HAL open science

Les cellules souches pluripotentes

Marielle Afanassieff

To cite this version:

Marielle Afanassieff. Les cellules souches pluripotentes. Licence. Licence ESTBB (Biotechnologies), 2011, 49 diapos. hal-02806548

HAL Id: hal-02806548

https://hal.inrae.fr/hal-02806548

Submitted on 6 Jun 2020

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.

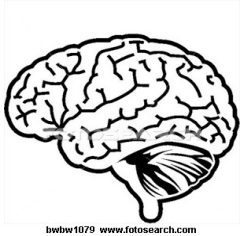
L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Les cellules souches pluripotentes

Marielle Afanassieff

INSERM U846
Stem cell and Brain Research Institute

from life to intelligence



Projet transversal:
Création d'un modèle de thérapie cellulaire chez le singe parkinsonien

Prima Stem

Cellules souches pluripotentes:
Souris, Lapin, Singe, Homme et Poulet

Plan de l'exposé

- ✓ *Définition et propriétés des cellules souches pluripotentes:*

  Autorenouvellement, Pluripotence et Tumorigénèse

  Reprogrammation et Transdifférenciation

- ✓ *Intérêts de ces cellules chez la souris:*

  Techniques de Transgénèse

  Différents types de cellules souches pluripotentes

- ✓ *Intérêts de ces cellules chez les animaux d'élevage:*

  Techniques de dérivation des cellules ES et iPS

  Les différents états de pluripotence

- ✓ *Intérêts de ces cellules chez l'Homme:*

  Thérapie par remplacement cellulaire

  Clonage thérapeutique

Plan de l'exposé

- ✓ *Définition et propriétés des cellules souches pluripotentes:*

  Autorenouvellement, Différenciation et Tumorigénèse

  Reprogrammation et Transdifférenciation
- ✓ *Intérêts de ces cellules chez la souris:*

  Techniques de Transgénèse

  Différents types de cellules souches pluripotentes
- ✓ *Intérêts de ces cellules chez les animaux d'élevage:*

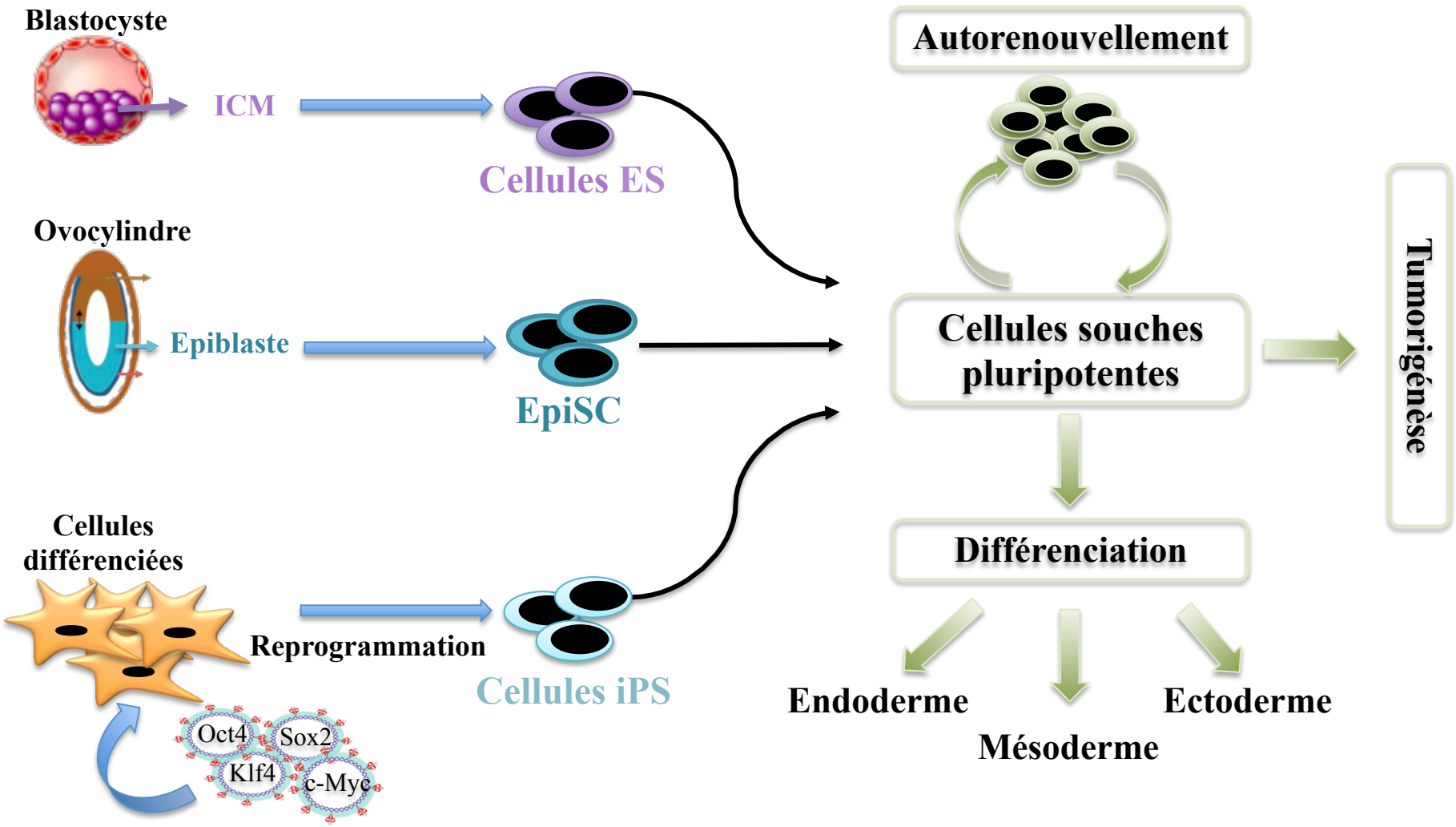
  Techniques de dérivation des cellules ES et iPS

  Les différents états de pluripotence
- ✓ *Intérêts de ces cellules chez l'Homme:*

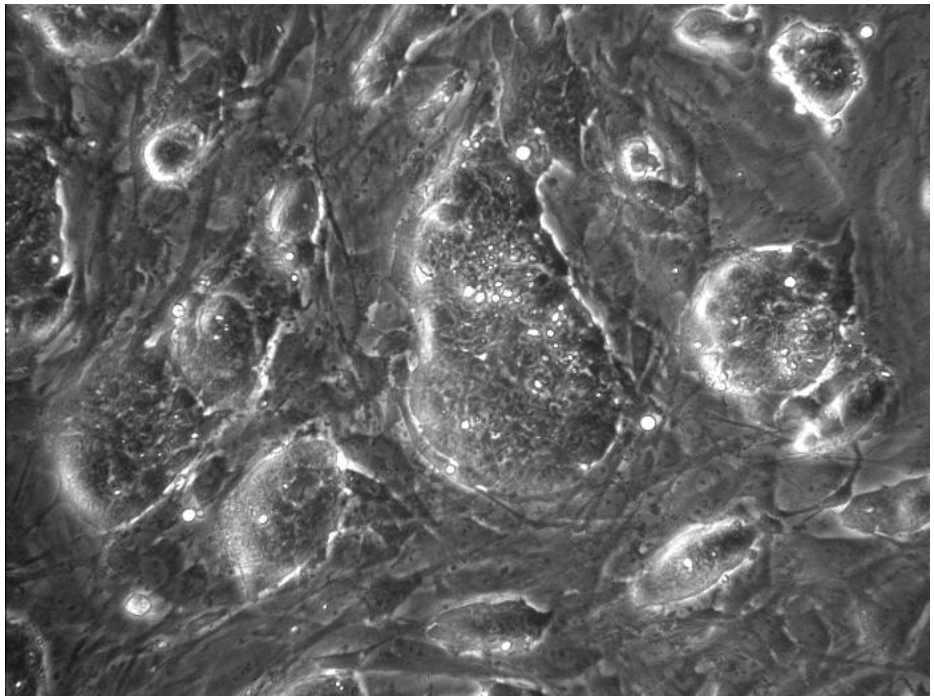
  Thérapie par remplacement cellulaire

  Clonage thérapeutique

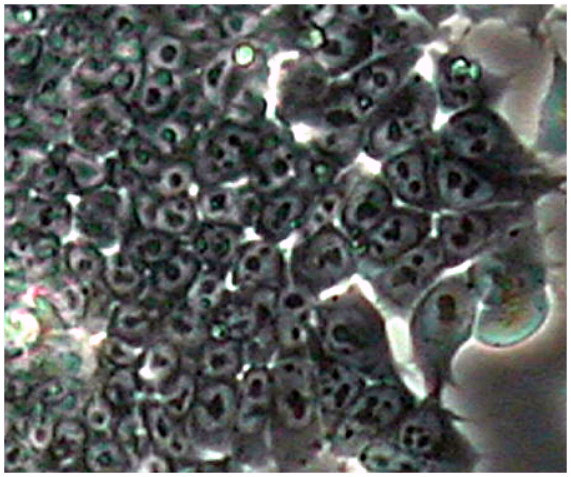
Origine et propriétés des cellules souches pluripotentes

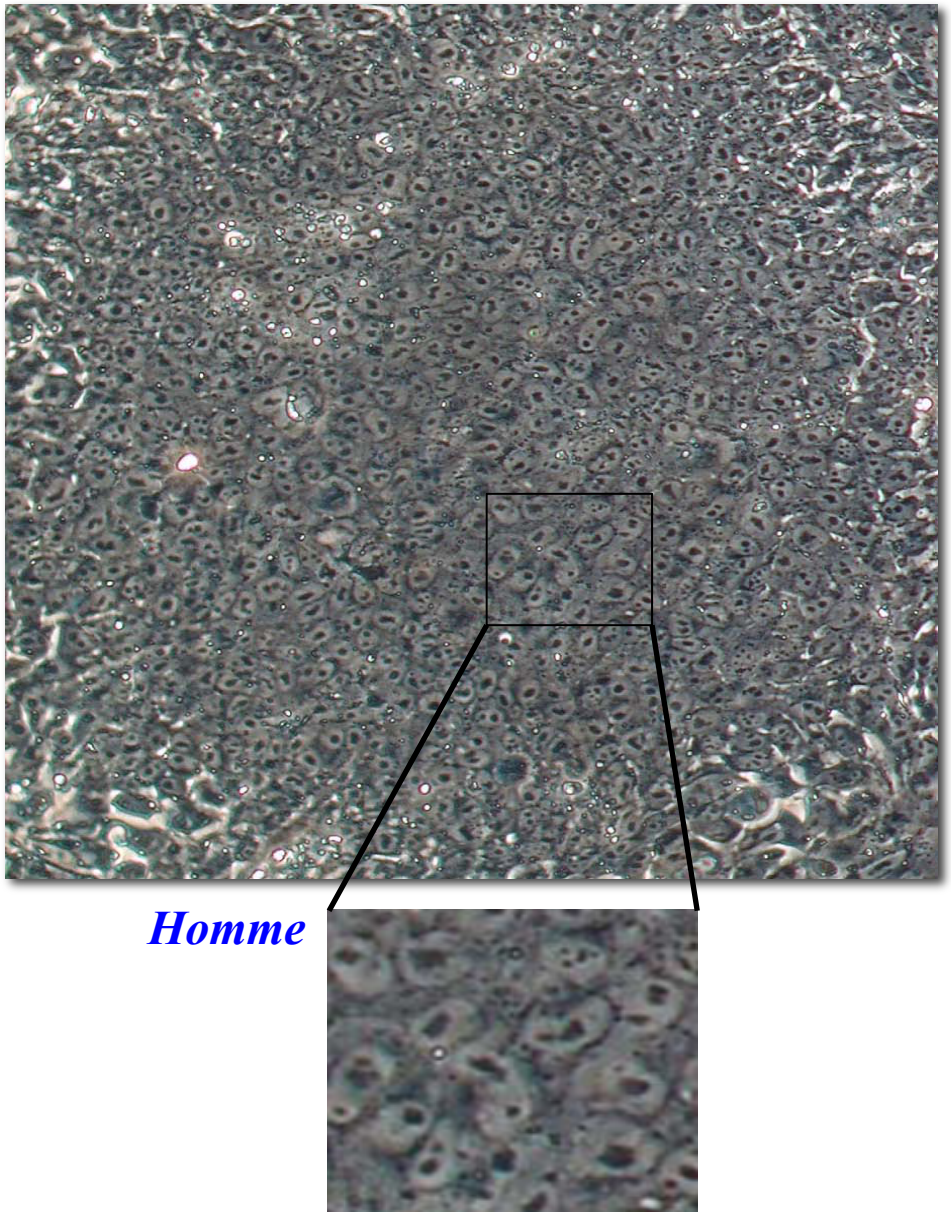


Morphologie des cellules souches pluripotentes



Souris





Homme

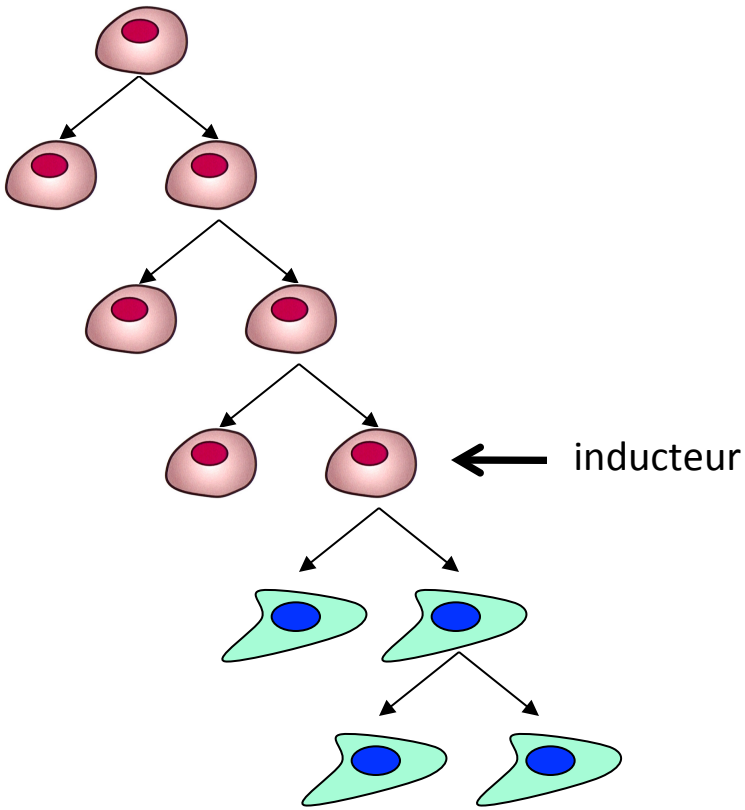
Autorenouvellement: Multiplication à l'infinie

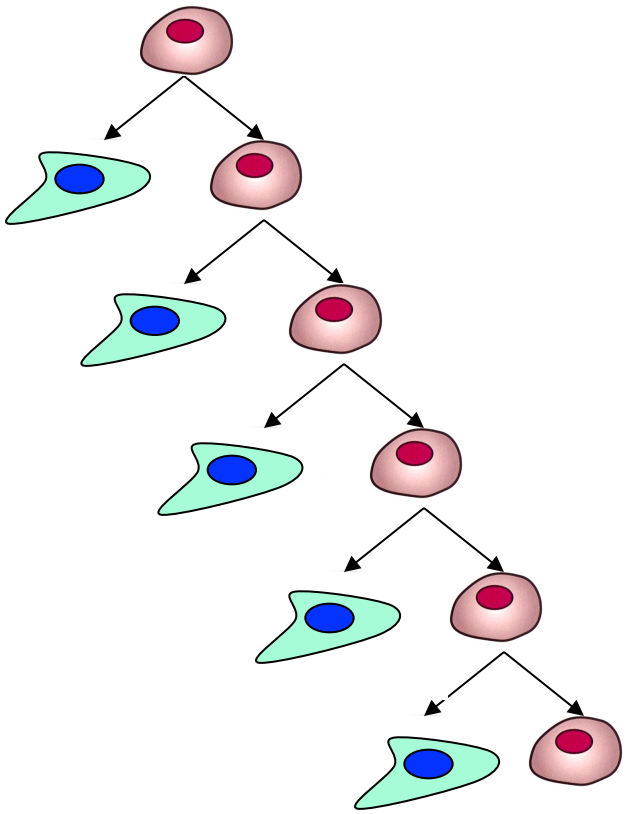
Cellules souches pluripotentes :

autorenouvellement par divisions symétriques

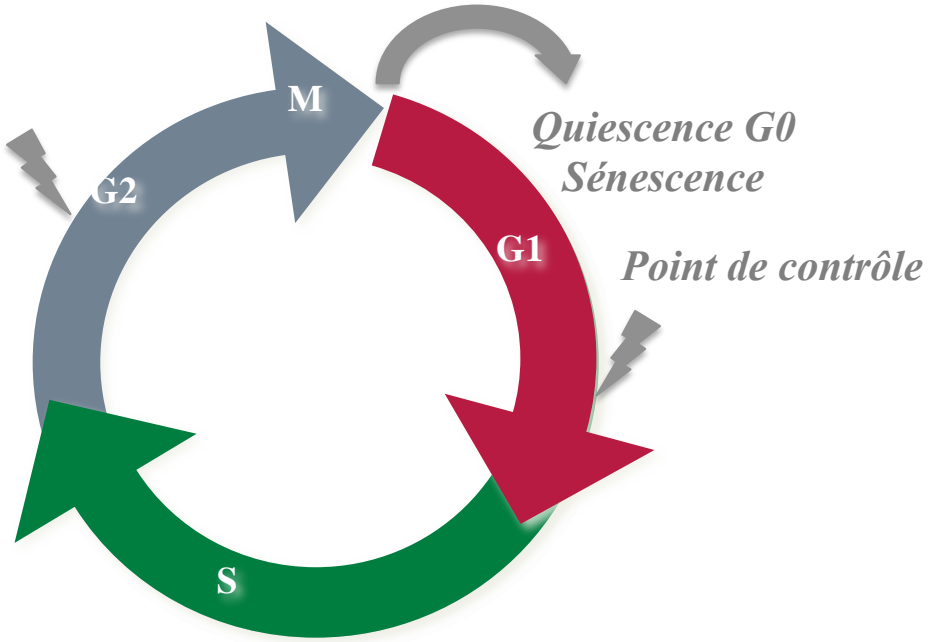
Cellules souches tissulaires :

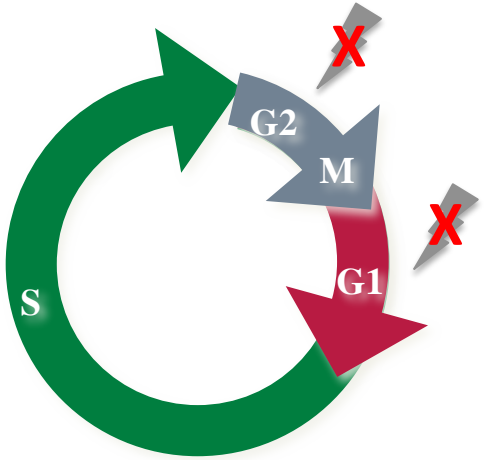
autorenouvellement par divisions asymétriques



