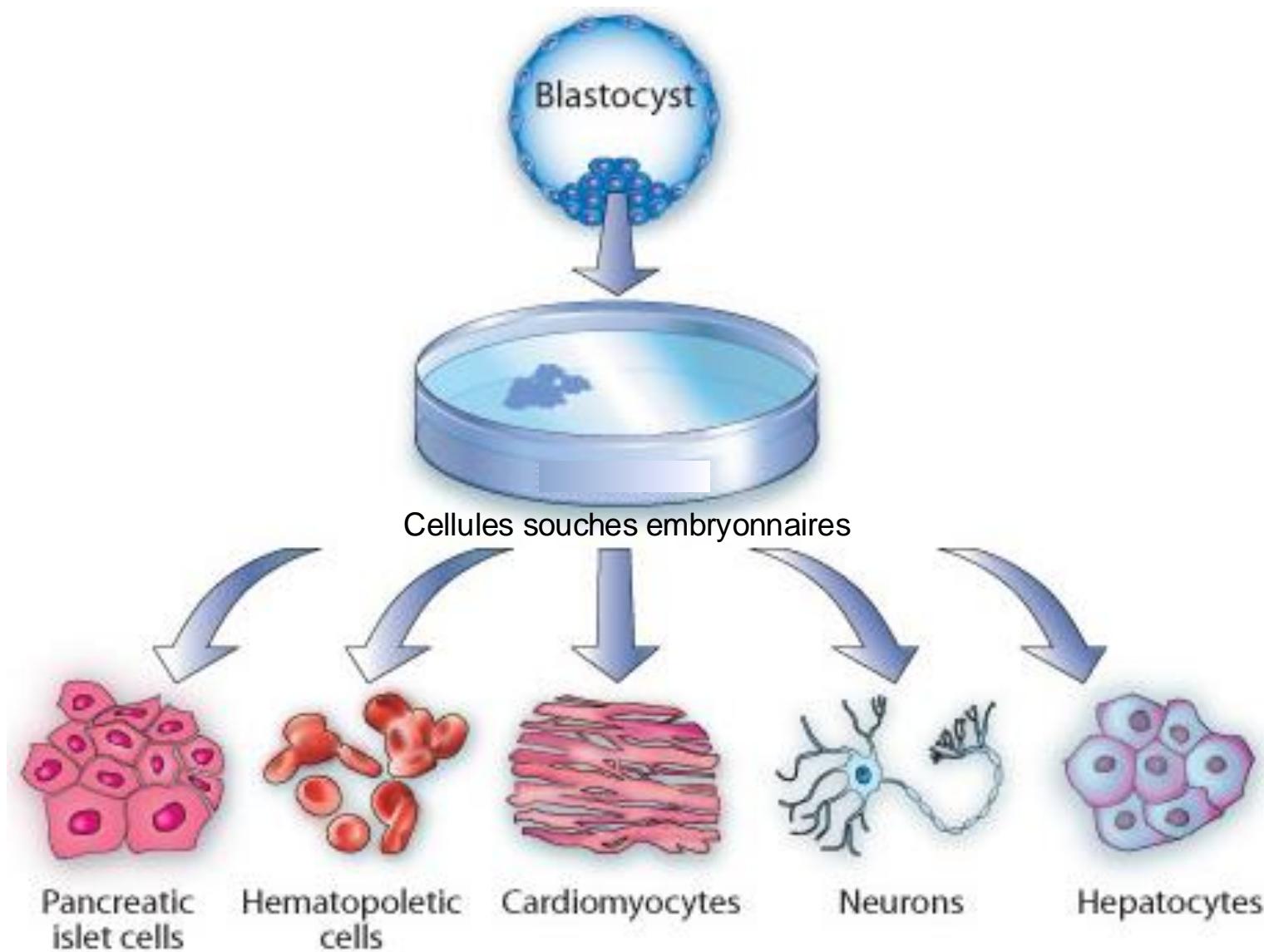


Au menu aujourd'hui

1. Comment étudier la différenciation des cellules souches
 - In vitro
 - In vivo
2. Les cellules souches pluripotentes comme outil pour:
 - l'étude de l'embryogenèse précoce
 - modélisation des maladies humaines
3. L'analyse de cellules uniques en tant que nouvel outil pour étudier la descendance dérivée des cellules souches

Cellules souches embryonnaires (CSE)



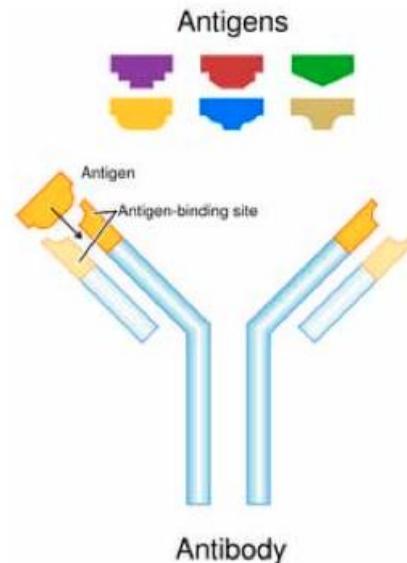
Modifié à partir de <http://brightnepenthe.blogspot.com/2010/10/stem-cells-part-2.html>

Outils d'imagerie pour étudier la différenciation des cellules souches embryonnaires

1. Immunofluorescence
2. **RNA Fluorescence *in Situ* Hybridation (RNA FISH)**
3. Constructions promoteur-rapporteur
4. Traçage du destin cellulaire *in vivo*

Immunofluorescence: un outil pour identifier la descendance des CSE

- Nous avons besoin d'une molécule qui peut se lier **spécifiquement** à la protéine que nous voulons étudier pour pouvoir la **marquer**
- Utilisation d'**anticorps**
- Les anticorps sont produits naturellement par nos cellules immunitaires (plasmocytes) dans notre corps en réponse à des protéines étrangères (par exemple des agents infectieux tels que des virus, des bactéries, etc.) Chaque anticorp se lie à un **antigène spécifique**.



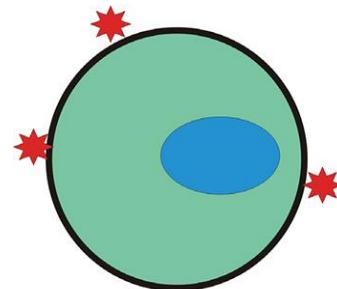
- En injectant une protéine humaine ou un fragment de protéine dans une autre espèce, on peut générer des anticorps contre cette protéine.

Comment fonctionne l'immunofluorescence?

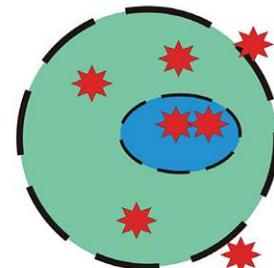
1. Fixation des cellules (avec du formaldehyde)
2. Perméabilisation de la membrane plasmique avec un detergent (par exemple du Triton) pour marquer des protéines intracellulaires



Anticorps pour
marquer les cellules

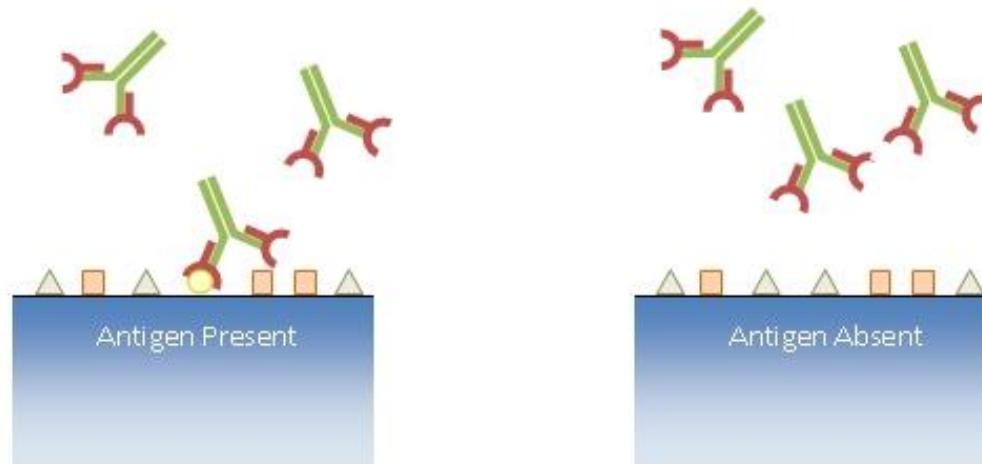


Non perméabilisé



Perméabilisé

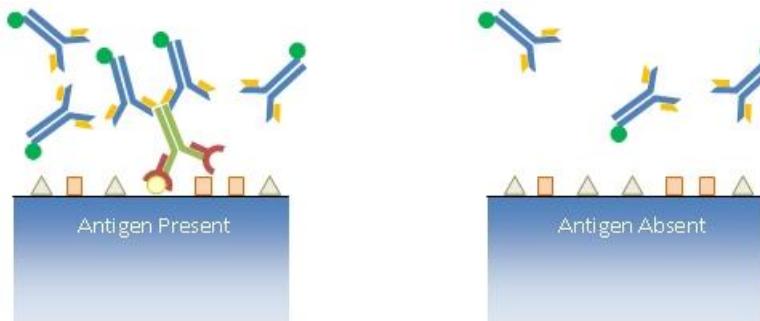
3. Incubation avec un anticorps primaire



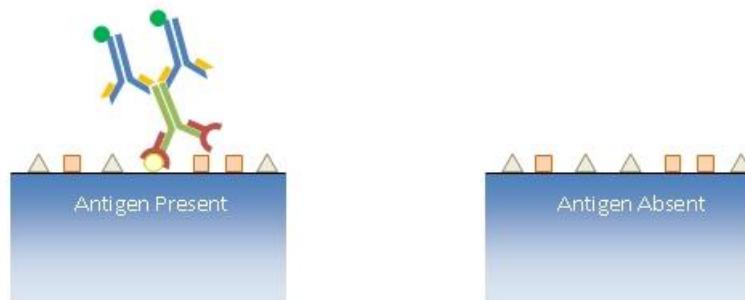
4. Lavage de l'excès d'anticorps



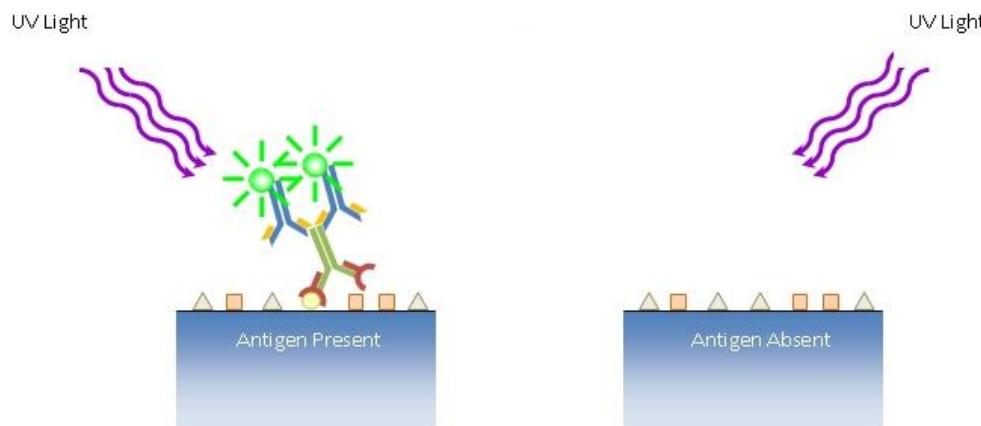
5. Incuber avec un anticorps secondaire marqué



6. Lavage de l'excès d'anticorps secondaire

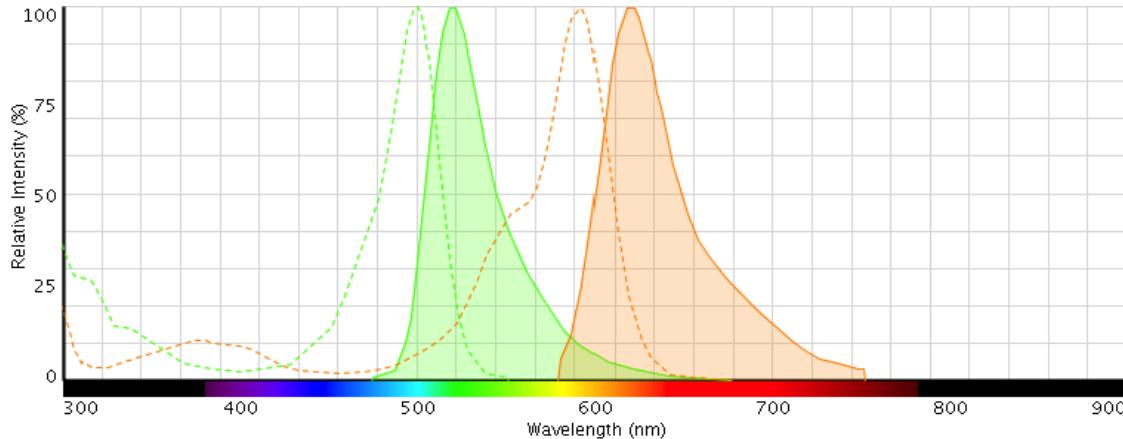


7. Imagerie en microscopie à fluorescence



Est-il possible de visualiser plusieurs fluorophores en même temps ?

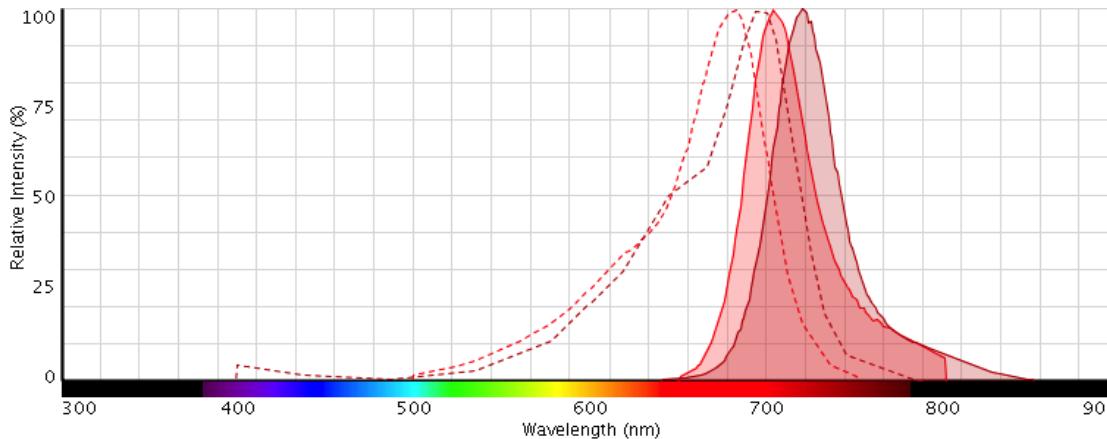
Spectres des fluorophores Alexa 488 et Alexa 594



→ Oui, si les spectres ne se chevauchent pas trop

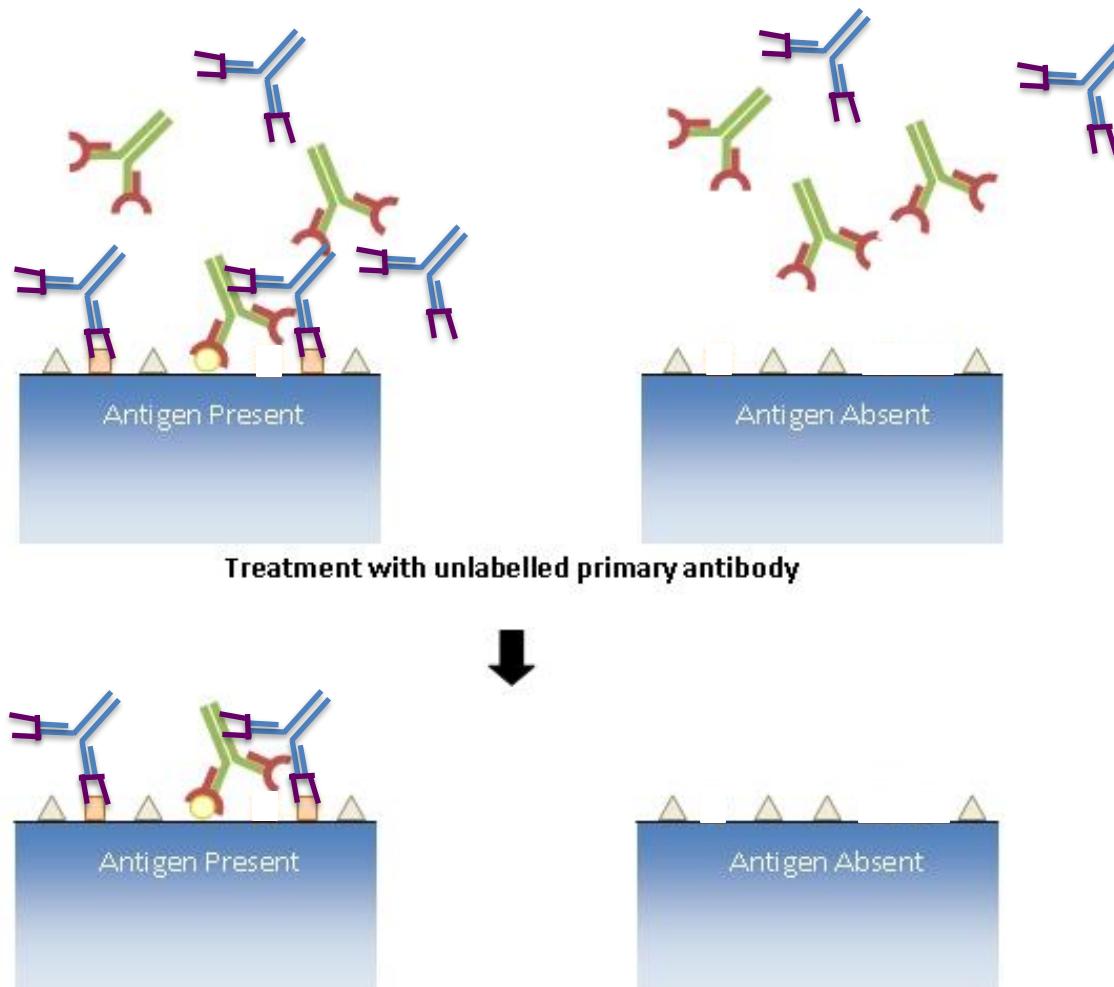
— Spectre d'excitation
— Spectre d'émission

