

# TABLE DES MATIERES

## CHAPITRE I : THERAPIE CELLULAIRE ET MARQUAGE DES CELLULES..... 7

### A. OBJECTIFS ET PRINCIPES DE LA THERAPIE CELLULAIRE..... 7

#### 1. *Traitement de l'insuffisance cardiaque : un exemple d'application de la thérapie cellulaire* ..... 7

- a) Incidence de l'insuffisance cardiaque ..... 7
- b) Thérapies médicales et chirurgicales de l'insuffisance cardiaque ..... 8
- c) Développement de nouvelles stratégies thérapeutiques ..... 9
  - (1) Thérapies cellulaires « endogènes » ..... 9
  - (2) Thérapies cellulaires « exogènes » ..... 10
    - (a) Cardiomyoplastie cellulaire ..... 10
    - (b) Cardiomyoplastie tissulaire ..... 10

#### 2. *Autres domaines d'intérêt de la thérapie cellulaire* ..... 11

### B. PROBLEME DE L'IDENTIFICATION CELLULAIRE, INTERETS DES MARQUEURS CELLULAIRES 13

#### 1. *Pourquoi identifier les cellules : qu'est-ce qu'un marqueur cellulaire ?* ..... 13

#### 2. *Comment identifier les cellules : quelles sont les qualités requises pour être un bon marqueur cellulaire ?*..... 15

### C. APPLICATIONS POSSIBLES DES MARQUEURS CELLULAIRES..... 16

#### 1. *Utilisation de ces marqueurs*..... 16

- a) Etude des divisions cellulaires ..... 16
- b) Suivi de la migration et de la différenciation cellulaire ..... 16
- c) Rôles actuels dans la thérapie cellulaire ..... 17
  - (1) Transplantation hépatocellulaire ..... 17
  - (2) Transplantation de cellules souches nerveuses dans le système nerveux central 17
  - (3) Transplantation de cellules musculaires ou de cellules souches dans le myocarde ..... 18
  - (4) Transplantation de myoblastes dans l'urètre : urétromyoplastie cellulaire.. 19
  - (5) Transplantation de cellules souches de la moelle osseuse au sein du tissu rénal 20
  - (6) Transplantation de cellules hématopoïétiques comme immunothérapie..... 21
- d) Rôles en cancérologie..... 21

#### 2. *Différents types de marqueurs, avantages et limites de leurs utilisations*..... 22

- a) Marqueurs radioactifs..... 22
- b) Marqueurs biochimiques ..... 22
- c) Gènes rapporteurs..... 26

# CHAPITRE II : VALIDATION IN VITRO ET IN VIVO DE DIFFERENTS MARQUEURS BIOCHIMIQUES POUR LE TRACAGE CELLULAIRE .....28

A. MATERIEL ET METHODES .....	28
1. <i>Tests in vitro</i> .....	28
a) Culture cellulaire .....	28
(1) Cellules utilisées.....	28
(2) Produits utilisés .....	29
(3) Mise en culture et expansion.....	29
b) Techniques de marquage des cellules .....	30
(1) Marquage avec le cmDiI .....	30
(2) Marquage avec le DAPI .....	30
(3) Marquage avec le BrdU.....	30
c) Expérience de recaptage.....	31
d) Expérience de dilution.....	35
2. <i>Tests in vivo</i> .....	37
a) Greffes cellulaires dans le myocarde .....	37
(1) Culture cellulaire .....	40
(a) Cellules utilisées .....	40
(b) Préparation cellulaire.....	40
(2) Marquage.....	40
(3) Implantation .....	40
(a) Greffes de cellules vivantes marquées .....	40
(b) Greffes de cadavres de cellules préalablement marquées .....	41
(c) Injections de marqueurs « libres » .....	41
(4) Analyse histologique et immunohistochimique .....	41
b) Greffes cellulaires dans l'urètre .....	42
(1) Culture cellulaire .....	42
(a) Cellules utilisées .....	42
(b) Produits utilisés .....	42
(c) Préparation des cellules et mise en culture .....	42
(d) Comptage cellulaire et reconditionnement des cellules pour la greffe .....	43
(2) Techniques de marquage cellulaire .....	43
(3) Méthode d'implantation .....	43
(4) Analyse histologique et immunohistochimique .....	44
B. RESULTATS.....	45
1. <i>Résultats des tests in vitro</i> .....	45
a) Résultats des expériences de recaptage.....	45
b) Résultats des expériences de dilution.....	45
2. <i>Résultats des tests in vivo</i> .....	48
a) Dans le myocarde .....	48
b) Dans l'urètre .....	48

C. DISCUSSION .....	52
<b>1. Interprétation des résultats .....</b>	<b>52</b>
<b>2. Limites de l'étude.....</b>	<b>52</b>
<b>a) Absence de comparaison avec un marqueur génétique.....</b>	<b>52</b>
<b>b) Taille des échantillons, nombre de mesures.....</b>	<b>53</b>

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

Tableau 1: Caractéristiques du DAPI, cmDiI et BrdU .....	27
Tableau 2: Expérience in vitro de recaptage des marqueurs chimiques libérés sur une population cellulaire non marquée à 2h et 48h.....	47
Tableau 3: Expérience de dilution des marqueurs chimiques.....	47
Tableau 4: Bilan des greffes myocardiques sur des brebis. ....	51
Tableau 5: Bilan des analyses anatomopathologiques réalisées sur les urètres de chiennes.....	51
Figure 1: De haut en bas: cellules souches mésenchymateuses vivantes en culture observées au microscope optique (LEICA®, DMIL) et au microscope à fluorescence (LEICA®, DMIL) avec un filtre bleu (visualisation des noyaux cellulaires colorés par le DAPI) puis un filtre vert (visualisation des cytoplasmes cellulaires colorés par le cmDiI). ....	24
Figure 2: Cellules souches mésenchymateuses vivantes en culture dont le noyau est marqué au BrdU (microscope optique LEICA®, DMIL) .....	25
Figure 3: expérience de recaptage.....	32
Figure 4 : Fixation, révélation et observation des cellules marquées au DAPI, cmDiI et BrdU lors des tests in vitro.....	34
Figure 5: Expérience de dilution .....	36
Figure 6: Schéma d'une cellule de Malassez .....	38
Figure 7 : Greffe de cellules marquées dans le myocarde de brebis .....	39
Figure 8 : : Marquage des cellules myocardiques lors de l'injection de DAPI libre, la couleur bleue du marquage est observée au microscope à fluorescence (LEICA®, DMIL) avec un filtre bleu.....	49
Figure 9 : : Marquage des cellules myocardiques lors de l'injection de cellules mortes préalablement marquées au DAPI, la couleur bleue du marquage est observée au microscope à fluorescence (LEICA®, DMIL) avec un filtre bleu. ....	49
Figure 10 : Marquage des cellules myocardiques lors de l'injection de cellules vivantes marquées au DAPI.....	50
Figure 11 : Absence de recaptage du BrdU par les cellules myocardiques lors de l'injection de cellules vivantes préalablement marquées .....	50

## INTRODUCTION

La connaissance des rôles joués par chaque type de cellules ainsi que des mécanismes permettant d'accomplir toutes les fonctions cellulaires constitue un des enjeux majeurs de la biologie cellulaire. Cependant, étudier les propriétés d'un type cellulaire donné chez l'animal sain suppose d'être capable d'identifier les cellules et de les suivre dans l'organisme.

Le suivi de cellules marquées a notamment permis une meilleure connaissance des phénomènes régissant la migration et la différenciation des cellules au cours du développement embryonnaire mais aussi au cours de la vie adulte; on peut citer par exemple le suivi des lymphocytes qui a permis de progresser en immunologie. Le suivi cellulaire est également utilisé afin de mieux étudier la biologie des tumeurs et le ciblage tissulaire des métastases.

La thérapie cellulaire s'inscrit dans une logique d'évolution de l'arsenal thérapeutique face à des pathologies telles que l'insuffisance cardiaque, l'insuffisance rénale chronique, les maladies nerveuses dégénératives, maladies qui constituent un problème majeur de santé publique dans les pays développés.

Remplacer des cellules dégénérées, dysfonctionnelles ou absentes sont les atouts primordiaux de la thérapie cellulaire, dans l'objectif de régénérer des organes défectueux.

Les enjeux, médicaux et financiers, sont importants et la compréhension des mécanismes par lesquels les cellules greffées vont pouvoir exercer un effet bénéfique passe par un marquage cellulaire fiable.

Il existe de nombreux marqueurs cellulaires : radioactifs, fluorescents, génétiques. Tous présentent des avantages et des inconvénients et le choix du marqueur le plus approprié est fonction de l'étude menée.

Afin de pouvoir suivre avec fiabilité les cellules greffées, il apparaît indispensable que le marqueur sélectionné présente un certain nombre de caractéristiques que nous avons rassemblées dans un cahier des charges.

Nous reviendrons d'abord sur quelques généralités concernant la thérapie cellulaire afin de mieux comprendre les intérêts en jeu, puis nous montrerons la nécessité d'identifier les cellules greffées et nous présenterons un cahier des charges du marqueur idéal. La partie bibliographique se terminera par des exemples d'utilisation des marqueurs cellulaires et par une présentation des différents types de marqueurs disponibles.

Notre projet de recherche expérimental sera décrit dans la deuxième partie de cette thèse. Il se proposait d'étudier et de comparer trois marqueurs biochimiques : le cmDiI marqueur fluorescent membranaire, le DAPI marqueur fluorescent nucléaire et le BrdU marqueur de l'ADN révélé par immunohistochimie.

Le projet global consistait à montrer si ces trois marqueurs étaient conformes au cahier des charges que nous nous étions fixés. Le premier volet du travail était une étude *in vitro* : des expériences de recaptage et de dilution ont été réalisées pour chaque marqueur. Le second volet était une étude *in vivo* : les cellules marquées ont été greffées dans le myocarde chez la brebis et dans l'urètre chez la chienne. Les résultats obtenus pour chacun des trois marqueurs ont été analysés et comparés.

# **CHAPITRE I : THERAPIE CELLULAIRE ET MARQUAGE DES CELLULES**

## **A. Objectifs et principes de la thérapie cellulaire**

La thérapie cellulaire connaît un essor considérable depuis la fin des années soixante avec le développement des premières greffes de moelle osseuse qui consistaient à recoloniser la moelle osseuse presque totalement éradiquée de ses cellules par une chimiothérapie anti-cancéreuse. Actuellement le champ d'application de la thérapie cellulaire est vaste et s'élargit régulièrement au gré de nouvelles découvertes sur le formidable potentiel des cellules souches. L'utilisation de cellules souches présente en effet de nombreux avantages pour la thérapie cellulaire. Une cellule souche est indifférenciée, douée d'auto renouvellement ce qui va assurer à long terme le renouvellement de la population cellulaire, et possède la capacité de proliférer et de donner des cellules différenciées.

### **1. Traitement de l'insuffisance cardiaque : un exemple d'application de la thérapie cellulaire**

Le développement de la thérapie cellulaire s'inscrit dans une logique d'évolution thérapeutique. Les recherches effectuées dans le cadre de l'insuffisance cardiaque sont un bon exemple de cette évolution.

#### **a) Incidence de l'insuffisance cardiaque**

Les maladies cardio-vasculaires sont la première cause de mortalité humaine dans les pays développés. Elles représentent à elles seules plus de 40 % des décès et causent plus de morts aux Etats Unis que les sept autres causes de mortalité les plus fréquentes (1). La prévalence de l'insuffisance cardiaque est d'environ 500 000 cas en France et 4,6 millions aux Etats Unis. Il y a environ 120 000 nouveaux cas par an en France et 400 000 aux Etats Unis (1,32). Prés d'un million et demi d'américains sont victimes chaque année d'un infarctus du myocarde qui s'avère fatal dans un tiers des cas (70). L'insuffisance cardiaque est responsable de plus de vingt milliards de dollars par an de coûts directs et indirects aux Etats Unis et de plus de 1 % des dépenses de santé totales aux Etats Unis et en Europe (1,32).

A cause du vieillissement de la population et de l'amélioration de la survie après infarctus du myocarde, l'insuffisance cardiaque est une des rares maladies dont l'incidence augmente avec le temps (32).

L'infarctus du myocarde est responsable de lésions de nécrose cellulaire irréversibles résultant de l'ischémie prolongée. Après un infarctus les régions lésées du myocarde sont remplacées par un tissu fibreux, non contractile, les fibroblastes ayant remplacé les cardiomyocytes (70).

De même, la dégénérescence diffuse du tissu myocardique rencontrée dans la cardiomyopathie dilatée idiopathique s'accompagne de la formation d'un territoire dysfonctionnel hypo ou akinétique diffus.

Que les lésions soient localisées ou diffuses elles induisent une surcharge de travail pour les cardiomyocytes restants et altèrent la fonction ventriculaire.

L'évolution spontanée de ces altérations est l'insuffisance cardiaque, stade d'inéquation entre la pompe cardiaque et des besoins métaboliques tissulaires (23).

### **b) Thérapies médicales et chirurgicales de l'insuffisance cardiaque**

Face à ce problème majeur de santé publique, les options thérapeutiques sont limitées.

Les thérapies pharmacologiques développées en premier lieu ont pour objectif l'amélioration fonctionnelle de la partie saine du myocarde (70). Si les inhibiteurs de l'enzyme de conversion et les bêta-bloquants ont amélioré la survie des patients, le pronostic reste sombre : 57 à 64 % de survie à un an et 25 à 38 % de survie à cinq ans (1, 32). Et malgré ces traitements une part non négligeable de patients développe une insuffisance cardiaque congestive et devient candidate à une transplantation cardiaque. Mais l'utilité de la transplantation cardiaque est limitée par une grave pénurie de greffons, les complications de l'immunosuppression et les rejets potentiels (70).

D'autres techniques ont été développées : l'opération de Batista, réduction du ventricule gauche afin d'en améliorer la contractilité, reste peu utilisée (34, 70) ; la cardiomyoplastie dynamique utilise le muscle grand dorsal comme assistance ventriculaire pour le traitement des insuffisances cardiaques sévères, cependant elle ne permet une amélioration clinique et fonctionnelle que chez des patients sélectionnés et les mécanismes d'action ne sont pas encore totalement élucidés (17, 18, 20, 40, 70).

L'assistance circulatoire mécanique initialement utilisée en attente de transplantation pourrait dans les années à venir représenter une solution palliative acceptable (36), mais du fait de ses complications thromboemboliques et infectieuses, et des contraintes techniques engendrées, elle n'est pas toujours compatible avec une vie sociale normale et demeure un traitement coûteux (70).

Une solution thérapeutique simple et largement applicable fait donc défaut dans le traitement de l'insuffisance cardiaque.



### c) Développement de nouvelles stratégies thérapeutiques

Les cardiomyocytes, passés les stades fœtaux du développement, perdent essentiellement leur faculté de prolifération. Malgré l'existence récemment découverte d'une population cellulaire participant à la régénération tissulaire myocardique (cellules souches d'origine médullaire ou cardiaque multipotentes) (3, 4, 8, 9, 46, 57, 72, 77), le cœur demeure incapable de mobiliser massivement ces cellules qui permettraient une régénération.

Les stratégies permettant d'augmenter le nombre de cardiomyocytes fonctionnels chez les insuffisants cardiaques pourraient potentiellement permettre d'améliorer la contractilité des zones lésées du myocarde et de ralentir la progression de l'insuffisance cardiaque (70). C'est le but recherché par la thérapie cellulaire.

Deux types de thérapies cellulaires ont été développées : les thérapies cellulaires endogènes et les thérapies cellulaires exogènes.

#### *(1) Thérapies cellulaires « endogènes »*

Les thérapies cellulaires « endogènes » consistent à augmenter le nombre de cellules fonctionnelles dans l'organe sans apport extérieur.

L'utilisation de facteurs de croissance tels que le basic fibroblast growth factor (bFGF), les insulin-like growth factors (IGF-I ou IGF-II), le transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) et le platelet derived growth factor (PDGF), a été associée à une augmentation de la prolifération cellulaire dans des cardiomyocytes (22, 30, 66). Cependant la prolifération est limitée et ne permet pas d'améliorer la contractilité cardiaque ni de remplacer le tissu fibreux.

D'autres études ont montré que la transfection de fibroblastes cardiaques avec le facteur MyoD (facteur de détermination nécessaire pour entrer dans la voie myoblastique) permettait de les convertir en cellules musculaires squelettiques (25, 64). Bien que les résultats obtenus soient encourageants, il n'y a pas de preuve que les fibroblastes transformés puissent établir des jonctions cellulaires fonctionnelles, mécaniques et électriques, avec les cardiomyocytes natifs (60).

L'induction de l'angiogénèse dans les zones d'infarctus est une méthode susceptible de recruter des cardiomyocytes présents à proximité et d'améliorer la contractilité. De nombreuses études ont ainsi montré que l'administration du vascular endothelial growth factor (VEGF) et du bFGF améliore le flux sanguin dans les régions ischémiques du myocarde (6, 61, 73, 88, 92). Cependant il n'existe pas, à ce jour, de technique efficace permettant de délivrer ces facteurs angiogéniques dans les zones lésées.

## *(2) Thérapies cellulaires « exogènes »*

Les thérapies cellulaires « exogènes » apportent une nouvelle approche dans le traitement de l'insuffisance cardiaque. Elles consistent en l'injection de suspensions cellulaires (cardiomyoplastie cellulaire) ou en l'implantation de tissus à fonction contractile (cardiomyoplastie tissulaire) dans le myocarde lésé.

### **(a) Cardiomyoplastie cellulaire**

Le concept de cardiomyoplastie cellulaire repose sur un apport de cellules exogènes myogéniques dans le myocarde pour suppléer les cardiomyocytes disparus ou altérés. Le but ultime recherché est le remplacement, la réparation, ou la stimulation d'une fonction biologique particulière inhérente aux cellules altérées, la restitution d'une masse myocardique fonctionnelle et une amélioration des performances contractiles du cœur (40, 48, 90).

