulaire.
 - Cette reprogrammation devrait permettre de surmonter le problème du clonage thérapeutique.