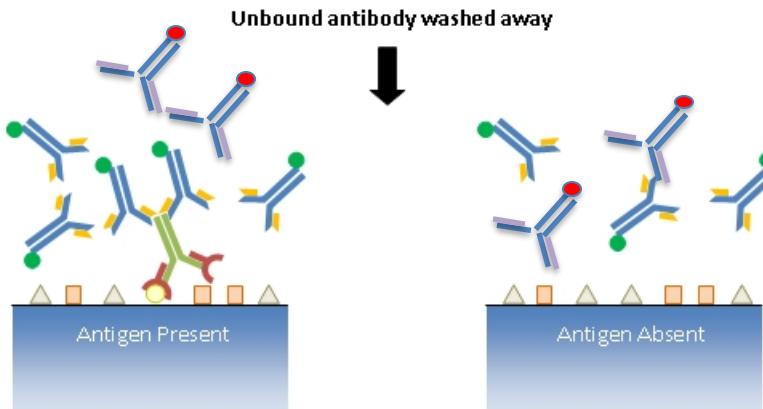
Spectres des fluorophores Alexa 680 et Alexa 700



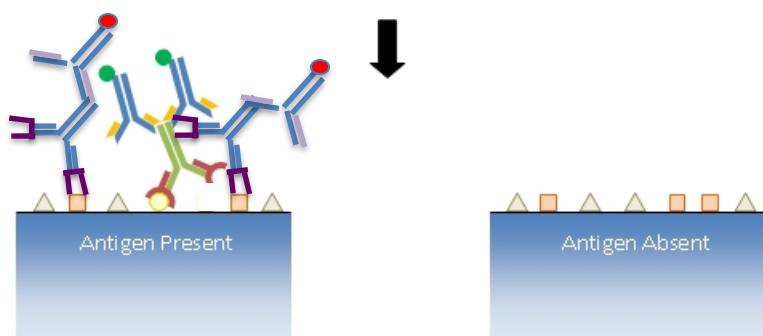
→ Non si les spectres se chevauchent beaucoup

Immunofluorescence: également possible avec plusieurs anticorps

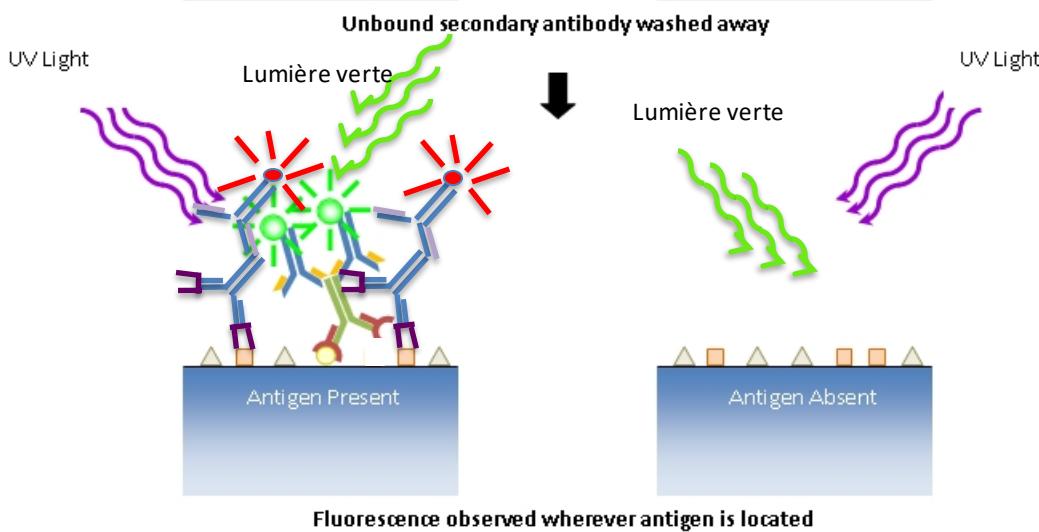




Treatment with unlabelled secondary antibody



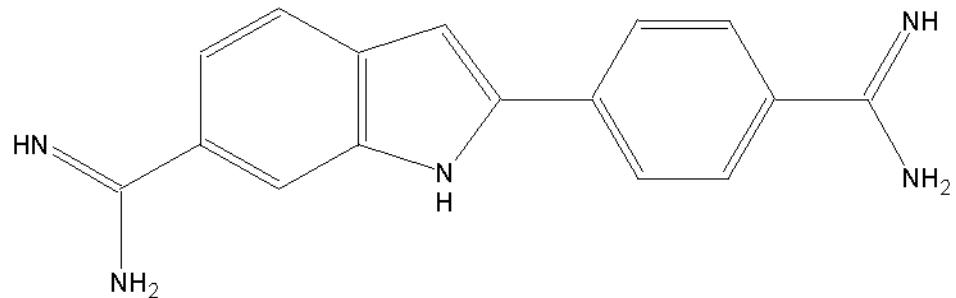
Antigen Absent



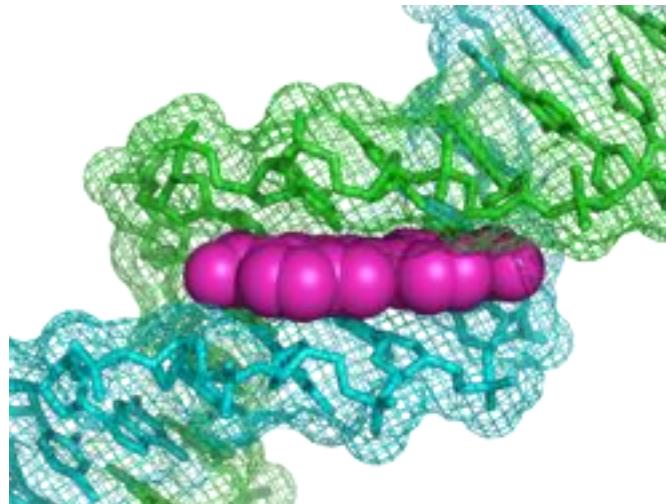
Comment marquer le noyau cellulaire

- En utilisant un produit chimique, par exemple 4 ', 6-diamidino-2-phénylindole (**DAPI**) qui se lie à l'ADN
- Il émet dans le spectre **bleu**, et peut être utilisé en combinaison avec des colorants à émission verte et à émission rouge

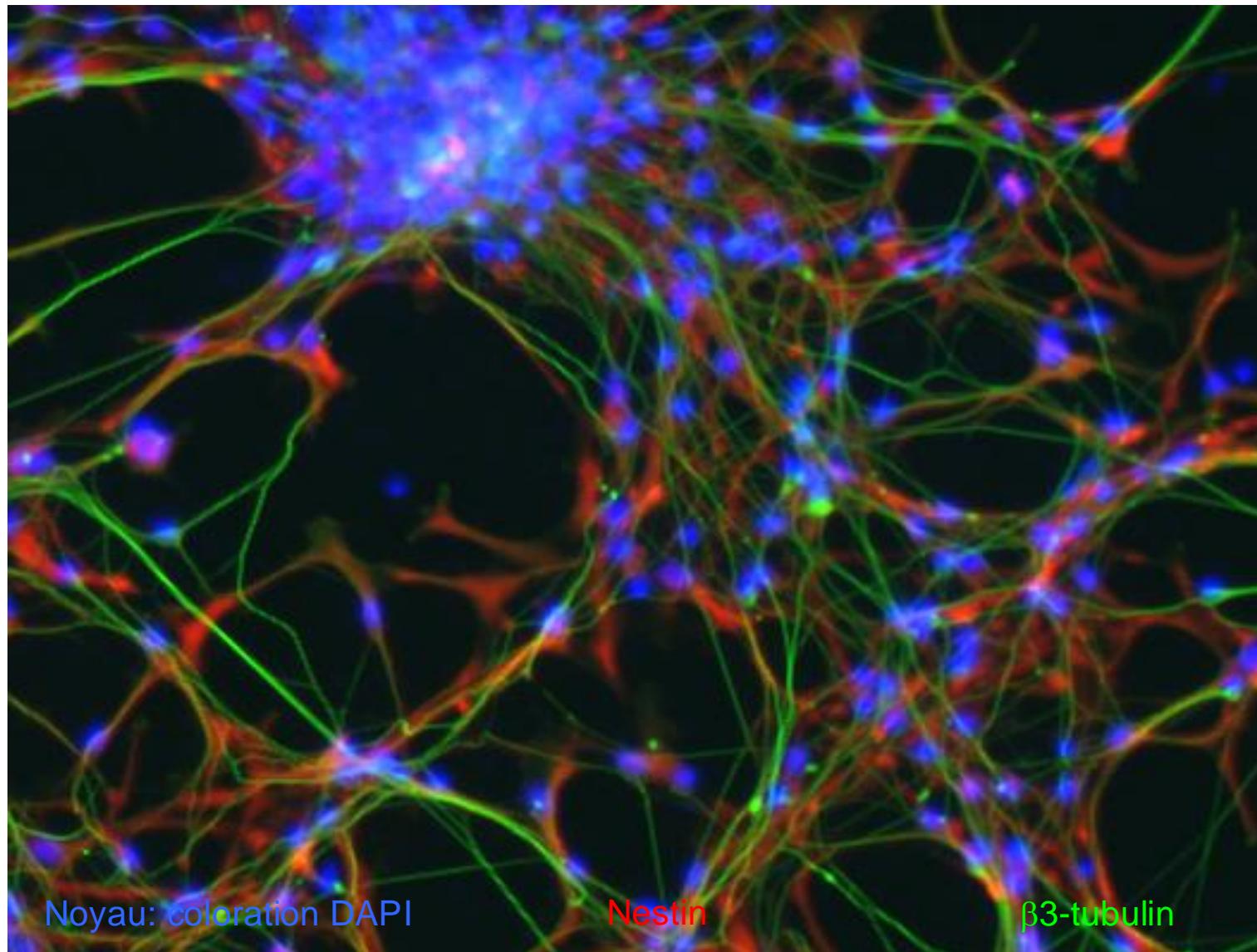
Structure chimique du DAPI



Modèle montrant une molécule de DAPI (rose) liée à l'ADN



Application: différenciation de CSE in vitro en neurones

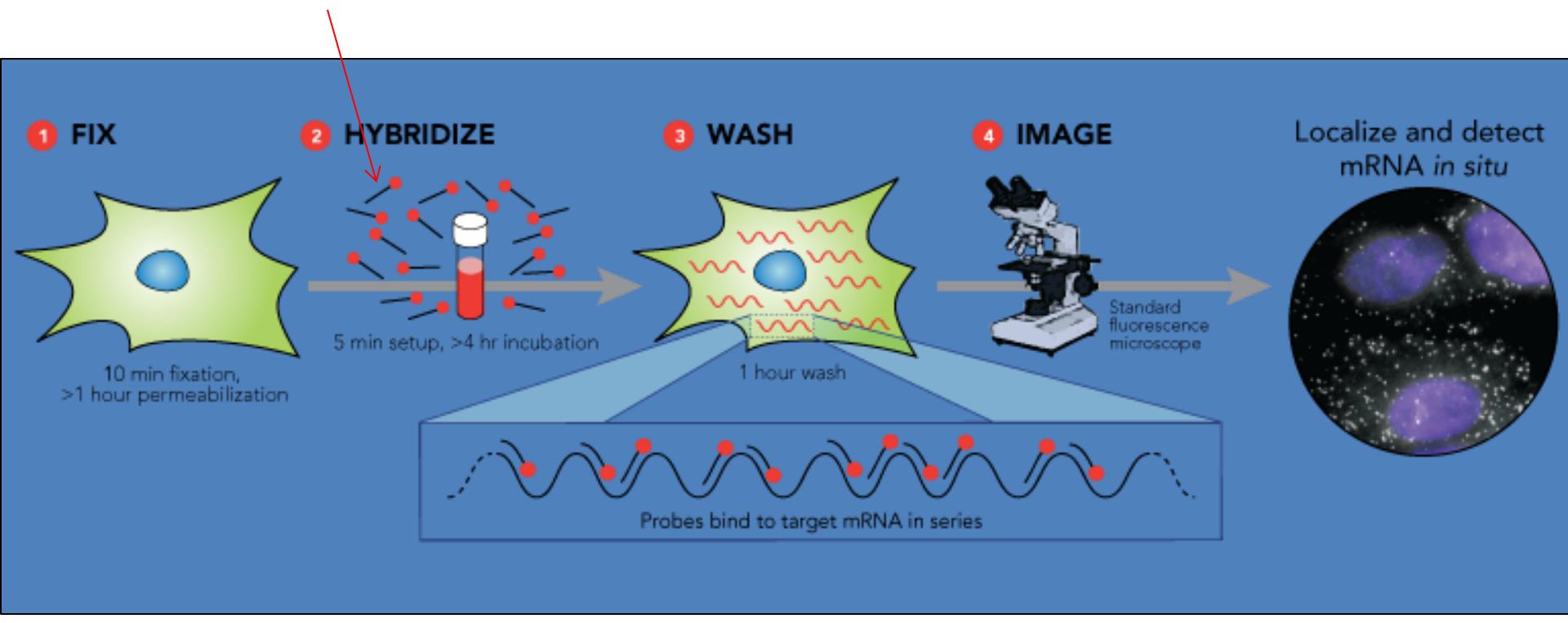


RNA Fluorescence in Situ Hybridization (RNA FISH)

Dans le RNA FISH, **plusieurs petites molécules d'ADN simple brin** complémentaires de la même molécule d'ARNm et marquées par des molécules fluorescentes (la **sonde**) sont hybridées (= liées par la complémentarité des bases) à leur ARNm cible

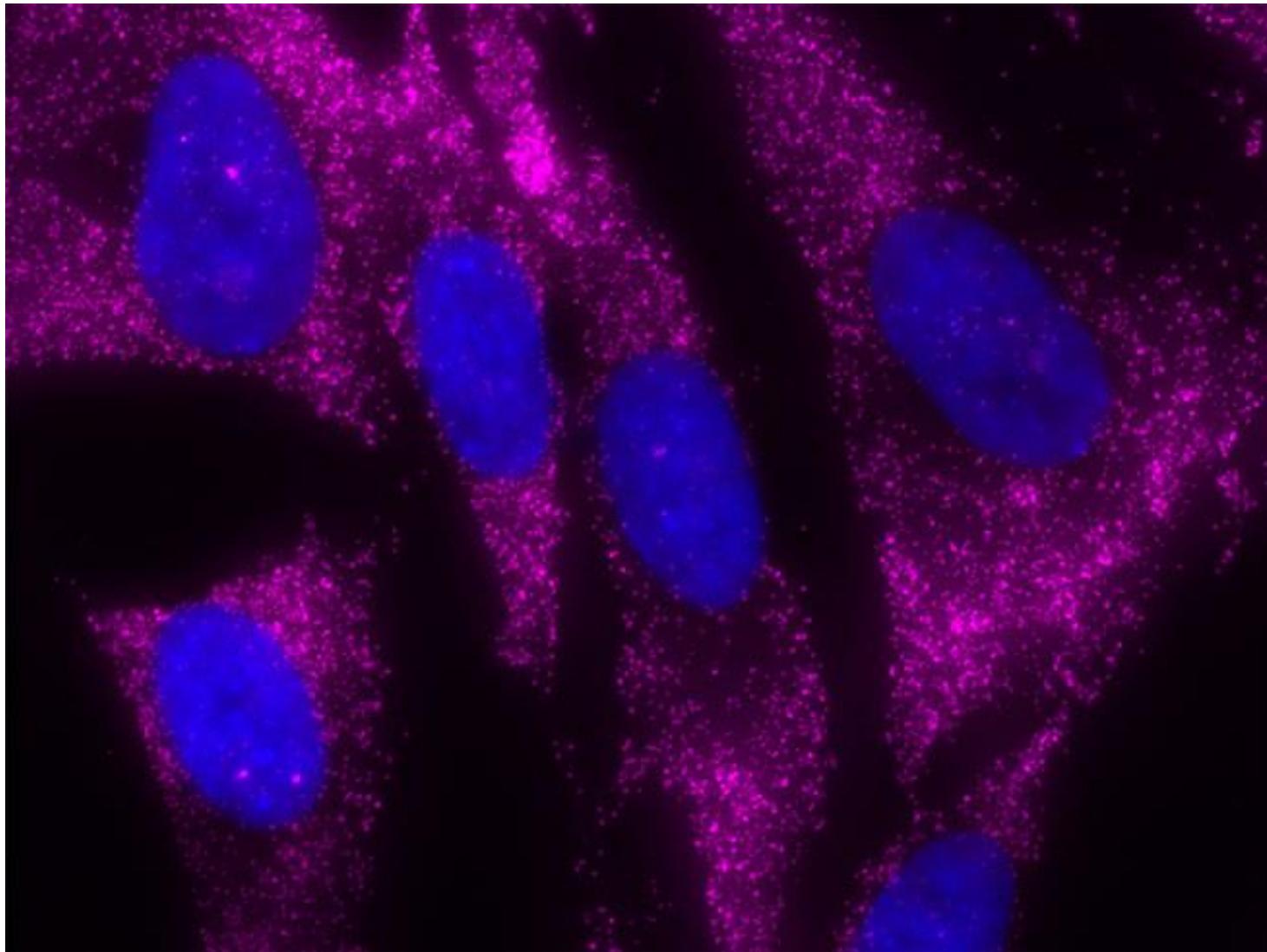
→ Permet de **localiser** et **compter** les molécules d'ARNm