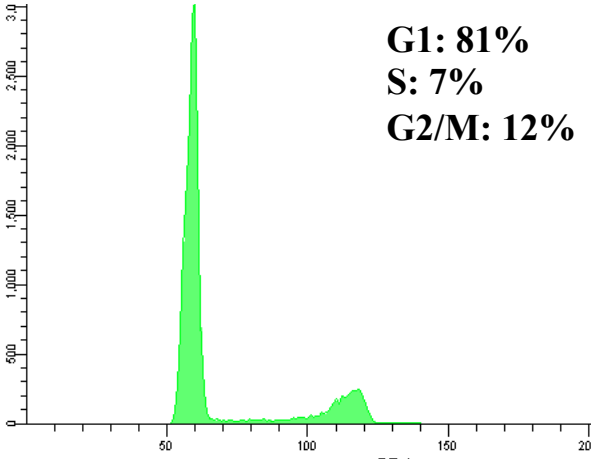


Cycle cellulaire et vitesse de prolifération

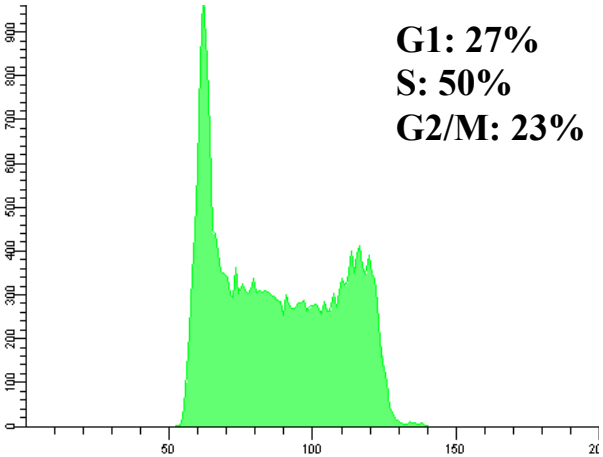




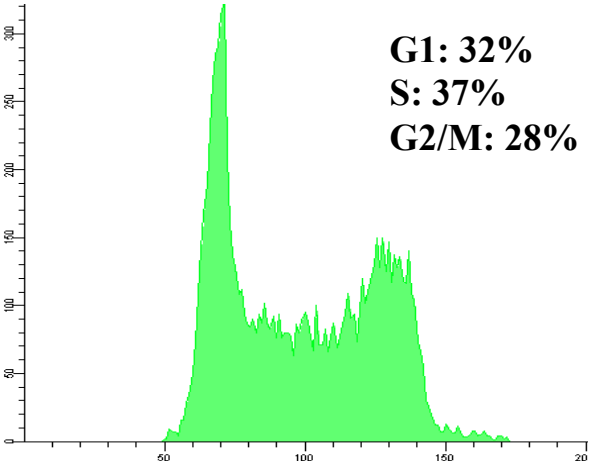
Fibroblastes



Cellules ES murines



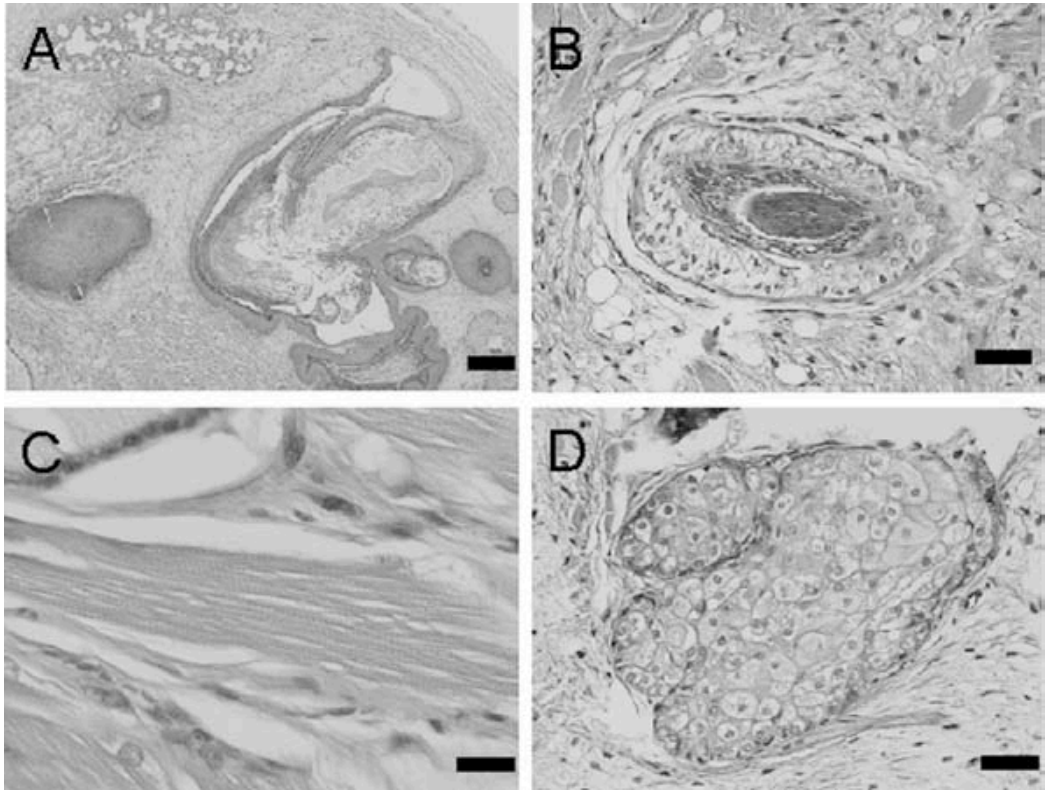
Cellules ES de primate



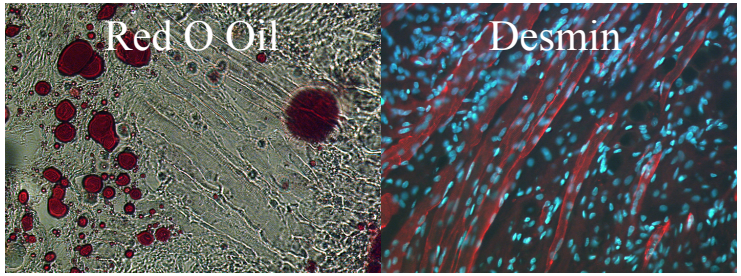
Tumorigénèse

1 mois →

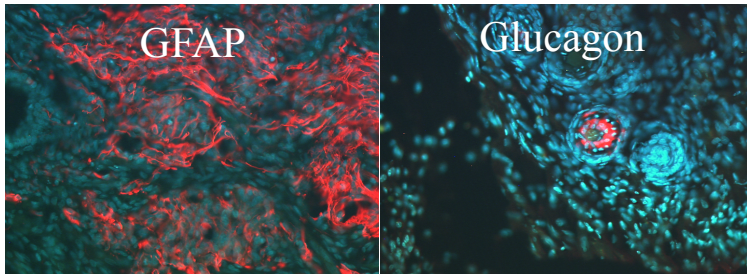
Tératome



Mésoderme



Ectoderme **Endoderme**



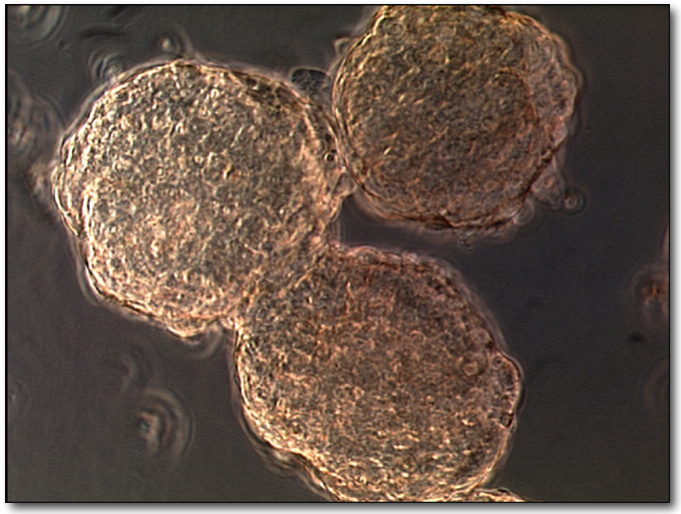
Pluripotence: Capacité de différenciation

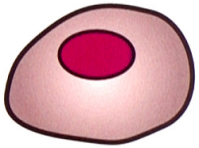
Totipotence: ovocyte fécondé

Pluripotence: cellules ES

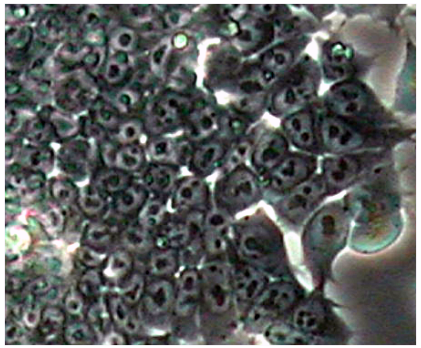
Multipotence: cellules souches hématopoïétiques

Unipotence: Pro-lymphocyte B

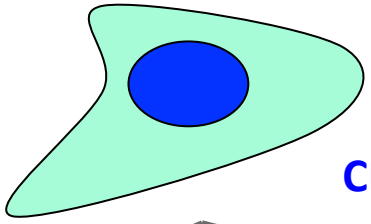




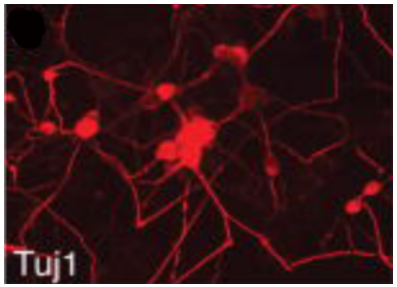
CELLULES ES



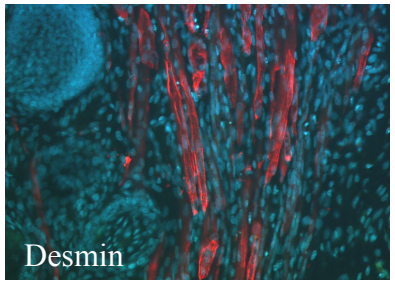
Différenciation



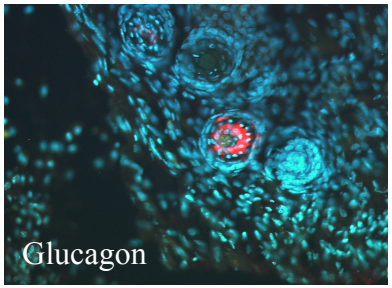
CELLULES DIFFERENCIEES



ECTODERME

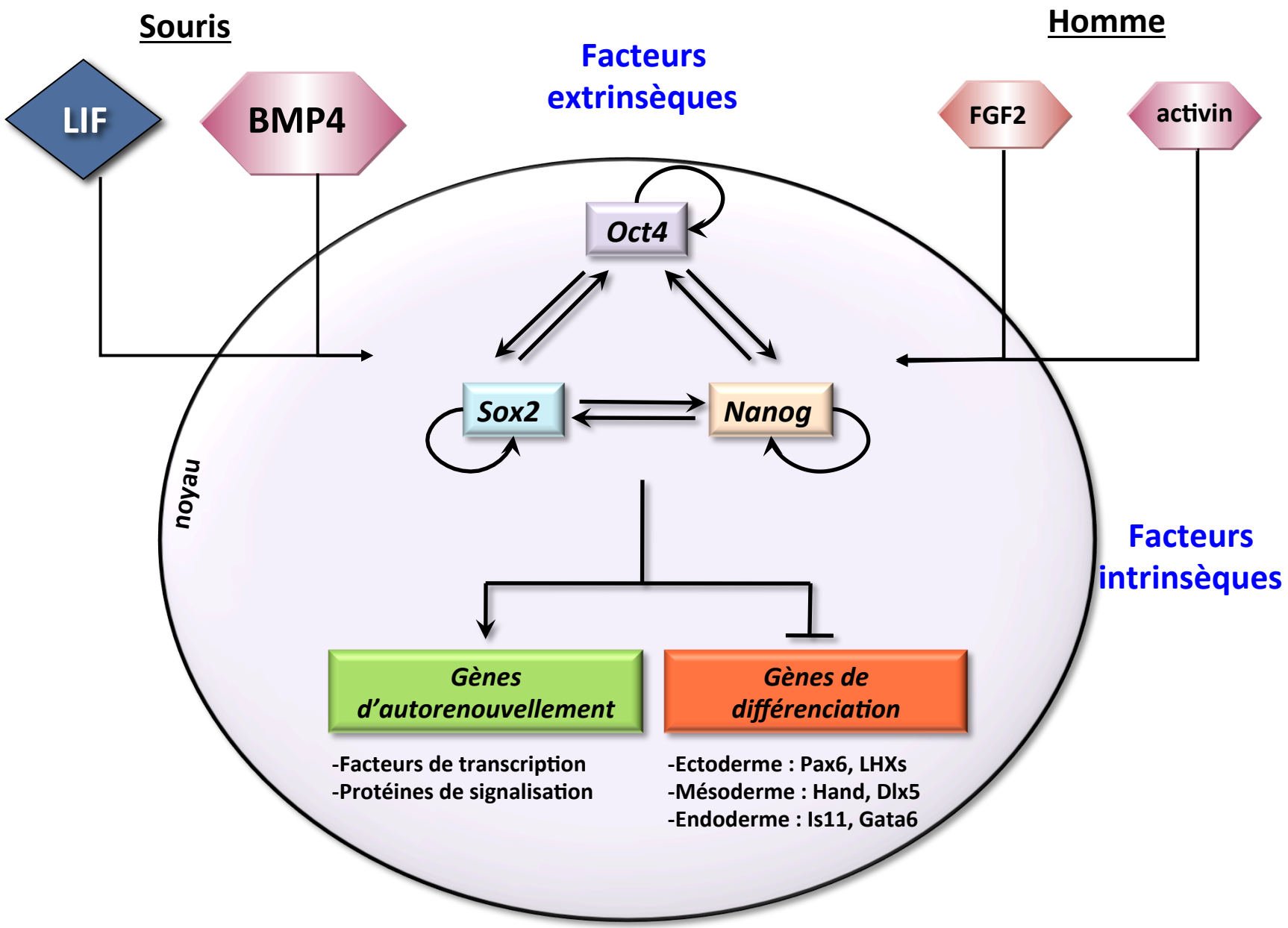


MESODERME

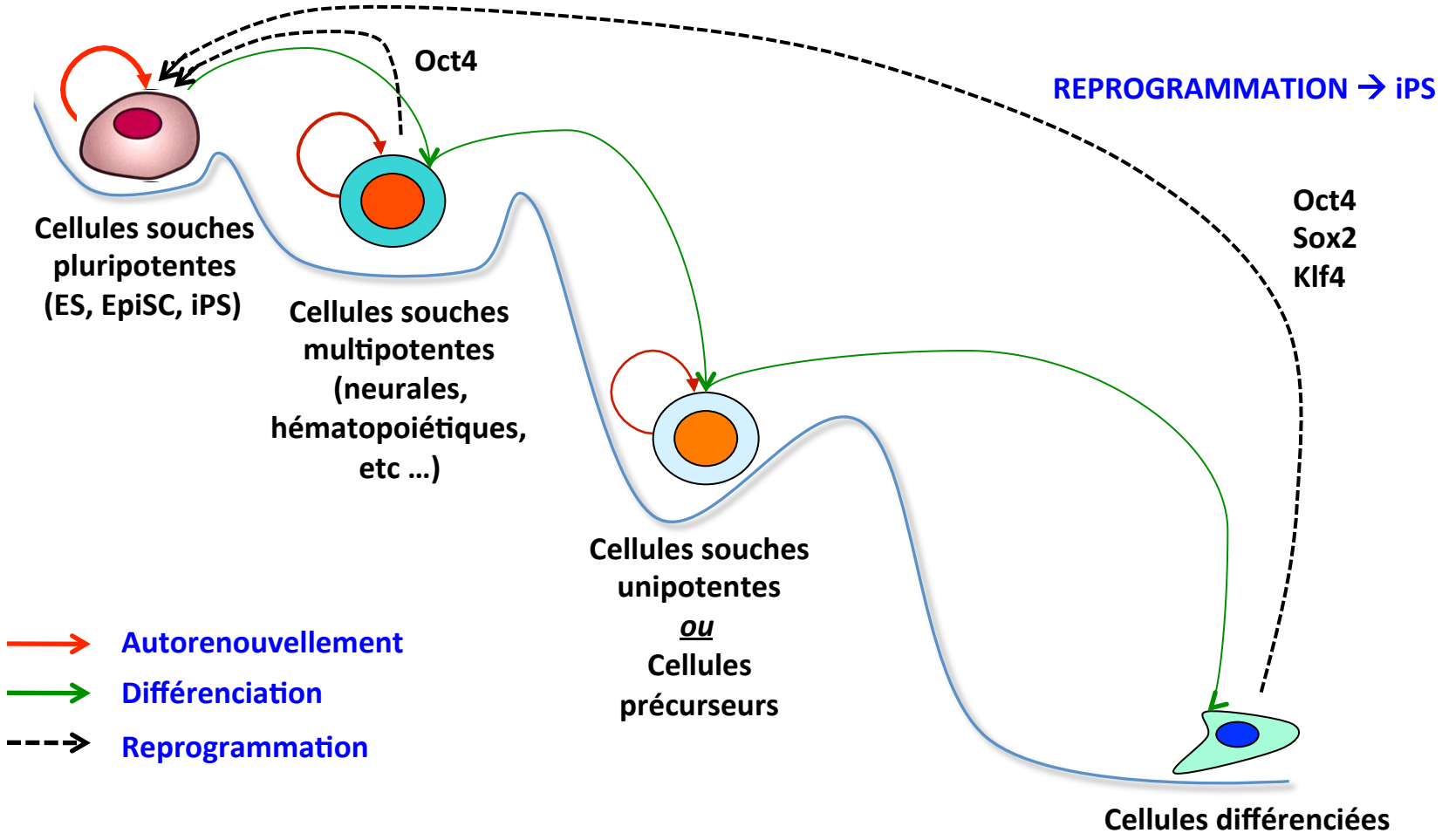


ENDODERME

Régulation de la pluripotence

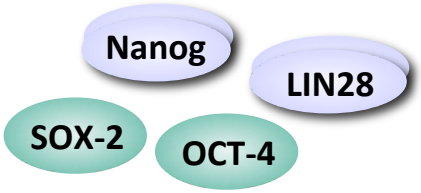


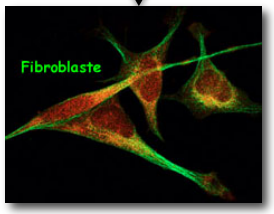
Différenciation et Reprogrammation



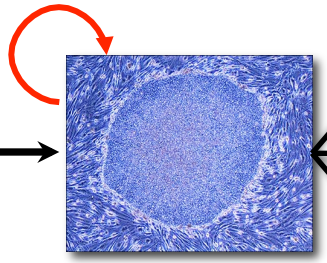
Reprogrammation de cellules somatiques en cellules iPS