Différents types cellulaires ont été injectés dans le myocarde sain ou pathologique et ont formé des greffes stables dans le temps : cardiomyocytes embryonnaires ou adultes (45, 60, 81, 91), lignées cellulaires (51, 52), myoblastes d'origine musculaire squelettique (24, 34, 49, 63, 66, 77, 80, 88, 90) ou lisse (60, 94), cellules souches hématopoïétiques adultes (45, 51, 54, 68) ou embryonnaires (49).

Des greffes stables ont été obtenues en transplantation autologue (24, 62, 77, 87, 93, 94) ainsi qu'homologue (45, 53, 60, 78, 80, 81, 82) et hétérologue (89) sur des animaux immunosupprimés.

Les cardiomyocytes greffés peuvent s'organiser et établir des jonctions intercellulaires entre eux et avec les cardiomyocytes environnants (gap junctions révélées par l'intermédiaire de la protéine connexine 43) (53, 78, 82, 89).

Des résultats fonctionnels extrêmement encourageants ont été rapportés *ex vivo* et *in vivo*, après transplantation de cellules exogènes, sur différents modèles de lésions cardiaques induites : infarctus du myocarde (45, 50, 65, 68, 77, 80, 81, 87) ou cardiomyopathie dilatée (80, 93, 94).

Quelques publications font état, à ce jour, de l'application à l'homme de ces nouvelles stratégies thérapeutiques : greffe de myoblastes autologues (62, 82) ou de cellules souches de la moelle osseuse (84). Après ces essais de phase I encourageants, des essais de phase II sont en cours.

### **(b) Cardiomyoplastie tissulaire**

Le concept de cardiomyoplastie tissulaire repose sur la transplantation d'un tissu dans le myocarde. Le tissu transplanté peut être un fragment de tissu cardiaque (55) ou issu de l'ingénierie tissulaire (« tissue engineering ») (14, 19).

Leor *et al.* ont montré que des fragments tissulaires cardiaques fœtaux ont survécu dans des myocardes de rats ayant subi des infarctus (56). Ces résultats suggèrent que des allogreffes ou des xénogreffes de tissus cardiaques peuvent être réalisées dans des myocardes infarctés et pourraient constituer une option thérapeutique dans la restauration de la fonction cardiaque. Cependant, certains problèmes demeurent, comme la disponibilité tissulaire, la manipulation *ex vivo* des tissus, l'immunosuppression des receveurs et l'induction de l'angiogénèse (58, 60).

Le « tissue engineering » consiste à créer des tissus équivalents aux tissus vivants, dans le but de remplacer la structure tissulaire existante et d'en améliorer la fonction (72).

Diverses applications sont envisageables : la réparation de fractures ou de défauts osseux par greffe de nouveaux tissus osseux, la réparation de fractures cartilagineuses et d'ostéochondrites disséquantes, la « construction » de néo vessie à partir de cellules autologues.

Actuellement la seule application chez l'homme est la greffe de tissus équivalents de la peau dans le traitement des grands brûlés.

En ce qui concerne le muscle cardiaque, le tissu « engineering » est assez récent. La seule tentative *in vivo* a été réalisée par l'équipe de Li. Ils ont utilisé des cardiomyocytes fœtaux de rats ayant été « ensemencés dans des mailles de gélatine » (communication personnelle). Le tissu implanté a survécu dans le myocarde lésé et a formé des jonctions avec les cellules hôtes (70).

Face à l'incidence croissante des maladies cardio-vasculaires dans les pays développés et aux faiblesses de l'arsenal thérapeutique, les thérapies cellulaire et tissulaire ont vu leur intérêt s'accroître.

## **2. Autres domaines d'intérêt de la thérapie cellulaire**

La thérapie cellulaire intéresse de nombreux autres domaines, que ce soit pour la restauration fonctionnelle des tissus ou pour délivrer des protéines thérapeutiques aux patients.

Des greffes intracérébrales de cellules progénitrices du système nerveux central (SNC) ont été réalisées chez des patients atteints de la maladie de Parkinson pour augmenter leur niveau de dopamine (31, 85) et ralentir l'évolution de la maladie.

La greffe directe de cellules satellites compétentes possédant le gène de la dystrophine constitue une alternative pour le traitement de la myopathie de Duchenne (DMD). Les greffes de cellules satellites chez des animaux modèles de la DMD, ont donné de très bons résultats et ont poussé les cliniciens à tenter des allogreffes chez des garçons malades.

La greffe de cellules satellites compétentes, provenant du père ou du frère du malade dans le muscle d'enfants myopathes, a permis d'obtenir l'expression de dystrophine dans le muscle greffé (63).

Les résultats cliniques sont cependant décevants et de nombreux problèmes restent encore à résoudre, mais il est indéniable que la thérapie cellulaire, par l'intermédiaire de la greffe de myoblastes, représente un outil thérapeutique important dans le traitement des myopathies.

La thérapie cellulaire s'inscrit dans une logique d'évolution de l'arsenal thérapeutique que ce soit pour les maladies cardio-vasculaires, les myopathies, les maladies nerveuses dégénératives... Elle répond à un manque de solutions thérapeutiques simples et largement applicables dans des domaines de plus en plus coûteux.

Les recherches actuelles portent entre autres sur l'identification du meilleur type cellulaire pour chaque greffe, l'optimisation des paramètres de culture cellulaire *in vitro*, et surtout sur les mécanismes par lesquels les cellules greffées survivent, s'intègrent dans l'organe receveur et apportent un effet thérapeutique. C'est grâce à une meilleure compréhension des mécanismes mis en jeu au sein même de l'organe que l'on pourra améliorer les greffes cellulaires et trouver des outils thérapeutiques largement applicables.

## **B. Problème de l'identification cellulaire, intérêts des marqueurs cellulaires**

### **1. Pourquoi identifier les cellules : qu'est-ce qu'un marqueur cellulaire ?**

Les enjeux de la thérapie cellulaire, dont on a vu quelques exemples, sont de plus en plus importants que ce soit d'un point de vue médical ou financier. La compréhension des mécanismes mis en jeu lors de greffe cellulaire est un des points clefs dans la progression des recherches. Il est indispensable de comprendre comment les cellules survivent et s'intègrent dans l'organe receveur, quelles sont les liaisons mises en place avec les cellules hôtes, quelle est l'influence de l'environnement sur leur phénotype, afin de mesurer l'impact de leur éventuel effet thérapeutique.

Pour comprendre les mécanismes mis en jeu et faire avancer les recherches, il est indispensable de pouvoir identifier les cellules greffées de manière fiable.

Différentes caractéristiques intrinsèques aux cellules peuvent permettre de les identifier sans manipulation:

- Lors de greffe dans un tissu différent du tissu d'origine on peut utiliser les caractéristiques morphologiques des cellules ou la présence d'antigènes spécifiques de tissus pour les identifier (83).  
On peut par exemple identifier des hépatocytes greffés dans une rate grâce aux différences morphologiques existant entre ces deux types cellulaires.  
Dans le cas d'une greffe de myoblastes dans un myocarde, on peut utiliser la chaîne lourde de la myosine comme marqueur endogène, cet antigène sera présent exclusivement sur les cellules greffées.  
Cependant cette technique ne permet pas de repérer des cardiomyocytes greffés dans un myocarde, elle ne permet pas non plus de suivre le destin des cellules si celles-ci changent de phénotype dans leur nouvel environnement, si par exemple les myoblastes greffées dans le myocarde se modifient et ne synthétisent plus de myosine, on ne peut plus les différencier des cellules hôtes.
- Lors d'allogreffe on peut utiliser la diversité allélique des complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) (16, 55).  
On peut également utiliser d'autres types de diversité allélique existant entre les individus d'une même espèce.  
Les neurones n'expriment pas les antigènes du CMH mais on utilise chez la souris la diversité allélique du gène codant pour la glycoprotéine

Thy-1. Lors de greffe de cellules embryonnaires provenant du SNC d'une souris exprimant l'allèle Thy-1.1 dans le SNC d'une souris exprimant l'allèle Thy-1.2, les cellules greffées sont détectées avec un anticorps spécifique de l'allèle Thy-1.

Cependant les allogreffes nécessitent une immunosuppression du receveur afin d'éviter un rejet des cellules greffées.

- Lors de greffe de cellules mâles dans des organismes femelles on peut détecter une portion spécifique du chromosome Y (16).

On a par exemple greffé un rein de femme à un homme afin d'étudier la colonisation de l'organe greffé par les cellules du receveur (74).

Cette technique nécessite une hybridation in situ pour visualiser les cellules greffées (FISH). Cette étape prend du temps et est difficilement réalisable conjointement à de l'immunohistochimie, technique nécessaire pour déterminer le phénotype cellulaire.

- Lors de xénogreffe il existe des antigènes spécifiques d'espèces (16, 55).

On peut par exemple greffer des cellules de souris dans le SNC de rats, la détection des cellules greffées est réalisable grâce à des anticorps spécifiques de souris.

De la même manière on a greffé des cellules nerveuses humaines dans le SNC de rongeurs afin d'évaluer la capacité des cellules humaines à se différencier dans le SNC, pour les identifier on utilise des anticorps spécifiques de l'espèce humaine.

Cependant de telles greffes sont problématiques car elles requièrent une immunosuppression de l'hôte ou l'utilisation d'animaux immunosupprimés d'un coût élevé et dont la manipulation reste délicate.

- Lors de l'utilisation d'animaux transgéniques comme donneurs, on peut identifier les cellules greffées grâce à l'expression d'une protéine spécifique (16, 83).

La myopathie de Duchenne (DMD) est une maladie génétique liée au chromosome X qui touche 1/3500 garçons à la naissance. Elle est due à une mutation touchant le gène de la dystrophine. L'absence de cette protéine chez les malades fragilise les fibres musculaires qui dégénèrent au cours des contractions.

Des lignées de chiens myopathes ont été créées pour l'étude de cette maladie. Lors de greffe de myoblastes provenant de chiens sains sur des chiens myopathes, on peut repérer les cellules greffées car celles-ci synthétisent de la dystrophine (62).

La création d'animaux transgéniques est toutefois coûteuse et nécessitent un savoir faire particulier.

L'utilisation de caractéristiques intrinsèques aux cellules greffées pour les identifier chez l'hôte et suivre leur devenir a des limites : certaines techniques ne

sont pas infaillibles, nécessitent une immunosuppression du receveur, un savoir faire particulier ou sont très coûteuses.

Le recours à des marqueurs cellulaires incorporés aux cellules apparaît donc indispensable dans le cadre de la thérapie cellulaire. Les cellules injectées étant des cellules souches, les marqueurs utilisés doivent permettre un suivi à long terme de ces cellules afin de déterminer leur devenir et notamment leur participation à la régénération et à la reconstitution à long terme d'épithéliums, de tissus...

**Nous qualifierons ici de marqueur cellulaire une molécule exogène utilisée pour suivre le devenir des cellules marquées.**

## **2. Comment identifier les cellules : quelles sont les qualités requises pour être un bon marqueur cellulaire ?**

Il existe de nombreux marqueurs cellulaires, tous présentent des avantages et des inconvénients (67).

Le choix du marqueur le plus approprié dépend du type cellulaire étudié, de la période pendant laquelle on a besoin de suivre les cellules greffées (16), des capacités techniques et du budget disponible.

Cependant on peut tout de même souligner les principales caractéristiques nécessaires à un marqueur afin d'assurer un suivi fiable des cellules greffées et réaliser un cahier des charges du marqueur idéal.

Un bon marqueur semble être :

- Persistant dans la cellule
- Détectable aisément
- Sans influence sur le métabolisme et la physiologie cellulaires
- Non toxique aux concentrations usuelles
- Non recapté par les cellules environnantes
- Facile d'utilisation (technique de marquage)
- Peu cher

## C. Applications possibles des marqueurs cellulaires

### 1. Utilisation de ces marqueurs

#### a) Etude des divisions cellulaires

La connaissance du cycle cellulaire et des mécanismes régissant la synthèse d'ADN ont constitué une étape importante en biologie cellulaire et moléculaire. Les premières études ont utilisé des marqueurs radioactifs, comme la thymidine tritiée dont l'incorporation à l'ADN cellulaire est détectée par autoradiographie. Actuellement d'autres marqueurs dont l'utilisation est plus simple sont utilisés, comme le BrdU qui s'incorpore dans l'ADN à la place de la thymidine et qui est révélé par immunohistochimie (38).

Les marqueurs cellulaires ont également permis l'étude de la prolifération de différentes populations cellulaires comme les lymphocytes ainsi que leur différenciation en clones cellulaires spécifiques d'antigènes.

#### b) Suivi de la migration et de la différenciation cellulaire

Les lymphocytes constituent le support de l'immunité, ils ont la capacité de pouvoir migrer continuellement dans le corps et selon leurs propriétés, ils se positionnent dans des zones spécifiques des organes lymphoïdes. Suite à une stimulation antigénique, on assiste à une prolifération rapide des clones cellulaires de lymphocytes B et de lymphocytes T spécifiques de l'antigène et à une migration des cellules formées.

L'utilisation de marqueurs cellulaires a permis de suivre les migrations lymphocytaires, ainsi que leur position dans les différents tissus et leur prolifération. Cela représente une aide considérable pour l'analyse de la physiologie de la circulation de ces cellules.

En 1999, PARISH (71) présente une étude comparative de quatorze marqueurs fluorescents utilisés depuis les vingt dernières années pour suivre la migration lymphocytaire. Cette étude a permis de classer ces marqueurs en fonction de différentes caractéristiques : facilité de détection, temps pendant lequel le suivi est possible, capacité de marquer différemment certaines sous populations lymphocytaires...



Différentes études ont ainsi pu démontrer que la remise en circulation des lymphocytes est influencée par leur origine anatomique (15), la présence d'une inflammation (22, 43) ou de cytokines pro inflammatoires (26, 45).

### c) Rôles actuels dans la thérapie cellulaire

#### *(1) Transplantation hépatocellulaire*

Lorsque l'on greffe des hépatocytes dans du parenchyme hépatique, les cellules greffées ont une apparence morphologique ne permettant pas de les différencier des hépatocytes de l'hôte par les techniques histologiques conventionnelles (hématoxyline, éosine). Ceci a représenté un facteur limitant dans de nombreuses études.

L'utilisation de marqueurs spécifiques et fiables a permis par la suite un suivi aisé et sans équivoque des cellules greffées.

Ainsi certaines études ont pu démontrer que la transplantation hépatocellulaire permet d'améliorer des déficits hépatiques chez l'animal de laboratoire, par exemple amélioration d'une hyperbilirubinémie secondaire à un déficit en UDP-glycuronyltransférase chez un rat « Gunn » ou encore d'une hypercholestérolémie due à un déficit en récepteurs LDL chez un lapin « Watanabe » (83).

L'utilisation de marqueurs cellulaires a permis de faire avancer les recherches sur la transplantation hépatocellulaire en tant que thérapie pour les maladies génétiques ou acquises chez des modèles expérimentaux.

Cependant les résultats de recherches plus récentes semblent moins prometteurs qu'attendu. La thérapie cellulaire appliquée à l'insuffisance hépatique n'est toujours pas considérée comme une thérapeutique efficace pour de nombreux patients.

#### *(2) Transplantation de cellules souches nerveuses dans le système nerveux central*

Les cellules nerveuses souches ont un potentiel thérapeutique illimité pour restaurer les fonctions du SNC perdues suite à un traumatisme ou à une maladie dégénérative (16). La transplantation de cellules souches du SNC apparaît donc intéressante en tant que thérapie potentielle lors de déficits fonctionnels (67).

L'utilisation thérapeutique de ces cellules implique qu'elles se différencient dans le SNC de l'hôte, il faut donc pouvoir démontrer sans ambiguïté si les cellules greffées survivent et si elles se modifient selon leurs fonctions futures (16).

Certaines études ont mis en évidence une amélioration clinique suite à la transplantation, mais les mécanismes mis en jeu demeurent inconnus. Afin de

comprendre comment un effet bénéfique peut se produire, l'identification des cellules greffées est indispensable (67).

Le marquage de ces cellules est donc un élément essentiel des recherches.

En 1993, ONIFER et al. (67) ont marqué des cellules nerveuses *in vitro* et *in vivo* avec différents marqueurs fluorescents. Les résultats de cette étude montrent l'importance d'utiliser des marqueurs parfaitement adapté à la population cellulaire greffée, pour cela les marqueurs envisagés doivent être testés *in vitro* puis *in vivo* avant d'interpréter les résultats.

### *(3) Transplantation de cellules musculaires ou de cellules souches dans le myocarde*

Le but de la thérapie cellulaire dans le cadre de l'insuffisance cardiaque est de remplacer les cardiomyocytes lésés afin d'améliorer la fonction contractile des ventricules notamment.

A l'inverse du tissu myocardique, le tissu musculaire strié squelettique présente de fortes potentialités de régénération, grâce à la présence de cellules souches : les cellules satellites. Les cellules satellites sont des cellules myogéniques mononuclées issues des myoblastes embryonnaires. Elles sont accolées à la fibre musculaire striée, sous la lame basale et l'endomysium. Quiescentes à l'état normal chez l'adulte, elles peuvent être réactivées par des lésions chimiques, mécaniques ou par une dissociation enzymatique. Elles représentent 20 % des noyaux musculaires chez le fœtus et 1 à 2 % chez l'adulte (38, 42). Leurs capacités de prolifération, leur origine embryonnaire mésodermique commune avec les cardiomyocytes ainsi que leur accessibilité dans tous les muscles squelettiques, en font des cellules particulièrement étudiées pour la transplantation cellulaire dans le myocarde. Elles sont, en outre, très résistantes à l'ischémie.

De nombreuses équipes de chercheurs ont greffé des myoblastes squelettiques au sein du myocarde. Les résultats de ce type de greffes dans le cœur de chiens, de rats, ou de lapins ont montré clairement la survie et la différenciation des cellules greffées. De plus, il a été démontré une amélioration des performances hémodynamiques du cœur ainsi greffé (87).