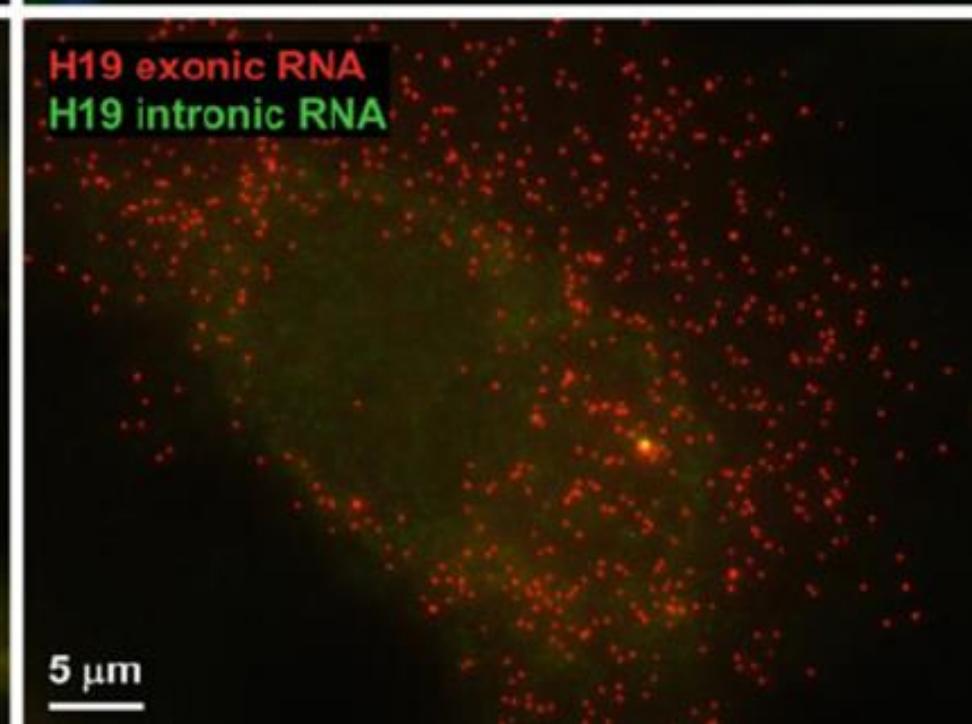
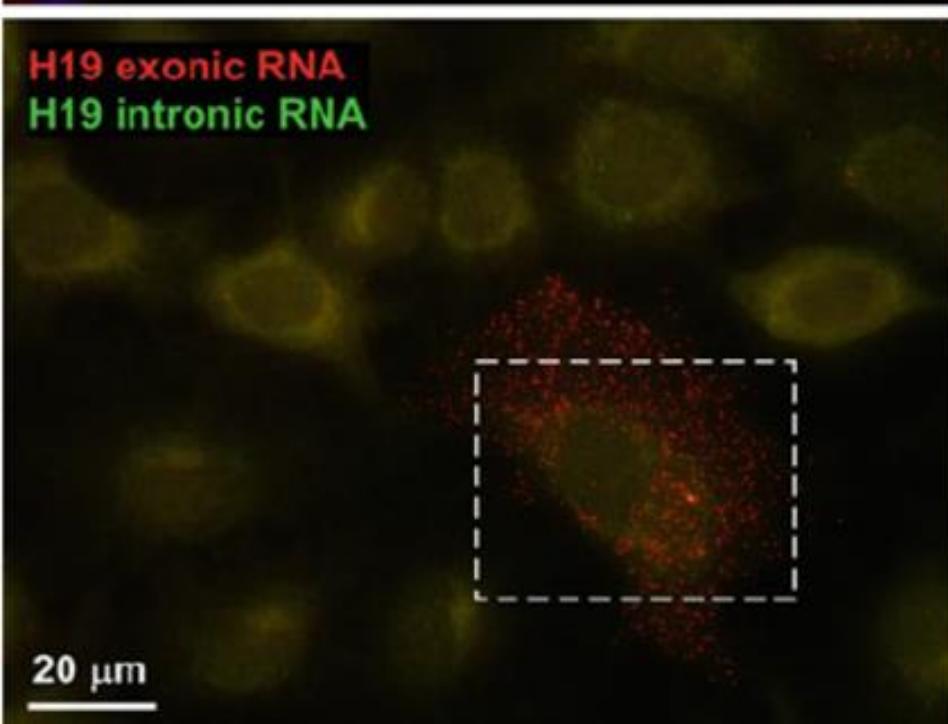
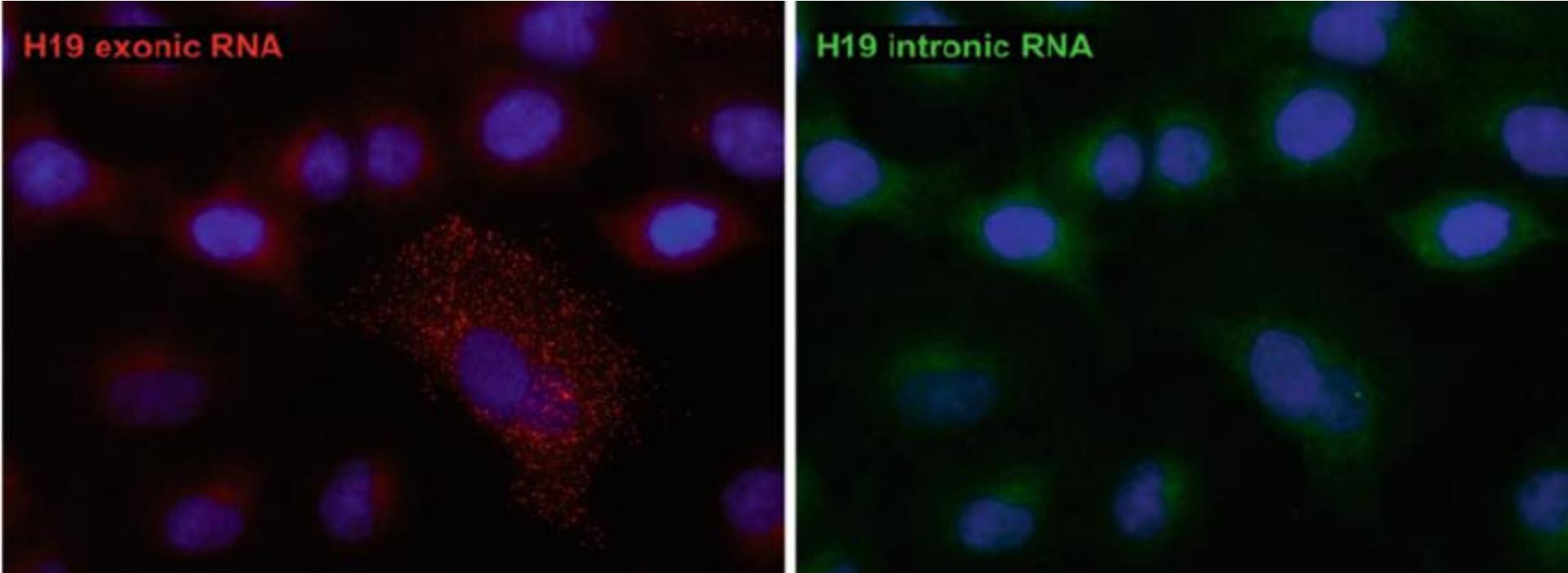
Sondes fluorescentes complémentaires à un ARNm donné



Chaque point représente **une seule molécule d'ARNm**

→ Permet de compter le nombre de molécules de chaque type d'ARNm

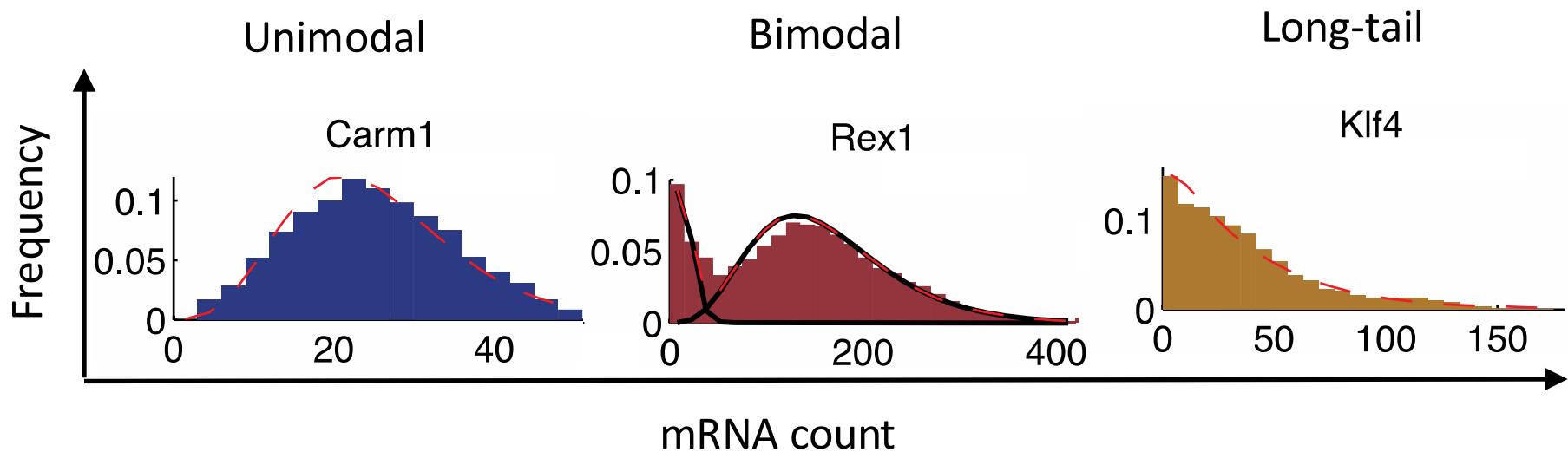




20 μ m

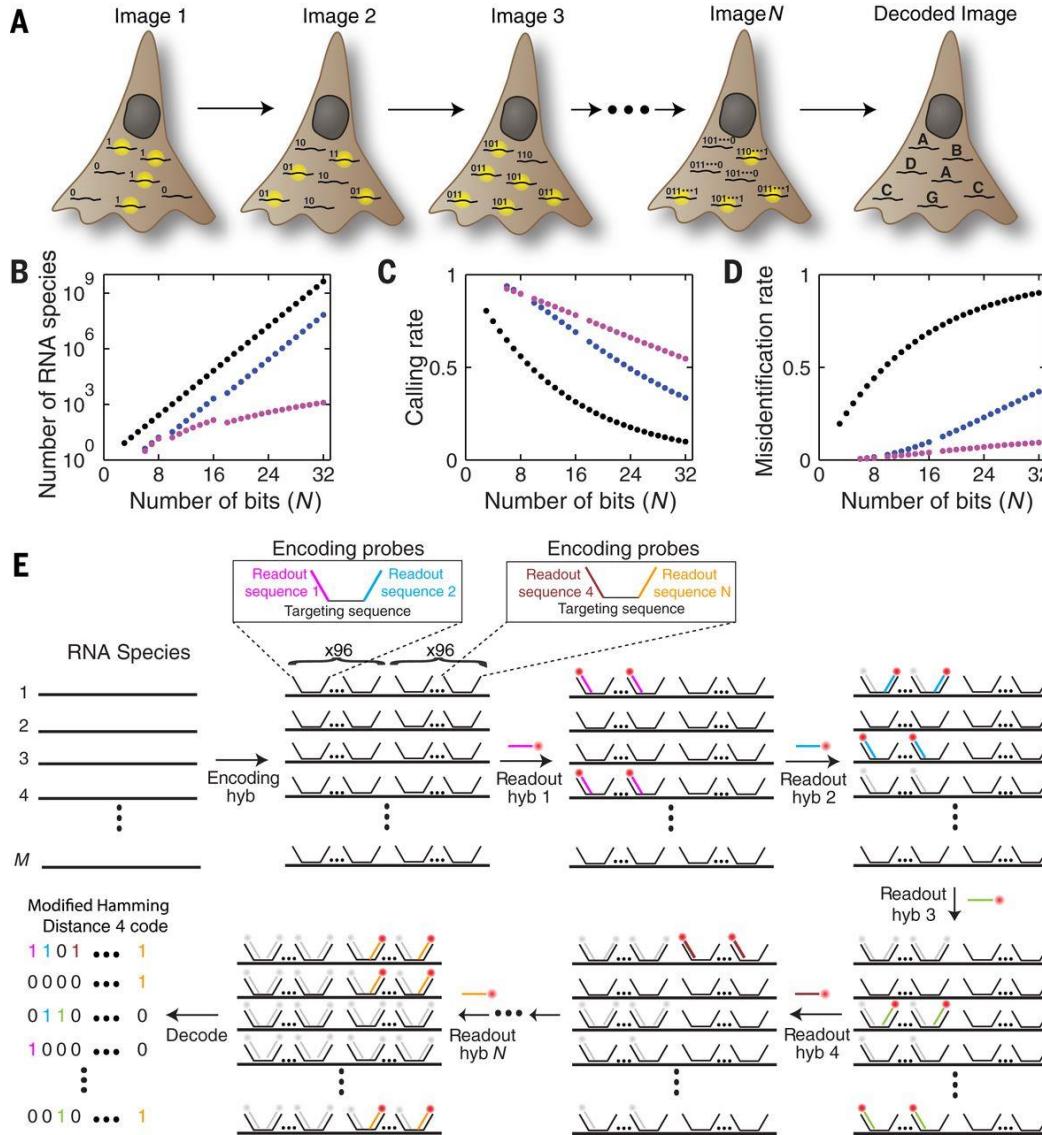
5 μ m

Distribution de molécules uniques d'ARNm obtenues par RNA FISH

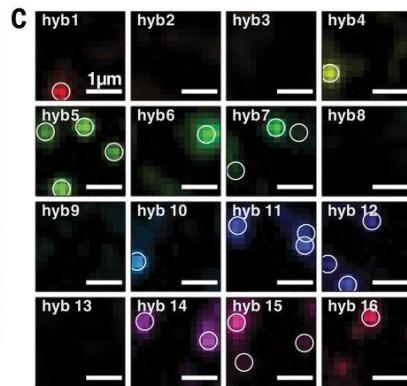
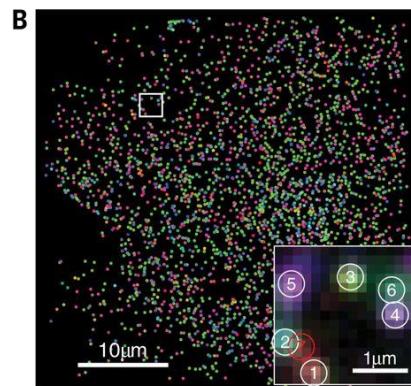
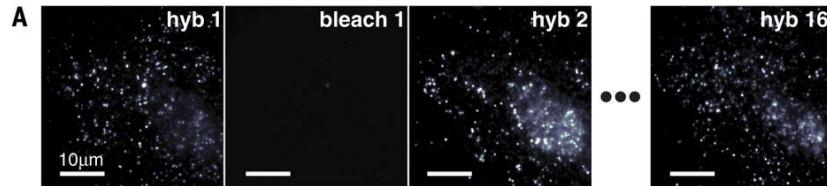


→ Donne des informations sur des sous-populations présentes dans la même culture de cellules

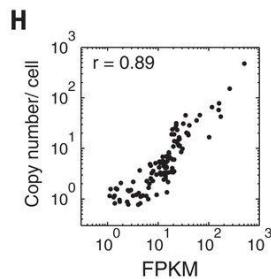
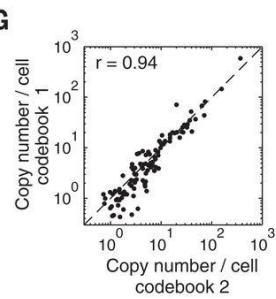
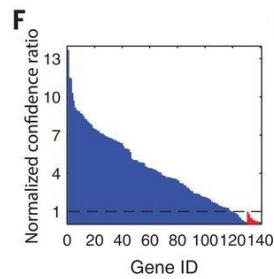
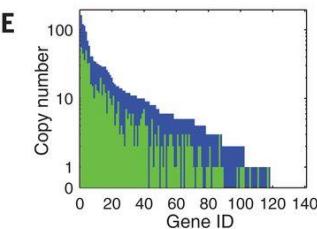
RNA FISH avec codes barres