Vecteurs rétroviraux

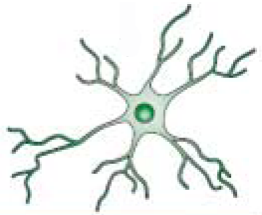


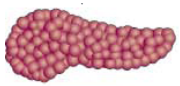


Fibroblastes embryonnaires

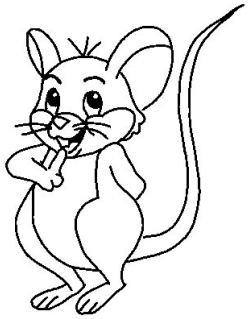


Cellules iPS





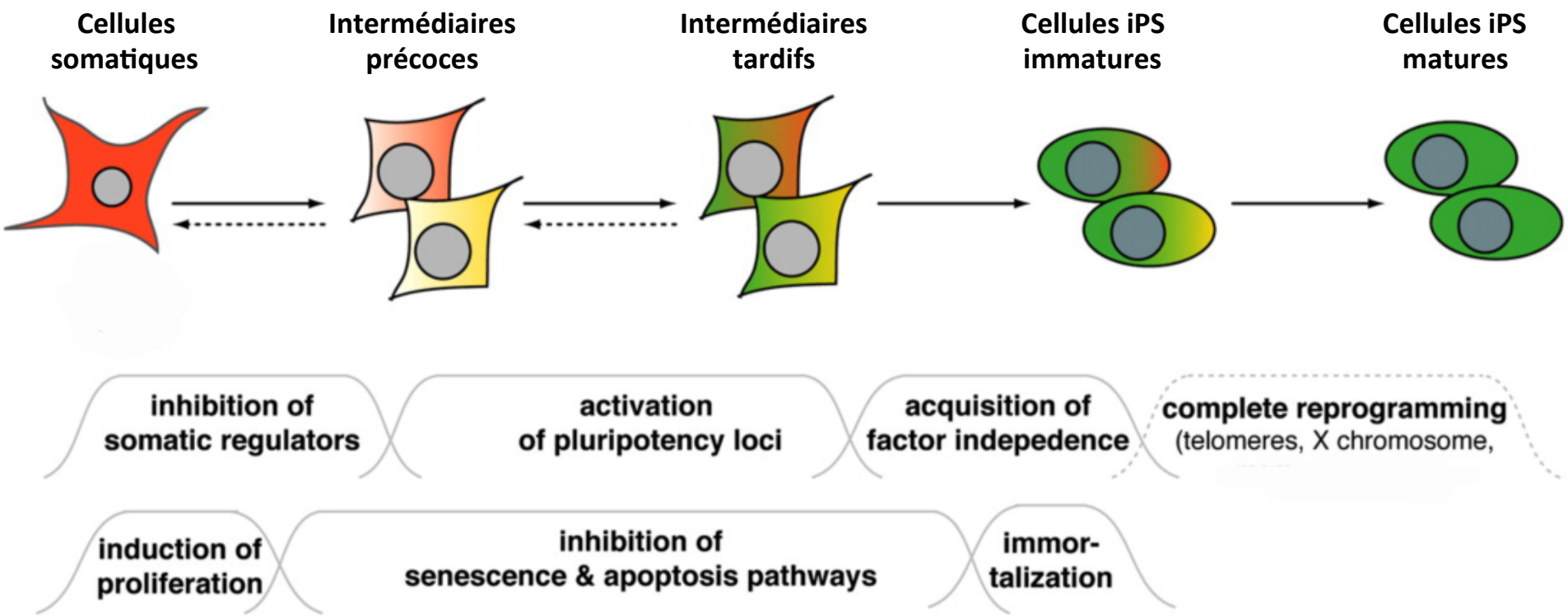
Kératinocytes, cellules souches neurales, lymphocytes, hépatocytes…

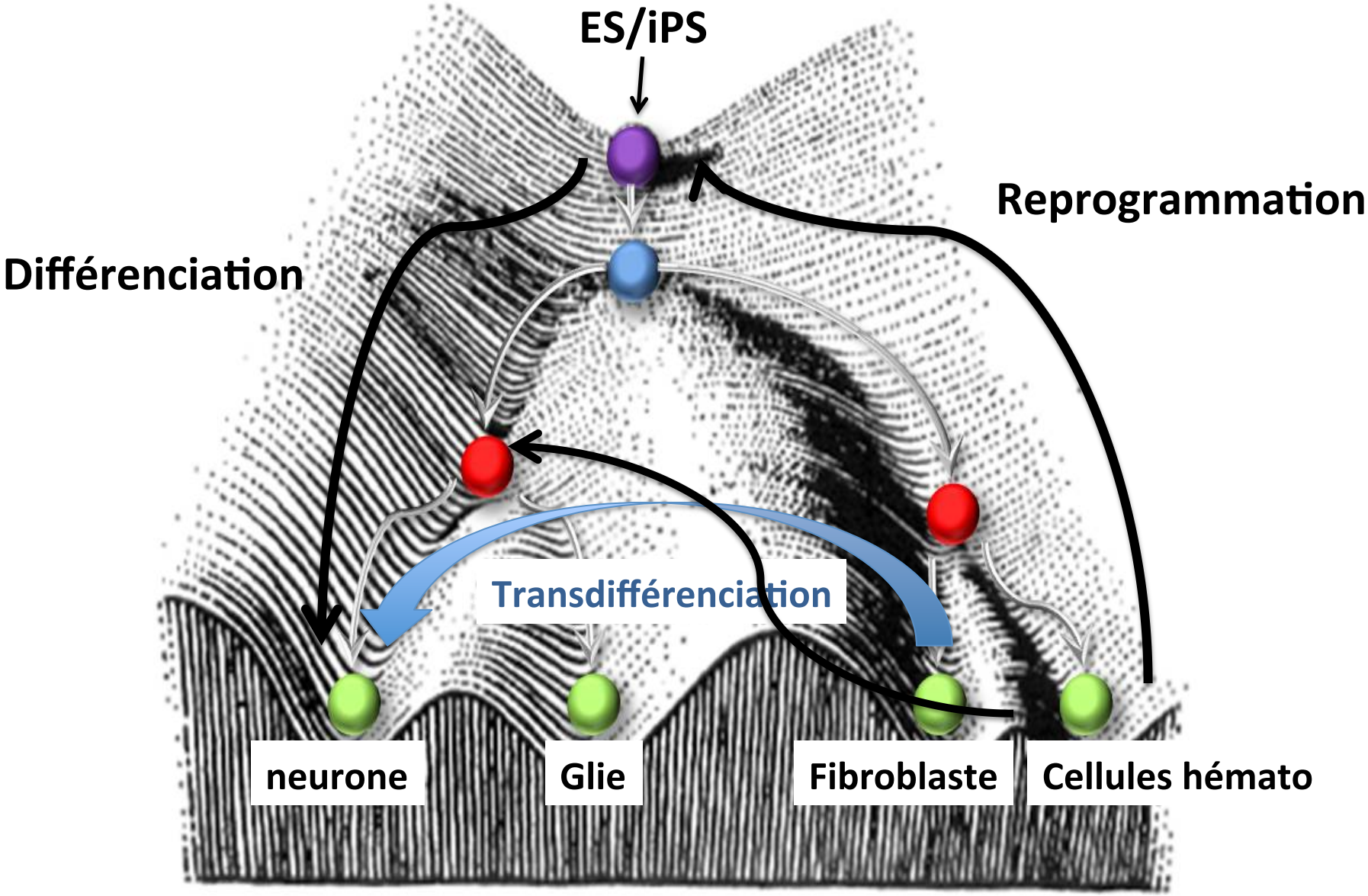


Vecteurs rétroviraux
Vecteurs lentiviraux
Transposons PiggyBac
Vecteurs adénoviraux
Vecteurs plasmidiques polycistroniques
Transfection d'ARNm
Transduction protéique
Petites molécules

Cellules ES

Modèle de la reprogrammation cellulaire

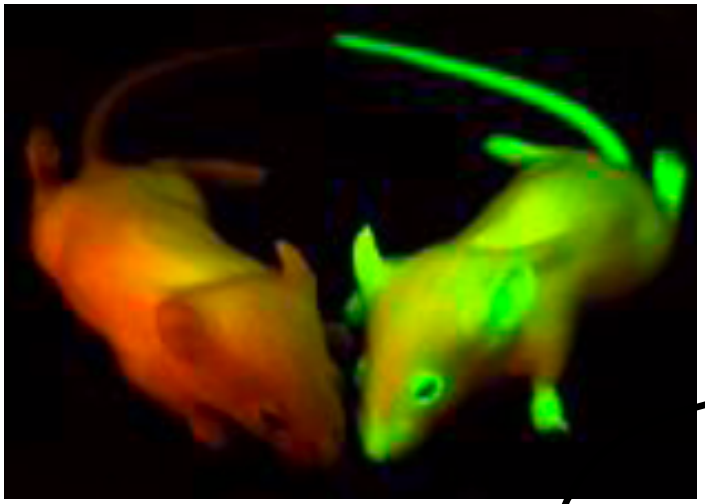


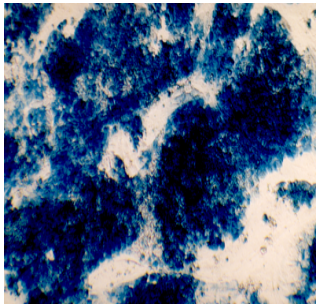

ES/iPS
Reprogrammation
Différenciation
Transdifférenciation
neurone
Glie
Fibroblaste
Cellules hémato

Plan de l'exposé

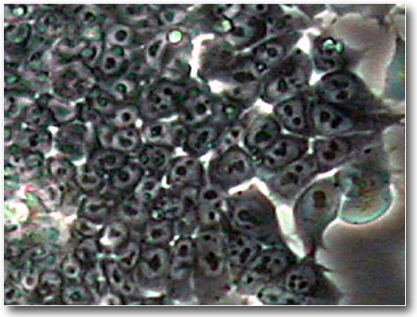
- ✓ *Définition et propriétés des cellules souches pluripotentes:*
  - *Autorenouvellement, Différenciation et Tumorigénèse*
  - *Reprogrammation et Transdifférenciation*
- ✓ *Intérêts de ces cellules chez la souris:*
  - *Techniques de Transgénèse*
  - *Différents types de cellules souches pluripotentes*
- ✓ *Intérêts de ces cellules chez les animaux d'élevage:*
  - *Techniques de dérivation des cellules ES et iPS*
  - *Les différents états de pluripotence*
- ✓ *Intérêts de ces cellules chez l'Homme:*
  - *Thérapie par remplacement cellulaire*
  - *Clonage thérapeutique*