La majorité des recherches dans ce domaine concerne la réparation de lésions myocardiques localisées, de type infarctus. Mais de bons résultats ont aussi pu être obtenus par la greffe intra myocardique de myoblastes autologues dans le cœur de chiens atteints de cardiomyopathie dilatée idiopathique : amélioration de l'état clinique de chiens greffés et amélioration des performances hémodynamiques (fraction de raccourcissement, volume systolique) (12).

BORENSTEIN et al. (11) ont montré très récemment que la greffe de myoblastes non cultivés, directement après leur extraction enzymatique, donne de très bon résultats dans le myocarde de moutons : les analyses histologiques après trois semaines montrent que les cellules musculaires se sont greffées massivement au sein du myocarde. Les études précédentes n'avaient jamais sautées l'étape de la culture cellulaire *in vitro* préalablement à la greffe. Pourtant, éviter la culture cellulaire permet de gagner du temps et de l'argent, et de réduire les risques de contamination des cellules.

Afin de pouvoir mesurer l'impact des greffes cellulaires sur la contractilité cardiaque, il est nécessaire de prouver que les cellules ont survécu à la transplantation et qu'elles se sont intégrées dans l'architecture du myocarde. Le recours aux marqueurs cellulaires est en cela indispensable.

#### *(4) Transplantation de myoblastes dans l'urètre : urétromyoplastie cellulaire*

Les premières greffes de myoblastes dans l'urètre (précurseurs embryonnaires des cellules musculaires striées) sont très récentes. Cette nouvelle stratégie pour le traitement de l'incontinence urinaire pourrait avoir un intérêt clinique direct, en améliorant les résultats des traitements endoscopiques classiques de l'incontinence urinaire à l'effort de la femme (injection de collagène, graisse, téflon).

Les myoblastes récoltés par simple aspiration dans le muscle du bras d'une patiente pourraient, après une mise en culture de quelques jours, lui être réinjectés au sein de l'urètre à l'aide d'un endoscope, sous anesthésie locale (38).

En 2000, l'équipe de CHANCELLOR (21) a publié les résultats de la greffe de myoblastes provenant d'une lignée cellulaire immortelle de souris, dans les parois urétrales et vésicales de rattes. Les myoblastes ont été mis en culture avec des adénovirus qui leur ont transmis le gène rapporteur de la  $\beta$ -galactosidase, et avec des microsphères de latex fluorescentes. Ainsi, le devenir des myoblastes après la greffe a pu être suivi à l'aide de deux marquages différents. Les urètres ont été prélevés trois à quatre jours après la greffe pour éviter le rejet par le système immunitaire. Les analyses histologiques ont révélé la présence de nombreuses cellules exprimant la  $\beta$ -galactosidase et contenant des microsphères fluorescentes dans la paroi vésicale et la paroi urétrale : des myoblastes, mais aussi des myotubes et des fibres musculaires résultant de leur fusion. Cette expérience montre la faisabilité de la greffe de myoblastes dans la paroi urétrale avec la survie et la différenciation des myoblastes injectés ainsi que la formation de myotubes et de fibres musculaires capables de produire la  $\beta$ -galactosidase dans la paroi de l'urètre, sans effet indésirable particulier.

L'équipe de BORENSTEIN a réalisé en 2002 (39) une succession d'essais de faisabilité de greffe de myoblastes sur des urètres de chiennes, avec en parallèle un travail réalisé *in vitro* et l'observation *in vivo* du devenir des cellules greffées. Ce travail a permis de mieux connaître les conditions de culture favorables à la multiplication des myoblastes, les marqueurs les plus efficaces sur ce type cellulaire (cmDiI, BrdU), les techniques utilisables pour améliorer la survie des cellules greffées.

#### *(5) Transplantation de cellules souches de la moelle osseuse au sein du tissu rénal*

L'insuffisance rénale chronique constitue un problème majeur de santé publique, les thérapeutiques sont peu nombreuses et la dialyse reste le passage obligé en attendant la greffe.

La néphrologie ne s'intéresse que depuis peu au potentiel thérapeutique des cellules souches (CS) (16, 67).

Les premiers résultats chez le petit animal (souris notamment) (42, 74) sont très prometteurs en vue d'une utilisation future chez l'homme et la thérapie cellulaire utilisant les CS de la moelle adulte ouvre une nouvelle voie thérapeutique dans le cadre du traitement de nombreuses pathologies rénales.

En 2001, IMASAWA *et al.* (42) ont greffé de la moelle osseuse provenant de souris transgéniques pour une protéine fluorescente (GFP), à des souris C37BL/6j irradiées. Le marquage par la GFP a permis de suivre les cellules greffées. Un nombre grandissant de cellules marquées a ainsi été observé parmi les cellules glomérulaires des souris greffées, jusqu'à 24 semaines après la greffe. De plus les cellules marquées ont pu être identifiées comme appartenant au groupe des cellules mésangiales.

En 2001, POULSOM *et al.* (74) ont étudié le rôle des cellules greffées dans le renouvellement et la régénération du parenchyme rénal en utilisant le chromosome Y comme marqueur du devenir des cellules médullaires. Ils ont injecté des cellules de moelle osseuse provenant de souris mâles dans la circulation sanguine de souris femelles. Les cellules greffées ont été retrouvées dans le rein, essentiellement sous la forme de cellules épithéliales tubulaires mais aussi, en moins grand nombre, sous la forme de cellules podocytaires.

Actuellement des études sont en cours dans l'espèce ovine dans le cadre de la recherche sur le potentiel d'un type particulier de CS, les cellules souches mésenchymateuses (CSM) de la moelle osseuse.

En 2003, l'équipe de LABORDE et BEHR (7) a travaillé sur un modèle expérimental ovin adulte d'ischémie-reperfusion rénale. Ils ont mis au point la culture, la sélection et l'amplification des CSM en vue de l'obtention d'un nombre conséquent et suffisant ( $100 \times 10^6$ ) de cellules pour une greffe autologue par une technique de cathétérisme percutanée dans l'artère rénale. Un double marquage

cellulaire immunohistochimique combinant le BrdU et des marqueurs spécifiques des différentes populations cellulaires rénales (la pancytokératine spécifique des podocytes, la vimentine spécifique des cellules mésangiales et la desmine spécifique des cellules glomérulaires) a permis de déterminer les différenciations cellulaires des CSM greffées. Dans l'ensemble des groupes, témoins ou ischémiés, les cellules se sont différenciées en podocytes au sein des glomérules ou en cellules épithéliales au sein des tubules. Ces résultats montrent la participation des CSM dans la régénération physiologique du rein.

#### *(6) Transplantation de cellules hématopoïétiques comme immunothérapie*

La transplantation de cellules hématopoïétiques chez des patients atteints de tumeurs hématopoïétiques malignes a montré son efficacité et est utilisée chez l'homme.

Elle permet d'augmenter les doses thérapeutiques de chimiothérapie ou de radiothérapie, de plus la transplantation de cellules immunocompétentes joue un rôle anti-tumoral chez les malades (5).

Les études se portent actuellement sur des méthodes permettant de diminuer les réactions antigéniques du receveur contre les cellules greffées et inversement.

#### **d) Rôles en cancérologie**

La localisation d'une cellule au sein d'un tissu ou d'une masse tissulaire peut avoir un impact considérable sur ses caractéristiques et sur sa réponse aux agents cytotoxiques ou mutagènes.

La méthode utilisée est la suivante : on réalise des perfusions de marqueurs cellulaires qui diffusent dans la tumeur à partir des vaisseaux sanguins, marquant différents types cellulaires, on peut par la suite effectuer un tri cellulaire par FACS. Le but est de sélectionner des sous populations cellulaires tumorales répondant de manière différente aux agents anti-cancéreux, et également d'étudier la vascularisation de la tumeur (35).

## 2. Différents types de marqueurs, avantages et limites de leurs utilisations

### a) Marqueurs radioactifs

Les marqueurs radioactifs ont été les premiers à être utilisés, ils permettent une détection rapide des cellules marquées dans les tissus (2) et autorisent une vue d'ensemble de la distribution des cellules marquées dans l'organisme hôte (71).

Mais leurs nombreux inconvénients ont limité leur utilisation au profit de marqueurs plus récents et plus sûrs.

L'utilisation de marqueurs radioactifs est toxique pour les cellules, elle réduit la viabilité cellulaire, c'est le cas notamment du  $^{51}\text{Cr}$  et de  $^{125}\text{I}$ . Le choix d'isotopes moins néfastes comme  $^3\text{H}$  et  $^{14}\text{C}$  rend la détection cellulaire difficile *in vivo* de part leur faible émission énergétique (71)

De plus les radio-isotopes sont rapidement perdus par les cellules ce qui limite les expériences dans le temps (2, 71).

Il est également difficile de savoir si le marqueur est toujours dans les cellules injectées ou s'il a été réutilisé par les cellules environnantes (71).

L'analyse phénotypique des cellules et leur tri ne sont pas réalisables avec ce type de marqueur.

### b) Marqueurs biochimiques

Les marqueurs biochimiques ont progressivement remplacé les marqueurs radioactifs. On en compte de nombreux que l'on peut classer suivant leur localisation dans la cellule.

- Marqueurs biochimiques nucléaires :

Thiazole orange (71)

Hoeschst, DAPI, DAPI (28, 35, 67, 69, 71)

BrdU (29, 71)...

- Marqueurs biochimiques cytoplasmiques :

BCECF-AM (71)

Calcéine (71)

FITC, TRITC (71)

CFSE (71)...

- Marqueurs biochimiques membranaires :

DiO (28, 35, 71), DiI (55, 67, 83), cmDiI (2, 37)  
PKH2, PKH3, PKH26 (71)...

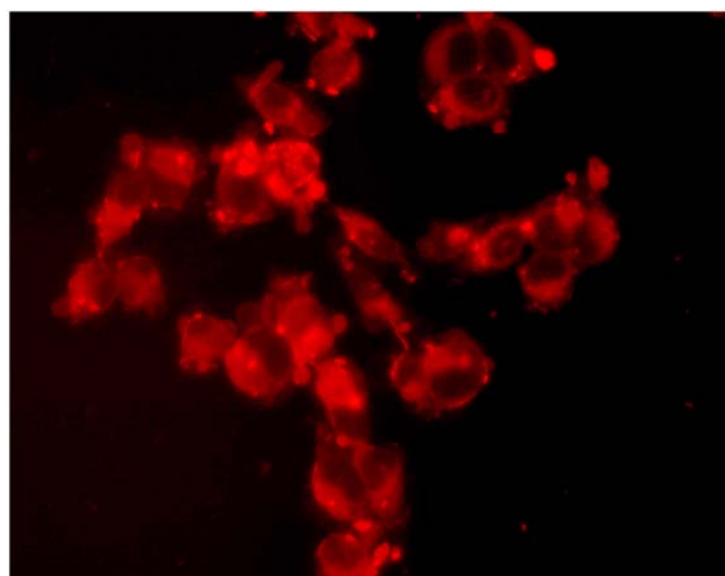
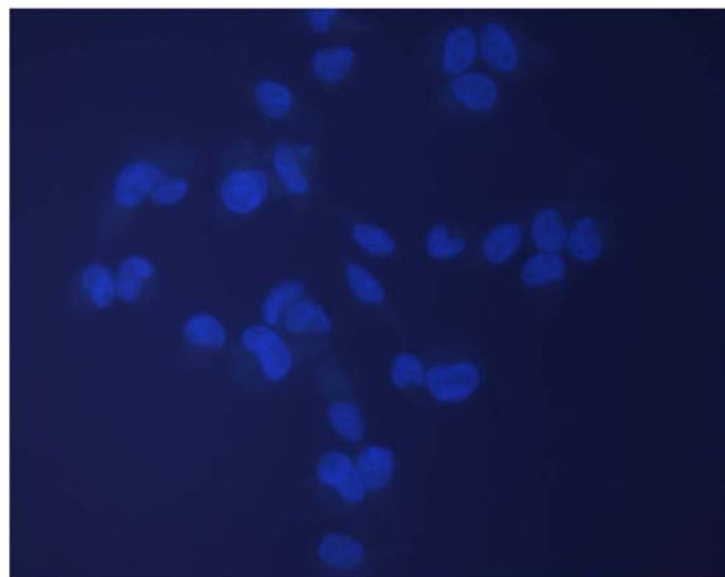
Les trois marqueurs biochimiques sélectionnés en vue d'une comparaison *in vitro* et *in vivo* sont : le cmDiI (Cell tracker, Molecular Probes®), le DAPI (Sigma®), et le BrdU (Roche®).

Le cmDiI est un dérivé du DiI (1-1'-dioctadecyl-3-3'-3'-3'-tetramethylindocarbocyanine). C'est un marqueur fluorescent des membranes plus soluble dans les solutions aqueuses que le DiI, ce qui rend le marquage plus facile. Les cellules marquées sont détectées en microscopie fluorescente par une couleur rouge, la longueur d'onde correspondant au maximum d'excitation est de 553 nm et la longueur d'onde émise est de 570 nm. La détection est réalisable sur des tissus congelés ou fixés dans la paraffine (2). Le cmDiI n'est pas toxique aux concentrations usuelles, il n'affecte ni la viabilité cellulaire, ni la prolifération (37). Lors d'expériences de dilution on note une diminution de la fluorescence de moitié à chaque division cellulaire. FERRARI *et al.* (37) ont pu néanmoins suivre des fibroblastes de la moelle osseuse marqués par le cmDiI pendant un mois, malgré leur intense prolifération. Le cmDiI n'est pas transféré aux cellules environnantes lors d'expériences de recaptage, cependant lors de la mort de cellules marquées on observe un marquage des macrophages ayant phagocyté des cellules ou des débris cellulaires marqués (37) (**Figure 1**).

Le DAPI (4'-6-diamino-2-phenylindole) est un marqueur fluorescent bleu se fixant par des liaisons hydrogènes sur les régions riches en bases A et T de l'ADN. Les cellules marquées sont détectées en microscopie fluorescente, la longueur d'onde excitatrice est de 355 nm et la longueur d'onde émise est de 460 nm. Le marquage par le DAPI est simple, rapide et reproductible, cependant on observe une fuite importante du DAPI lors de la mort des cellules marquées et un marquage des cellules environnantes (71). De plus le DAPI n'est retenu que peu de jours par les cellules, on ne peut donc l'utiliser que pour des études à court terme (**Figure 1**).

Le BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine) est un analogue de la thymidine qui s'incorpore à l'ADN cellulaire pendant la phase S du cycle cellulaire. Le temps nécessaire au marquage dépend de la durée du cycle cellulaire et donc du type de cellule étudiée (29). La détection des cellules marquées se fait par immunohistochimie (16). Le BrdU n'est pas toxique pour les cellules, il ne marque pas les cellules environnantes et est utilisable pour des expériences à long terme (16) (**Figure 2**).

Le cahier des charges de ces trois marqueurs est repris dans le **tableau 1**.



**Figure 1: De haut en bas: cellules souches mésenchymateuses vivantes en culture observées au microscope optique (LEICA®, DMIL) et au microscope à fluorescence (LEICA®, DMIL) avec un filtre bleu (visualisation des noyaux cellulaires colorés par le DAPI) puis un filtre vert (visualisation des cytoplasmes cellulaires colorés par le cmDil).**





**Figure 2: Cellules souches mésenchymateuses vivantes en culture dont le noyau est marqué au BrdU (microscope optique LEICA®, DMIL)**

### c) Gènes rapporteurs

Le marquage génétique demeure la meilleure méthode de marquage des cellules puisqu'il est transmis à toutes les générations cellulaires descendantes (39) et pas aux cellules environnantes (16). Cependant certains problèmes demeurent : ces techniques sont assez coûteuses, nécessitent un savoir faire particulier et un matériel biologique difficile à manipuler. Les cellules sont par la suite implantées chez des animaux devant être gardés dans des conditions de confinement élevé et sont donc coûteuses. L'immunogénicité du transgène utilisé est, en outre, un écueil difficile à évaluer.

Différents gènes sont utilisés régulièrement comme *LacZ* (*E. Coli*  $\beta$ -galactosidase) et les gènes codant pour l'EGFP, l'Alcaline phosphatase, la Luciférase.

Différentes méthodes d'intégration des gènes rapporteurs sont possibles :

- L'injection directe d'ADN (plasmides) dans des noyaux cellulaires est la technique la moins risquée, la plus simple et la moins chère. Cependant, l'injection d'ADN nu ou complexé reste peu efficace.
- Les virus vecteurs de gènes peuvent être utilisés pour améliorer le transfert génétique. Ce sont des virus dont le génome a été modifié artificiellement *in vitro* : une partie de leurs gènes a été remplacée par un ou plusieurs gènes intéressants. Ces virus jouent le rôle de vecteur de gènes car, une fois injectés au sein de l'organisme, ils délivrent leur génome aux cellules qu'ils infectent. Leur modification génétique empêche leur propagation incontrôlée et élimine leur pouvoir pathogène.  
Les adénovirus ont l'avantage d'être stables et d'infecter des cellules quiescentes comme des cellules en division. Leur génome est facile à manipuler et subit peu de réarrangements. L'inconvénient principal est la limitation de la taille du gène qu'il est possible d'introduire dans le virus : 7,8 kb maximum. De plus, ils produisent des protéines qui stimulent le système immunitaire et provoquent la mort des cellules infectées.  
Les rétrovirus sont aussi intéressants car leur génome modifié est introduit de manière stable dans le génome de la cellule hôte et permet une expression durable de la protéine. Cependant, la longueur du gène est encore limitée (9-10 kb) et les rétrovirus n'infectent que les cellules en mitose ou proches de la mitose.