RNA FISH avec codes barres

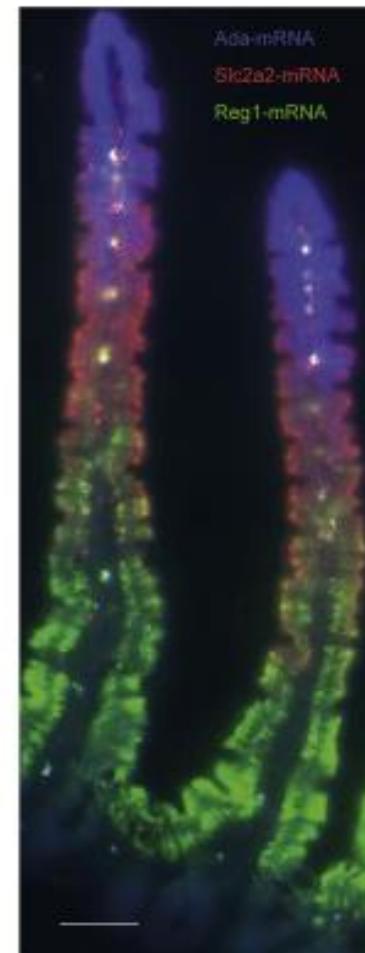


→ Visualisation of the whole transcriptome in each single cell



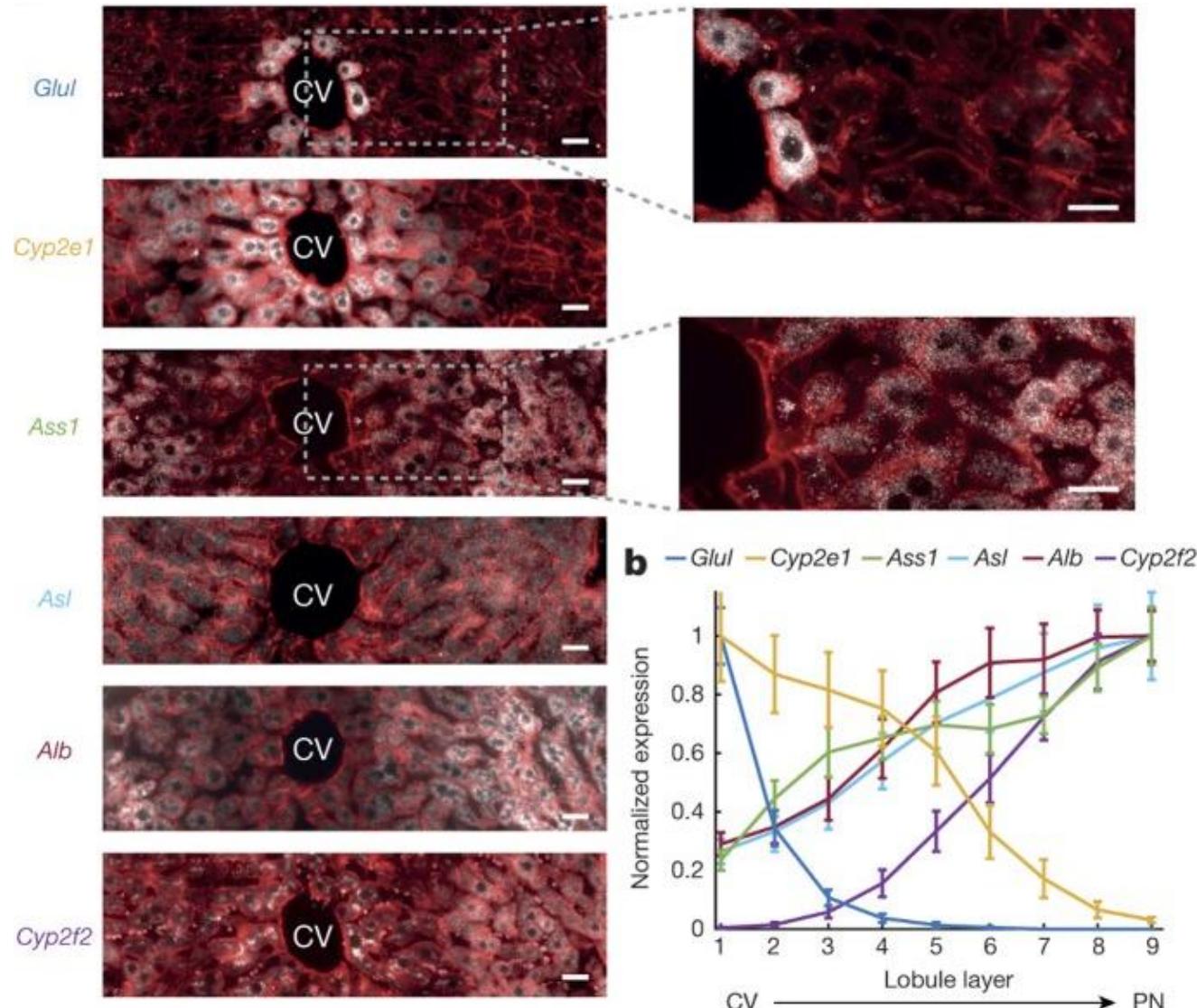
RNA FISH pour étudier la zonation de l'intestin

- Différents gènes sont exprimés dans différentes parties des villosités
- Transport de nutriments en haut
- Gènes de réponse à la flore microbienne en bas



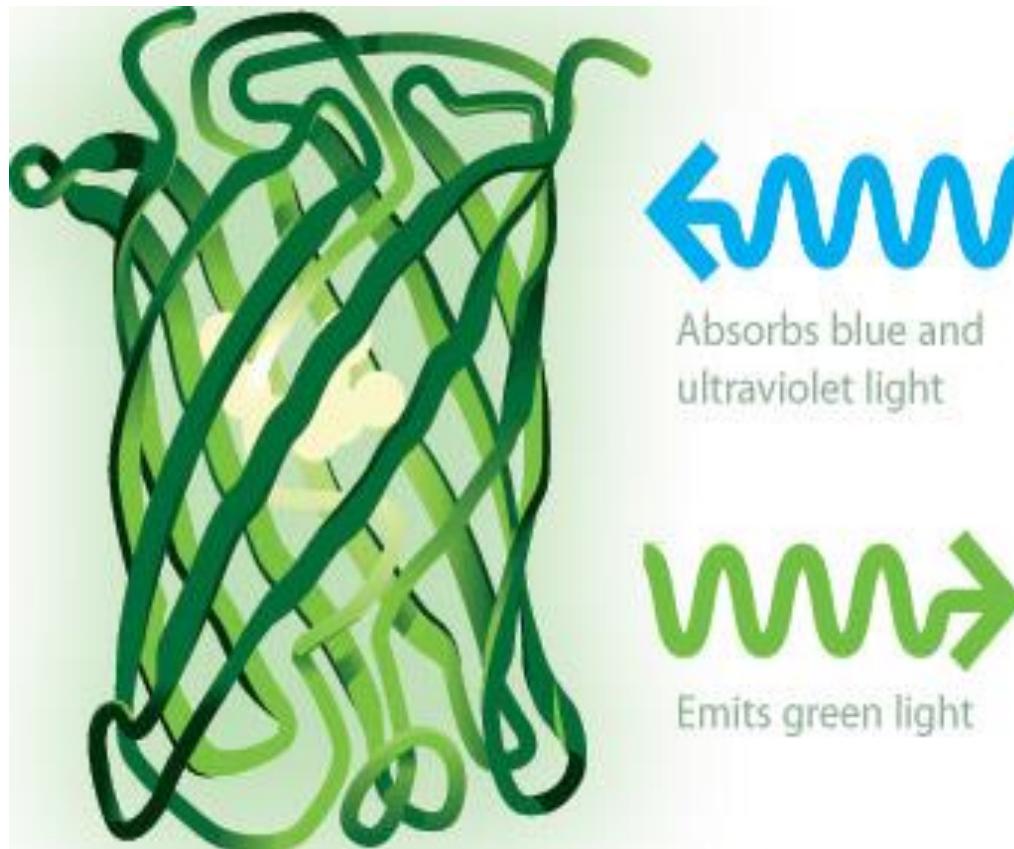
Moor et al., Cell 2018

RNA FISH pour étudier la zonation du foie



Comment marquer les cellules vivantes: protéines fluorescentes

GFP (Green Fluorescent Protein)



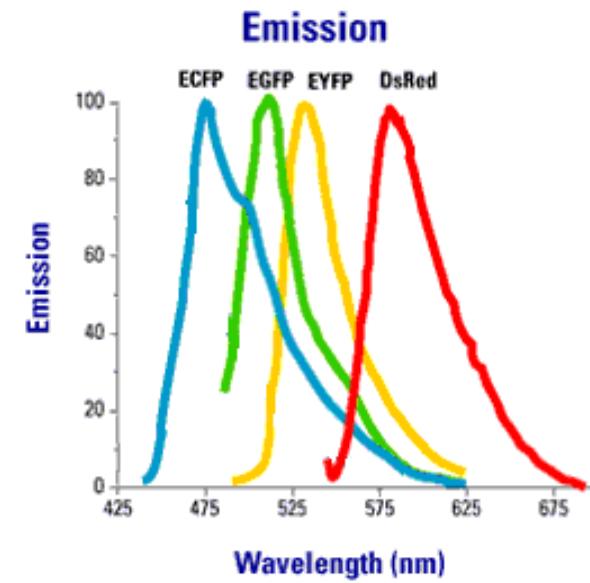
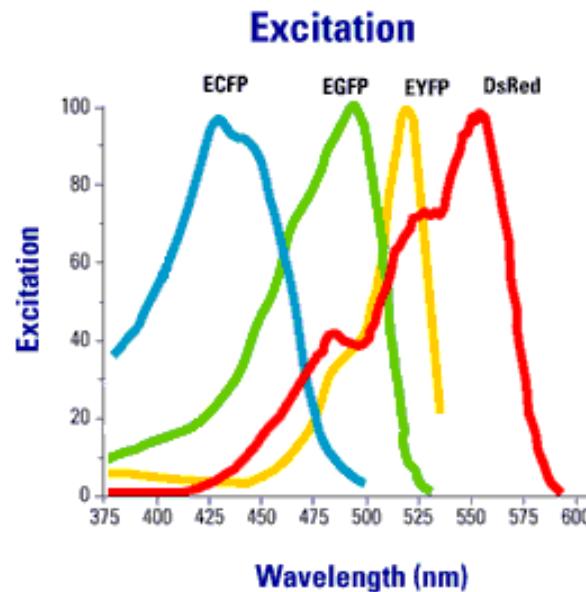
Des souris peuvent être conçues pour exprimer la GFP
→ Faible degré de toxicité



Une palette colorée grâce aux mutations du gène GFP



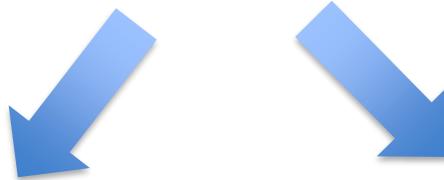
Différentes protéines fluorescentes ont des spectres d'excitation et d'émission différents



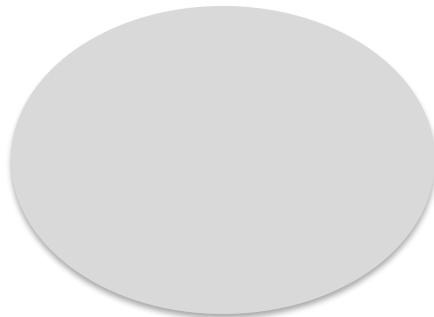
Utilisation de la GFP comme gène rapporteur spécifique à un type cellulaire

Promoteur actif dans les neurones

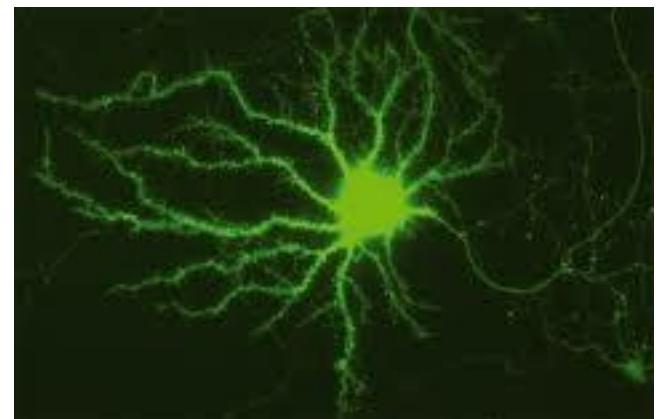
GFP



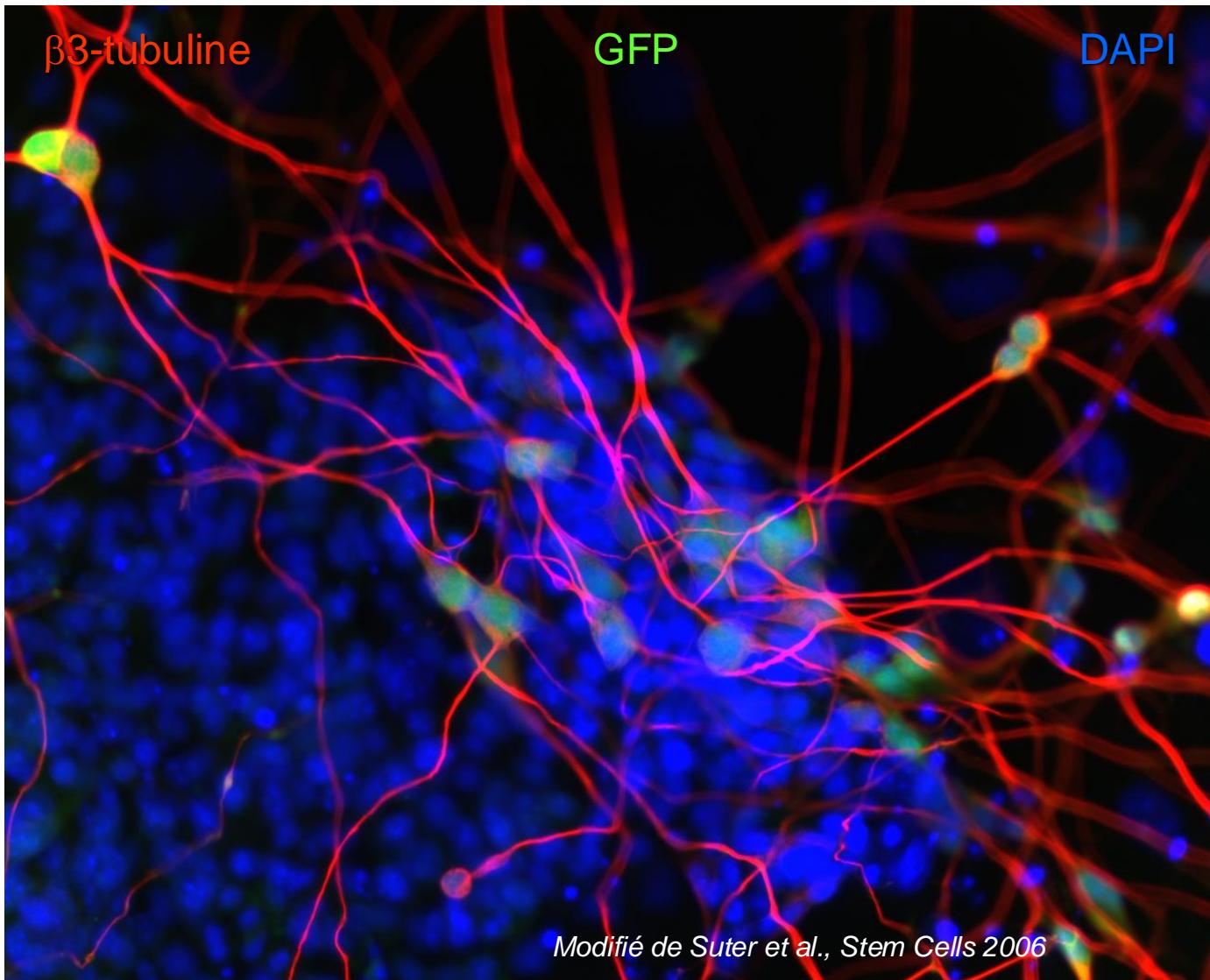
Cellule non neuronale: GFP non exprimée



Neurone: GFP exprimée

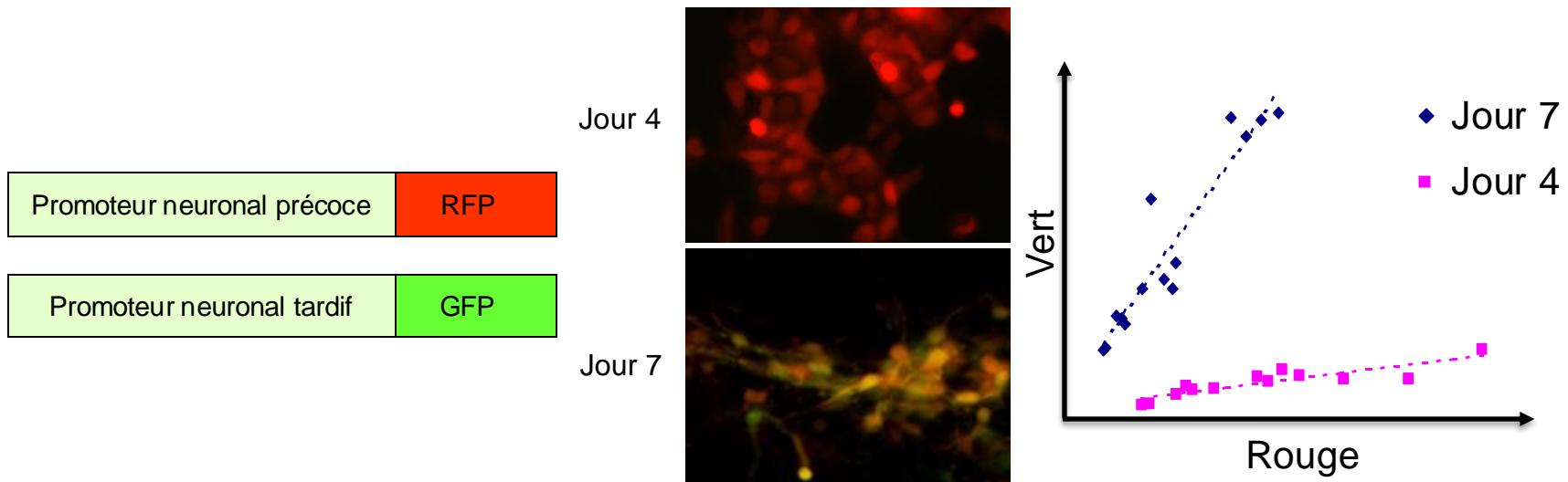


CSE avec un promoteur neuronal entraînant l'expression de la GFP et différencier en neurones