Intérêts des cellules souches pluripotentes: Souris



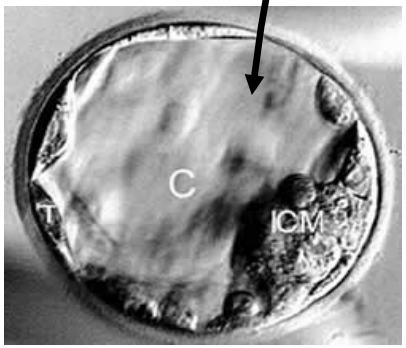


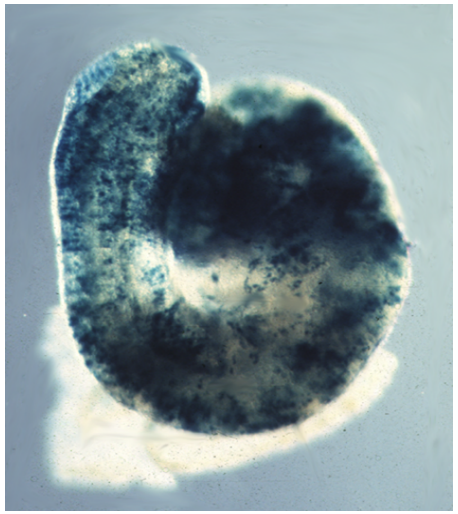
Cellules ES-LacZ



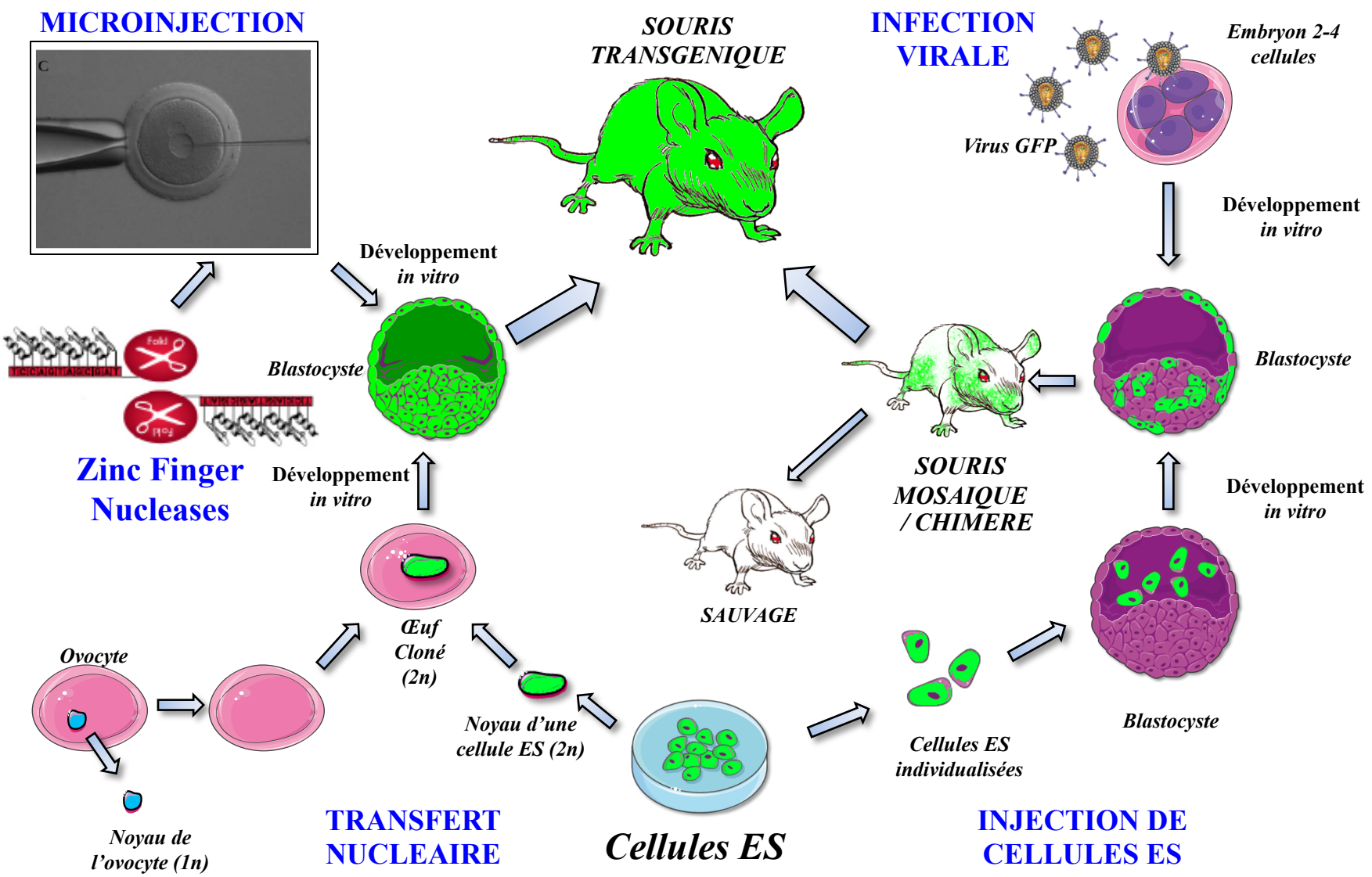
Cellules ES

Blastocyste





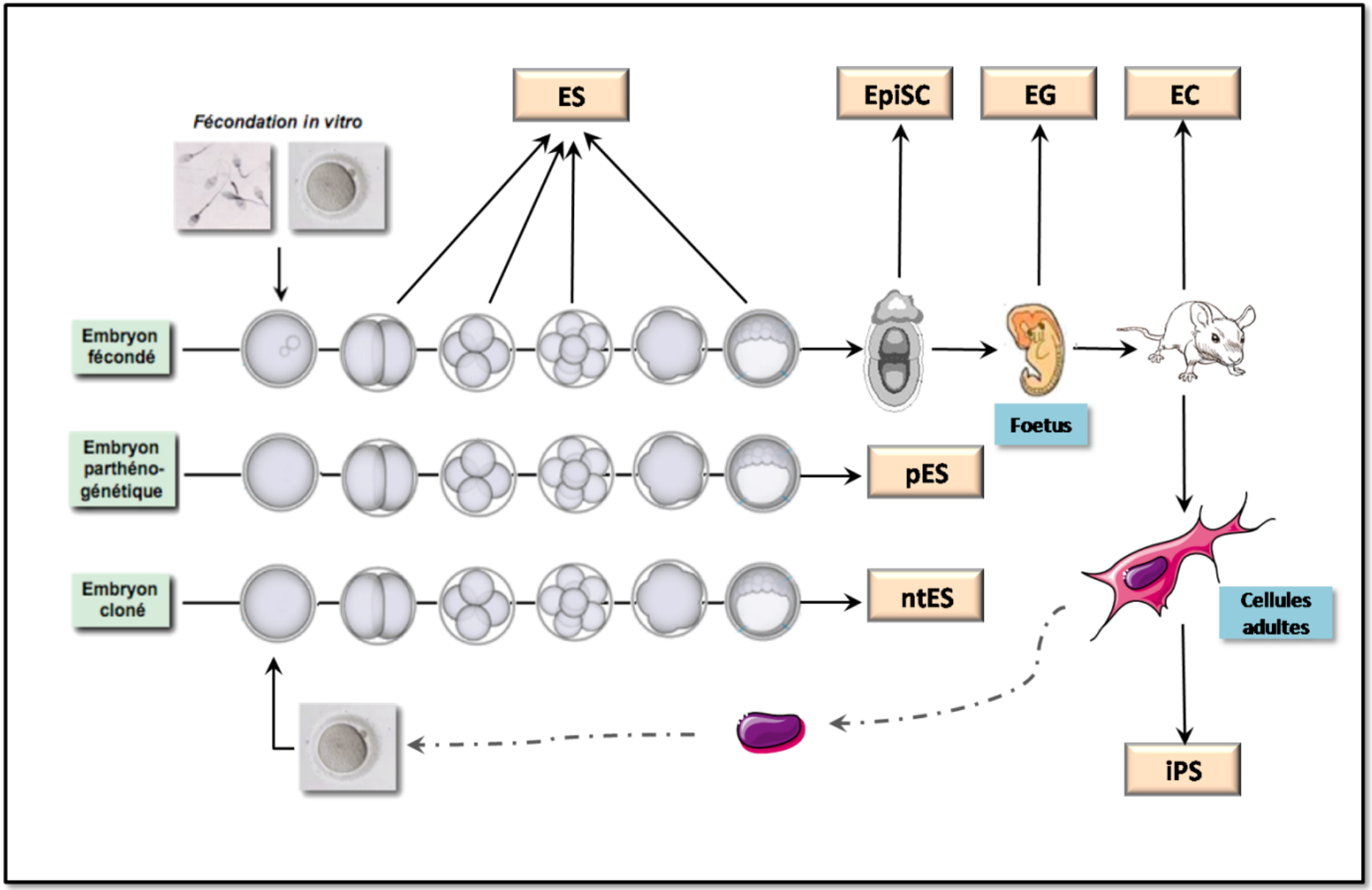
Les techniques de transgénèse



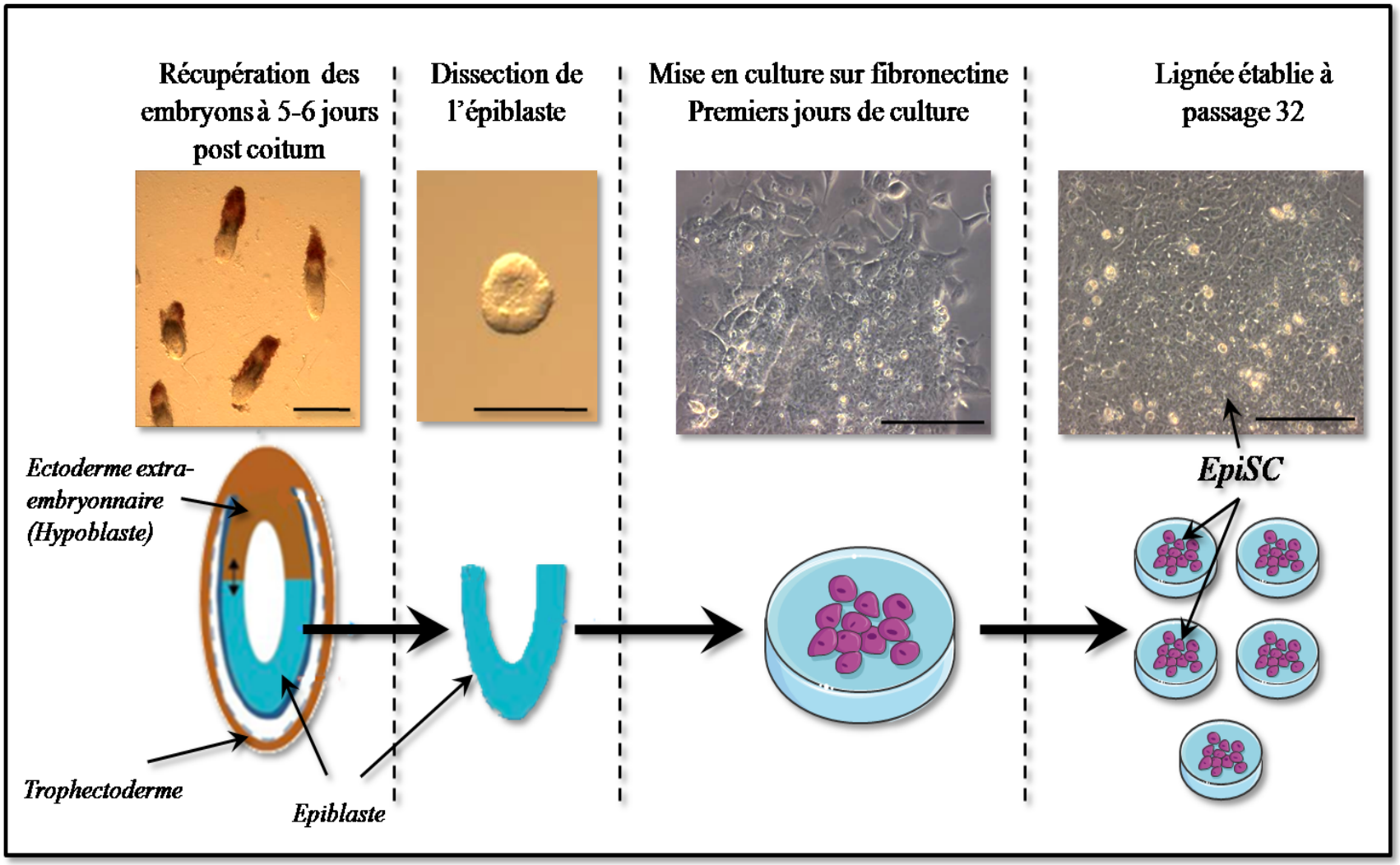
Comparaison des techniques de transgénèse

Vecteur	ADN	Virus	Noyau de cellules ES	Cellules ES
Techniques	Microinjection	Infection	Transfert nucléaire	Injection de cellules
Mécanismes d'insertion	Recombinaison aléatoire		Recombinaison homologue	
Locus d'insertion	Inconnu		Connu	
Nombre d'insertion	Multiple		Unique	
Inconvénients	Modification du génome importante, risque d'apparition de tumeurs. Difficulté d'obtention d'une activité spécifique de tissus.		Obtention de cellules ES (iPS) **Pas de succès dans la création de chimères**	

Différents types de cellules souches pluripotentes



Dérivation des cellules EpiSC



Plan de l'exposé

- ✓ *Définition et propriétés des cellules souches pluripotentes:*
  - *Autorenouvellement, Différenciation et Tumorigénèse*
  - *Reprogrammation et Transdifférenciation*
- ✓ *Intérêts de ces cellules chez la souris:*
  - *Techniques de Transgénèse*
  - *Différents types de cellules souches pluripotentes*
- ✓ *Intérêts de ces cellules chez les animaux d'élevage:*
  - *Techniques de dérivation des cellules ES et iPS*
  - *Les différents états de pluripotence*
- ✓ *Intérêts de ces cellules chez l'Homme:*
  - *Thérapie par remplacement cellulaire*
  - *Clonage thérapeutique*

Intérêts des cellules souches pluripotentes: Animaux d'intérêt agronomique

- ***Recherche fondamentale:***

  Modèles d'étude des grandes fonctions physiologiques
  (reproduction, lactation, photopériodisme, croissance musculaire)

- ***Recherche médicale:***

  Animaux modèles de maladies humaines
  (athérosclérose, tuberculose, arrhythmie, obésité, infection virale…)

- ***Industrie:***

  Bioréacteurs pour la production de molécules pharmacologiques dans le lait

Animaux Bioréacteurs

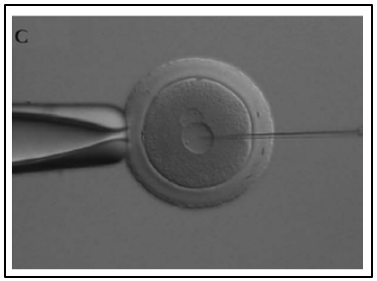
- Modifications post-traductionnelles absentes chez les levures et bactéries.
- Moins coûteux qu'une production *in vitro* .

Espèce	Temps de gestation (mois)	Maturation (mois)	Volume de lait par lactation (Litre)	Temps entre la microinjection et la production de lait (mois)	Production de protéines recombinantes (Kg/an)	Fraction de protéines (%)
Souris	0.75	1	0.0015	3-6	-	-
Lapin	**1**	**5-6**	**1-1.5**	**7-8**	**1**	**14**
Porc	4	7-8	200-400	15-16	100	6
Mouton	5	6-8	200-400	16-18	100	7
Chèvre	5	6-8	600-800	16-18	100	6
Vache	9	15	8000	30-33	1000	3

Différences entre les espèces d'intérêt agronomique (Fan & Watanabe, Pharmacology & Therapeutics, 2003)

Transgénèse chez le lapin

MICROINJECTION



Zinc Finger Nucleases

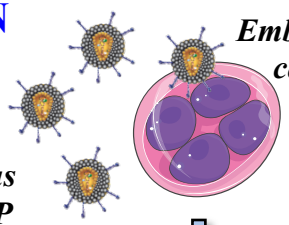
?

Développement *in vitro*

Blastocyste

TRANSGENIQUE

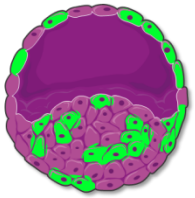
INFECTION VIRALE



Embryon 2-4 cellules

Virus GFP

Développement *in vitro*



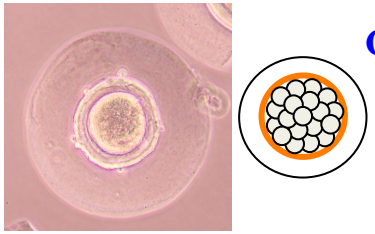
Blastocyste

LAPIN MOSAIQUE

Cellules Souches pluripotentes

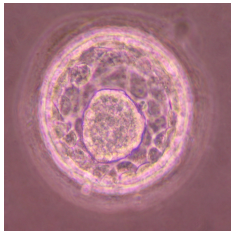
Projet de recherche

Dérivation de cellules ES de lapin



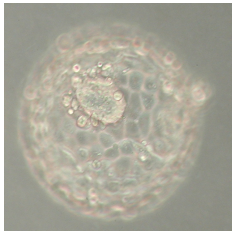
Morula

Culture



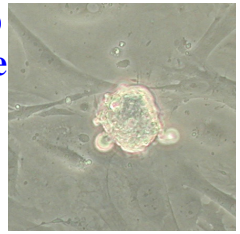
Blastocyste

Pronase



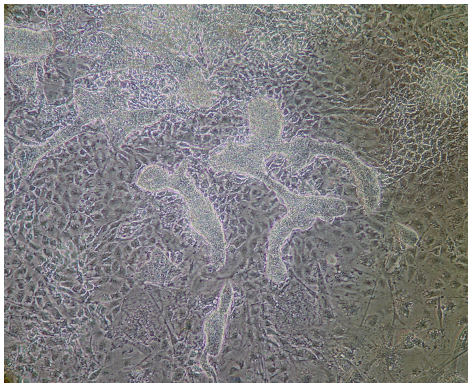
Blastocyste sans manteau muqueux ni zone pellucide

Immuno chirurgie



ICM isolé

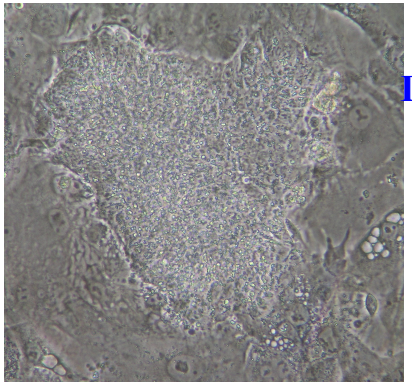
Culture sur feeders
DMEM/F12 medium
+ 20% KOSR
+ 13ng/ml FGF2