Tableau 1: Caractéristiques du DAPI, cmDiI et BrdU

	DAPI	cmDiI	BrdU
Principales caractéristiques	4',6-diamino-2-phenylindole Fixation sur les régions riches en bases A et T de l'ADN Fluorescence bleue (absorption : 355nm, émission : 460nm)	DiI : 1,1'-dioctadecyl-3, 3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate Marqueur fluorescent rouge des membranes (absorption : 553nm, émission : 570nm) Lipophile, son dérivé le cmDiI est plus hydrosoluble.	5-bromo-2'-deoxyuridine Marqueur nucléaire incorporé à l'ADN, analogue non radioactif de le thymidine
Toxicité aux concentrations usuelles	Inhibe la prolifération lymphocytaire (20)	Pas de toxicité (viabilité, prolifération) (13, 17,21)	Pas de toxicité (11,6)
Modifications du métabolisme et de la physiologie cellulaire	Pas de modifications	Non métabolisé par les cellules marquées (21) N'altère pas la physiologie de recirculation lymphocytaire (1)	Pas de modifications
Recaptage par les cellules environnantes (faux positifs)	Marquage des cellules environnantes lors de la mort des cellules marquées (20)	Pas de transfert aux cellules voisines <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> (13, 17, 21,1) Marquage des macrophages lors de mort cellulaire	Pas de transfert aux cellules hôtes (6)
Dilution (faux négatifs)	Dilution rapide, études cellulaires à court terme seulement (20)	Diminution de la fluorescence de moitié à chaque division (1,13) Etudes sur plusieurs semaines possible	Utilisable pour des études à long terme (6)
Facilité d'emploi (techniques de marquage)	Méthode de marquage simple, rapide et reproductible (19)	Méthode de marquage simple et rapide. L'intensité de la fluorescence dépend de la température d'incubation et du temps d'exposition (17)	Marquage plus long, le temps d'exposition au BrdU dépend de la durée de cycle cellulaire, donc du type de cellules étudiées (11,6)
Détection	Microscopie fluorescente ou cytométrie de flux Tissus congelés ou fixés (20)	Microscopie fluorescente ou cytométrie de flux Tissus congelés ou fixés (1)	Immunohistochimie Tissus congelés ou fixés
Coût	Environ 3 € par marquage	Environ 23 € par marquage	Environ 30 € par marquage (immunohistochimie comprise)

## **CHAPITRE II : VALIDATION IN VITRO ET IN VIVO DE DIFFERENTS MARQUEURS BIOCHIMIQUES POUR LE TRACAGE CELLULAIRE**

Le but de l'étude que nous voulons entreprendre est d'étudier le comportement *in vitro* et *in vivo* de trois marqueurs biochimiques couramment utilisés en thérapie cellulaire : le DAPI, le cmDiI et le BrdU. Le modèle animal que nous avons choisi est la brebis pour les greffes cellulaires myocardiques et la chienne pour les greffes cellulaires urétrales.

La thérapie cellulaire s'inscrit dans une logique d'évolution de l'arsenal thérapeutique de nombreuses pathologies et son champ d'application est de plus en plus vaste. Le recours aux marqueurs cellulaires pour suivre le devenir des cellules injectées est indispensable. De nombreux marqueurs cellulaires sont disponibles et il apparaît indispensable de bien connaître les caractéristiques inhérentes à chaque marqueur afin d'obtenir une fiabilité maximale du suivi cellulaire en fonction de l'étude menée.

### **A. MATERIEL ET METHODES**

#### **1. Tests in vitro**

##### **a) Culture cellulaire**

##### *(1) Cellules utilisées*

La population cellulaire sur laquelle nous avons travaillé est issue de la purification de cellules de moelle osseuse de brebis adulte : ce sont des cellules souches mésenchymateuses (CSM) adultes caractérisées par leurs propriétés d'adhérence sur un support et leur potentialité de différenciation vers les lignages mésodermiques (27).

Les ponctions de moelle osseuse ont été réalisées en quatre points différents sur animal anesthésié: les deux tubercules majeurs huméraux et les deux tubérosités tibiales.

Deux à trois mL de moelle osseuse ont été prélevés par site de ponction à l'aide d'un trocard de Mallarmé de 16 gauges introduit par voie per cutanée jusque dans la cavité médullaire, et d'une seringue de 10 mL à luer-lock préalablement remplie d'héparine (1 mL d'héparine à 25.000 UI/mL) pour éviter la formation de caillot lors de l'aspiration de la moelle osseuse.

Une fois l'aspiration terminée, le prélèvement obtenu a été homogénéisé en agitant la seringue. Les cellules ont été ensuite mises en culture.

## *(2) Produits utilisés*

Les produits et milieux utilisés pour la technique de culture sont les suivants :

- DULBECCO'S Modified Eagle Medium (DMEM) avec Glutamax- 1, sodium pyruvate, pyridoxine, 4500 mg/L glucose, Gibco®
- Phosphate Buffered Saline (PBS), pH7,2 / 0,1M, Gibco®
- Trypsine (1X), Gibco®
- Sérum de veau foetal (SVF), Gibco®
- Diméthyl sulfoxyde (DMSO), Sigma®
- Pénicilline/Streptomycine (Péni/Strepto), Gibco®

Milieu préparé par l'opérateur :

Milieu de culture de base : DMEM complété (DMEMc)

DMEM	79%
SVF	20%
Péni/Strepto	1%

## *(3) Mise en culture et expansion*

Les cellules prélevées ont été transférées dans deux flasques de 75 cm<sup>2</sup> contenant chacune 15 mL de DMEMc. Les flasques ont été placés trois jours à l'étuve humidifiée, à 38°C avec 5% de CO<sub>2</sub>, avant toute manipulation ultérieure. En effet les CSM sont caractérisées par leur propriété d'adhérence au support de culture, l'attente a donc permis aux CSM de se fixer au fond des flasques (10, 86).

Une observation quotidienne des cellules au microscope inversé à contraste de phase (Olympus®, LH50A) a été réalisée pour déterminer la vitesse de multiplication. Les CSM adhérentes apparaissent de forme allongée sur le fond de la boîte, elles sont présentes à ce stade sous forme d'îlots de quelques cellules (3 à 5 cellules regroupées).

Un repiquage (transfert du contenu d'une boîte dans plusieurs boîtes de culture en vue d'une augmentation de la surface de culture) a été effectué dès que les cellules arrivaient à plus de 70 % de confluence.

Le surnageant a été retiré des flasques par aspiration puis 5 mL de trypsine ont été ajoutés pendant 5 à 10 min en fonction du décollement des cellules du fond du flacon (le décollement a été vérifié au microscope). Quarante mL de DMEMc ont été ajoutés car le SVF stoppe la digestion. Les cellules dans le DMEMc et la trypsine

ont été transférées dans un tube et centrifugées 10 min à 1700 t/min, le surnageant a été retiré puis les cellules ont été remises en suspension dans du DMEM pour être à nouveau centrifugées (rincage). Dans les deux flasques les cellules ont été remises en suspension dans 10 mL de DMEMc. Les 20 mL obtenus ont été répartis dans 10 flacons contenant 15 mL chacun de DMEMc. Les flacons ont été mis à l'étuve dans les mêmes conditions que précédemment.

## **b) Techniques de marquage des cellules**

### *(1) Marquage avec le cmDiI*

Les cellules ont été lavées au PBS une fois dans 30 mL puis remises en suspension dans 10 mL de PBS. Le cmDiI a été ajouté (un tube de 50 µL, à 1 mg/mL dans du DMSO, dilution =  $1/200$  ( $5 \times 10^{-4}$  /mL)). Les cellules ont été laissées 5 minutes à température ambiante puis 15 minutes dans la glace. Vingt mL de PBS ont été ajoutés puis les cellules ont été centrifugées pendant 5 minutes à 2000 t/min. Les cellules ont enfin été lavées trois fois.

### *(2) Marquage avec le DAPI*

Les cellules ont été lavées au PBS une fois dans 30 mL puis remises en suspension dans 5 mL de DMEM pur. Le DAPI a été ajouté (25 µL/ 5 mL) et laissé au contact des cellules pendant 30 minutes à température ambiante. Les cellules ont enfin été lavées trois fois.

### *(3) Marquage avec le BrdU*

Les cellules encore en boîtes de Pétri en basse densité (potentiel de division et d'incorporation du BrdU) sont rincées au PBS puis incubées avec le BrdU (10 µmol/L) pendant 48 heures à 38°C dans l'incubateur. Les cellules sont ensuite rincées trois fois dans du PBS avant d'être trypsinées.

### c) Expérience de recaptage

Une des critiques classiques de ce genre de marquage est le risque de relargage des marqueurs lors de mort cellulaire avec marquage des cellules résidentes et ainsi confusion entre cellule native et cellule greffée (faux positif).

Le principe de l'expérience de recaptage est présenté sur la **figure 3**.

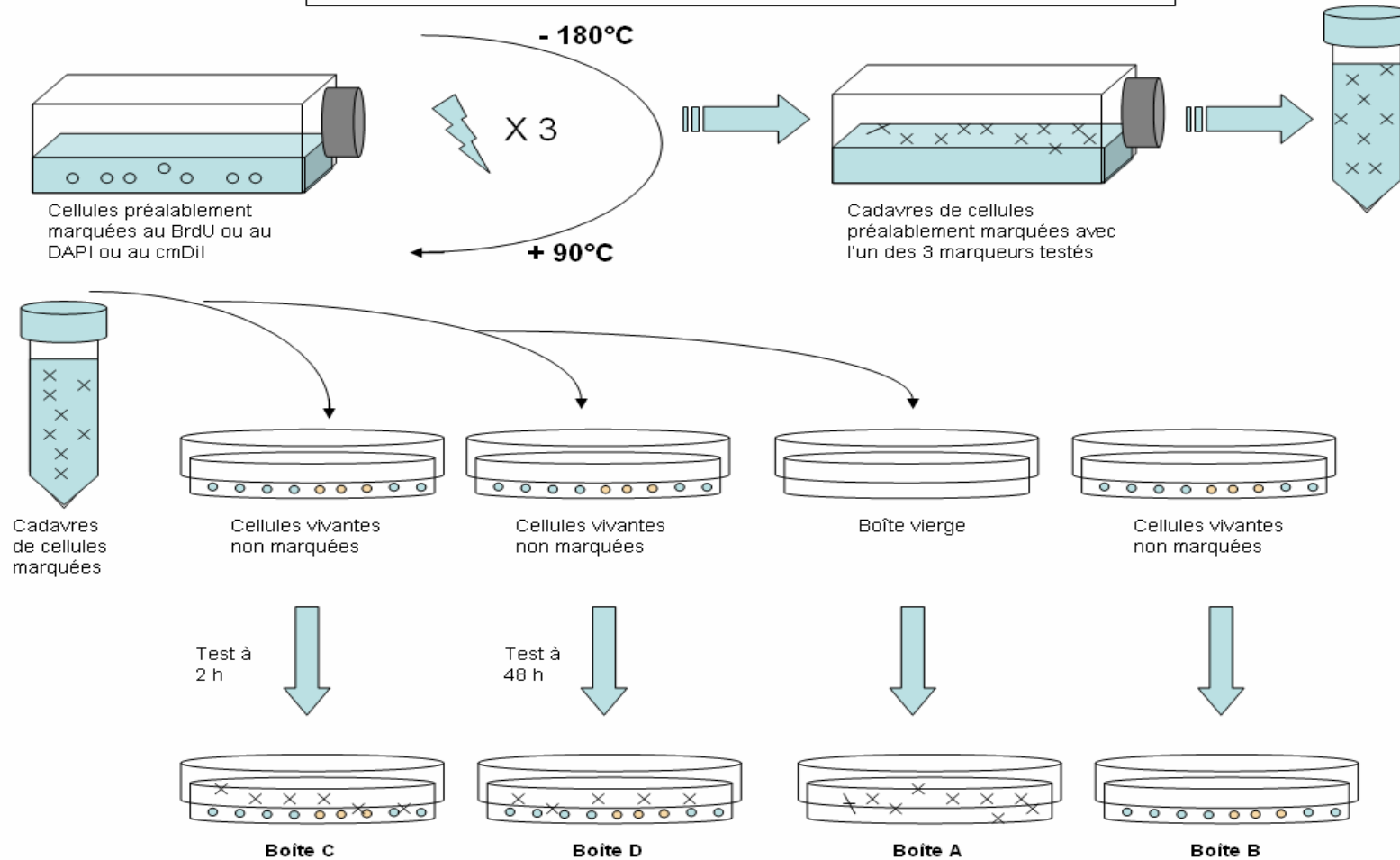
Des cellules ( $20 \times 10^6$  minimum, ce qui correspond à 2 ou 3 flasques) préalablement marquées avec l'un des trois marqueurs ont été détruites par choc thermique intense : trois cycles d'exposition à  $-160^\circ\text{C}$  puis à  $90^\circ\text{C}$  en quelques minutes.

Quatre boîtes de Pétri de 60 mm ont été préparées pour chacun des trois marqueurs étudiés :

- boîte A : cellules mortes marquées ( $1 \times 10^6$ ). Il s'agit d'une boîte témoin permettant de vérifier que toutes les cellules ont bien été tuées, les cellules mortes n'adhérant pas à la boîte elles sont éliminées lors de l'étape de fixation et ainsi la boîte apparaît vide à l'observation microscopique.
- boîte B : cellules vivantes non marquées ( $2 \times 10^5$ ). Il s'agit d'une boîte témoin permettant de vérifier que les cellules cultivées se sont multipliées et sont bien adhérentes au support.
- boîte C : cellules vivantes sans marquage préalable ( $2 \times 10^5$ ) et cellules mortes marquées ( $1 \times 10^6$ ). Cette boîte a été observée à 2h pour l'intensité de marquage par recaptage. Les cellules vivantes ayant été éventuellement marquées par les cellules tuées sont visibles au microscope après l'étape de fixation.
- boîte D : cellules vivantes sans marquage préalable ( $2 \times 10^5$ ) et cellules mortes marquées ( $1 \times 10^6$ ). Cette boîte a été observée à 48h pour l'intensité de marquage par recaptage.

Les boîtes ont ensuite été mises à l'étuve humidifiée à  $38^\circ\text{C}$  avec 5 %  $\text{CO}_2$ .

**Figure 3: Expérience de recaptage**





Afin d'observer les cellules marquées on a réalisé une fixation des boîtes (méthanol pour le DAPI et le BrdU, formol pour le cmDiI). Les cellules marquées au DAPI et au cmDiI ont été observées directement au microscope à fluorescence (LEICA®, DMIL), les cellules marquées au BrdU ont été révélées en immunohistochimie avant d'être observées au microscope inversé à contraste de phase (**Figure 4**).

A 2h les 3 boîtes C ont été fixées.

Les 2 boîtes contenant des cellules marquées au DAPI et au BrdU ont été fixées au méthanol de la manière suivante : le surnageant a été aspiré des boîtes puis les cellules ont été rincées 2 fois avec du PBS (5 mL/boîte). Deux mL de méthanol à -20°C ont été ajoutés puis les boîtes ont été placées à -20°C pendant 20 min. Le méthanol a ensuite été vidé et les boîtes remplacées à -20°C en attendant l'observation au microscope.

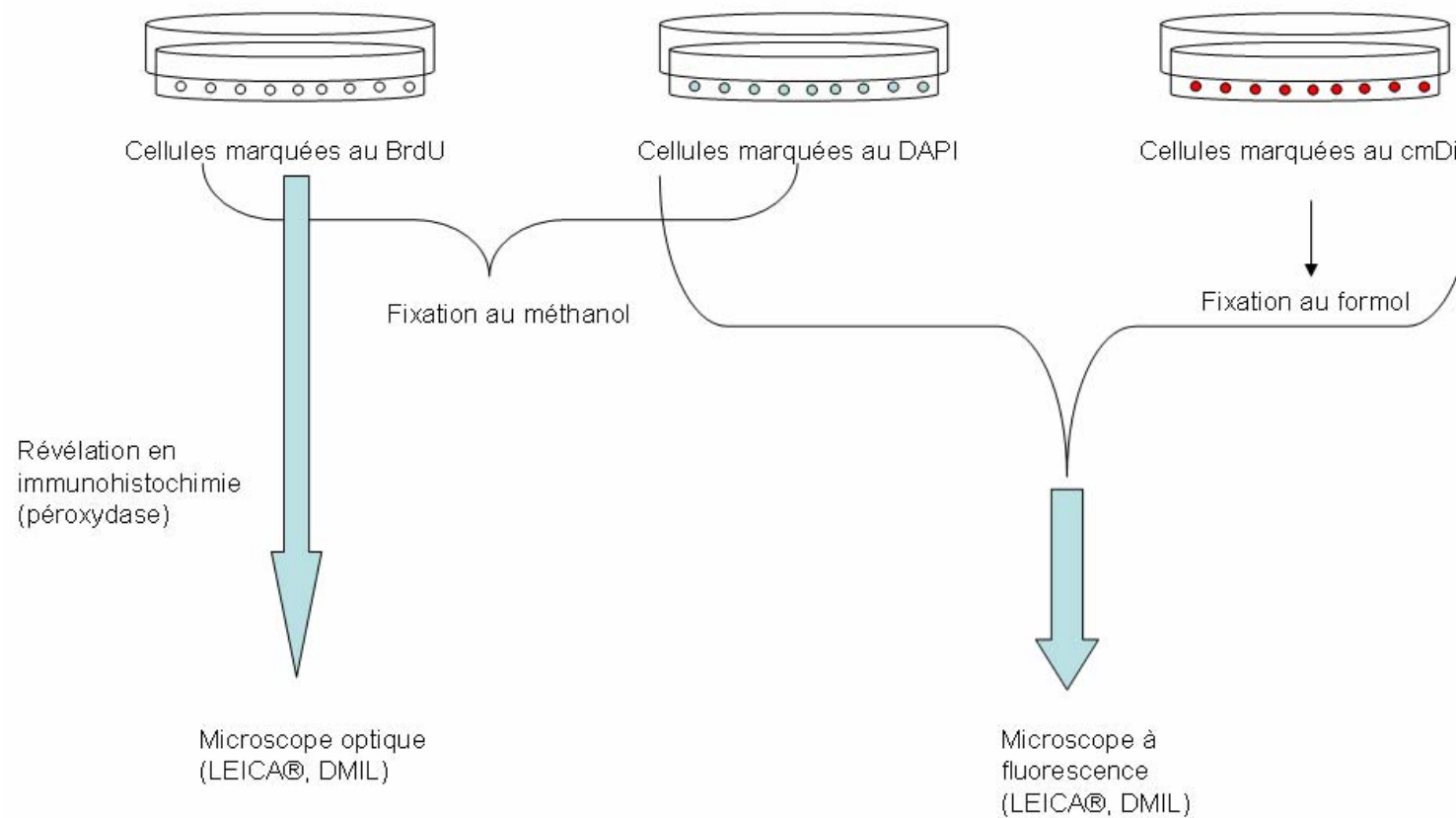
La boîte C contenant des cellules marquées au cmDiI a été fixée au formol de la manière suivante : le surnageant a été aspiré de la boîte puis les cellules ont été rincées 2 fois avec du PBS. Deux mL d'une solution de PBS à 3,7 % de formaldéhyde ont été ajoutés puis la boîte a été placée à 37°C pendant 10 min. La boîte a ensuite été vidée.