Suivi de la différenciation cellulaire au cours du temps

- Le promoteur actif dans un type de cellule spécifique permet de suivre la différenciation par imagerie en fluorescence
- Différenciation *in vitro* des CSE en neurones



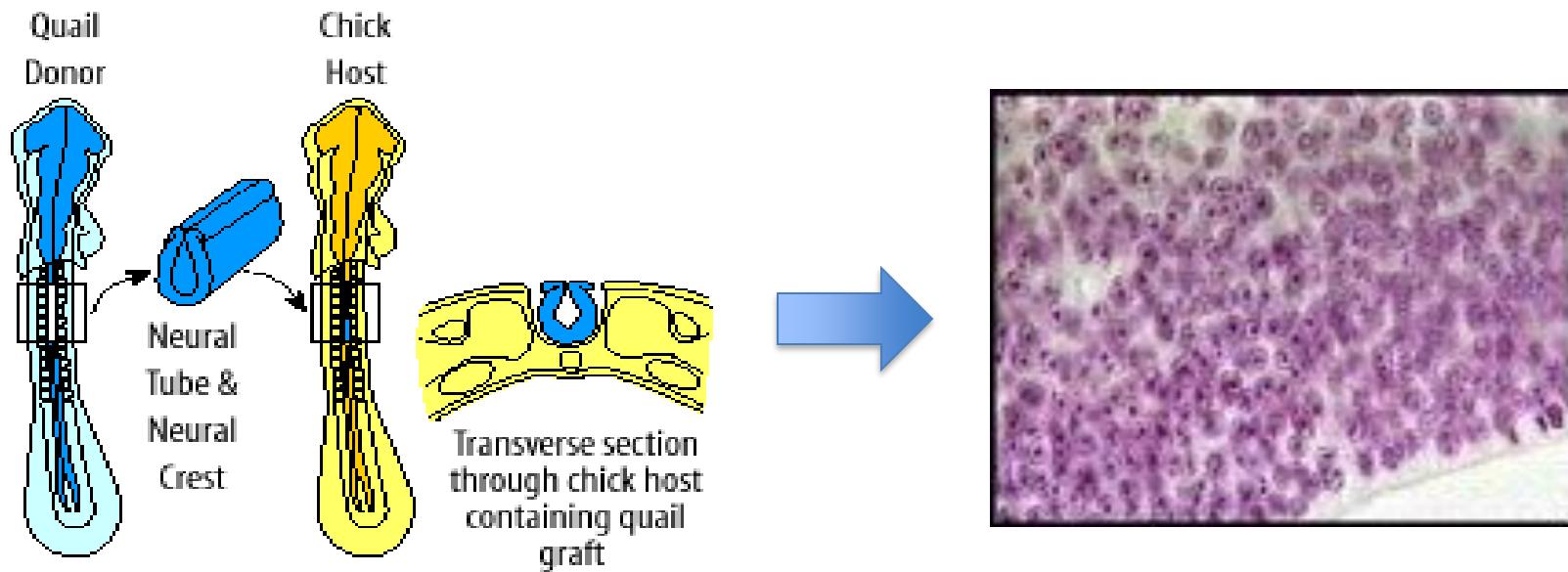
Modifié à partir de Suter et al., *Stem Cells* 2006

Fin de la 1^{ère} partie

Marquage in vivo des cellules souches



Suivi du sort des cellules après transplantation: expériences fondatrices de Nicole Le Douarin



Concept clé: les cellules de caille ont un nucléole proéminent qui sert de marqueur permanent

→ Peuvent être distinguées des cellules de poulet

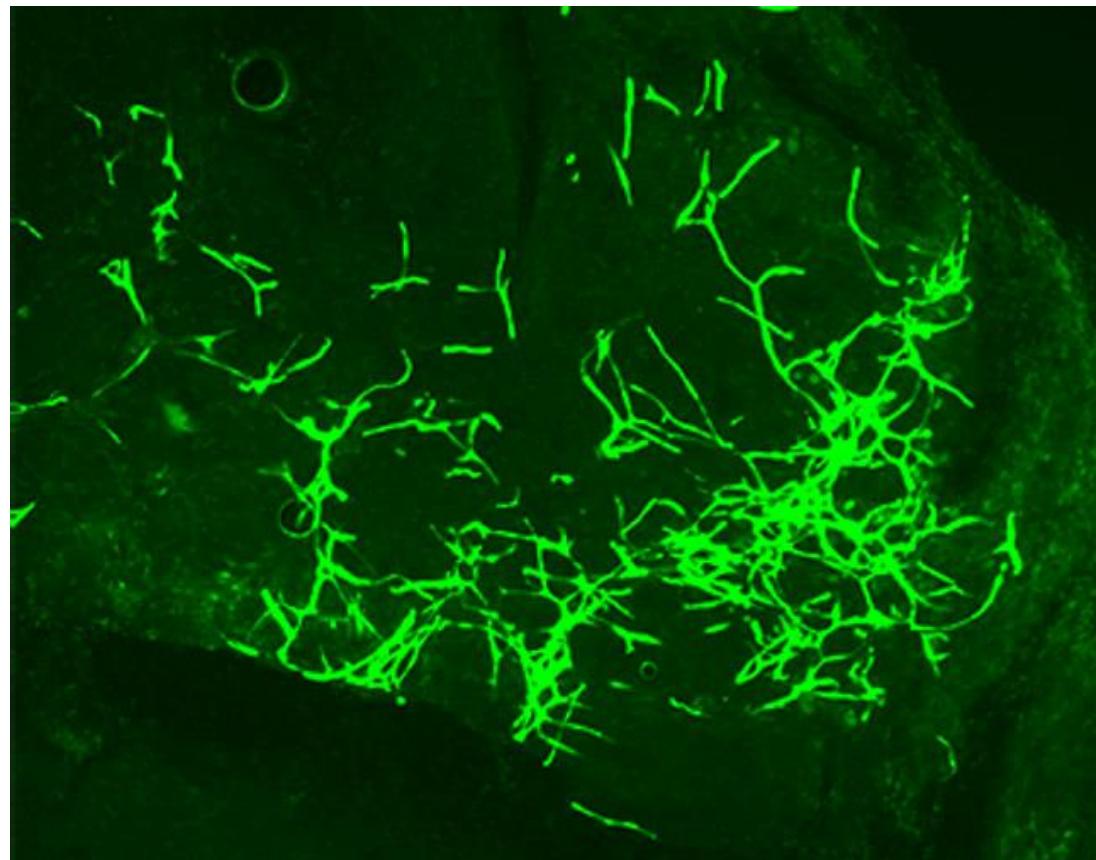
Expériences de transplantation

Des cellules particulières d'une souris GFP peuvent être isolées et transplantées dans une souris non-GFP

→ Cela permet de suivre le sort des cellules transplantées

Exemple: transplantation de cellules souches endothéliales vasculaires

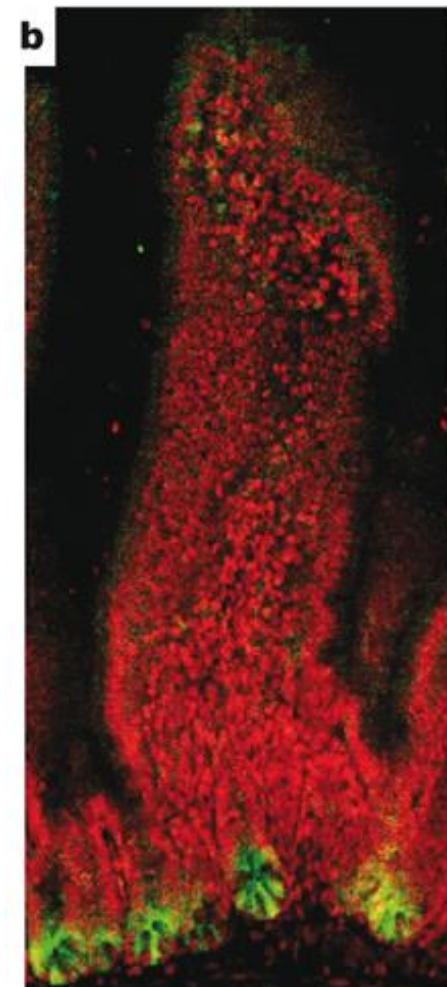
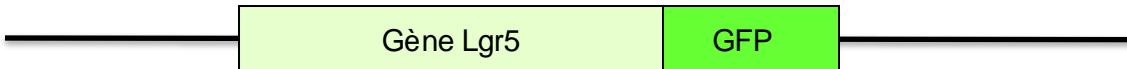
→ Les vaisseaux résultants peuvent être directement vus par fluorescence GFP chez la souris receveuse



Marquage *in vivo* des cellules souches

Les cellules souches intestinales peuvent être marquées *in vivo* en contrôlant l'expression de la GFP par un gène endogène qui est actif spécifiquement dans ces cellules

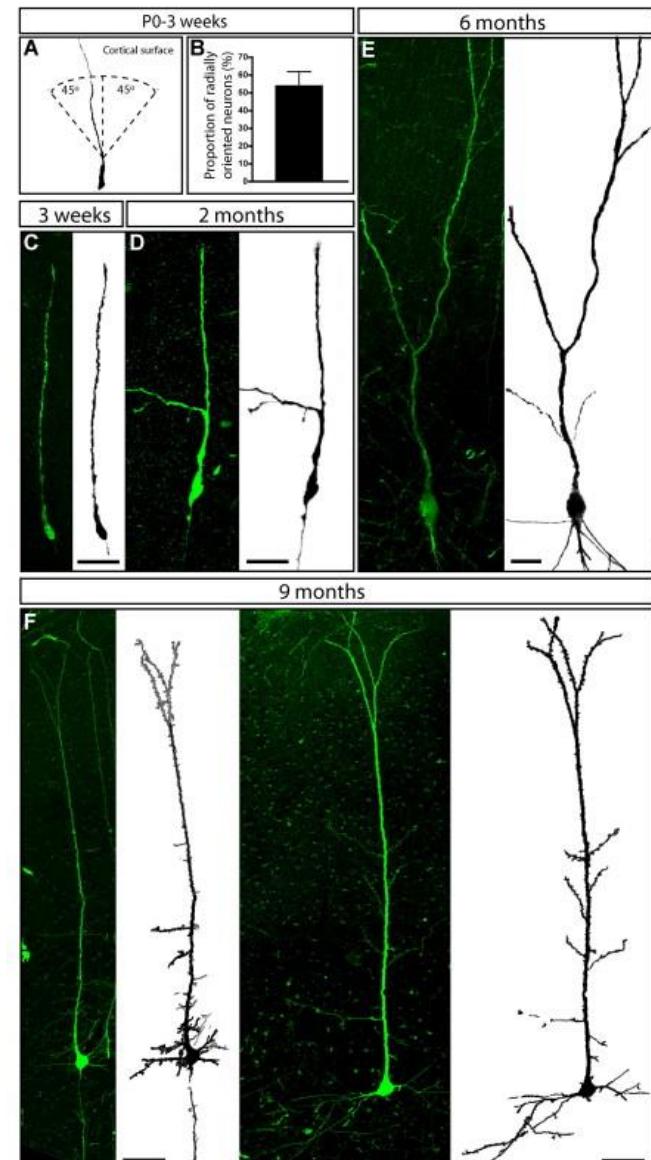
Génome de souris



Marquage *in vivo* de la descendance de cellules souches

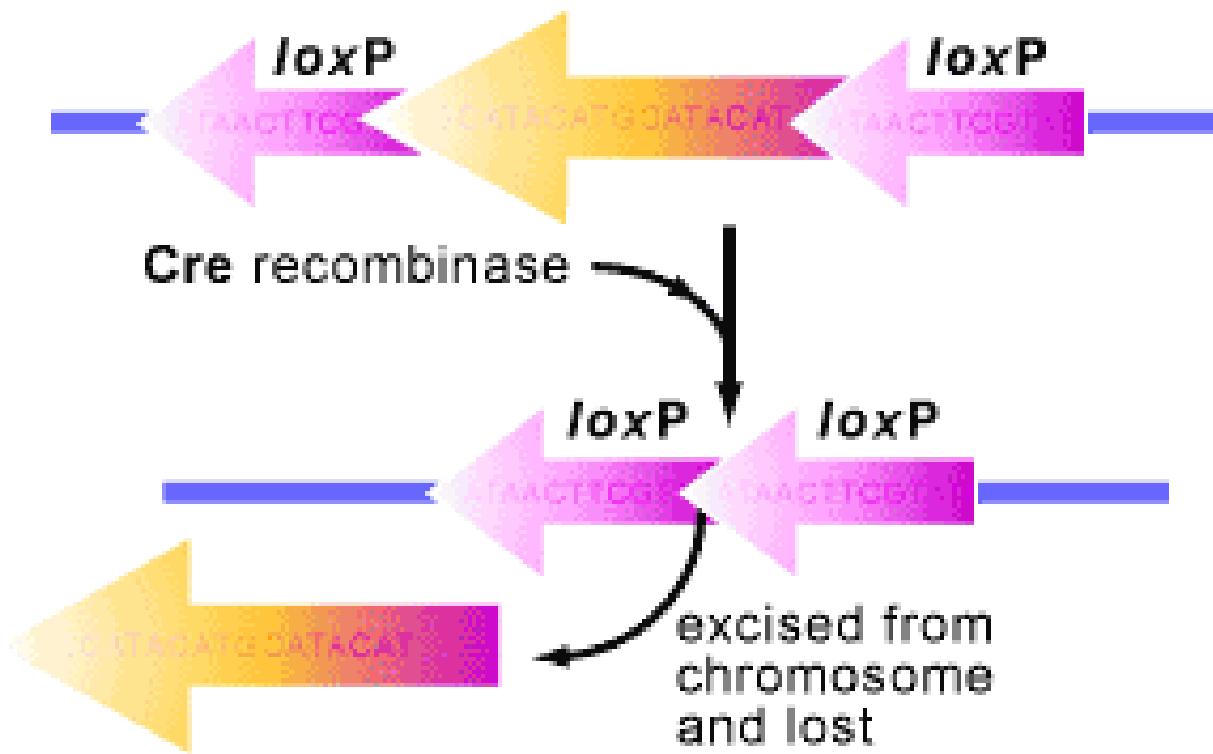
Des progéniteurs neuronaux humains dérivés de CSE humaines ont été injectés dans le cerveau de souris

→ Permet de les distinguer des neurones de souris



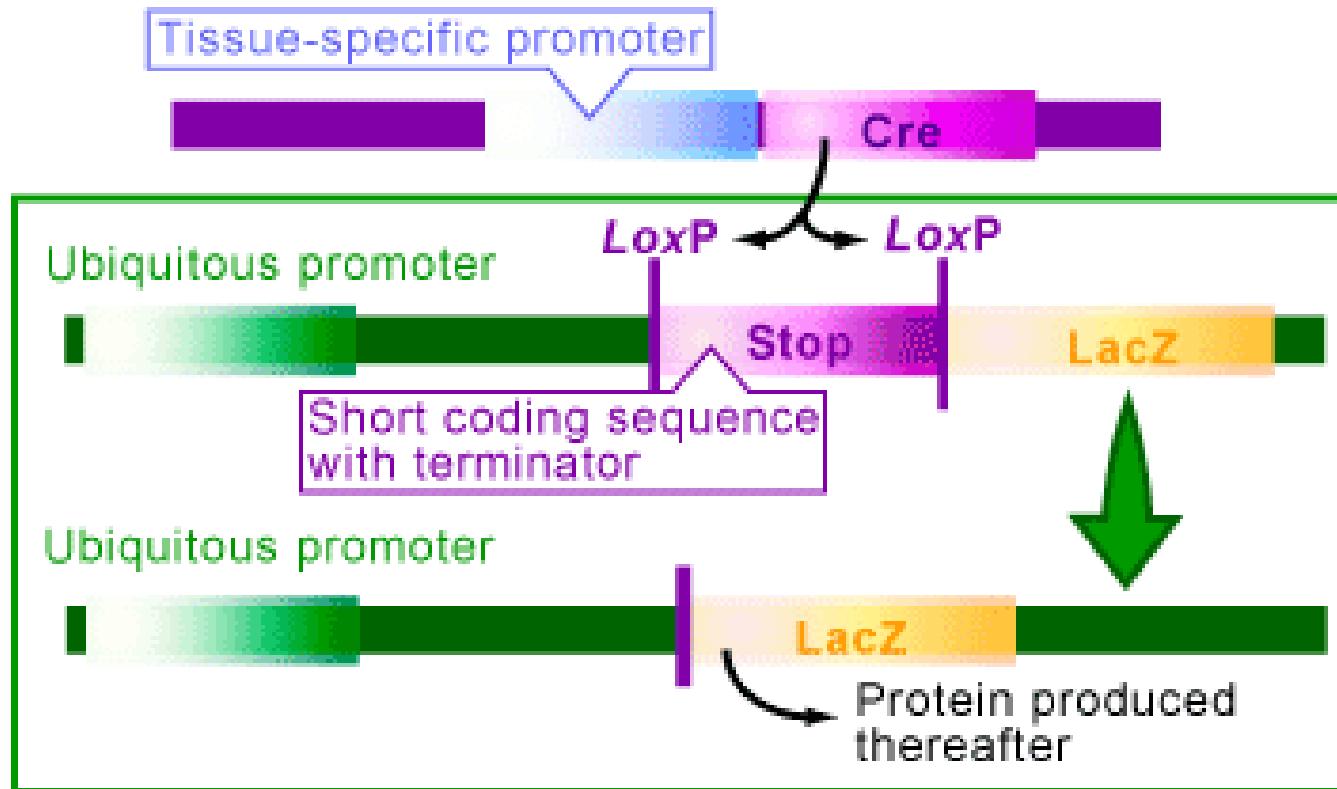
Traçage de lignées

Pouvons-nous également marquer de manière stable les cellules souches endogènes et suivre leur sort?