P0: Excroissances

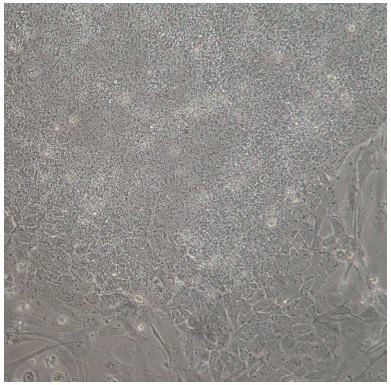
5 jours de culture

Dissociation mécanique



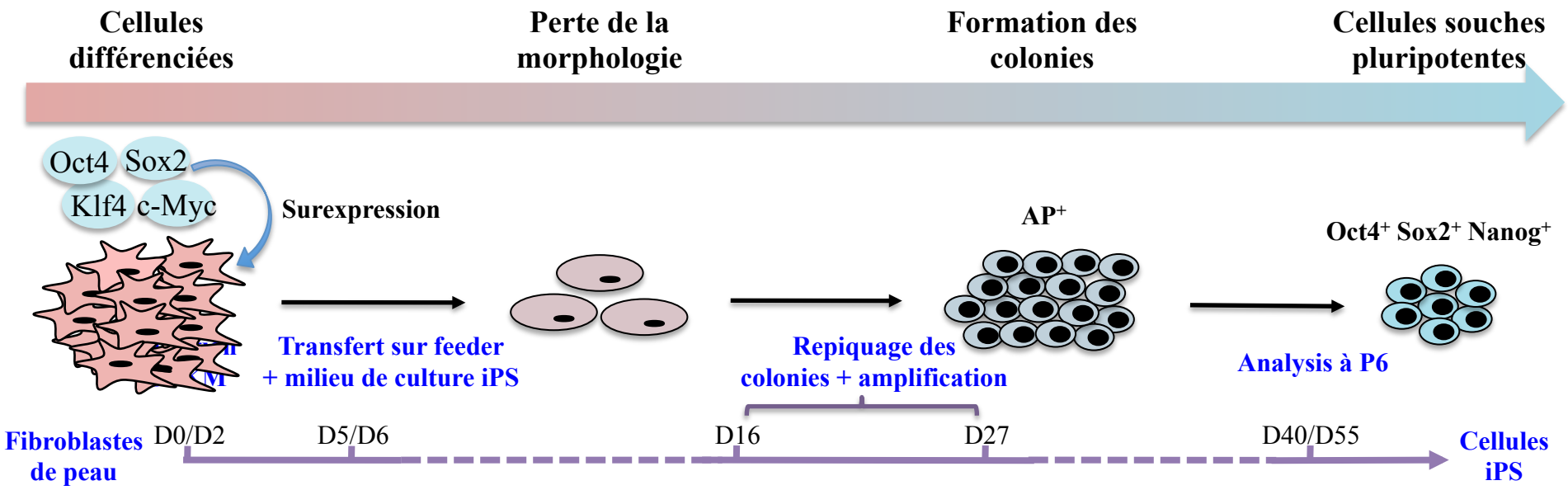
P1: Colonie de cellules ES

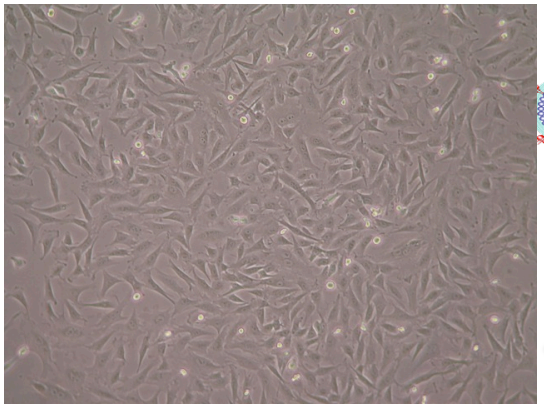
Collagènase



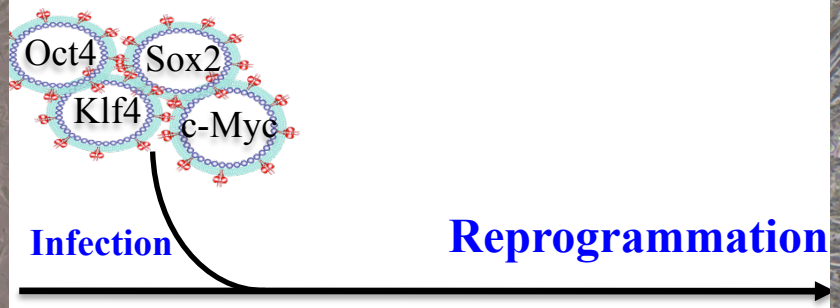
Lignée de cellules ES P28

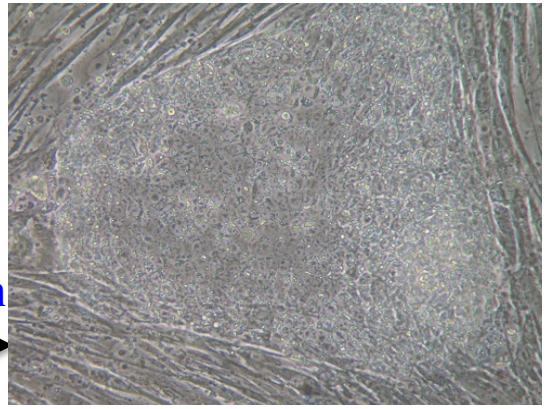
Génération de cellules iPS de lapin





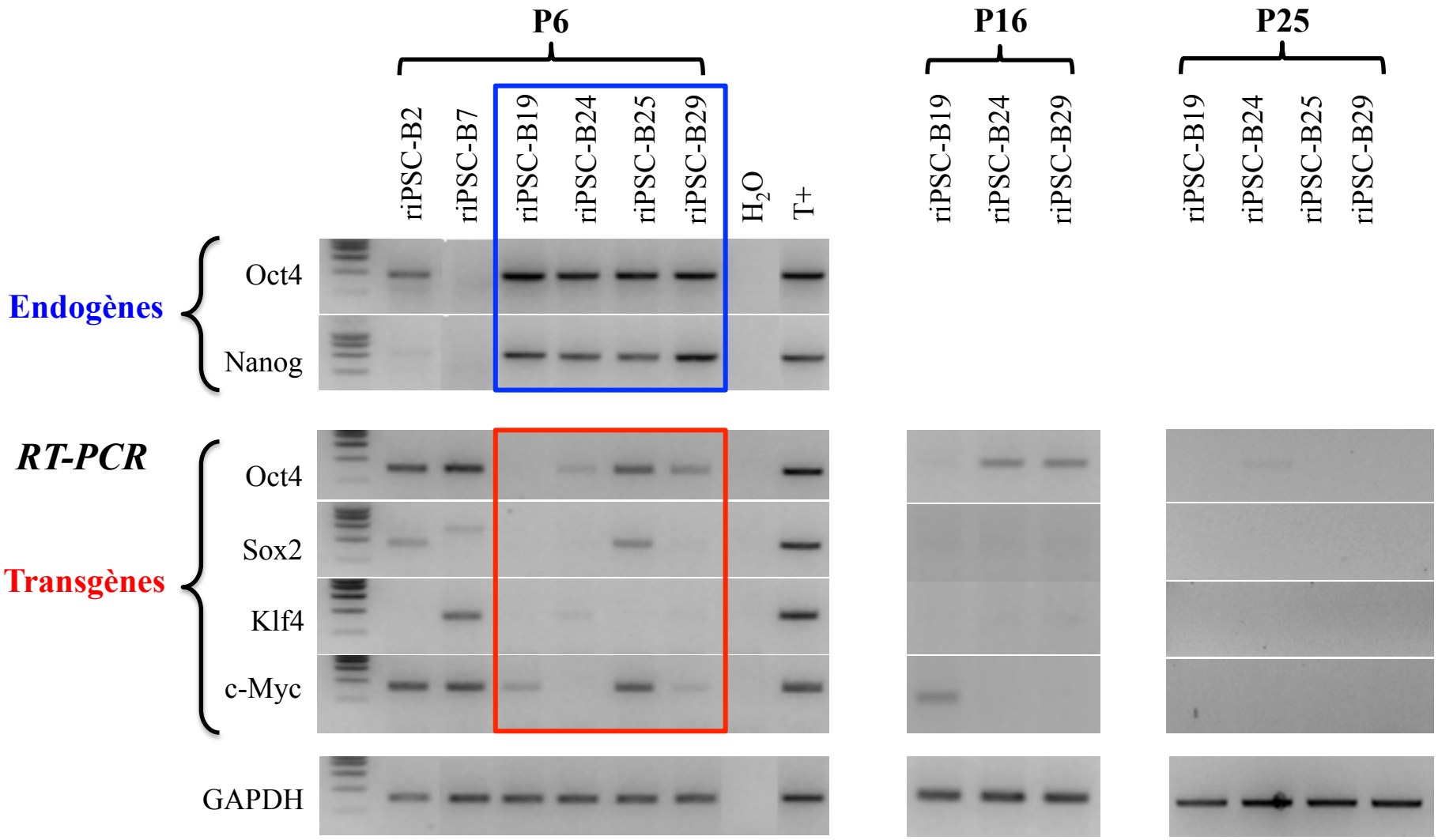
Fibroblastes de peau de jeune lapin





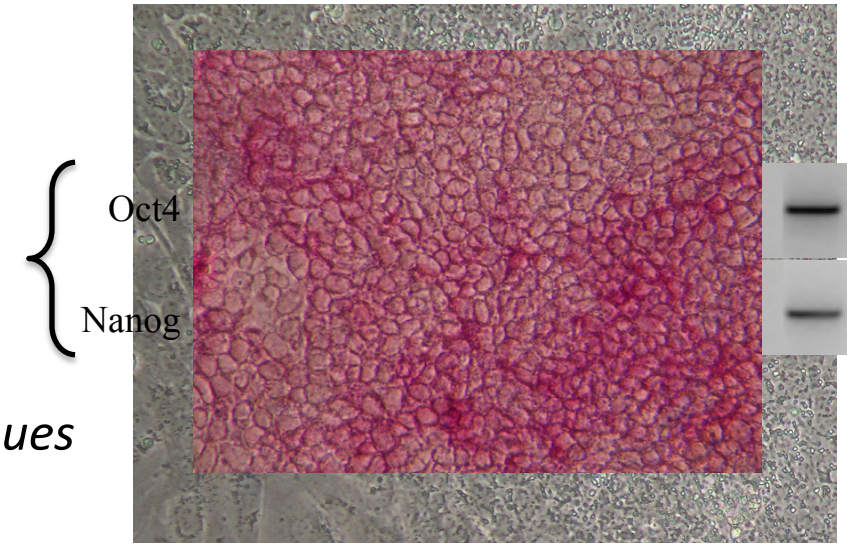
Colonie de cellules iPS de lapin

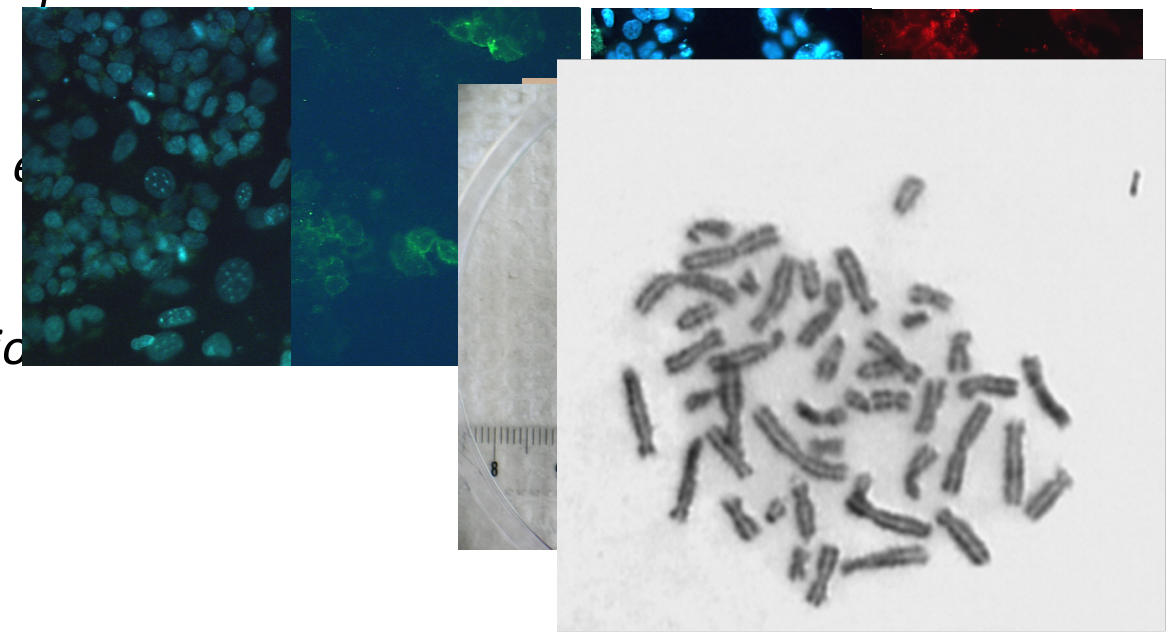
Ré-expression des endogènes et extinction des transgènes



Caractérisation des cellules souches pluripotentes

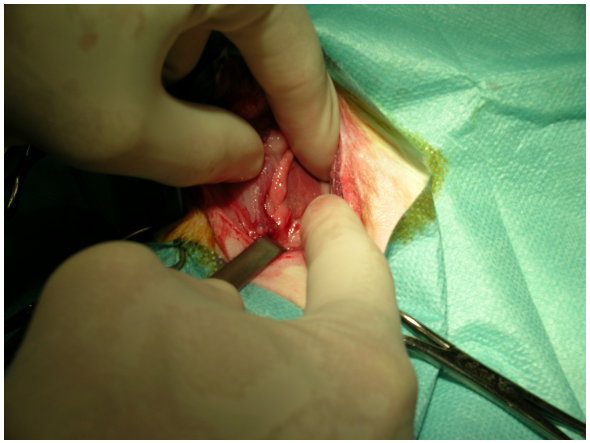
- ✓ *Morphologie et vitesse de prolifération*
- ✓ *Expression des gènes de pluripotence*
- ✓ *Expression de marqueurs de surface spécifiques*
- ✓ *Activités enzymatiques: Phosphatase Alcaline et Télomérase*
- ✓ *Pluripotence in vitro: Corps e*
- ✓ *Pluripotence in vivo: Inductio*
- ✓ *Caryotype normal*





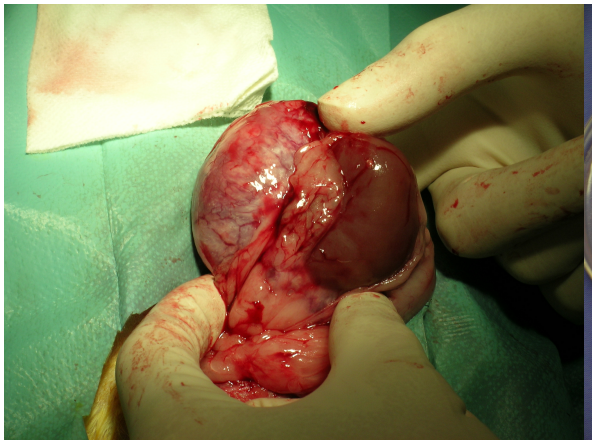
Greffes autologues de cellules iPS

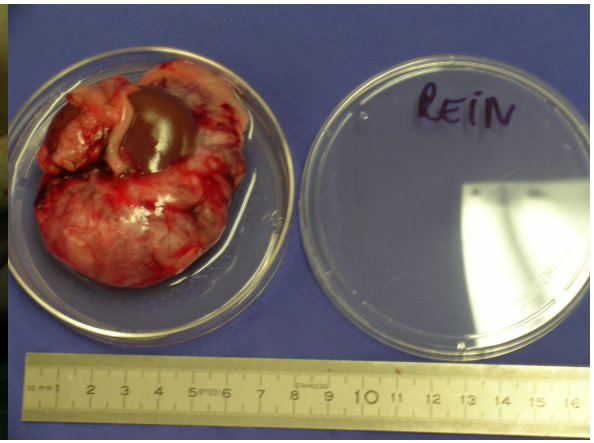
Intramusculaire

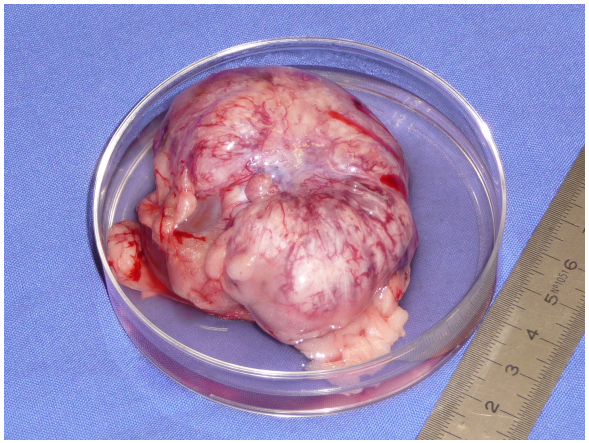


Sous la capsule rénale

Sous-cutanée

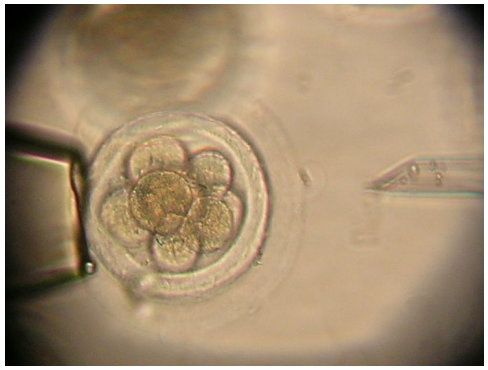




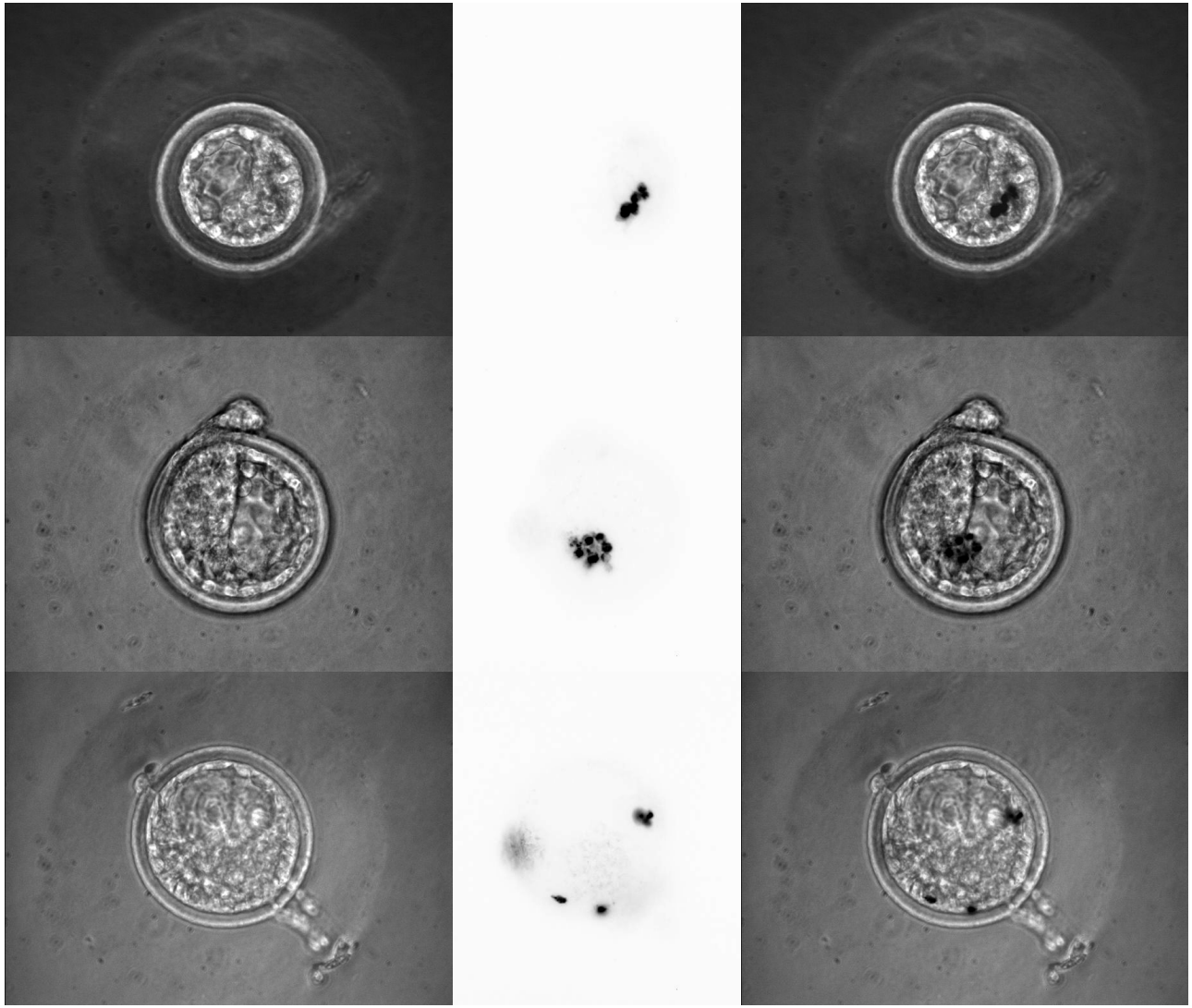


Production de lapins chimères

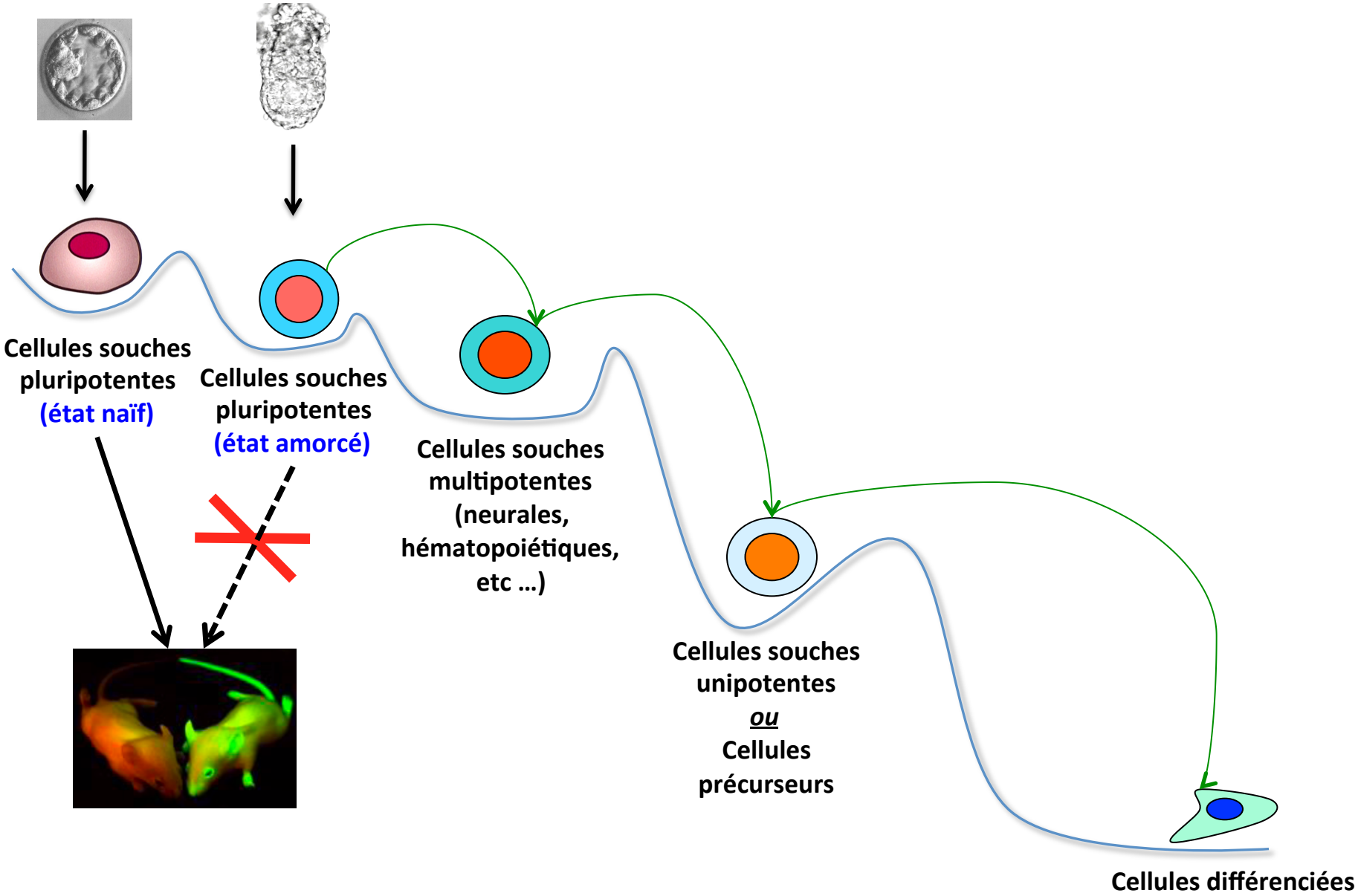
Injection de cellules ES GFP$^+$ dans des embryons de 8 cellules et analyse de la fluorescence au stade blastocyste



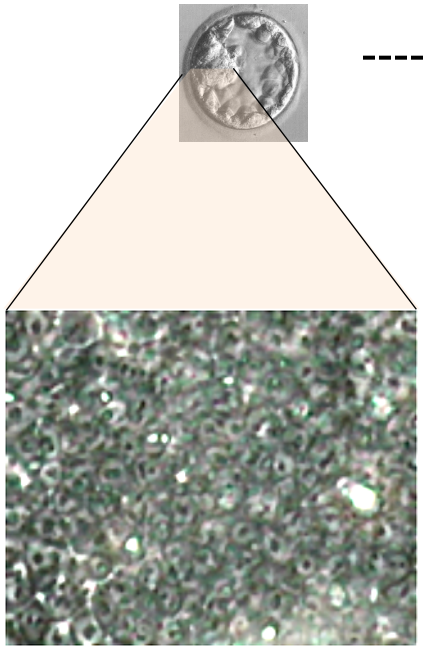
Lumière blanche ***GFP Fluorescence*** ***Superposition***



Etats naïf et amorcé de pluripotence chez les rongeurs



Etats naïf et amorcé de pluripotence: différenciation et réversion



Cellules ES (état naïf)

« LIF/BMP4 dépendantes »