A 48h les boîtes A, B et D de chaque marqueur ont été fixées de la même manière que précédemment.

Les cellules marquées au cmDiI et au DAPI ont été observées au microscope à fluorescence, un filtre qui émet dans le rouge a été utilisé pour le cmDiI et un filtre bleu a été utilisé pour le DAPI.

Les cellules marquées au BrdU ont été révélées en immunohistochimie : les boîtes ont été incubées avec un anticorps monoclonal de souris anti-BrdU dilué au 10<sup>ème</sup> pendant 1 heure à 38°C, puis le kit de révélation DAKO Envision™+ System, Peroxydase (DAB) contenant des anticorps anti monoclonal de souris a été utilisé. Les cellules marquées ont été visualisées au microscope par une coloration brune de leur noyau.

**Figure 4:** Fixation, révélation et observation des cellules marquées au DAPI, cmDil et BrdU lors des tests in vitro.



#### d) Expérience de dilution

La seconde critique classique de ce genre de marquage est le risque de dilution rapide du marqueur au cours des divisions cellulaires et ainsi confusion entre cellule native et cellule greffée (faux négatif).

Le principe de l'expérience de dilution est présenté sur la **figure 5**.

Dix boîtes de Pétri de 60 mm ont étéensemencées chacune avec 10.000 cellules marquées au BrdU et vingt boîtes ont étéensemencées chacune avec 5.000 cellules marquées conjointement au cmDiI et au DAPI.

Ces boîtes ont été observées quotidiennement pour noter l'intensité du marquage et le nombre de cellules encore marquées.

Tous les deux jours deux boîtes de la série BrdU et trois boîtes de la série cmDiI/DAPI ont été prélevées afin de mesurer la dilution de chaque marqueur.

Une boîte marquée au BrdU et une boîte marquée au cmDiI et au DAPI ont été fixées au méthanol de la même manière que pour l'expérience de recaptage afin de quantifier le nombre de cellules encore marquées au BrdU et au DAPI.

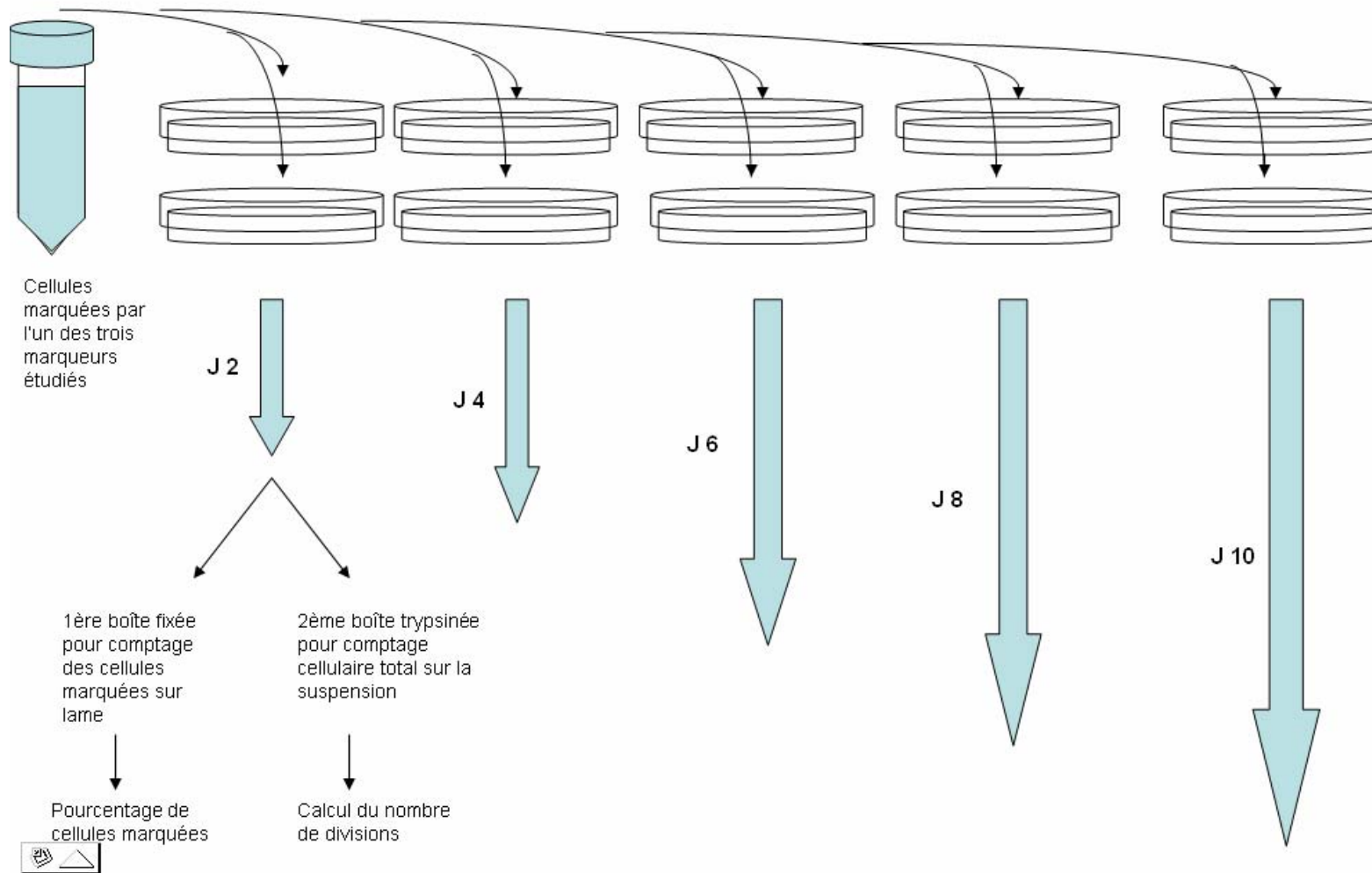
La deuxième boîte marquée au cmDiI et au DAPI a été fixée au formol de la même manière que pour l'expérience de recaptage afin de quantifier le nombre de cellules encore marquées au cmDiI.

L'observation a été réalisée au microscope de la même manière que pour l'expérience de recaptage.

Le pourcentage de cellules marquées a été déterminé par le calcul suivant :

$\left( \frac{\text{Nombre de cellules marquées par champ}}{\text{nombre de cellules totales par champ}} \right) \times 100$
--

**Figure 5: Expérience de dilution**



La méthode d'échantillonnage utilisée est la suivante : comptage sur trois champs microscopiques pris au hasard sur la même boîte.

La dernière boîte prélevée dans chacune de deux séries a été trypsinée de la manière suivante : le surnageant a été aspiré puis 1 mL de trypsine a été ajouté pendant 5 min afin de décoller toutes les cellules du fond de la boîte (décollement vérifié au microscope). Vingt  $\mu\text{L}$  ont été prélevés à l'aide d'une pipette BIOHIT PROLINE 2-20  $\mu\text{L}$  et déposés sur une cellule de Malassez, les cellules ont alors été comptées à l'aide du microscope afin d'identifier le nombre de doublement de population.

L'observation a été réalisée avec le microscope inversé à contraste de phase. Le nombre de cellules dans l'échantillon a été déterminé par le calcul suivant :

$\text{Nombre moyen de cellules dans la cellule de Malassez} \times 10^5 \times \text{volume de l'échantillon (mL)}$
--

La **figure 6** présente le principe d'utilisation d'une cellule de Malassez.

## 2. Tests *in vivo*

Dans le cadre de différents protocoles expérimentaux en thérapie cellulaire le DAPI, le cmDiI et le BrdU ont été testés *in vivo* dans le myocarde de brebis et dans l'urètre de chienne.

### a) Greffes cellulaires dans le myocarde

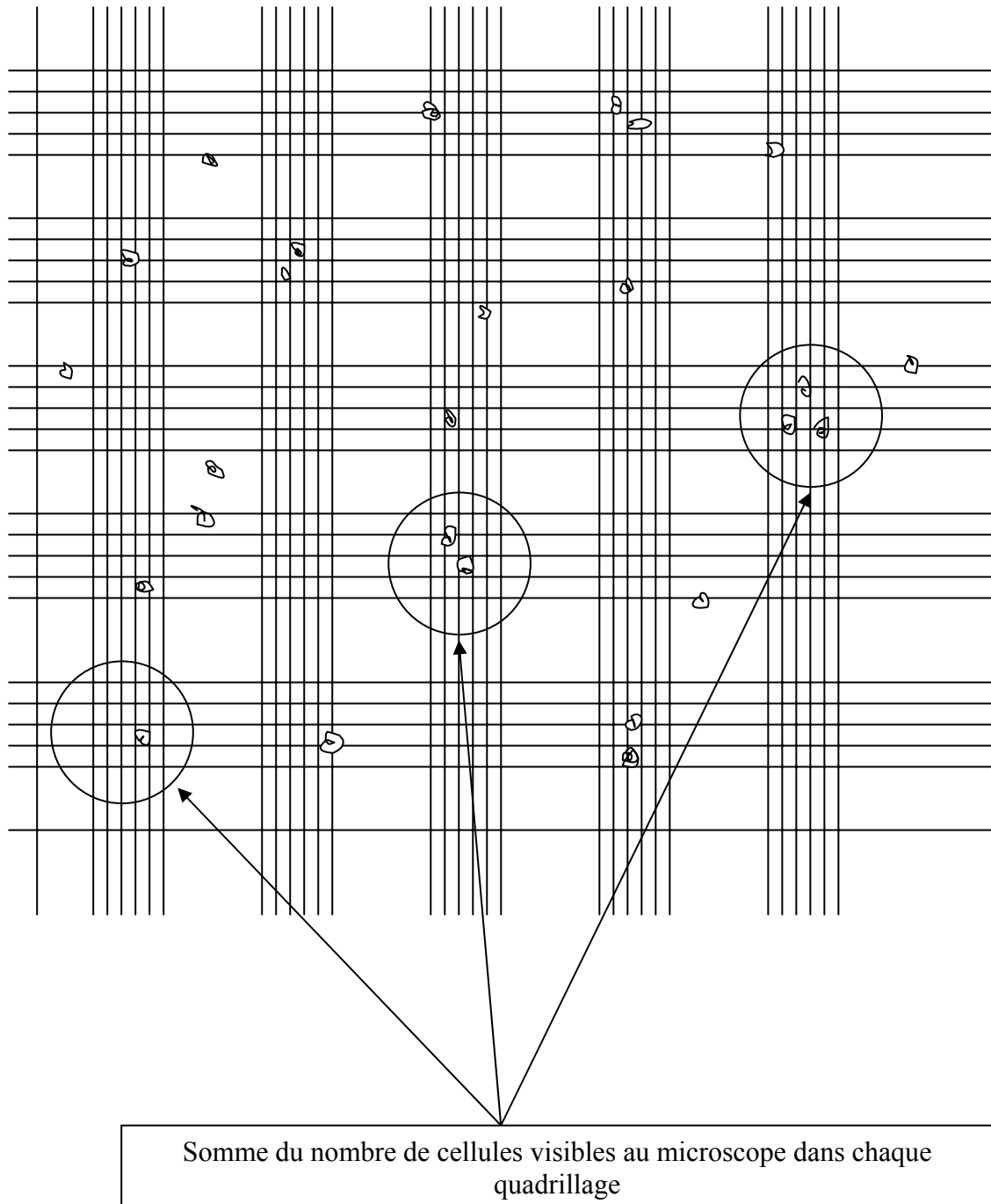
Trois sortes de greffes ont été réalisées dans le myocarde de brebis « Ile-de-France » pour chacun des trois marqueurs étudiés :

- greffe de cellules vivantes marquées,
- greffe de cadavres de cellules préalablement marquées,
- greffe du marqueur « libre ».

Le principe de l'expérience est présenté sur la **figure 7**.

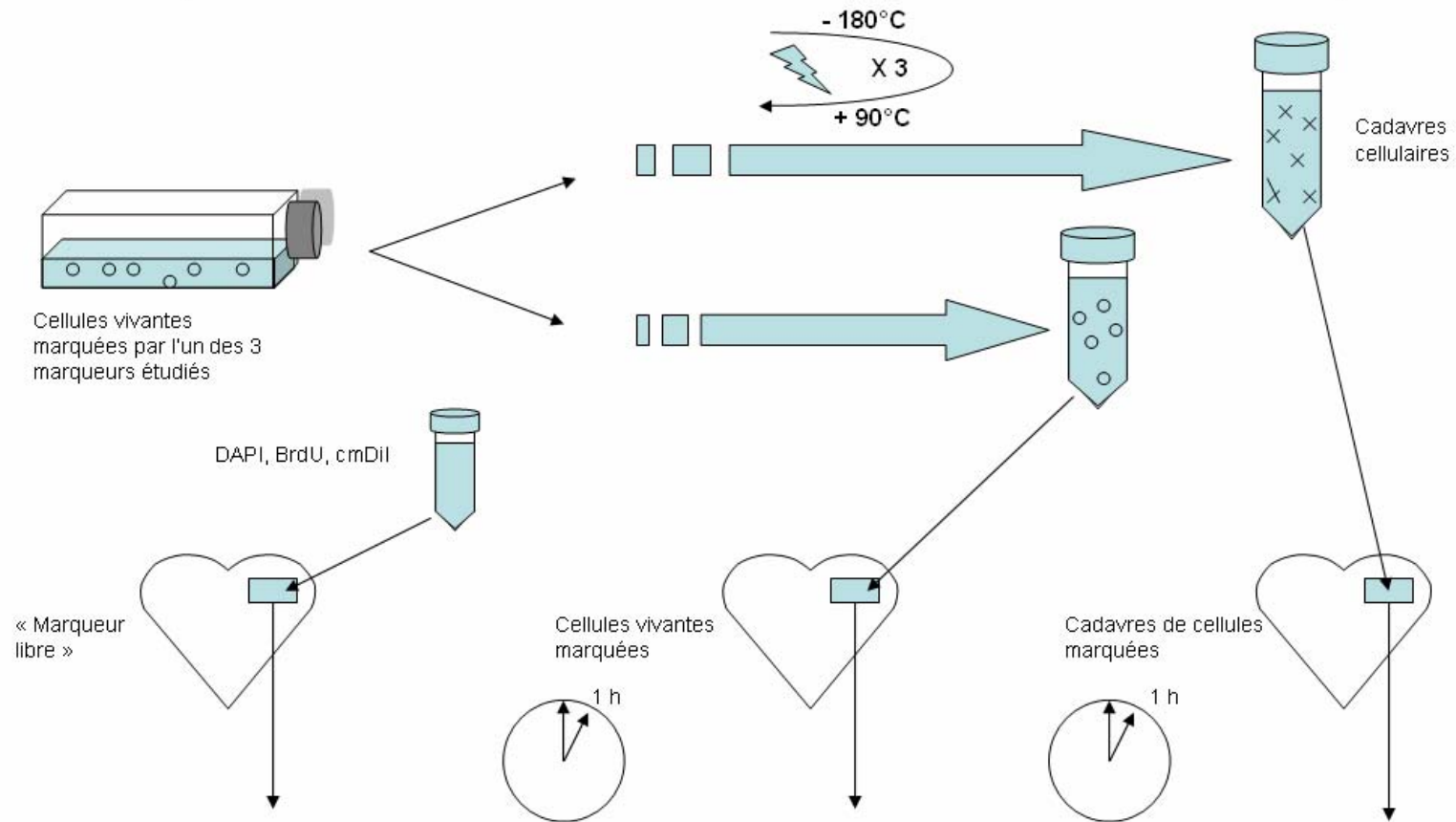
Les myocardes greffés ont été prélevés et observés une heure après la greffe.

**Figure 6: Schéma d'une cellule de Malassez**

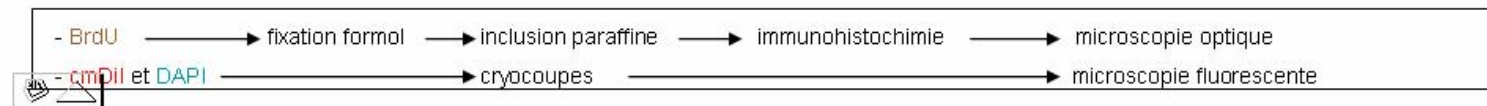


$$\text{Nombre moyen de cellules dans la cellule de Malassez} = \frac{\sum \text{des cellules dans chaque quadrillage}}{25}$$

**Figure 7: Greffe de cellules marquées dans le myocarde de brebis**



**Fixation et évaluation en fonction des différents marqueurs:**



## *(1) Culture cellulaire*

### **(a) Cellules utilisées**

Les cellules utilisées sont des cellules satellites présentes dans les muscles striés squelettiques. Elles ont été prélevées par biopsie (10 g environ) dans le muscle biceps fémoral gauche de chaque brebis. Les tissus biopsés ont été conservés dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) à température ambiante.