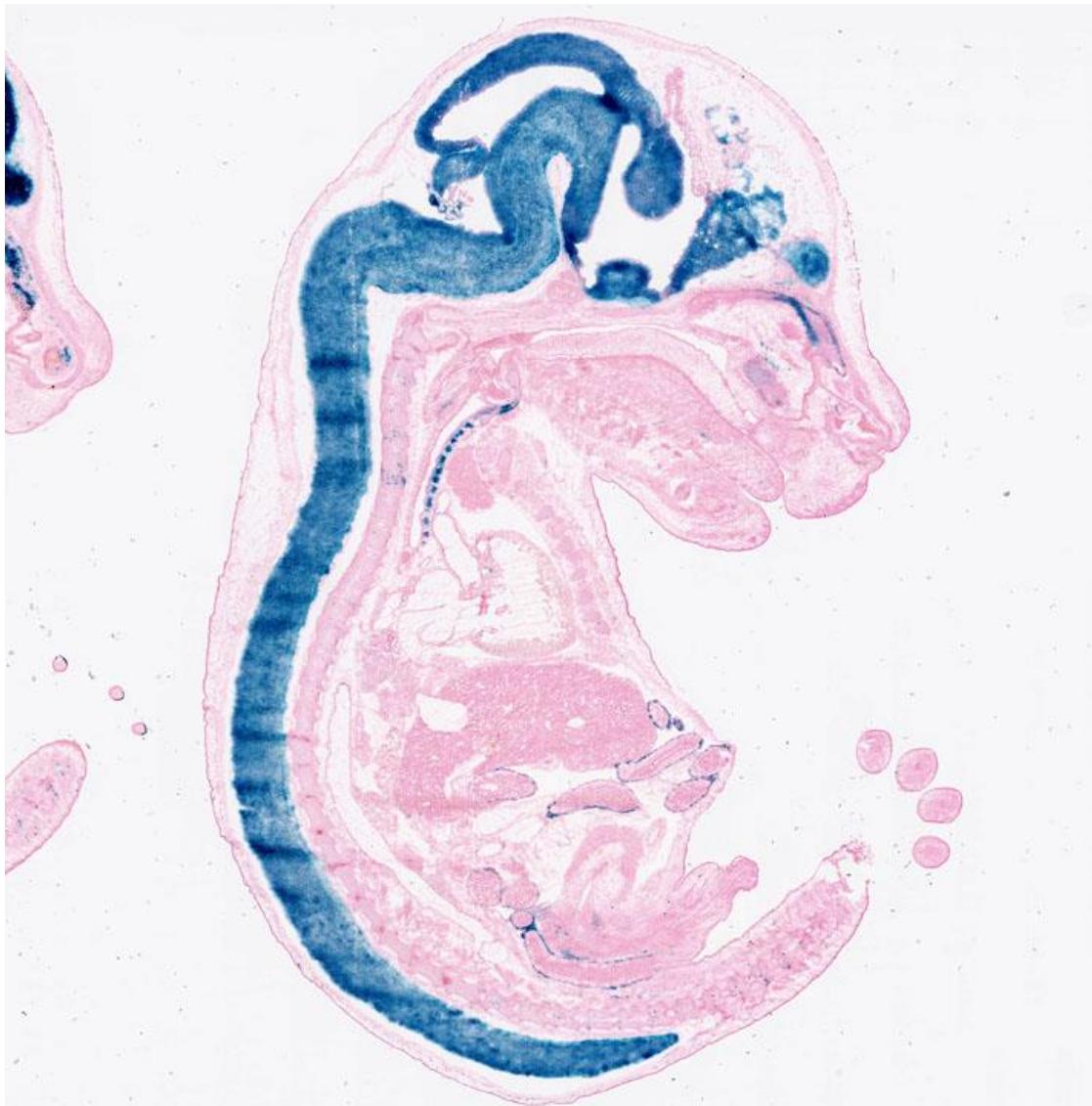


Traçage de lignées

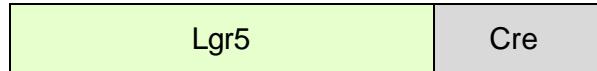
Pouvons-nous également marquer de manière stable les cellules souches endogènes et suivre leur sort?



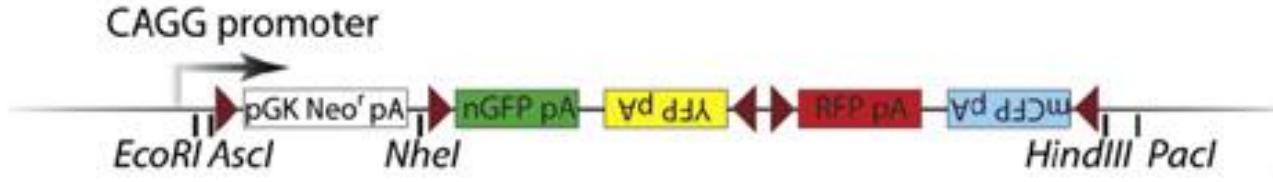
Nestin	Cre
Promoteur à activité ubiquitaire	LacZ



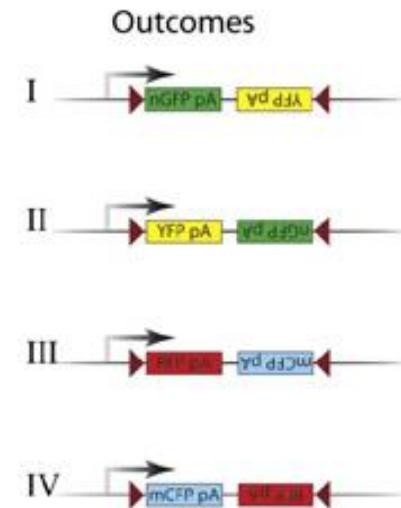
Traçage multicolore du destin des cellules souches: *confetti mouse*



Rosa26 locus in Mouse, Chr6

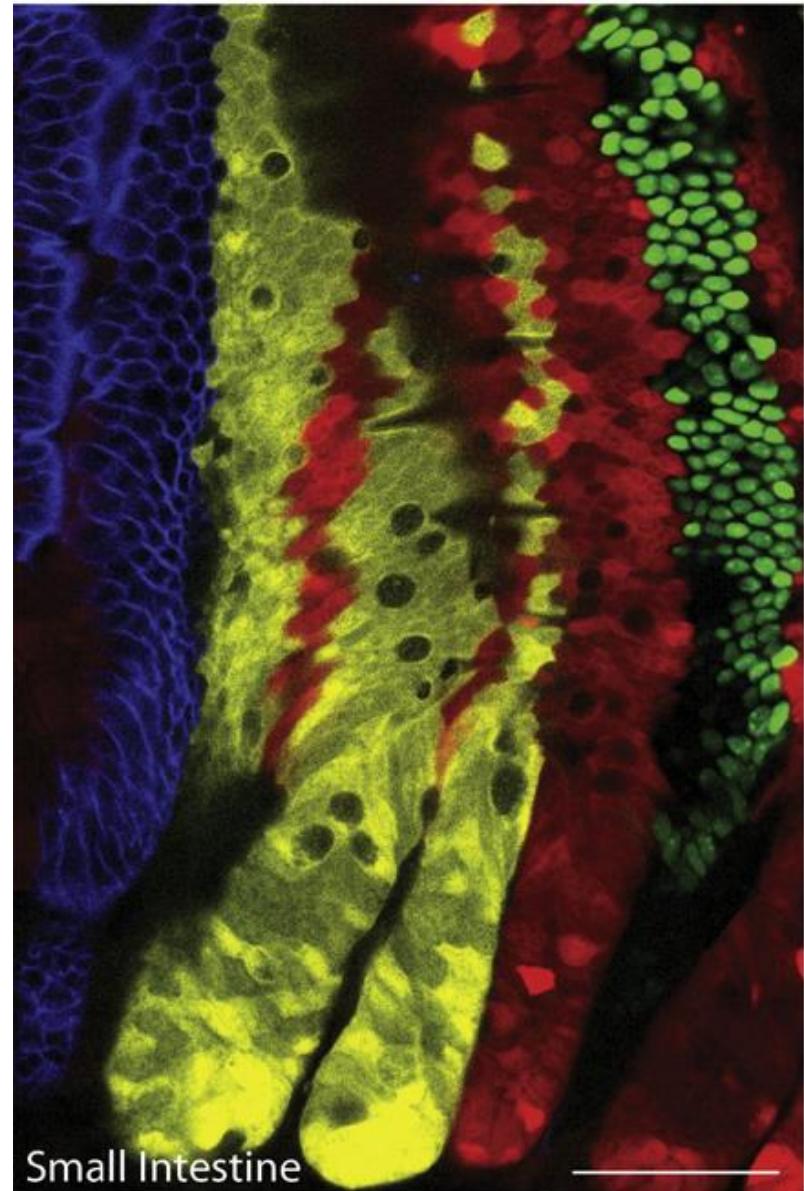


Cre recombination



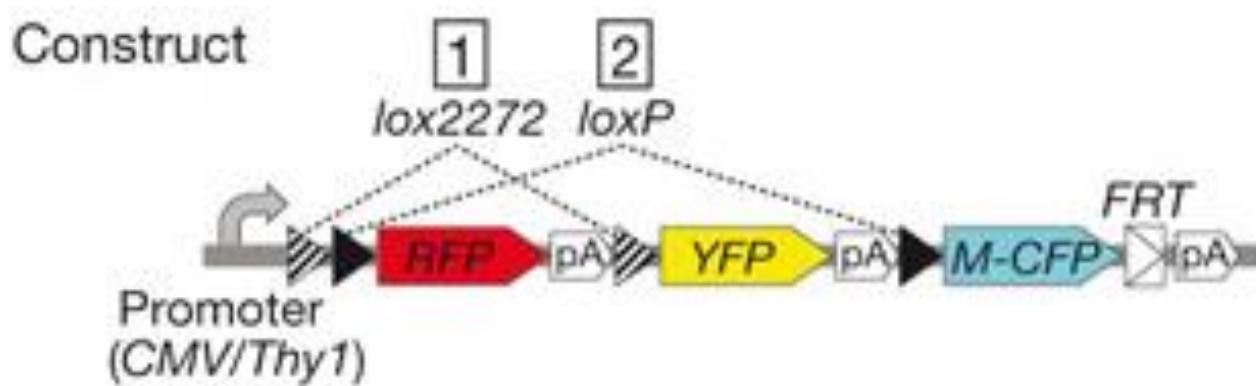
Traçage multicolore du destin des cellules souches: *confetti mouse*

→ La descendance de chaque cellule est marquée d'une couleur différente



Marquage de neurons individuels dans le cerveau: *brainbow mouse*

On a inséré une séquence d'ADN codant pour plusieurs protéines fluorescentes dans le génome d'une souris, sous le contrôle d'un promoteur actif uniquement dans le cerveau.

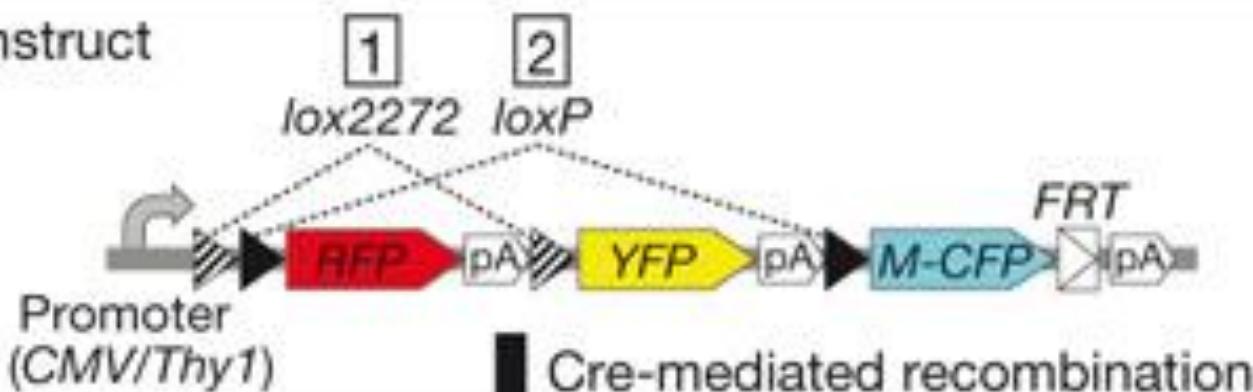


La Cre recombinase permute au hasard des parties de cette séquence de sorte qu'une seule des protéines fluorescentes soit exprimée

Brainbow mouse

a Brainbow-1.0

Construct



Outcomes



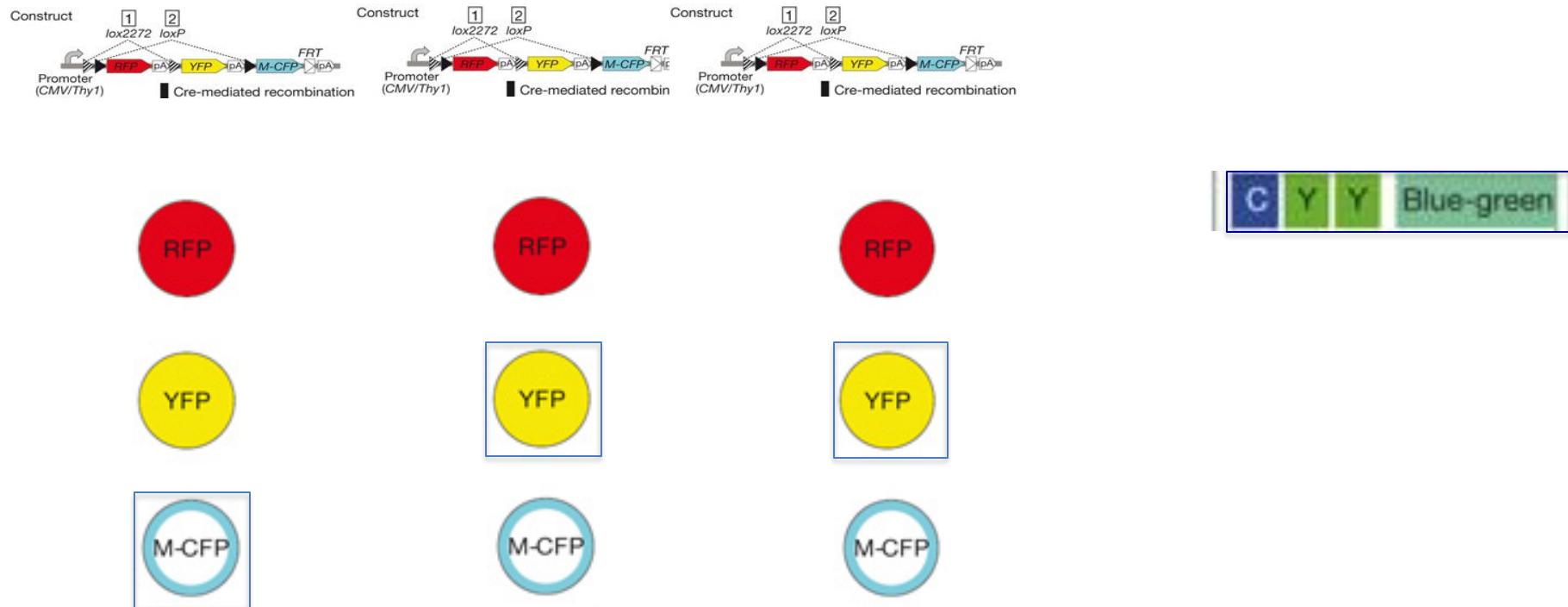
or



Chaque permutation entraîne l'expression d'une seule protéine fluorescente

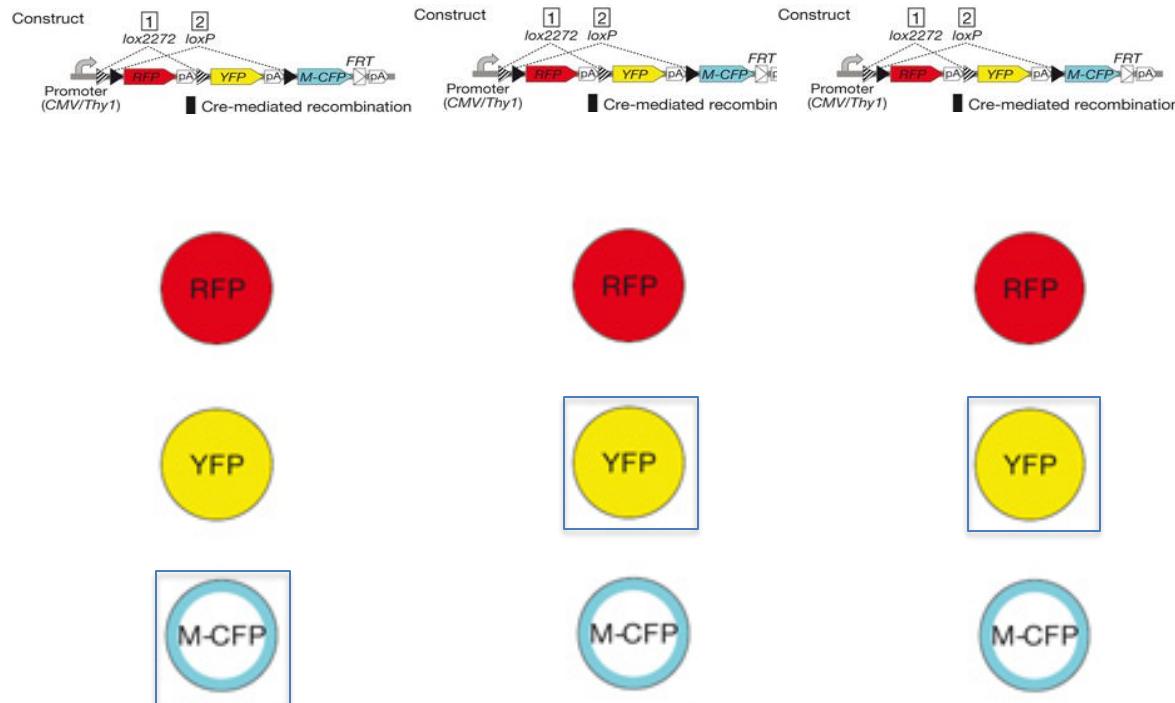
Brainbow mouse

Imaginons maintenant que cette séquence d'ADN soit présente en **3 exemplaires**:
→ **3 protéines fluorescentes différentes sont exprimées dans chaque cellule!**