- Expression de gènes caractéristiques de l'ICM (Klf2, Klf4, Nanog)
- 2 chromosomes X actifs

implantation

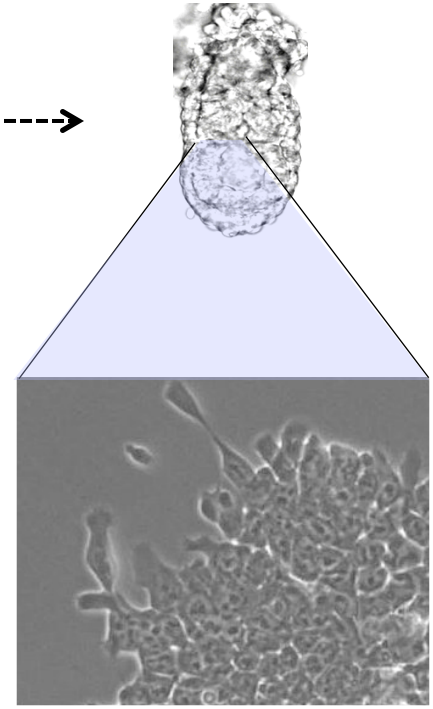
Inactivation du 2nd chrom. X

DIFFERENCIATION

Inhibition de la signalisation LIF/Stat3
Activation de la signalisation FGF2
Activation de la signalisation activin

REVERSION

Activation de la signalisation LIF
Inhibtion de la signalisation FGF2
Inhibition de la signalisation activin
+
Inhibition des voies de différenciation
Surexpression de facteurs de pluripotence spécifiques de l'état naïf (Klf2, Klf4, Nanog)

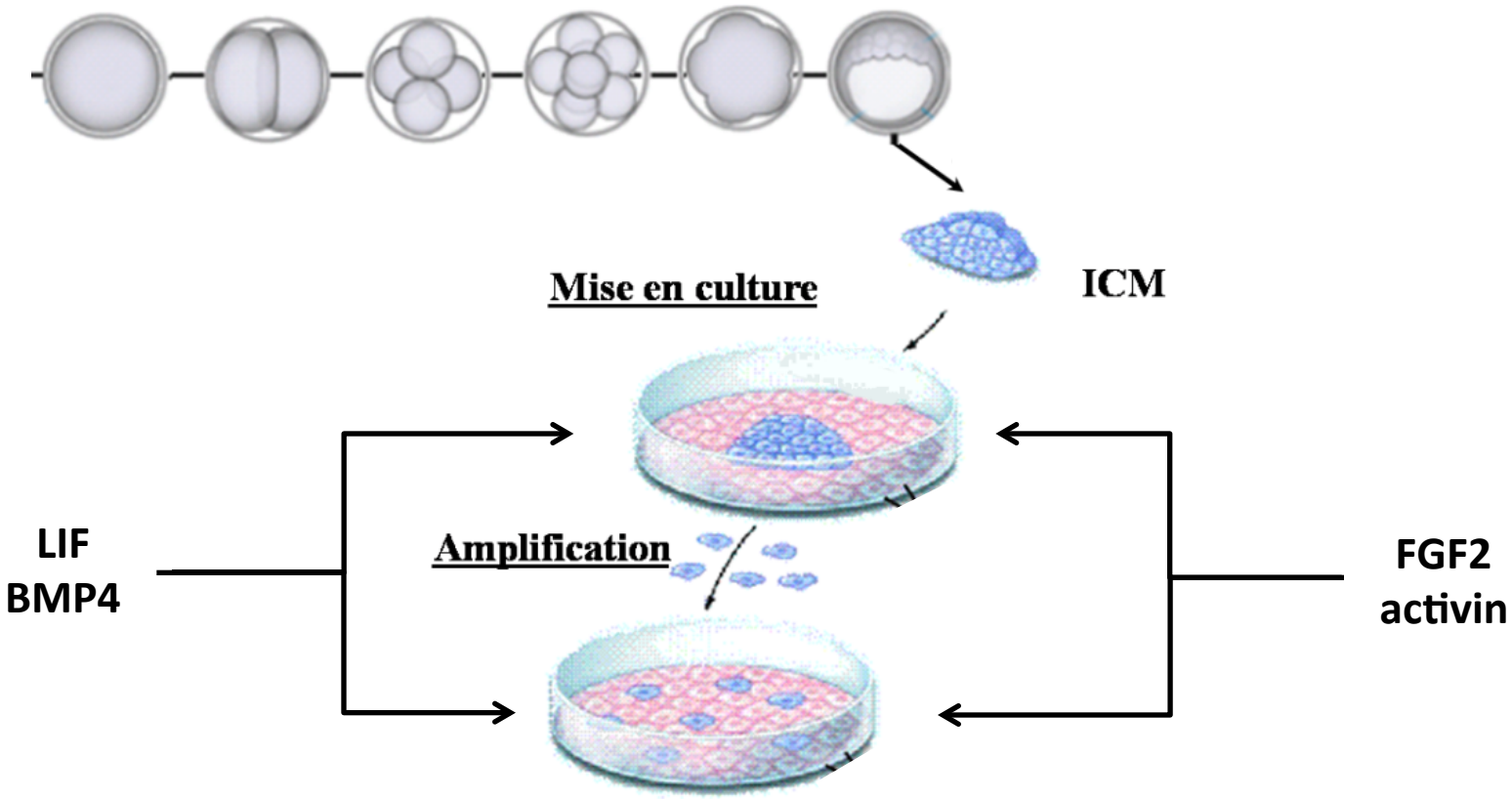


Cellules EpiSC (état amorcé)

« FGF2/activin dépendantes »

- Expression de gènes caractéristiques de l'épiblaste de l'embryon post-implantatoire
- Inactivation de l'un des chromosomes X

Etat de pluripotence des cellules ES non murines



- Expression de gènes caractéristiques de l'ICM
- 2 chromosomes X actifs

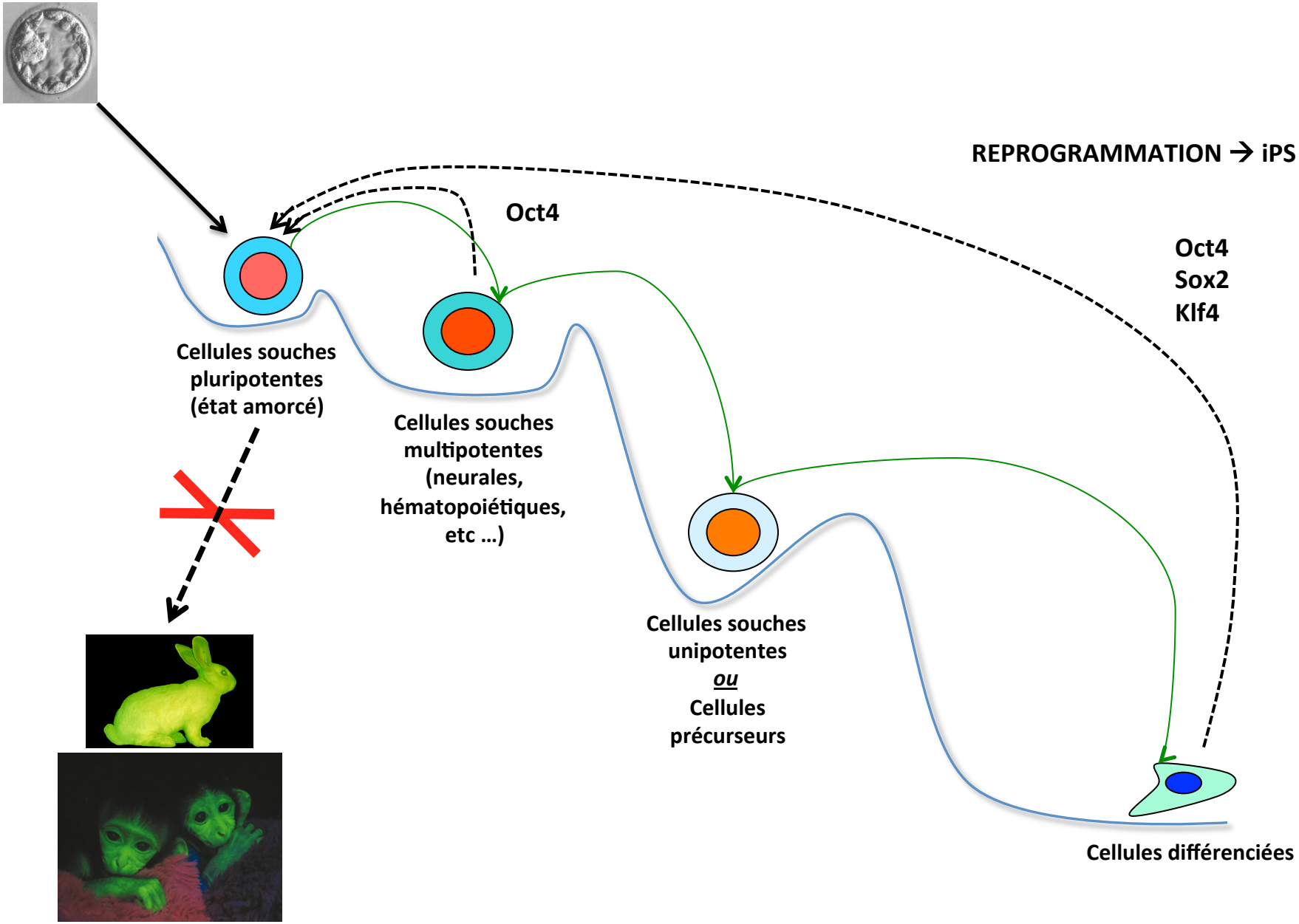
SOURIS, RAT

- Expression de gènes caractéristiques de l'épiblaste de l'embryon post-implantatoire
- Inactivation de l'un des chromosomes X

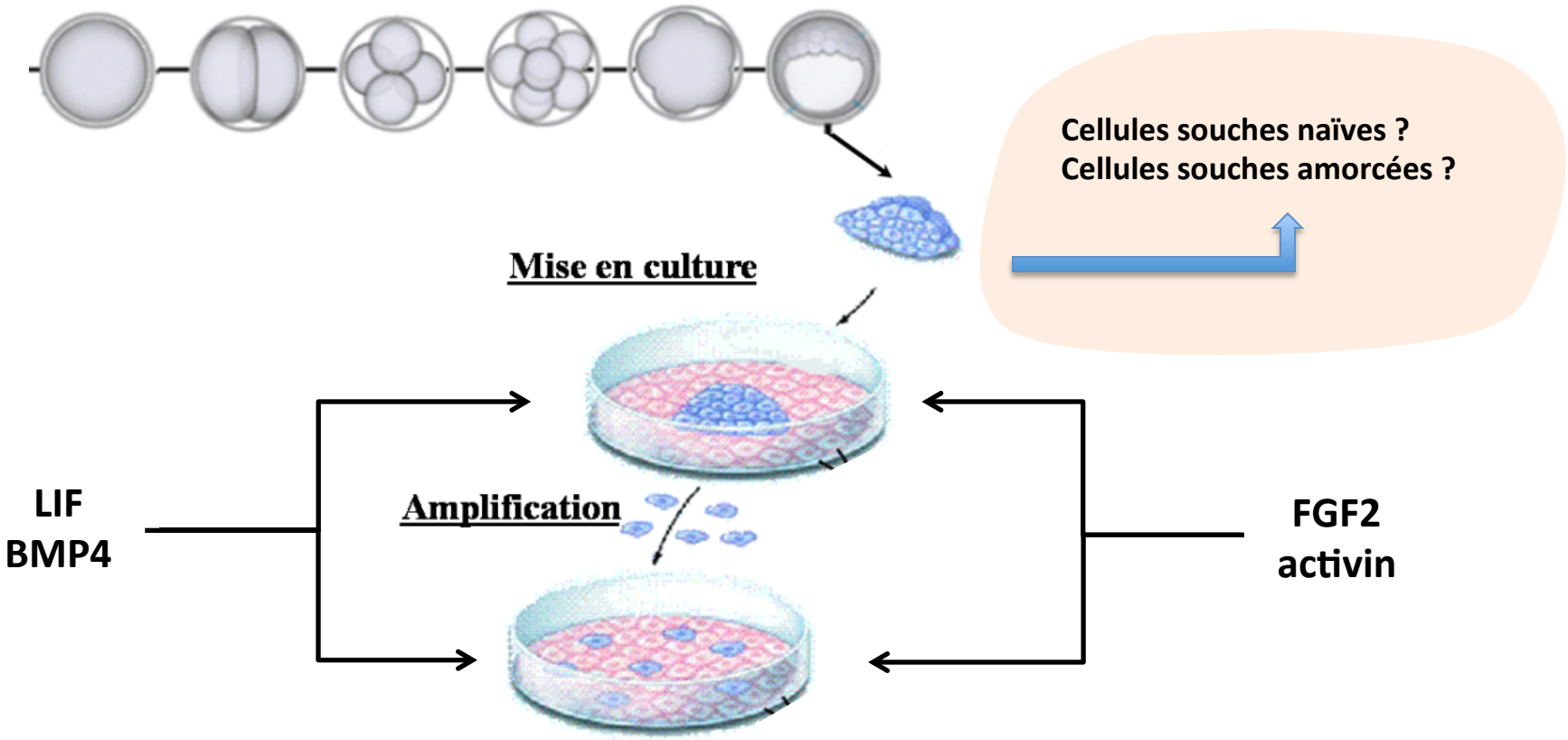
Proche des cellules EpiSC murines

LAPIN, SINGE, HOMME

Les cellules ES et iPS non murines sont des cellules amorcées



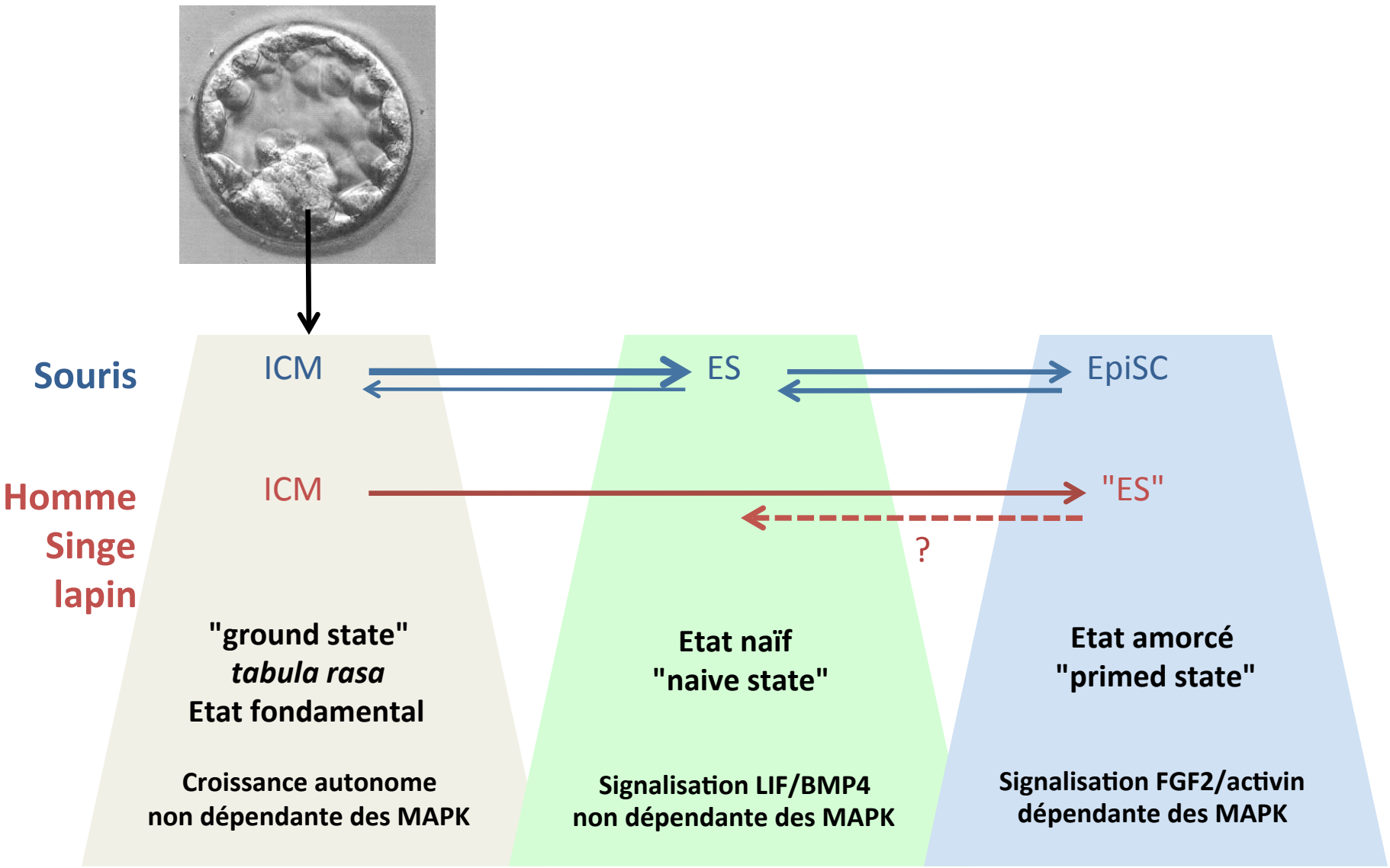
Etat de pluripotence des cellules de l'ICM?