### **(b) Préparation cellulaire**

Les fragments musculaires ont été lavés dans du DMEM, puis le fascia et le tissu adipeux ont été enlevés avant la dissociation mécanique aux ciseaux. Le mélange obtenu a été centrifugé dans du DMEM à 300 tours/min pendant 2 minutes puis le surnageant a été retiré.

Les fragments musculaires ont ensuite été placés dans un agitateur à 37°C avec 10 mL de DMEM supplémenté avec 0,4% de collagénase (type IA, SIGMA®). Après 20 minutes de digestion enzymatique le mélange a été centrifugé à 300 tours/min pendant 2 minutes. Le surnageant contenant les cellules isolées a été conservé dans du DMEM contenant 20% de sérum de veau fœtal. Le culot a de nouveau subi une digestion enzymatique comme décrit précédemment. L'opération a été répétée 4 fois en tout.

Les cellules extraites ont été passées sur un filtre cellulaire en nylon de 250 µm (Polylabo SA, Genève, Suisse).

## *(2) Marquage*

Les cellules obtenues ont été marquées au DAPI, au cmDiI ou au BrdU de la même manière que pour les expériences in vitro.

Une fois marquées les cellules ont été conservées dans du DMEM à 4°C.

## *(3) Implantation*

### **(a) Greffes de cellules vivantes marquées**

Les brebis ont été anesthésiées au thiopental (injection IV à 10 mg/kg) suivi d'un relais gazeux avec de l'isoflurane dans 100% d'oxygène. Une thoracotomie gauche en arrière du 5<sup>ème</sup> espace intercostal a été réalisée. Les sites d'injection sur la paroi ventriculaire gauche ont été matérialisés par des points de suture au



polypropylène 5/0. La greffe a été réalisée dans l'épicaarde en 10 points d'injection de 100 µL à l'aiguille 27G.

Le thorax a été refermé de manière classique.

#### **(b) Greffes de cadavres de cellules préalablement marquées**

Une partie des cellules marquées au DAPI, au cmDiI et au BrdU a été détruite par choc thermique intense : trois cycles d'exposition à – 160°C puis à 90°C en quelques minutes.

Ces cellules ont ensuite été greffées dans la paroi ventriculaire gauche de brebis avec la même technique que pour les cellules vivantes.

#### **(c) Injections de marqueurs « libres »**

Des injections de DAPI, de cmDiI et de BrdU ont été réalisées dans le ventricule gauche de brebis de la même manière que pour les greffes cellulaires précédentes.

#### ***(4) Analyse histologique et immunohistochimique***

Les brebis ont été sacrifiées 1 heure après l'implantation, par injection intraveineuse de penthobarbital. Une thoracotomie gauche a été réalisée afin de prélever le cœur. Les sites d'injection ont été repérés puis disséqués.

Les prélèvements marqués au BrdU ont été fixés dans du formol dilué au 1/10<sup>ème</sup>. Des coupes de paraffine de 5µm ont été réalisées après l'inclusion en paraffine classique et le marquage HES standard. Un anticorps anti-BrdU (clone BMG 6H8, Roche®, au 1/10<sup>ème</sup>) a ensuite été utilisé pour repérer les cellules marquées au BrdU. Les coupes ont été observées au microscope optique (LEICA®, DMIL).

Les prélèvements marqués au DAPI ou au cmDiI ont été congelés à – 80°C avant d'être coupés au cryostat. Des coupes de 10µm ont été réalisées à – 20°C, ces coupes ont ensuite été observées au microscope à fluorescence (LEICA®, DMIL), un filtre bleu a été utilisé pour repérer les cellules marquées au DAPI et un filtre vert pour les cellules marquées au cmDiI.

## **b) Greffes cellulaires dans l'urètre**

Des cellules vivantes préalablement marquées par l'un des trois marqueurs étudiés ont été injectées dans des urètres de chiennes.

Les urètres greffés ont été prélevés et observés soit 2 jours soit 4 semaines après l'implantation.

### *(1) Culture cellulaire*

#### **(a) Cellules utilisées**

Les cellules utilisées sont les cellules satellites présentes dans le muscle strié squelettique et intervenant dans sa régénération. Elles ont été prélevées par biopsie musculaire dans le muscle sartorius puis le prélèvement a été nettoyé du tissu fibreux et adipeux l'entourant avant d'être dissocié mécaniquement.

#### **(b) Produits utilisés**

Les produits et milieux utilisés pour la technique de culture sont les suivants :

- DULBECCO'S Modified Eagle Medium (DMEM) avec Glutamax- 1, sodium pyruvate, pyridoxide, 4500 mg/L glucose, Gibco®
- Phosphate Buffered Saline (PBS), pH7,2 / 0,1M, Gibco®
- Collagénase (dessicat) Sigma® C-9891, Lot 129H8607, collagen digestion activity: 548 U/mg solid, FALGPA hydrolysis activity: 1,9 U/mg solid.
- Trypsine (1X), Gibco®
- Sérum de veau foetal (SVF), Gibco®
- Diméthyl sulfoxyde (DMSO), Sigma®
- Pénicilline/Streptomycine (Péni/Strepto), Gibco®

Milieu préparé par l'opérateur :

Milieu de culture de base : DMEM complété (DMEMc)

DMEM	79%
SVF	20%
Péni/Strepto	1%

#### **(c) Préparation des cellules et mise en culture**

La biopsie a été transférée dans une cupule stérile pour être dissociée mécaniquement aux ciseaux jusqu'à l'obtention d'un mélange type compote. Cette préparation a été stérilement transférée dans deux tubes contenant chacun 10 mL d'une solution stérile à base de collagénase 0,2 % puis a été pesée (environ 10 grammes). Les tubes ont ensuite été transférés dans un agitateur sec à 37°C pendant 20 minutes.

Les tubes ont ensuite été centrifugés à 1200 t/min pendant 2 minutes. Le surnageant contenant les cellules satellites a été retiré et conservé dans un flacon de 75 cm<sup>2</sup> contenant 50 mL de DMEMc. Dix mL de collagénase 0,2 % ont été rajoutés dans chaque tube avec le culot restant et remis à l'agitation à 37°C pendant 20 minutes encore. Cette série de digestion enzymatique a été recommencée 4 fois, soit 5 extractions en tout.

Le contenu du flacon de 75 cm<sup>2</sup> avec les cellules satellites a été filtré et la préparation a ensuite été lavée par centrifugation dans 4 tubes de 50 mL, à 2000 t/min pendant 15 minutes. Le surnageant a été éliminé et cette étape a été répétée une seconde fois.

L'ensemble a été reconditionné dans 30 mL de DMEM puis transféré dans 30 boîtes (1 mL/boîte) de Pétri contenant chacune 10 mL de DMEMc.

Les boîtes ont ensuite été mises à l'étuve humidifiée, à 38°C avec 5% de CO<sub>2</sub>, puis surveillée quotidiennement pour l'avancement des cultures et l'absence d'infection. Un changement de milieu a été effectué tous les 3 jours.

L'observation quotidienne des cellules a été réalisée avec un microscope inversé à contraste de phase (LEICA®, DMIL).

#### **(d) Comptage cellulaire et reconditionnement des cellules pour la greffe**

Le jour de la greffe, les cellules ont été trypsinées : le surnageant a été enlevé des boîtes puis les cellules ont été rincées avec du PBS pendant 1 minute. Deux à trois mL de trypsine ont été ajoutés pendant 5 à 10 minutes en fonction du décollement des cellules du fond de la boîte. Deux à trois mL de DMEMc ont été ajoutés puis les cellules ont été centrifugées 10 minutes à 2000 t/min et remises en suspension dans du DMEM pour être à nouveau centrifugées (rinçage). Les cellules remises en suspension dans du DMEM ont été comptées à la cellule de Malassez.

### *(2) Techniques de marquage cellulaire*

Le marquage des cellules par le cmDiI, le DAPI et le BrdU a été réalisé de manière identique aux tests in vitro.

### *(3) Méthode d'implantation*

Une laparotomie sus-pubienne de 10 cm environ a été pratiquée sur les chiennes préalablement anesthésiées et placées en décubitus dorsal. La vessie a été

extériorisée puis la partie proximale de l'urètre individualisée entre les couches graisseuses de cette région. Deux injections de 0,5 mL ont été pratiquées de part et d'autre de l'urètre avec une seringue et une aiguille à insuline (26G), en tentant de ne pas traverser la paroi jusqu'à la lumière urétrale.

La paroi abdominale a été refermée plan par plan de manière classique avec du fil de polyglactine (Vicryl®) et du nylon (Filapeau®). Les chiennes ont été enfin réveillées et traitées contre la douleur.

#### *(4) Analyse histologique et immunohistochimique*

Les chiennes ont été euthanasiées de deux à quatre semaines après la greffe par injection intraveineuse de penthobarbital (Doléthol®). Les urètres ont été prélevés par laparotomie sus-pubienne.

Chaque prélèvement a été divisé en deux éléments. Le premier a été fixé dans du formol dilué au 1/10<sup>ème</sup> (formol 3%) pour la microscopie optique, le deuxième a été congelé à -80°C avant d'être coupé au cryostat pour la fluorescence.

Des coupes de paraffine de 5µm ont été réalisées pour la microscopie optique après l'inclusion en paraffine classique et le marquage HES standard. Un anticorps anti-BrdU (clone BMG 6H8, Roche®, au 1/10<sup>ème</sup>) a ensuite été utilisé pour repérer les cellules marquées au BrdU.

Des coupes de 10 µm ont été réalisées à -20°C au cryostat afin d'évaluer la présence des marqueurs fluorescents. Les coupes ont ensuite été observées au microscope à fluorescence (LEICA®, DMIL), un filtre bleu a été utilisé pour repérer les cellules marquées au DAPI et un filtre vert pour les cellules marquées au cmDiI.

## B. RESULTATS

### 1. Résultats des tests *in vitro*

#### a) Résultats des expériences de recaptage

Les résultats de l'épreuve de recaptage sont présentés dans le **tableau 2**.

L'observation des trois boîtes A (boîtes témoins ne contenant que des cadavres de cellules préalablement marquées) permet de vérifier après fixation que les cellules marquées ont été correctement tuées. Ces boîtes étant négatives (absence de cellules adhérentes) et la croissance cellulaire sur les boîtes B (boîtes témoins ne contenant que des cellules vivantes non marquées) étant correcte les autres résultats de l'épreuve peuvent être interprétés.

Dès 2h on peut observer que toutes les cellules résidentes sont marquées au DAPI alors qu'aucune cellule n'est marquée au cmDiI ou au BrdU.

A 48h le marquage des cellules résidentes par le BrdU est toujours négatif et seules quelques cellules sont marquées faiblement au cmDiI.

Ces résultats démontrent que le recaptage par les cellules résidentes *in vitro* est considérable avec le DAPI et ce très rapidement après le contact alors qu'il est très faible avec le cmDiI et inexistant avec le BrdU même au bout de 48h de contact.

Ces résultats *in vitro* ont effectivement été confirmés *in vivo*, comme le montreront les résultats histologiques obtenus sur plusieurs animaux.

#### b) Résultats des expériences de dilution

Les résultats obtenus avec les trois marqueurs sont présentés dans le **tableau 3**.

On peut observer que 80 % des cellules marquées au BrdU sont encore marquées après 4 divisions alors que seulement 43 % des cellules marquées initialement au DAPI ou au cmDiI sont encore marquées. De plus après 4 divisions le marquage au DAPI est très faible tandis que le marquage au cmDiI a conservé une intensité de bonne qualité.

Le BrdU et le cmDiI sont encore présents après 9 divisions. Ce nombre de doublements de populations est considérable : 9 doublements de populations déterminent le passage de 10.000 à 5 millions de cellules.

En d'autres termes, le BrdU et le cmDiI permettent de suivre longtemps le destin des cellules greffées. En revanche, le DAPI est un mauvais marqueur en terme de durabilité sur une population cellulaire en division notamment par la perte d'intensité de sa fluorescence.

Le DAPI ne peut donc être utilisé que pour des études à très court terme, en effet sa dilution et la baisse d'intensité de la fluorescence sont responsables de faux négatifs, les cellules greffées ne peuvent être suivies sur de longues périodes.

En revanche le cmDiI et surtout le BrdU sont des marqueurs plus fiables lors d'expériences à moyen terme, ils permettent de suivre plus longtemps le devenir des cellules greffées. Cependant leur comportement à plus long terme (suivi sur plusieurs mois par exemple) n'a pas été étudié.

**Tableau 2: Expérience in vitro de recaptage des marqueurs chimiques libérés sur une population cellulaire non marquée à 2h et 48h.**

	Boîte A (témoin cellules mortes marquées)	Boîte B (témoin cellules vivantes non marquées)	Boîte C (2 heures après le contact)	Boîte D (48 heures après le contact)
cmDiI	0 cellule marquée	Bonne croissance cellulaire	0 cellule marquée	Quelques rares cellules faiblement marquées
DAPI	Quelques débris cellulaires marqués	Bonne croissance cellulaire	100 % des cellules sont marquées de manière intense	100 % des cellules sont marquées de manière intense
BrdU	0 cellule marquée	Bonne croissance cellulaire	0 cellule marquée	0 cellule marquée

**Tableau 3: Expérience de dilution des marqueurs chimiques**

Nombre de divisions cellulaires	Pourcentage de cellules marquées		
	DAPI	cmDiI	BrdU
3	100 %	100 %	90 %
4	43 % (marquage de faible intensité)	43 %	80 %
6	10 % (marquage de faible intensité)	40 %	13 %
9	0 %	10 %	8 %

## 2. Résultats des tests *in vivo*

### a) Dans le myocarde

Le bilan des analyses histopathologiques est présenté dans le **tableau 4**.

Les coupes réalisées à partir de myocardes greffés avec des cellules vivantes ou mortes marquées au DAPI ont montré un relargage important du DAPI dans le milieu ainsi qu'un recaptage intense par les cellules environnantes et ceci une heure après la greffe. De nombreux cardiomyocytes marqués ont également été observés lors de greffe de DAPI « libre » (**Figures 8, 9 et 10**).

Le DAPI est donc libéré lors de la mort des cellules marquées et recapté de manière intense et rapide (moins d'une heure) par les cellules environnantes.

La mort cellulaire étant un phénomène majeur lors de greffe cellulaire l'utilisation du DAPI ne permet pas un suivi fiable des cellules injectées sauf pour des expériences à très court terme (quelques minutes).

Aucune trace de recaptage n'a été observée lors de greffes de cellules marquées au cmDiI ou au BrdU (cellules vivantes ou mortes). Aucun cardiomyocyte marqué n'a été observé lors d'injection de cmDiI ou de BrdU libre (**Figure 11**).

Le cmDiI et le BrdU ne sont pas recaptés par les cellules environnantes même lorsqu'ils sont présents en quantité importante dans le milieu extracellulaire (cas des injections de marqueurs libres). Le cmDiI et le BrdU sont donc des marqueurs biochimiques fiables pour des études à court terme.

### b) Dans l'urètre

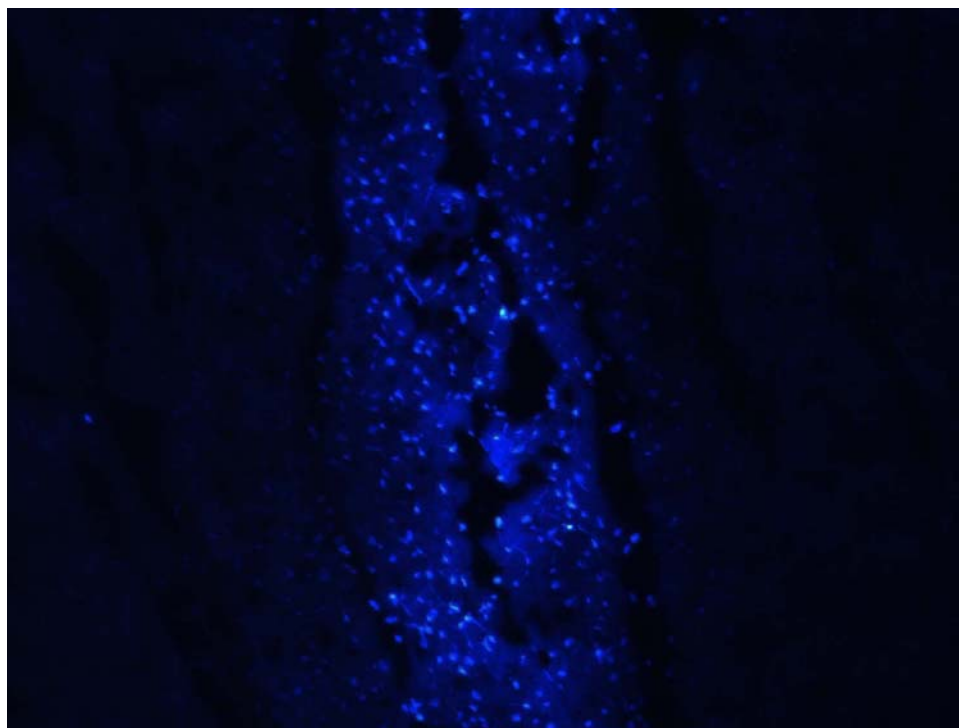
Les analyses anatomopathologiques menées au cours de ce protocole permettent d'établir le bilan présenté dans le **tableau 5**.

Une fuite très importante de DAPI a été observée, de nombreuses cellules résidentes sont marquées. Cette constatation a été faite sur plusieurs lames, sur des tissus prélevés à J2 notamment. Cette fuite est à mettre en relation avec une mortalité cellulaire intense après l'implantation et un recaptage du DAPI par les cellules environnantes. Ce phénomène avait déjà été observé lors des tests *in vitro* et confirme le risque important de faux positifs lors d'utilisation du DAPI.