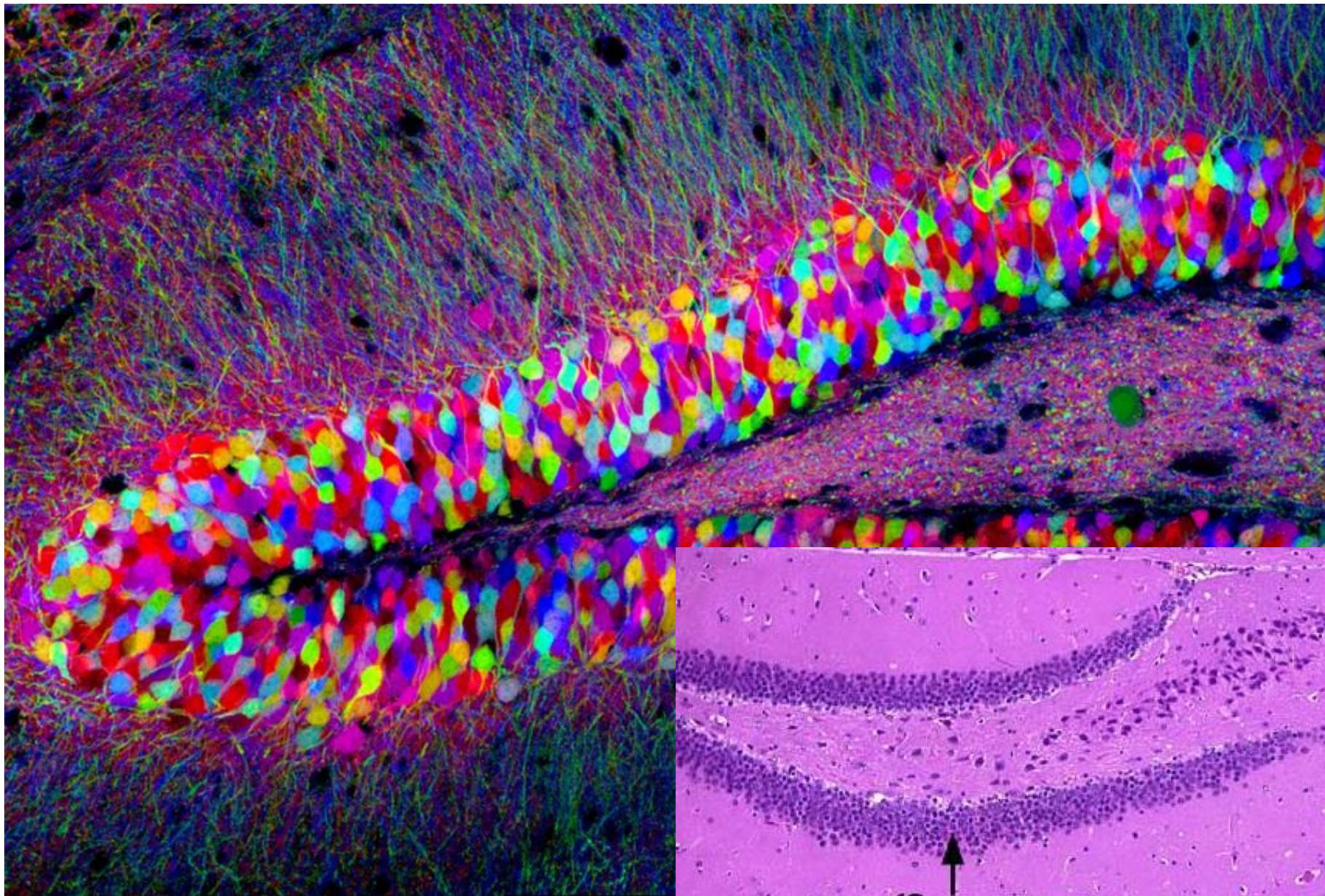
Brainbow mouse

Imaginons maintenant que cette séquence d'ADN soit présente en **3 exemplaires**:
→ **3 protéines fluorescentes différentes sont exprimées dans chaque cellule!**

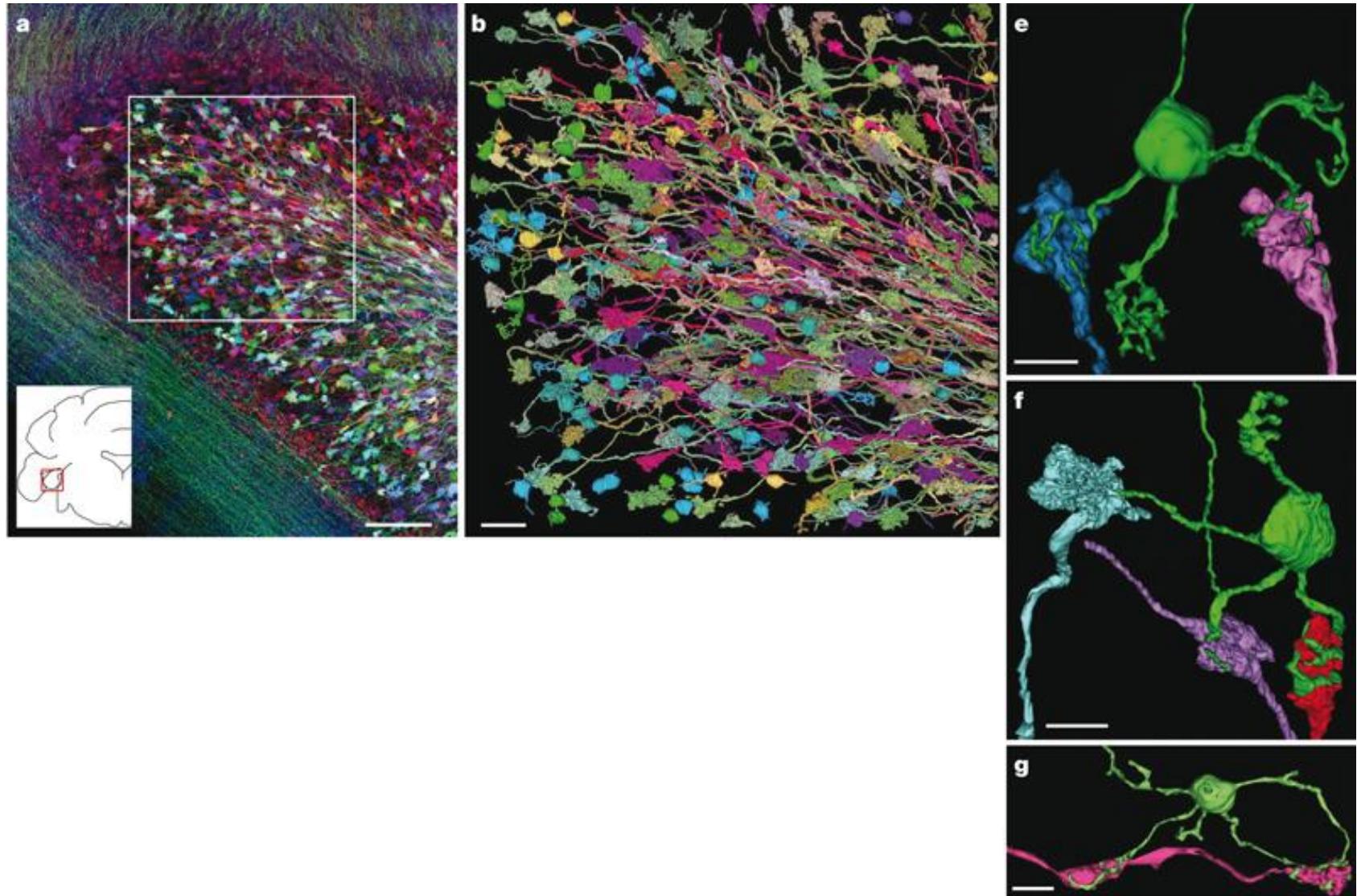


a XFP combinations			
Outcome for each copy		Resulting colour	
1	2	3	
C	C	C	Blue
C	C	Y	Light blue
C	Y	Y	Blue-green
Y	Y	Y	Green
Y	Y	R	Light green
Y	R	R	Orange
R	R	R	Red
R	R	C	Magenta
R	C	C	Purple
R	C	Y	Grey

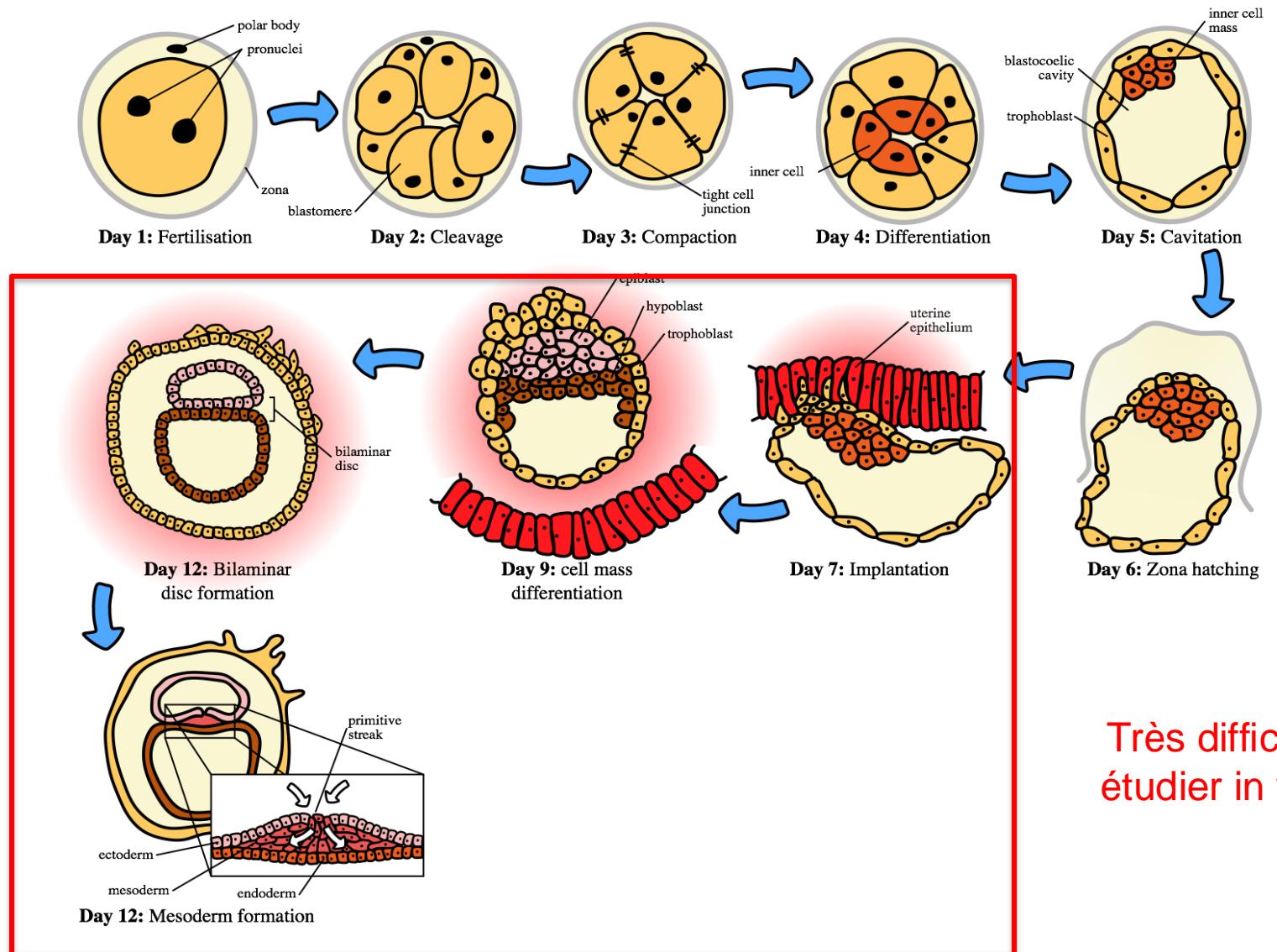
Neurones du gyrus denté (hippocampe)



Traçage 3D des neurones dans le cerveau et imagerie précise des contacts de cellule à cellule

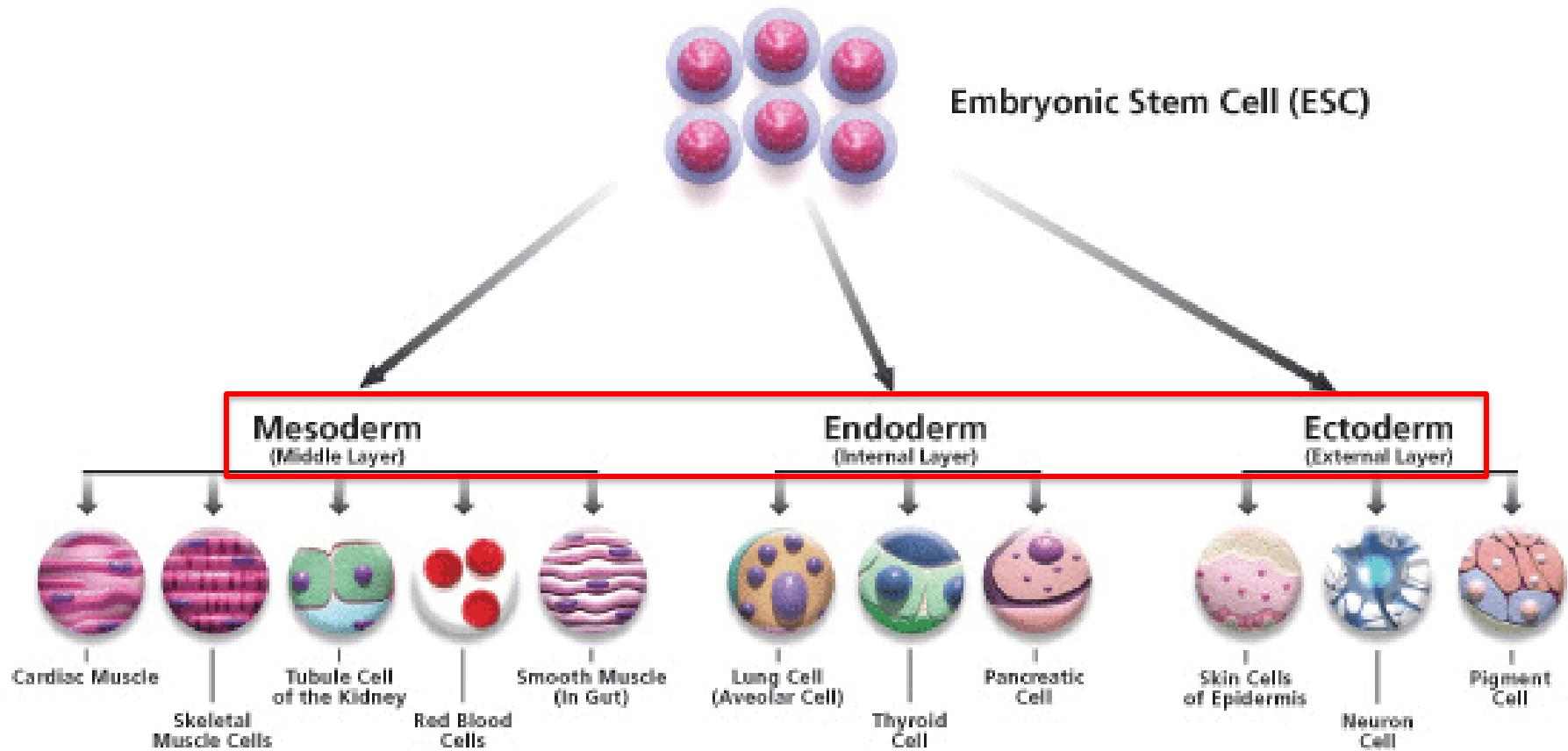


Comment étudier l'embryogenèse précoce?



Très difficile à étudier in vivo!

Les CSE comme outil pour étudier l'embryogenèse



Durée de l'embryogenèse...