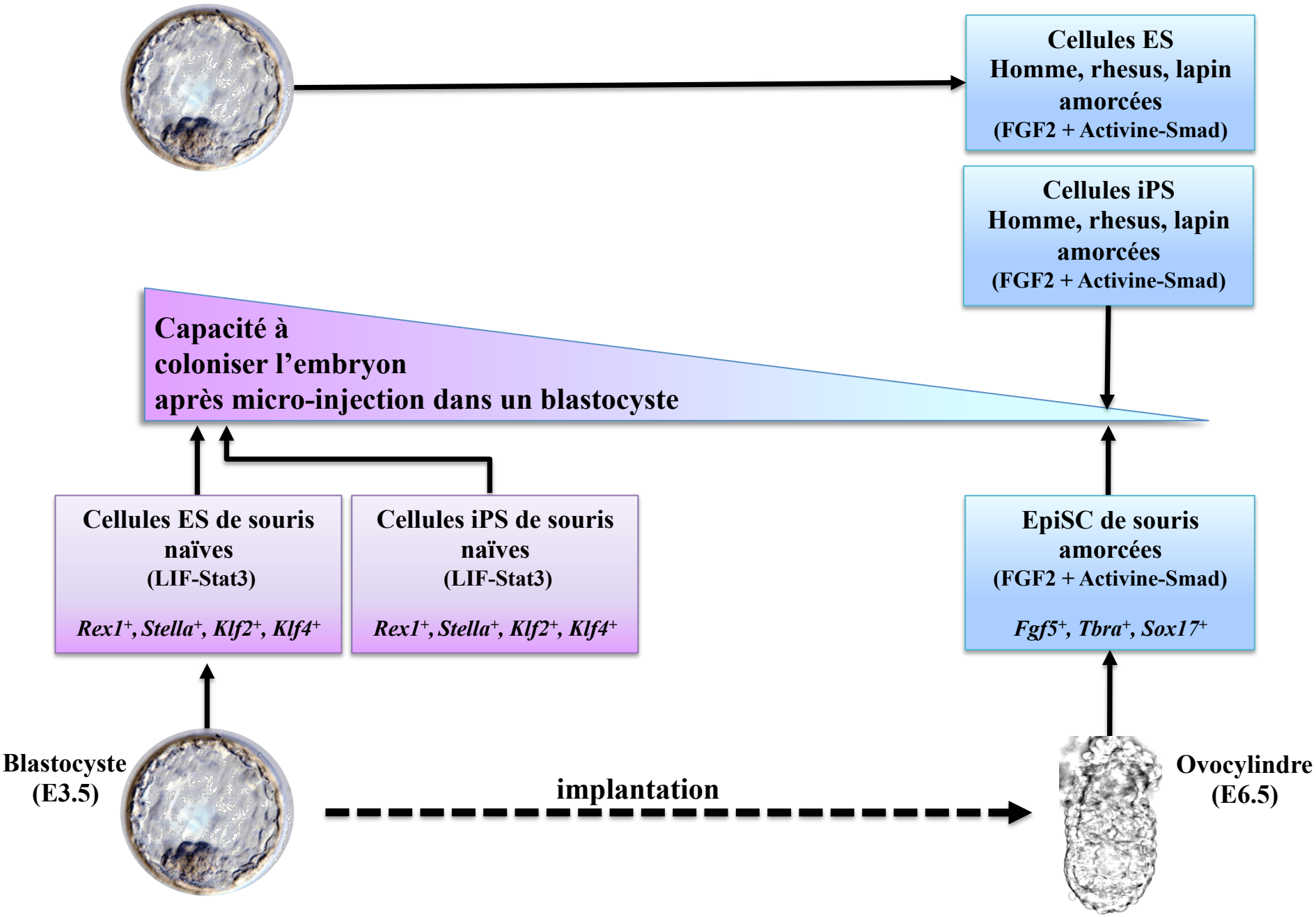
SOURIS, RAT
(cellules ES naïves)

LAPIN, SINGE, HOMME
(cellules amorcées)

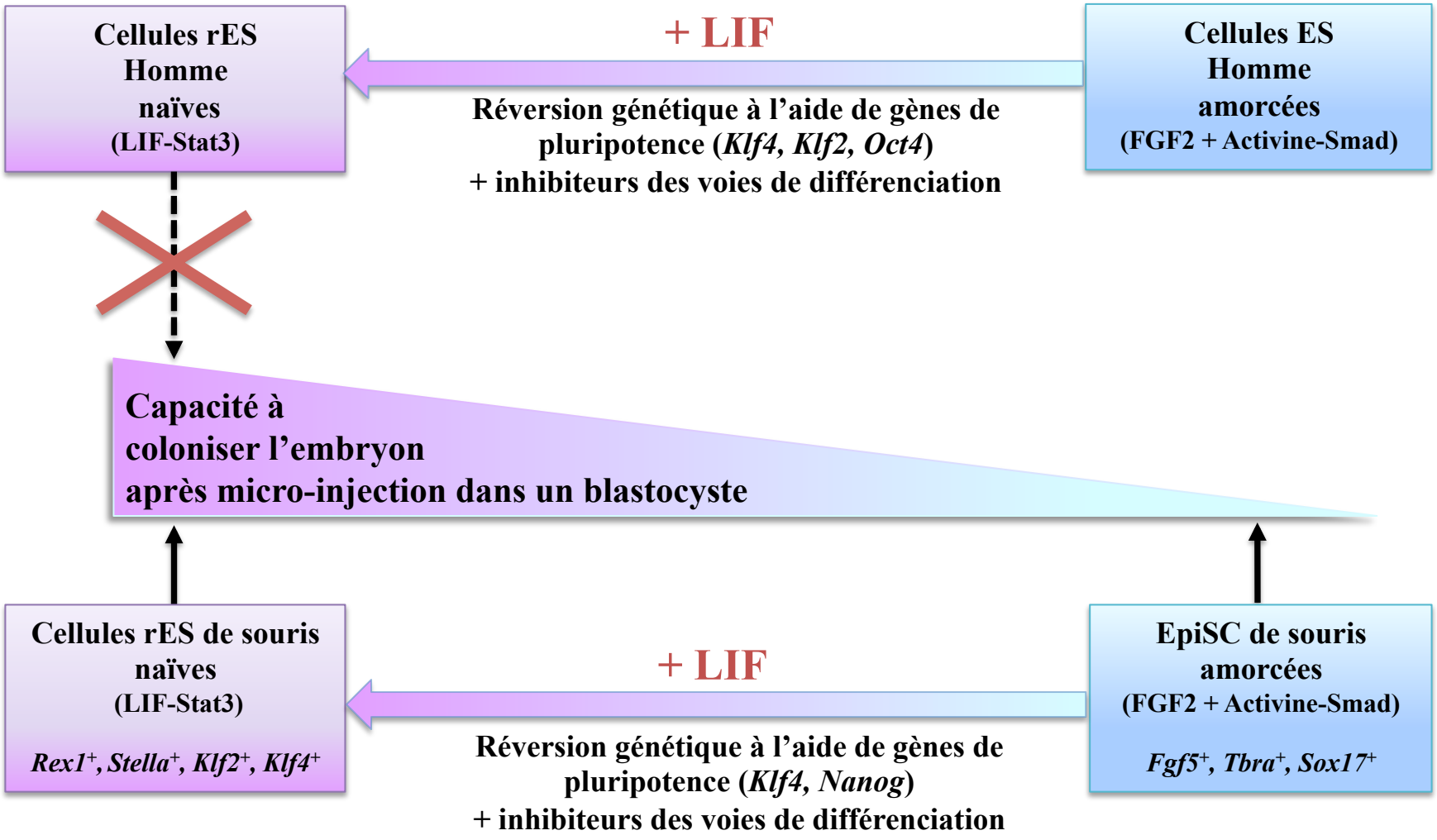
La pluripotence dans tous ses états



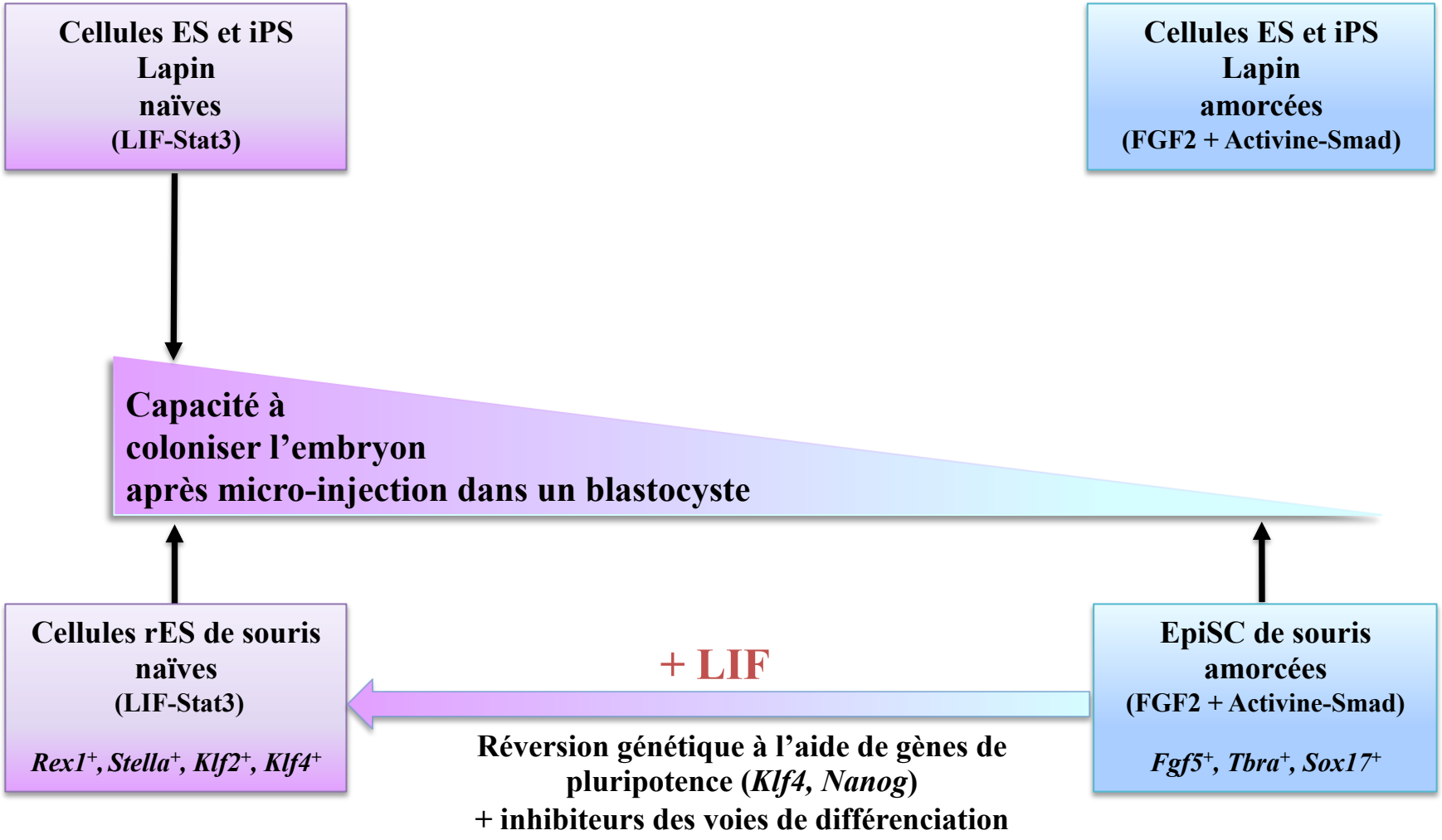
Transgénèse et cellules amorcées



Réversion des cellules amorcées vers un état naïf



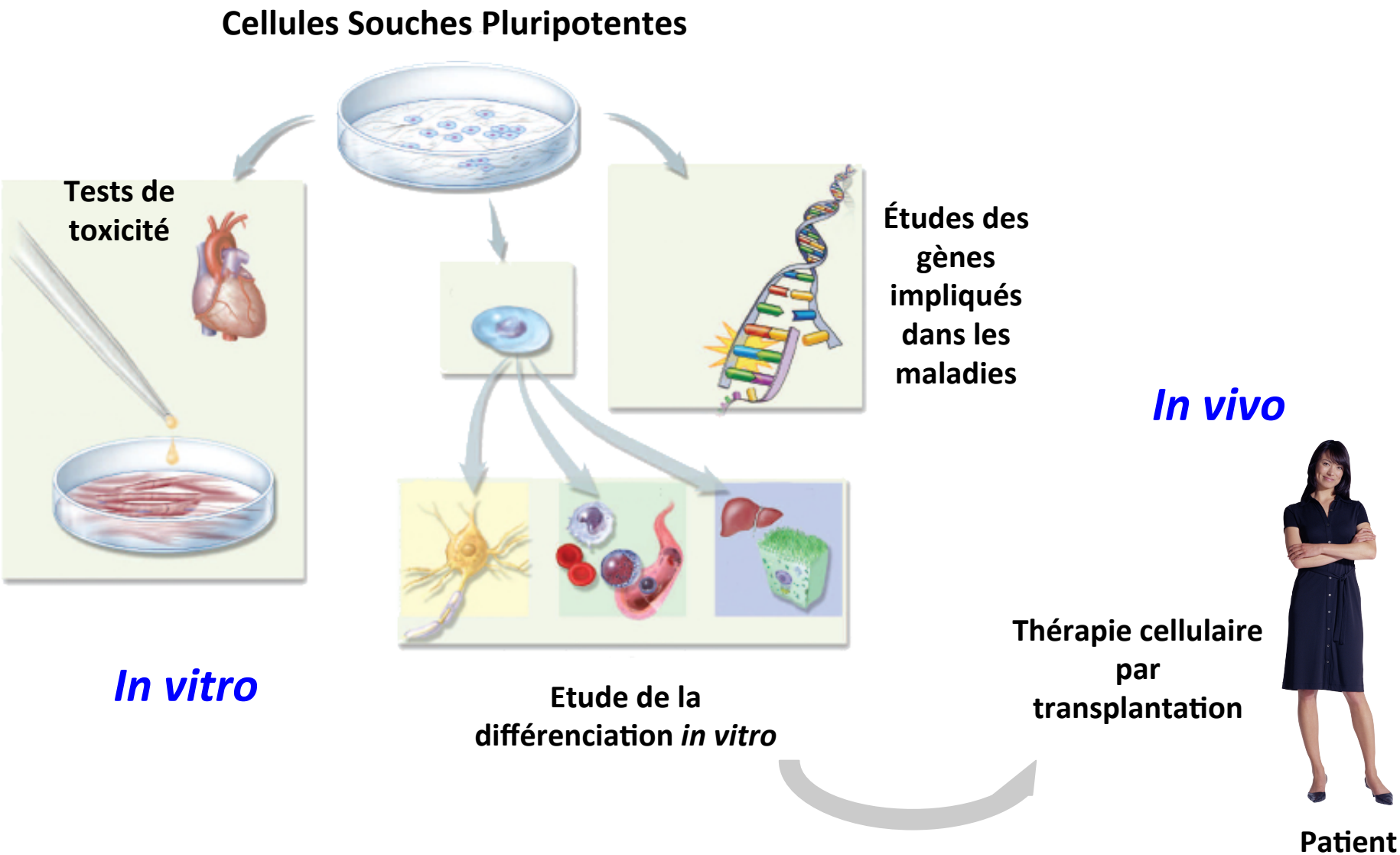
Réversion des cellules souches pluripotentes de lapin



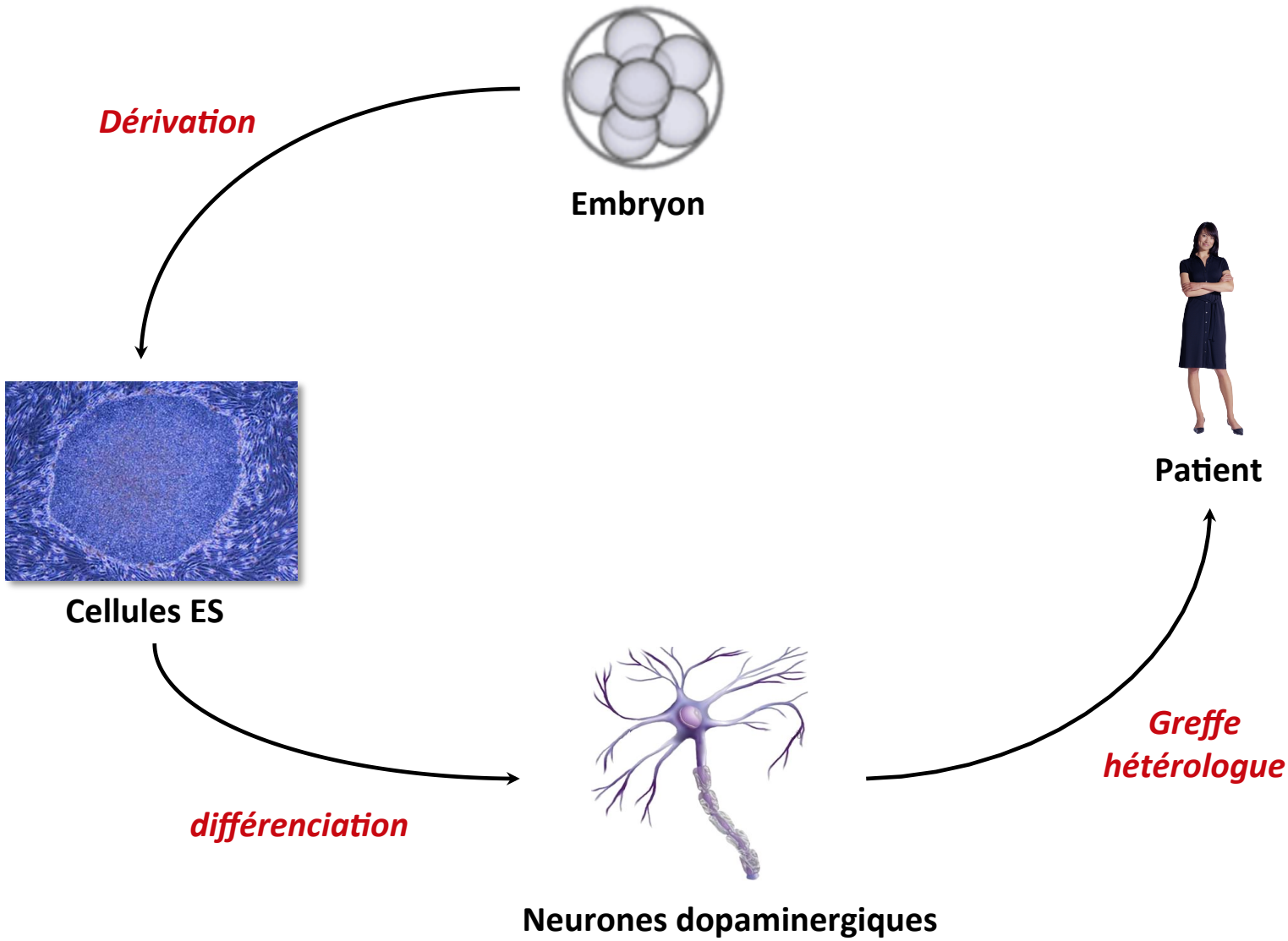
Plan de l'exposé

- ✓ *Définition et propriétés des cellules souches pluripotentes:*
  - *Autorenouvellement, Différenciation et Tumorigénèse*
  - *Reprogrammation et Transdifférenciation*
- ✓ *Intérêts de ces cellules chez la souris:*
  - *Techniques de Transgénèse*
  - *Différents types de cellules souches pluripotentes*
- ✓ *Intérêts de ces cellules chez les animaux d'élevage:*
  - *Techniques de dérivation des cellules ES et iPS*
  - *Les différents états de pluripotence*
- ✓ *Intérêts de ces cellules chez l'Homme:*
  - *Thérapie par remplacement cellulaire*
  - *Clonage thérapeutique*