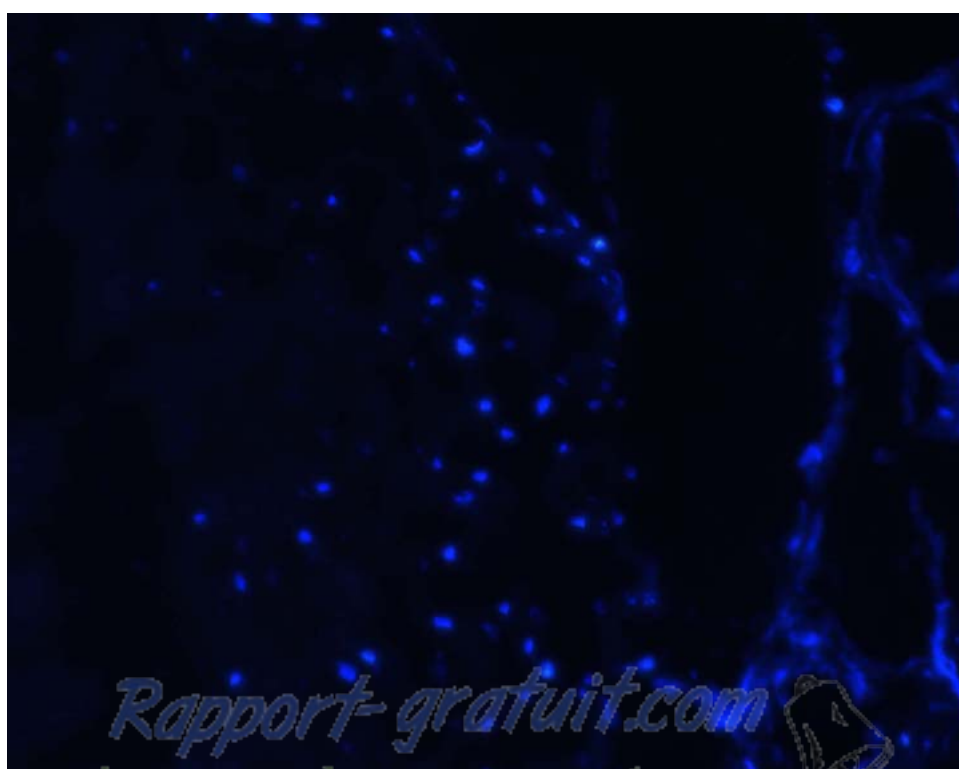
Ce phénomène de fuite du marqueur et de recaptage par les cellules environnantes n'a pas été retrouvé avec le cmDiI ce qui confirme les résultats obtenus *in vivo* à savoir que le cmDiI n'est pas recapté par les cellules environnantes.



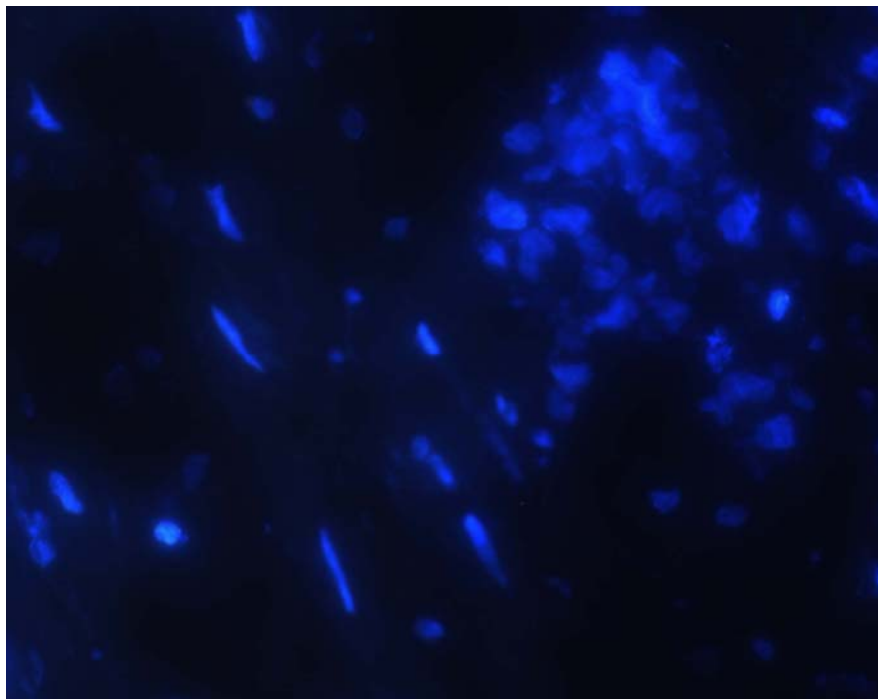
**Figure 8 : : Marquage des cellules myocardiques lors de l'injection de DAPI libre, la couleur bleue du marquage est observée au microscope à fluorescence (LEICA®, DMIL) avec un filtre bleu.**



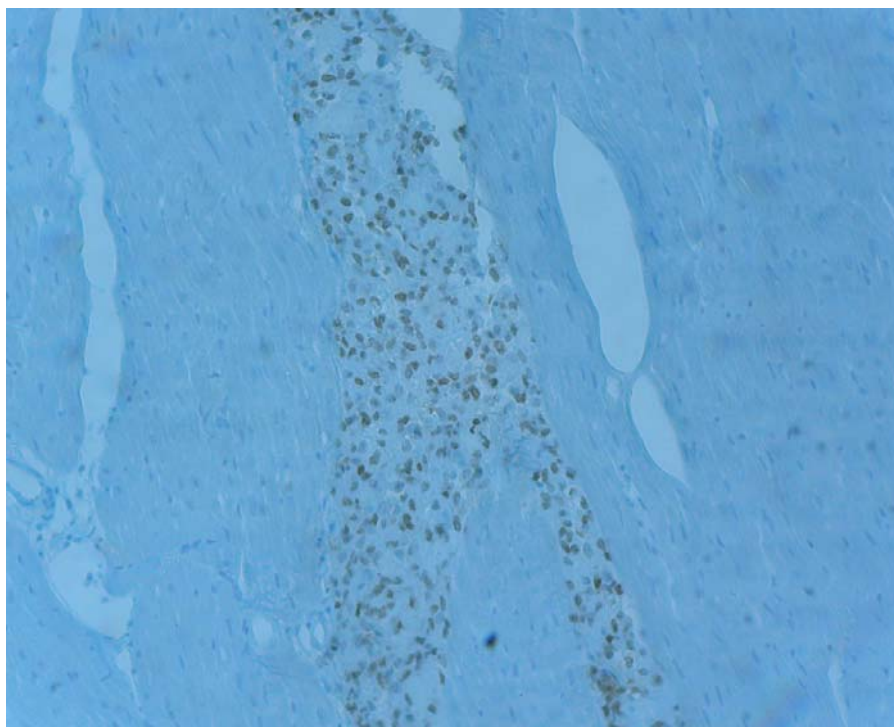
**Figure 9 : : Marquage des cellules myocardiques lors de l'injection de cellules mortes préalablement marquées au DAPI, la couleur bleue du marquage est observée au microscope à fluorescence (LEICA®, DMIL) avec un filtre bleu.**



**Figure 10 : Marquage des cellules myocardiques lors de l'injection de cellules vivantes marquées au DAPI**



**Figure 11 : Absence de recaptage du BrdU par les cellules myocardiques lors de l'injection de cellules vivantes préalablement marquées**



**Tableau 4: Bilan des greffes myocardiques sur des brebis.**

	DAPI	cmDiI	BrdU
Greffes de cellules vivantes marquées	Nombreux cardiomyocytes marqués	Pas de marquage des cellules environnantes	Pas de marquage des cellules environnantes
Greffes de cadavres de cellules préalablement marquées	Nombreux cardiomyocytes marqués	Pas de marquage des cellules environnantes	Pas de marquage des cellules environnantes
Greffes de marqueur « libre »	Nombreux cardiomyocytes marqués	Pas de marquage des cellules environnantes	Pas de marquage des cellules environnantes

**Tableau 5: Bilan des analyses anatomopathologiques réalisées sur les urètres de chiennes.**

	Marquage cellulaire	Observation histologique	Conclusions / hypothèses
Chienne 1	DAPI	Prélèvement à J2: Fuite évidente du DAPI sur les cellules natives.	Le DAPI est un mauvais marqueur (fuite, dilution).
Chienne 2	CmDiI et DAPI	Prélèvement à J ? : Granulome avec amas cellulaires retrouvés DAPI+ et cmDiI+. Fuite du DAPI à la périphérie.	La DAPI est un mauvais marqueur. Le cmDiI ne fuit pas in vivo.

## C. DISCUSSION

### 1. Interprétation des résultats

Cette étude nous a permis de confirmer les principales caractéristiques de chacun des trois marqueurs présentés et de mettre à jour leurs atouts et leurs limites.

Les résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* aboutissent aux mêmes conclusions, en particulier :

- recaptage intense et quasi-immédiat du DAPI par les cellules résidentes lors de mort cellulaire, phénomène absent lors de marquage avec le cmDiI et le BrdU,
- dilution rapide et perte d'intensité du DAPI au cours des divisions cellulaires, phénomène moins marqué avec le cmDiI et surtout avec le BrdU,
- techniques de marquage et détection plus longues et plus coûteuses avec le BrdU qu'avec les deux autres marqueurs.

Au terme de ce travail le DAPI apparaît comme un mauvais marqueur cellulaire en terme de recaptage et de dilution, son utilisation ne permet donc pas de suivre de manière fiable le devenir des cellules marquées.

Le cmDiI et le BrdU apparaissent au contraire comme des marqueurs beaucoup plus fiables car conformes au cahier des charges fixé, même si un risque de faux négatifs par dilution du marquage est présent pour des études à moyen et long terme.

En ce qui concerne la persistance dans les cellules le BrdU apparaît comme le plus performant des trois marqueurs, cette persistance peut être expliquée par son incorporation dans l'ADN cellulaire alors que le DAPI et le cmDiI établissent des liaisons plus fragiles avec les cellules.

### 2. Limites de l'étude

#### a) Absence de comparaison avec un marqueur génétique

Notre travail a permis d'étudier trois marqueurs fluorescents et de les comparer entre eux. Le cmDiI et le BrdU apparaissent comme les deux plus fiables pour suivre le devenir des cellules. Cependant les différents tests effectués ont été de courte durée et ces marqueurs pourraient poser des problèmes de dilution avec le temps et être moins performants.

Afin d'évaluer de manière plus précise la fiabilité de ces marqueurs il faudrait les comparer à des marqueurs génétiques (Beta-Gal, GFP, luciférase) qui sont transmis à toutes les générations cellulaires et pas aux cellules environnantes.

Une telle comparaison n'a pas pu être effectuée en raison des coûts engendrés et des contraintes techniques.

Le marquage génétique reste à l'heure actuelle la méthode la plus fiable pour suivre le devenir des cellules sur de longues périodes.

#### **b) Taille des échantillons, nombre de mesures**

Notre étude a été réalisée sur un petit nombre d'animaux et n'a pas permis de réaliser des groupes d'animaux homogènes ni de réaliser une étude statistique.

Nos résultats sont donc basés sur un faible effectif et sur une courte durée. Il est difficile dans ces conditions de tirer des conclusions sur le comportement à plus long terme des marqueurs.

## **CONCLUSION**

La thérapie cellulaire s'inscrit dans une logique d'évolution de l'arsenal thérapeutique de nombreuses pathologies telles que l'insuffisance cardiaque, l'insuffisance rénale, les maladies nerveuses dégénératives... Elle cherche ainsi à apporter des solutions simples et largement applicables dans des domaines de plus en plus coûteux.

Les enjeux médicaux et financiers de ce type de recherche sont colossaux et de nombreuses questions sont posées : quel type cellulaire greffer selon la pathologie en cause? Comment optimiser la survie des cellules greffées ? Par quels mécanismes les cellules injectées s'intègrent-elles dans l'organe receveur ? Quels sont les effets thérapeutiques résultant de cette intégration ?

La réponse à toutes ces questions passent entre autres au départ par une identification fiable des cellules greffées. De nombreux marqueurs cellulaires existent sur le marché mais tous ne possèdent pas les mêmes qualités.

Notre étude a permis de mettre en évidence la grande facilité d'utilisation et de détection des trois marqueurs biochimiques étudiés, qualité appréciable pour les protocoles de recherche. Cependant aucun des marqueurs étudiés ne réunit toutes les qualités du marqueur idéal, et le choix du marqueur le plus approprié est fonction de l'étude menée. Le DAPI par exemple peut convenir pour des études à très court terme avec un faible risque de mort cellulaire. L'utilisation du BrdU quant à elle impose que les cellules étudiées se multiplient afin de pouvoir incorporer le marqueur. L'utilisation des gènes rapporteurs permet de mieux répondre au cahier des charges d'un marqueur idéal mais pose toujours des problèmes de coût, de technicité et d'immunogénicité.

Une méthode de marquage simple, facilement reproductible, peu onéreuse et fiable reste encore à développer.

## **ANNEXE I**

### **GLOSSAIRE**

- Grefe autologue = autogrefe

Les cellules greffées sont prélevées sur l'organisme receveur (exemple : greffe de cellules myocardiques de brebis dans le myocarde de cette même brebis).

- Grefe homologue = allogrefe

Donneur et receveur appartiennent à la même espèce (exemple : greffe de cellules musculaires d'une brebis A dans le myocarde d'une brebis B, les cellules greffées sont donc génétiquement différentes des cellules du receveur).

- Grefe hétérologue = xénogrefe

Donneur et receveur appartiennent à des espèces différentes (exemple : greffe de cellules de souris à un rat).

## **BIBLIOGRAPHIE**

1. AMERICAN HEART ASSOCIATION. 1999 Heart and stroke statistical uptake. *Dallas, Tex: American Heart Association*, 1998.
2. ANDRADE W, SEABROOK TJ, JOHNSTON MG *et al.* The use of the lipophilic fluorochromes CM-DiI for tracking the migration of lymphocytes. *J. Immunol. Methods.*, 1996, **194**, 181-189.
3. ANVERSA P, LERI A, KAJSTURA J *et al.* Myocyte growth and cardiac repair. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2002, **34**, 91-105.
4. ANVERSA P, NADAL-GINARD B. Myocyte renewal and ventricular remodelling. *Nature*, 2002, **415**, 240-243.
5. APPELBAUM FR. Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy. *Nature*, 2001, **411**, 385-389.
6. ASAHARA T, BAUTERS C, ZHENG LP *et al.* Synergistic effect of vascular endothelial growth factor on angiogenesis in vivo. *Circulation*, 1995, **92 (9 Suppl)**, II 365-371.
7. BEHR L, LABORDE K. Evaluation du potentiel des cellules souches mésenchymateuses de la moelle dans la régénération du rein après ischémie-reperfusion: étude expérimentale chez la brebis adulte. *DEA de sciences chirurgicales*, Paris-Sud, 2003, 60 p.
8. BELTRAMI A *et al.* Cardiac c-kit positive cells proliferate in vitro and generate new myocardium in vivo. *AHA Scientific Sessions 2001 Anaheim*, 10-15 November 2001.
9. BELTRAMI AP, URBANEK K, KAJSTURA J *et al.* Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N. Engl. J. med.*, 2001, **344**, 1750-1757.
10. BIANCO P, GEHRON ROBEY P. Marrow stromal stem cells. *J. Clin. Invest.*, 2000, **105** (12), 1663-1668.
11. BORENSTEIN N, BRUNEVAL P, HEKMATI M *et al.* Non-cultured autologous skeletal muscle cells can successfully engraft into ovine myocardium, *Circulation*, 2003, **107**, 3088-3092.
12. BORENSTEIN N, CHETBOUL V, RAJNOCH C *et al.* Successful cellular cardiomyoplasty in canine idiopathic dilated cardiomyopathy. *Ann. Thorac. Surg.*, 2002, **74**, 294-300.



13. BOSIO P, BENACERRAF S, GAROT J *et al.* Stratégie thérapeutique de la prise en charge de l'insuffisance cardiaque aiguë. *Arch. Mal. Coeur*, 1998, **91**, 1349-1358.
14. BURSAC N, PAPADAKI M, COHEN R *et al.* Cardiac muscle engineering: Toward an *in vitro* model for electrophysiological studies. *Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol)*, 1999, **277**, H433-H444.
15. CAHILL RNP, POSKITT DC, FROST H, TRNKA Z. Two distinct pools of recirculating T lymphocytes: migratory characteristics of nodal and intestinal T lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 1977, **145**, 420.
16. CAO QL, ONIFER SM, WHITTEMORE SR. Labelling stem cells in vitro for identification of their differentiated phenotypes after grafting into the CNS. *Methods Mol. Biol.*, 2002, **198**, 307-318.
17. CARPENTIER A, CHACHQUES JC, GRANDJEAN P (Eds). Cardiac Bioassist. Futura publishing, New York 1997, **1**, 632.
18. CARPENTIER A, CHACHQUES JC. Myocardial substitution with a stimulated skeletal muscle: first successful clinical case. *Lancet*, 1985, **1**, 1267.
19. CARRIER RL, PAPADAKI M, RUPNICK M *et al.* Cardiac tissue engineering: Cell seeding, cultivation parameters, and tissue construct characterization. *Biotechnol. Bioeng.*, 1999, **64**, 580-589.
20. CHACHQUES JC, BERREBI A, CARPENTIER A *et al.* Study of muscular and ventricular function in dynamic cardiomyoplasty: a ten year follow up. *J. Heart Lung transplant.*, 1997, **16**, 854-868.
21. CHANCELLOR MB, YOKOYAMA T, TIRNEY S *et al.* Preliminary results of myoblast injection into the urethra and bladder wall. *Neurourol. Urodyn.*, 2000, **19**, 279-287.
22. CHENG W, REISS K, KAJSTURA J *et al.* Down-regulation of the IGF-1 system parallels the attenuation in the proliferative capacity of rat ventricular myocytes during postnatal development. *Lab. Invest.*, 1995, **72**, 646-655.
23. CHIN GW, HAY JB. A comparison of lymphocyte migration through intestinal lymph nodes, subcutaneous lymph nodes, and chronic inflammatory sites of the sheep. *Gastroenterology*, 1980, **79**, 1231.
24. CHIU RC, ZIBAITIS A, KAO RL. Cellular cardiomyoplasty: myocardial regeneration with satellite cell implantation. *Ann. Thorac. Surg.*, 1995, **60**, 12-18.
25. CHOI J, COSTA ML, MERMELSTEIN CS *et al.* MyoD converts primary dermal fibroblasts, chondroblasts, smooth muscle, and retinal pigmented epithelial cells into striated mononucleated myoblasts and multinucleated myotubes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, **87**, 7988-7992.

26. COLDITZ IG , WATSON DL. The effect of cytokines and chemotactic agonists on the migration of the T lymphocytes into skin. *Immuol.*, 1992, **76**, 272.
27. COULOMBEL L. Cellules souches tissulaires adultes: seing is not being. *Medecine/Sciences*, 2003, **19**, 683-694.
28. CRISSMAN HA , HOFLAND MH , STEVENSON AP *et al.* Supravital cell staining with Hoechst 33342 and DiOC5(3). *Methods Cell Biol.*, 1990, **33**, 89-95.
- 29.
30. CRISSMAN HA , STEINKAMP JA. Detection of bromodeoxyuridine-labeled cells by differential fluorescence analysis of DNA fluorochromes. *Methods Cell Biol.*, 1990, **33**, 199-206.
31. CUMMINS P. Fibroblast and transforming growth factor expression in the cardiac myocyte. *Cardiovasc. Res.*, 1993, **27**, 1150-1154.
32. DEACON T, SCHUMACHER J, DINSMORE J *et al.* Histological evidence of fetal pig neural cell survival after transplantation into a patient with Parkinson's disease. *Nat. Med.*, 1997, **3**, 350-353.
33. DELAHAYE F, DE GEVIGNEY G, GAILLARD S, CHENEAU E. Epidémiologie et impact de l'insuffisance cardiaque en France. *Arch. Mal. Cœur*, 1998, **91**, 1307-1314.
34. DORFMAN J, DUONG M, ZIBAITIS A *et al.* Myocardial tissue engineering with autologous myoblast implantation. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 1998, **116**, 744-751.
35. DREYFUS G. Options chirurgicales alternatives à la transplantation cardiaque. *Arch. Mal. Cœur*, 1998, **91**, 1413-1422.
36. DURAND RE , CHAPLIN DJ , OLIVE PL. Cell sorting with Hoechst or carbocyanine dyes as perfusion probes in spheroids and tumors. *Methods Cell Biol.*, 1990, **33**, 509-518.
37. DUVEAUX D, BARON O. Insuffisance cardiaque terminale. Dispositifs d'assistance circulatoire. *Arch. Mal. Cœur*, 1996, **89**, (6), 51-54.
38. FERRARI A , HANNOUCHE D , OUDINA K *et al.* In vivo tracking of bone marrow fibroblasts with fluorescent carbocyanine dye. *J. Biomed. Mater Res.*, 2001, **56**, 361-367.
39. GAUTRON J. Culture de cellules musculaires squelettiques. *In*: ADOLPH M, BARLOUATZ G, editors. *Techniques en culture de cellules animales*. Editions INSERM, Paris, 231-245.
40. GOURIOU M. *Urétromyoplastie cellulaire chez la chienne*. Thèse Méd. Vét., Alfort, 2003, n°15, 113p.

41. HAGEGE A, SCORSIN M, SAMUEL JL *et al.* Cardiomyoplastie cellulaire. Etat des lieux, évaluation et avenir. *Arch. Mal. Coeur*, 1998, **91**, 1429-1435.
42. HORAN PK, MELNICOFF MJ, JENSEN BD, SLEZAK SE. Fluorescent cell labelling for in vivo and in vitro cell tracking. *Meth. In Cell Biol.*, 1990, **33**, 469-490.
43. IMASAWA T, UTSUNOMIYA Y, KAWAMURA T *et al.* The potential of bone marrow-derived cells to differentiate to glomerular mesangial cells. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2001, **12**, 1401-1409.
44. ISSEKUTZ T, CHIN W, HAY JB. Measurement of lymphocyte traffic with indium-111. *Clin. Exp. Immunol.*, 1980, **39**, 215.
45. JACKSON KA, MAJKA SM, WANG H *et al.* Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J. Clin. Invest.*, 2001, **107**, 1395-1402.
46. JIA ZQ, MICKLE DA, WEISEL RD *et al.* Transplanted cardiomyocytes survive in scar tissue and improve heart function. *Transplant. Proc.*, 1997, **29**, 2093-2094.
47. KAJSTURA J *et al.* Cardiac stem cells mediate myocyte in the young and senescent rat heart. *In: AHA Scientific Sessions 2001 Anaheim*, 10-15 November 2001.
48. KALAAJI AN, Mc CULLOUGH K, HAY JB. The enhancement of lymphocytes localization in skin sites of sheep by tumour necrosis factor alpha. *Immunol. Lett.*, 1989, **23**, 143.
49. KESSLER PD, BYRNE BJ. Myoblast cell grafting into heart muscle: cellular biology and potential applications. *Annu. Rev. Physiol.*, 1999, **61**, 219-242.
50. KLUG MG, SOONPAA MH, KOH GY, FIELD LJ. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells from stable intracardiac grafts. *J. Clin. Invest.*, 1996, **98**, 216-224.
51. KOCHER AA, SCHUSTER MD, SZABOLCS MJ *et al.* Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat. Med.*, 2001, **7**, 430-436.
52. KOH GY, KLUG MG, SOONPAA MH, FIELD LG. Long-term survival of AT-1 cardiomyocytes grafts in syngenic myocardium. *Am. J. Physiol.*, 1993, **264**, 1727-1733.
53. KOH GY, KLUG MG, SOONPAA MH, FIELD LJ. Differentiation and long-term survival of C2C12 myoblasts grafts in heart. *J. Clin. Invest.*, 1993, **92**, 1548-1554.
54. KOH GY, KLUG MG, SOONPAA MH *et al.* Stable fetal cardiomyocyte grafts in the hearts of dystrophic mice and dogs. *J. Clin. Invest.*, 1995, **96**, 2034-2042.

55. KRAUSE DS, THEISE ND, COLLECTOR MI *et al.* Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone-marrow-derived stem cell. *Cell*, 2001, **105**, 369-377.
56. LEDLEY FD , SORIANO HE , O'MALLEY BW *et al.* DiI as a marker for cellular transplantation into solid organs. *Biotechniques*, 1992, **13**, 580-582.
57. LEOR J, PATTERSON M, QUINONES MJ *et al.* Transplantation of fetal myocardial tissue into the infarcted myocardium of rat. A potential method for repair of infarcted myocardium? *Circulation*, 1996, **94**, II 332-336.
58. LERI A, QUAINI F, KAJSTURA J, ANVERSA P. Myocyte death and myocyte regeneration in the failing human heart. *Ital. Heart J.*, 2001, **2**, 12-14.
59. LI RK, JIA ZQ, WEISEL RD *et al.* Cardiomyocyte transplantation improves heart function. *Ann. Thorac. Surg.*, 1996, **62**, 654-660.
60. LI RK, JIA ZQ, WEISEL RD *et al.* Smooth muscle cells transplanted into myocardial scar tissue improves heart function (abstract). *In: American Heart Association - 71 st Scientific Sessions*. Dallas, Texas, 8-11 November 1998.
61. LI RK, YAU TM, SAKAI T *et al.* Cell therapy to repair broken hearts. *Can. J. Cardiol.*, 1998, **4**, 735-744.
62. LOSORDO DW, VALE PR, SYMES JF *et al.* Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation*, 1998, **98**, 2800-2804.
63. MENASCHE P, HAGEGE AA, SCORSIN M *et al.* Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet.*, 2001, **357**, 279-280.
64. MENDELL JR, KISSEL JT, AMATO AA *et al.* Myoblast transfer in the treatment of Duchenne's muscular dystrophy. *N. Engl. J. Med.*, 1995, **333**, 832-838.
65. MURRY CE, KAY MA, BARTOSEK T *et al.* Skeletal differentiation during repair of myocardial necrosis in rats via gene transfer with MyoD. *J. Clin. Invest.*, 1996, **98**, 2209-2217.
66. MURRY CE, WISEMAN RW, HAUSCHKA SD, SCHWARTZ SM. Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis. *J. Clin. Invest.*, 1996, **98**, 2515-2523.
67. MUSLIN AJ, WILLIAMS LT. Well-defined growth factors promote cardiac development in axolotl mesodermal explants. *Development*, 1991, **112**, 1095-1101.
68. ONIFER SM , WHITE LA , WHITTEMORE SR , HOLETS VR. In vitro labelling strategies for identifying primary neural tissue and a neuronal cell line after transplantation in the CNS. *Cell Transplant.*, 1993, **2** , 131-149.

69. ORLIC D, KAJSTURA J, CHIMENTI S *et al.* Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, **98**, 10344-10349.
70. OTTO F, TSOU KC. A comparative study of DAPI, DIPI, and Hoechst 33258 and 33342 as chromosomal DNA stains. *Stain Technol.*, 1985, **60**, 7-11.
71. PAPADAKI M, LANGER R. Cardiomyoplasty: cellular and tissue engineering approaches. *Basic Appl. Myol.*, 1999, **9**, 151-159.
72. PARISH CR. Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. *Immunol. Cell Biol.*, 1999, **77**, 499-508.
73. PARTICK Jr. C, MIKOS A, McINTIRE L. *Frontiers in Tissue Engineering*. New York: Pergamon, 1998, pp.
74. PEARLMAN JD, HIBBERG MG, CHUANG ML *et al.* Magnetic resonance mapping demonstrates benefits of VEGF-induced myocardial angiogenesis. *Nat. Med.*, 1995, **1**, 1085-1089.
75. POULSOM R, FORBES SJ, HODIVALA-DILKE K *et al.* Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration. *J. Pathol.*, 2001, **195**, 229-235.
76. QUAINI F *and al.* Cardiac stem cells regeneration myocardium in ischemic heart failure. In: *AHA Scientific Sessions 2001 Anaheim*, 10-15 November 2001.
77. QUAINI F, URBANEK K, BELTRAMI AP *et al.* Chimerism of the transplanted heart. *N. Engl. J. Med.*, 2002, **346**, 5-15.
78. RAJNOCH C, CHACHQUES JC, BERREBI A *et al.* Cellular therapy reverses myocardial dysfunction. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2001, **121**, 871-878.
79. REINECKE H, ZHANG M, BARTOSEK T, MURRY CE. Survival, integration and differentiation of cardiomyocytes grafts. *Circulation*, 1999, **100**, 193-202.
80. ROBINSON SW, CHO PW, LEVITSKY HI *et al.* Arterial delivery of genetically labelled skeletal myoblasts to the murine heart: long-term survival and phenotypic modification of implanted myoblasts. *Cell. Transplant.*, 1996, **5**, 77-91.
81. SCORSIN M, HAGEGE A, DOLIZY I *et al.* Can cellular transplantation improve function in doxorubicin-induced heart failure? *Circulation*, 1997, **96**, 188-193.
82. SCORSIN M, HAGEGE A, MAROTTE F *et al.* Does transplantation of cardiomyocytes improve function of infarcted myocardium? *Circulation*, 1997, **96**, 188-193.
83. SIMINIAK T, KALAWSKI R, FISZER D *et al.* Skeletal myoblast transplantation during bypass grafting in the treatment of heart failure- phase I clinical trial feasibility study and early results. In: *Heart Surg Forum*. 2002, **6**, 3.

84. SORIANO HE , LEWIS D , LEGNER M *et al.* The use of DiI-marked hepatocytes to demonstrate orthotopic, intrahepatic engraftment following hepatocellular transplantation. *Transplantation*, 1992, **54**, 717-723.
85. STRAUER BE, BREHM M, ZEUS T *et al.* Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation*, 2002, **106**, 1913-1918.
86. SVENDSEN CN, CALDWELL MA, SHEN J *et al.* Long-term survival of human central nervous system progenitor cells transplanted into a rat model of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.*, 1997, **148**, 135-146.
87. TANG YL, ZHAO Q, ZHANG YC *et al.* Autologous mesenchymal stem cell transplantation induce VEGF and neovascularisation in ischemic myocardium. *Regulatory Peptides*, 2004, **117**, 3-10.
88. TAYLOR DA , ATKINS BZ , HUNGSPREVOS P *et al.* Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat. Med.*, 1998, **4**, 929-934.
89. UCHIDA Y, YANAGISAWA-MIWA A, NAKAMURA F *et al.* Angiogenic therapy of acute myocardial infarction by intrapericardial injection of basic fibroblast growth factor and heparin sulfate: an experimental study. *Am. Heart J.*, 1995, **130**, 1182-1188.
90. VAN METER CH, CLAYCOMB WC, DELCARPIO JB *et al.* Myoblast transplantation in the porcine model: a potential technique for myocardial repair. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 1995, **110**, 1442-1448.
91. VILQUIN JT, SCORSIN M, POUZET B *et al.* Transplantation de cellules musculaires dans le myocarde. *Réal. Cardiol.*, 1999, **146**, 31-36.
92. WATANABE E, SMITH DM, DELCARPIO JB *et al.* Cardiomyocyte transplantation in a porcine myocardial infarction model. *Cell Transplant.*, 1998, **7**, 239-246.
93. YANAGISAWA-MIWA A, UCHIDA Y, NAKAMURA F *et al.* Salvage of infarcted myocardium by angiogenic action of basic fibroblast growth factor. *Science*, 1992, **257**, 1401-1403.
94. YOO KJ, LI RK, WEISEL RD, MICKLE DAG *et al.* Heart cell transplantation improves heart function in dilated cardiomyopathic hamsters. *Circulation*, 2000, **102**, 204-209.
95. YOO KJ, LI RK, WEISEL RD *et al.* Autologous smooth muscle cell transplantation improved heart function in dilated cardiomyopathy. *Ann. Thorac. Surg.*, 2000, **70**, 859-865.

# COMPARAISON DE DIFFERENTS MARQUEURS BIOCHIMIQUES POUR LA THERAPIE CELLULAIRE : ETUDE EXPERIMENTALE

NOM et Prénom : PASQUIER Aurélie

## RESUME :

Le développement de la thérapie cellulaire s'inscrit dans une logique d'évolution de l'arsenal thérapeutique face à des pathologies aussi diverses que l'insuffisance cardiaque, l'insuffisance rénale... Celles-ci constituent un problème majeur de santé publique dans les pays développés. Le marquage cellulaire représente un des points clefs de la progression des recherches et de nombreux marqueurs cellulaires sont présents sur le marché. Cependant, le marqueur cellulaire idéal en terme de fiabilité, de simplicité d'utilisation et de coût n'est pas encore disponible.

Notre projet concernait la comparaison *in vitro* et *in vivo* de trois marqueurs biochimiques : le DAPI marqueur fluorescent nucléaire, le cmDiI marqueur fluorescent membranaire et le BrdU marqueur de l'ADN révélé par immunohistochimie. Au cours des tests que nous avons pratiqués, soit *in vitro*, soit *in vivo* (greffe de cellules dans le myocarde chez la brebis et dans l'urètre chez la chienne), nous avons principalement étudié les propriétés de recaptage et de dilution de ces marqueurs afin de vérifier leur conformité au cahier des charges pré-établi.

Le DAPI s'est révélé être un mauvais marqueur cellulaire en terme de recaptage, son utilisation ne permet donc pas de suivre avec fiabilité le devenir des cellules greffées. Comparativement le cmDiI et le BrdU se sont révélés être des marqueurs plus fiables.

Cependant, seul le marquage génétique permet de repérer et de suivre sans ambiguïté les cellules greffées.

Mots-clés : Thérapie cellulaire, marqueur cellulaire, DAPI, cmDiI, BrdU, marqueur génétique.

## JURY :

Président : Pr

Directeur : Pr BERNEX

Assesseur : Pr POUCHELON

Invités : Dr BORENSTEIN

Mme HEKMATI

Adresse de l'auteur :  
89 c les bois du cerf  
91450 Etolles

# COMPARISON OF DIFFERENT BIOCHEMICAL TRACERS FOR CELLULAR THERAPY: EXPERIMENTAL STUDY

NAME and Surname: PASQUIER Aurélie

## SUMMARY:

The development of cellular therapy is in line with the logic of evolution of the therapeutic arsenal, faced with several severe conditions such as heart failure and renal failure, which are major health care issues in developed countries. Cell labelling is a crucial aspect of pre-clinical research for cellular therapy. Many different cell labelling techniques are available on the market. However, as regards reliability, ease of use and cost, the ideal cell tracker is not yet available.

Our project deals with the *in vitro* and *in vivo* comparison of three cell trackers: DAPI, nuclear fluorescent tracker, cmDiI, membrane fluorescent tracker, BrdU, tracker revealed by immunohistochemistry. During our tests, either *in vitro* or *in vivo* (cellular transplantation in sheep's myocardium and in dog's urethra) we have mainly studied the re-uptake and dilution properties of the trackers in order to check their accordance with the specifications that we had previously established.

We conclude that re-uptake of DAPI disqualifies the use of this reagent for accurate tracking of implanted cells. By comparison cmDiI and BrdU proved to be more reliable.

We think that only genetic labelling will permit unambiguous identification of the implanted cells and analysis of their fate.

Key words: cellular therapy, cell tracker, DAPI, cmDiI, BrdU, genetic labelling.

## JURY:

President: Pr

Director: Pr BERNEX

Assessor: Pr POUCHELON

Guest : Dr BORENSTEIN

Mme HEKMATI

Author's Address :

89 c les bois du cerf

91450 Etolles