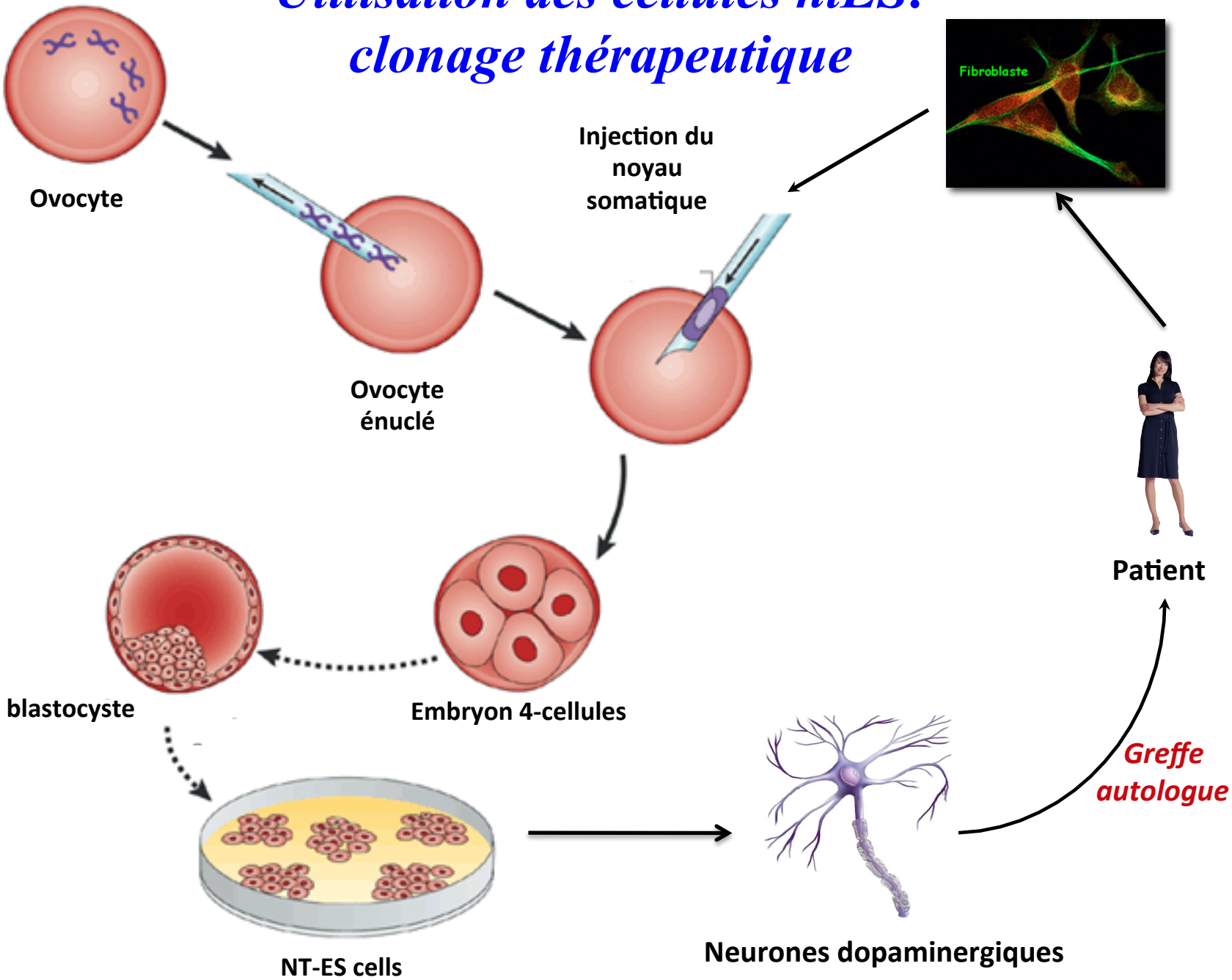
Intérêts des cellules souches pluripotentes: Homme



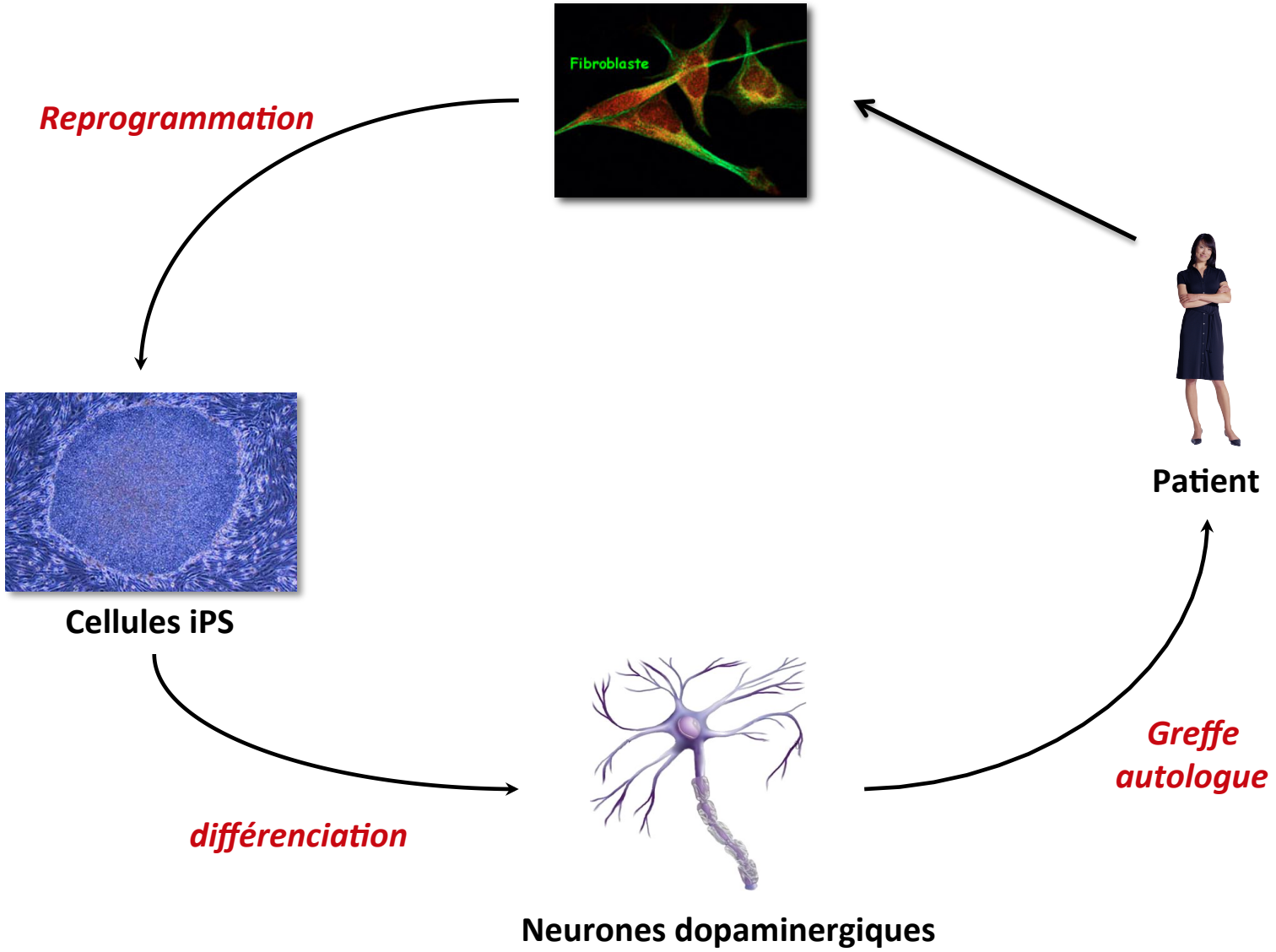
Utilisation des cellules ES: greffes hétérologues



Utilisation des cellules ntES: clonage thérapeutique

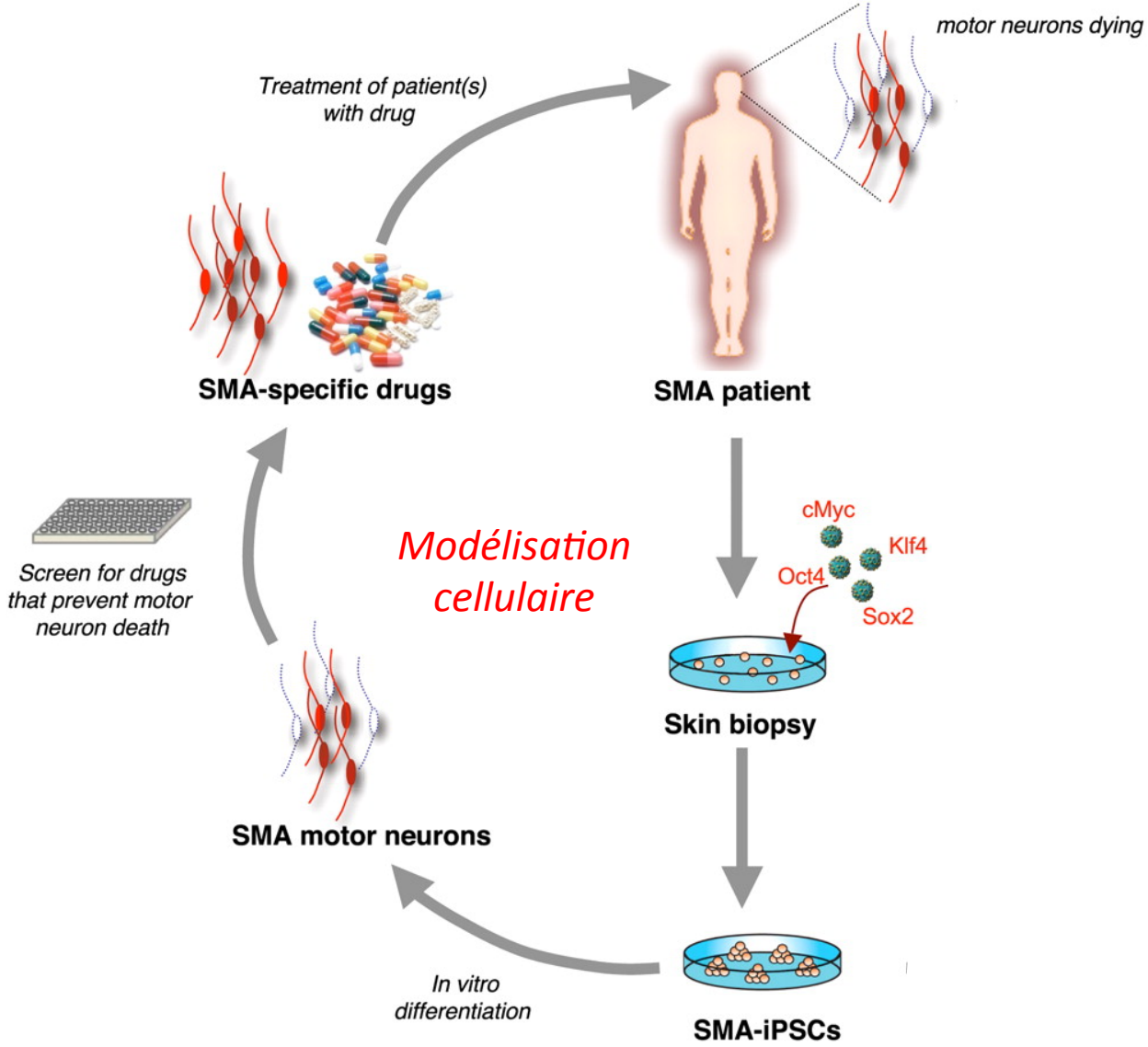


Utilisation des cellules iPS: greffes autologues

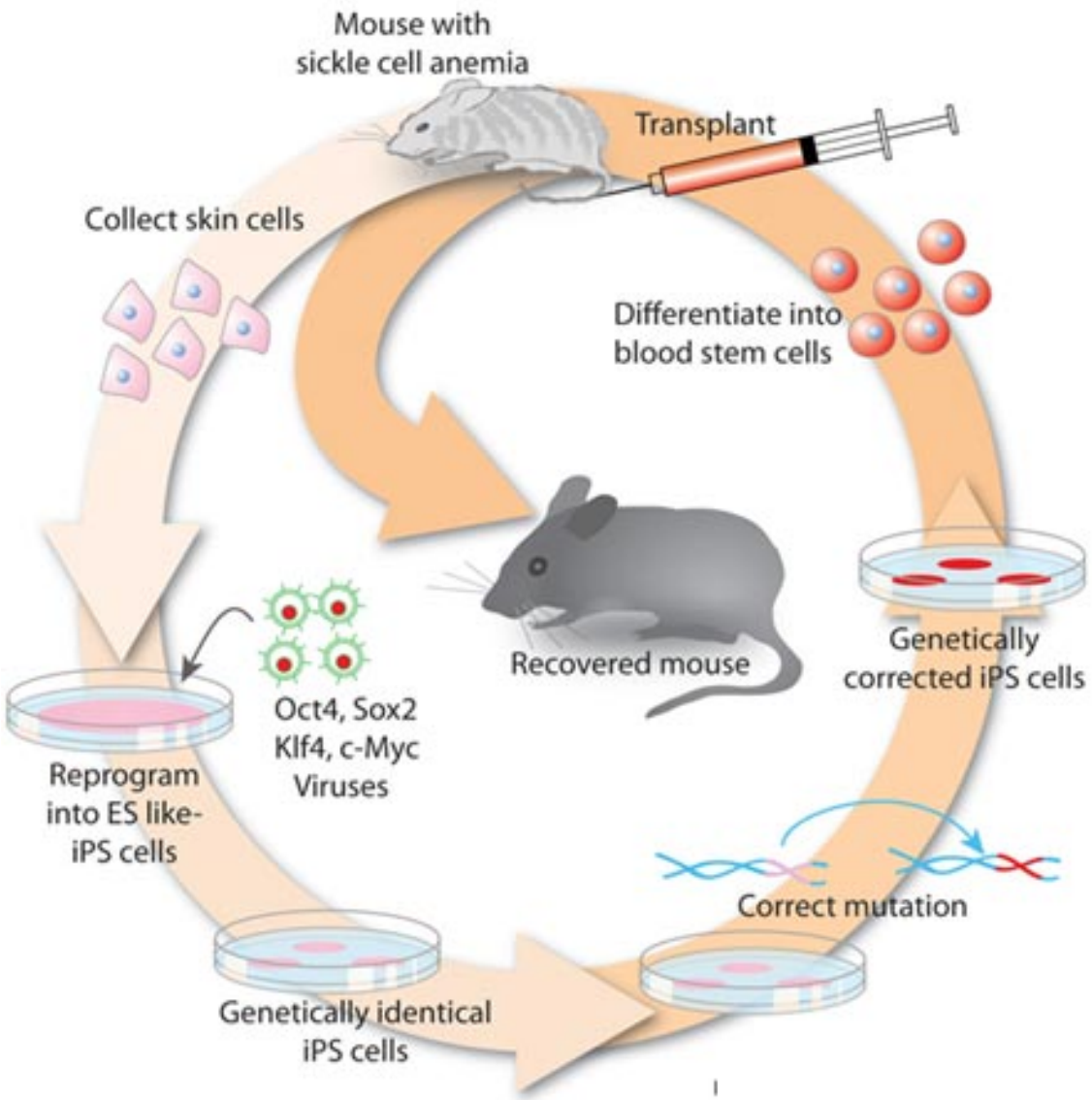


Exemple d'utilisation des cellules iPS: SMA (Spinal Muscular Atrophy)

dégénérescence des neurones moteurs dues à une mutation du gène SMN

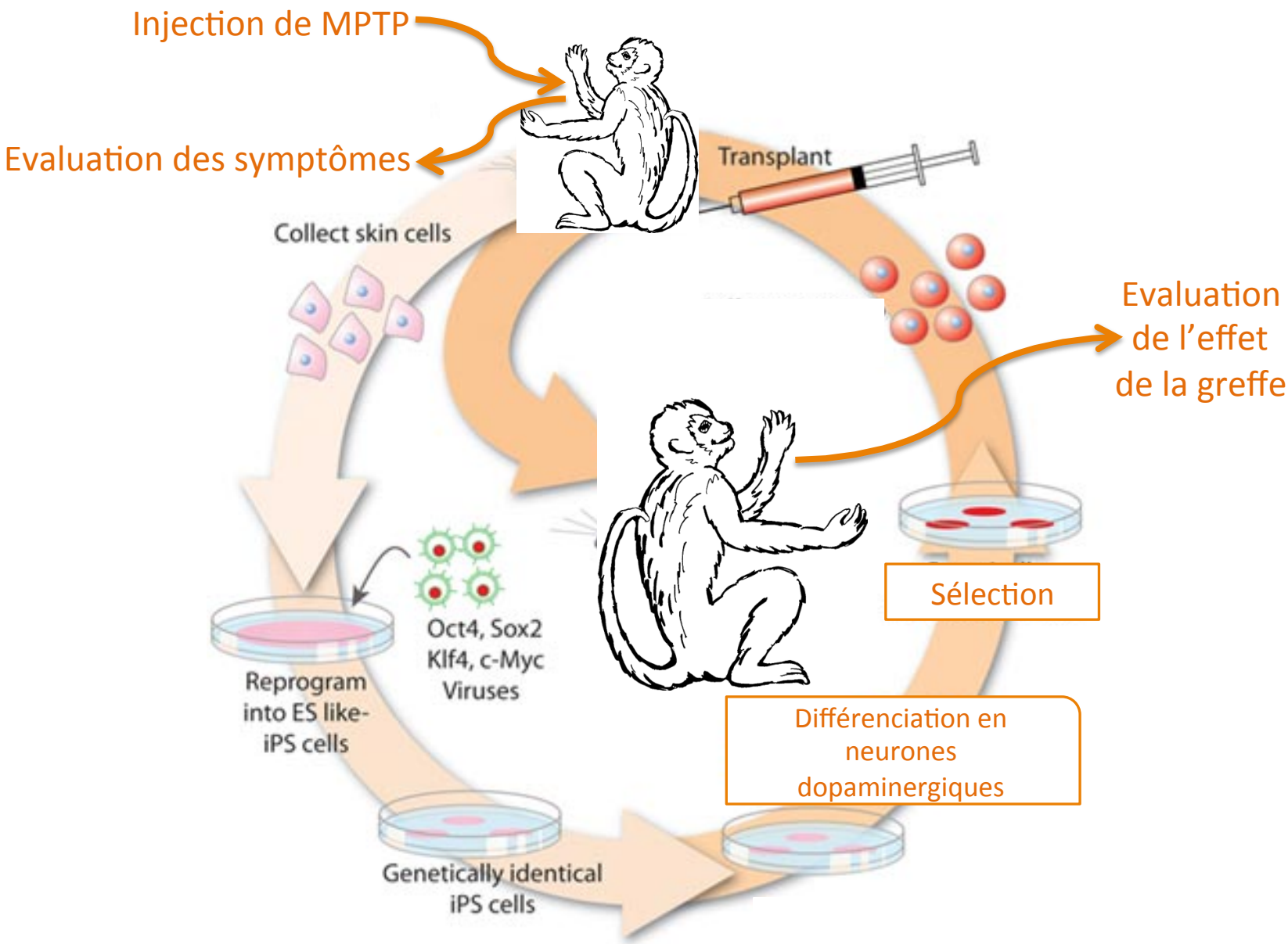


Modèle de thérapie cellulaire et génique



Hanna *et al.*, 2007, Science, 318:1879-80.

Modèle de thérapie cellulaire chez le singe parkinsonien



Conclusion

Cellules souches pluripotentes

=

Puissants outils biotechnologiques
Enormes espoirs thérapeutiques

?

Obtention de cellules naïves chez des espèces non murines
Maîtrise des processus de différenciation et de sélection
Contrôle des mécanismes de reprogrammation

Merci