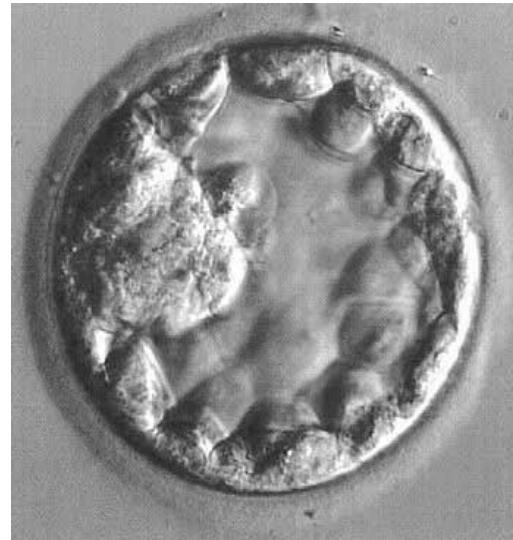
3 semaines



40 semaines

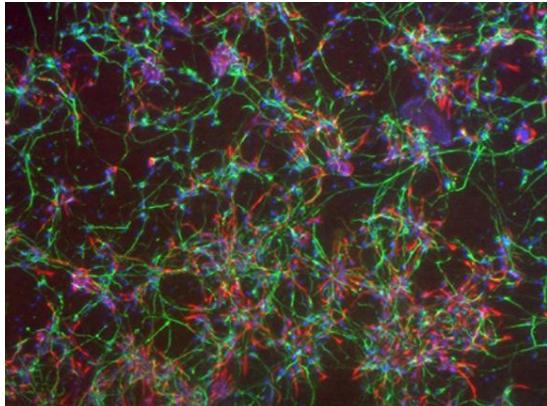


... Est parallèle au timing de différenciation des CSE



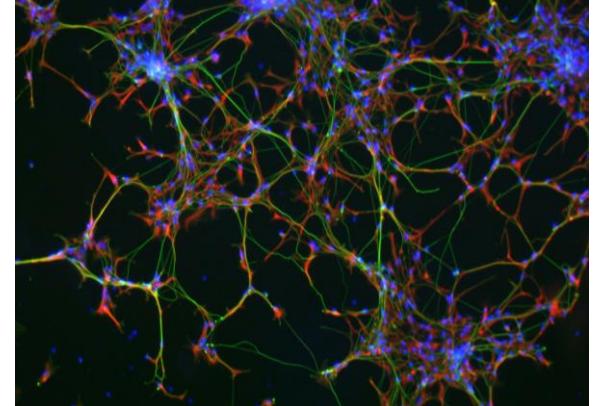
5 jours
↓

Neurones dérivés de CSE de souris



↓
3 semaines

Neurones dérivés de CSE humaines

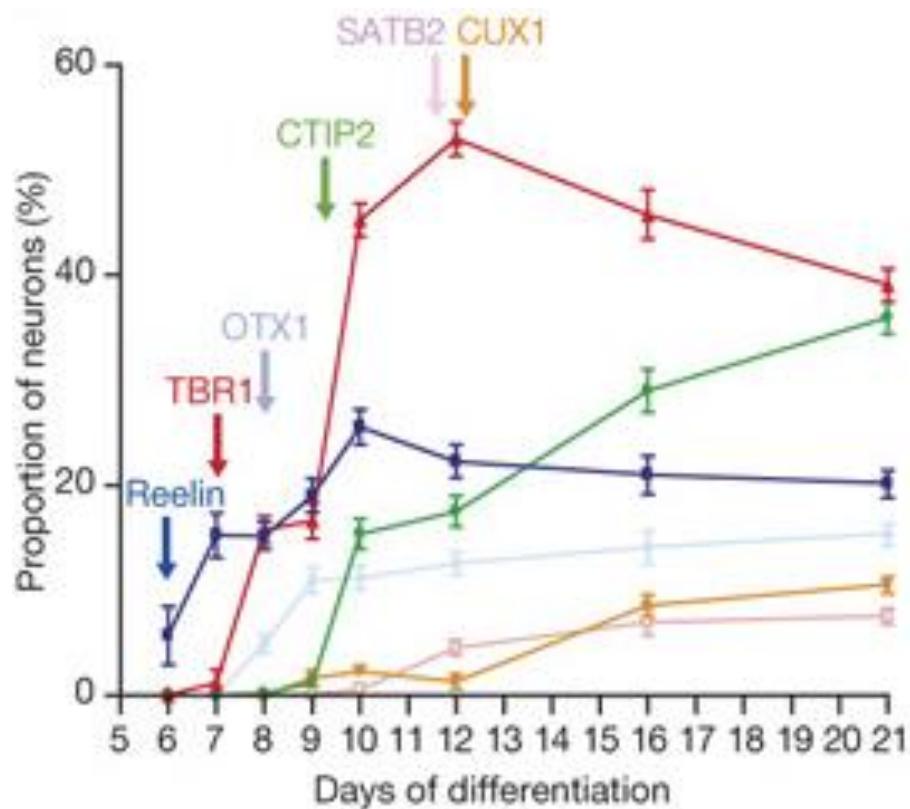


La différenciation *in vitro* des CSE récapitule la différenciation *in vivo*

Cortex de souris

Layers	Markers	Birthdate
Cajal-Retzius neurons	Reelin, calretinin, p73, TBR1	E10.5–11.5
Upper layers	SATB2, CUX1	E13.5–16.5
Deep layers	CTIP2, SOX5, OTX1, ER81, TBR1, TLE4, FOXP2	E11.5–14.5
Subplate	TBR1, calretinin, reelin	E10.5–13.5

Neurones dérivés de cellules ES de souris

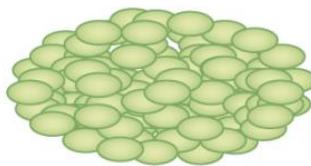


Utiliser des cellules souches pluripotentes pour modéliser les maladies

Steps of disease modeling

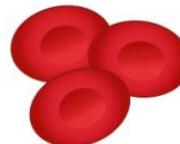
I. Design and verify

Patient-specific induced pluripotent stem (iPS) cells



Differentiation protocol

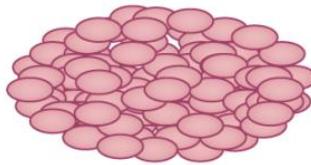
Target cell type



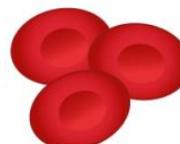
Induce disease-relevant phenotype



Patient-specific iPS cells with genetic correction



Differentiation protocol



Induce disease-relevant phenotype

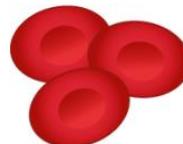


II. Employ

Study mechanisms of disease phenotype

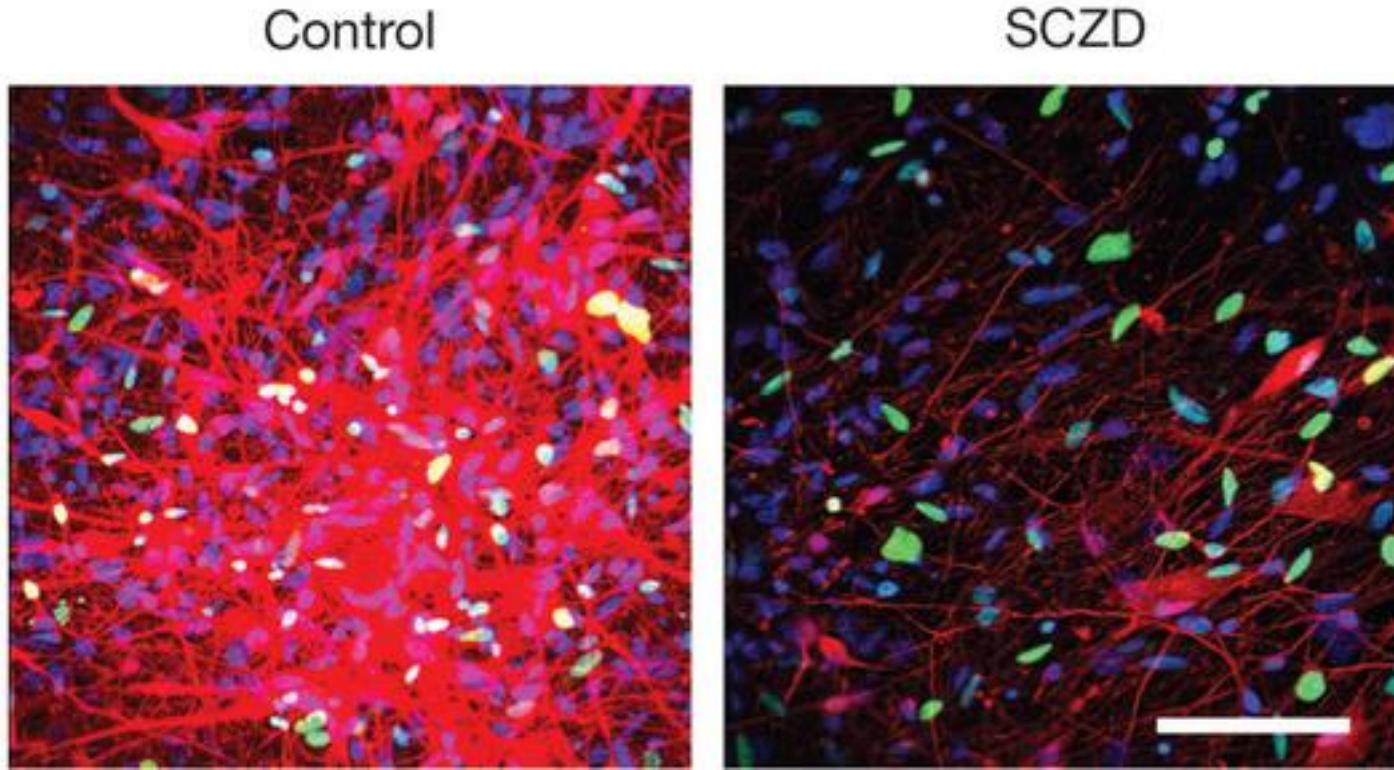


High-throughput drug screens to reduce disease phenotype



Étude de la fonction neuronale de patients schizophrènes

LV-SYNP-HTG
Rabies-EnvAΔG-RFP



Problèmes avec les cellules dérivées du patient

- Les patients diffèrent les uns des autres non seulement par leur maladie mais aussi à des millions d'autres positions du génome
- Chaque lignée cellulaire iPS du **même** patient se comporte différemment

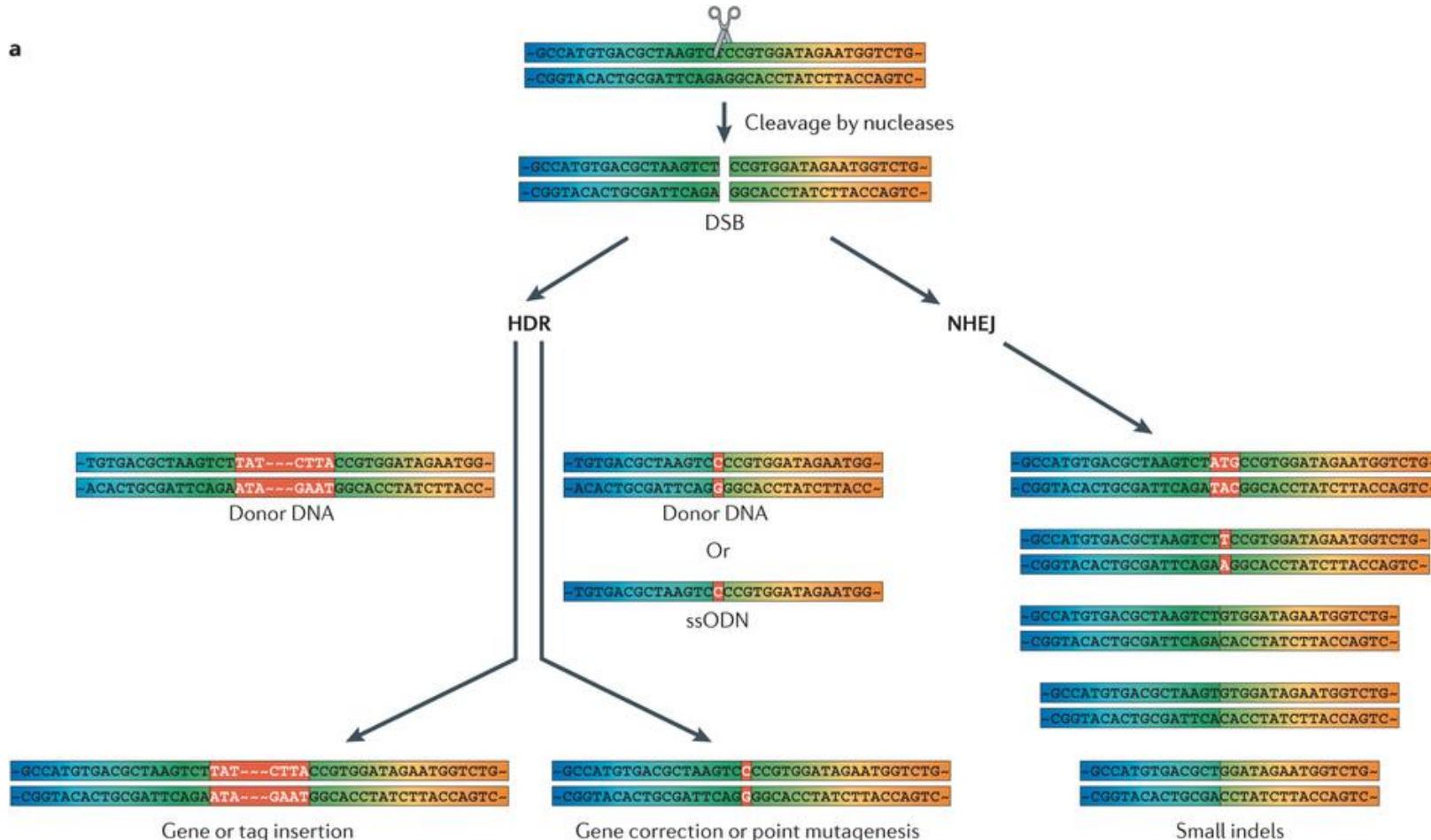
Modification du génome pour créer des modèles in vitro spécifiques à une maladie



- À partir d'une lignée cellulaire pluripotente donnée qui est modifiée **précisément** au locus de la maladie, on peut obtenir un modèle beaucoup plus “propre”
- Comment introduire des mutations spécifiques dans le génome des cellules pluripotentes?

Technologies actuelles d'édition du génome

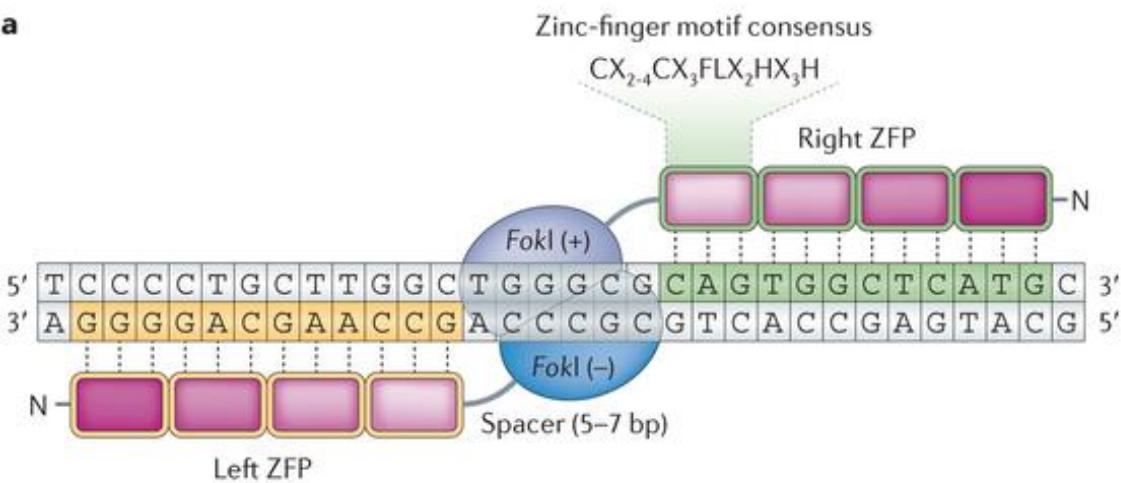
Principe: clivage d'une séquence génomique spécifique par des nucléases
→ La rupture sera réparée soit par jonction d'extrémité non homologue (NHEJ),
soit par réparation dirigée par homologie (HDR)



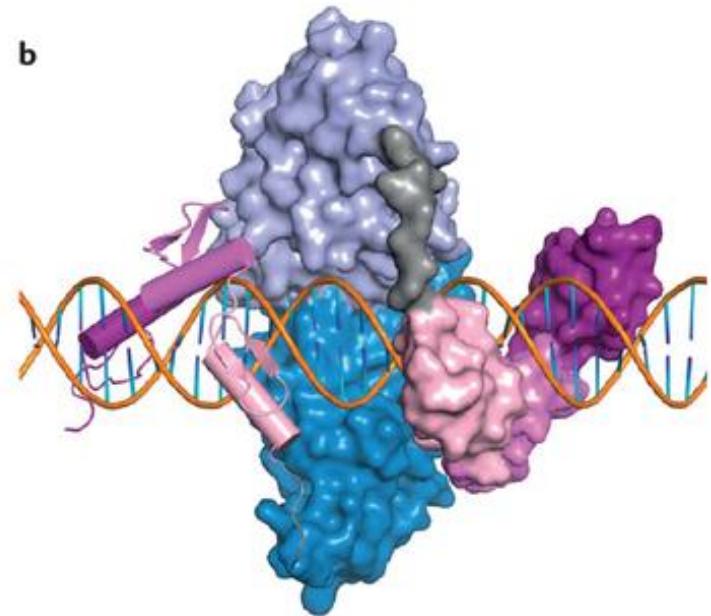
3 générations différentes de nucléases

1. Nucléases à doigts de zinc: des motifs spécifiques peuvent reconnaître des triplets spécifiques de paires de bases

a



b



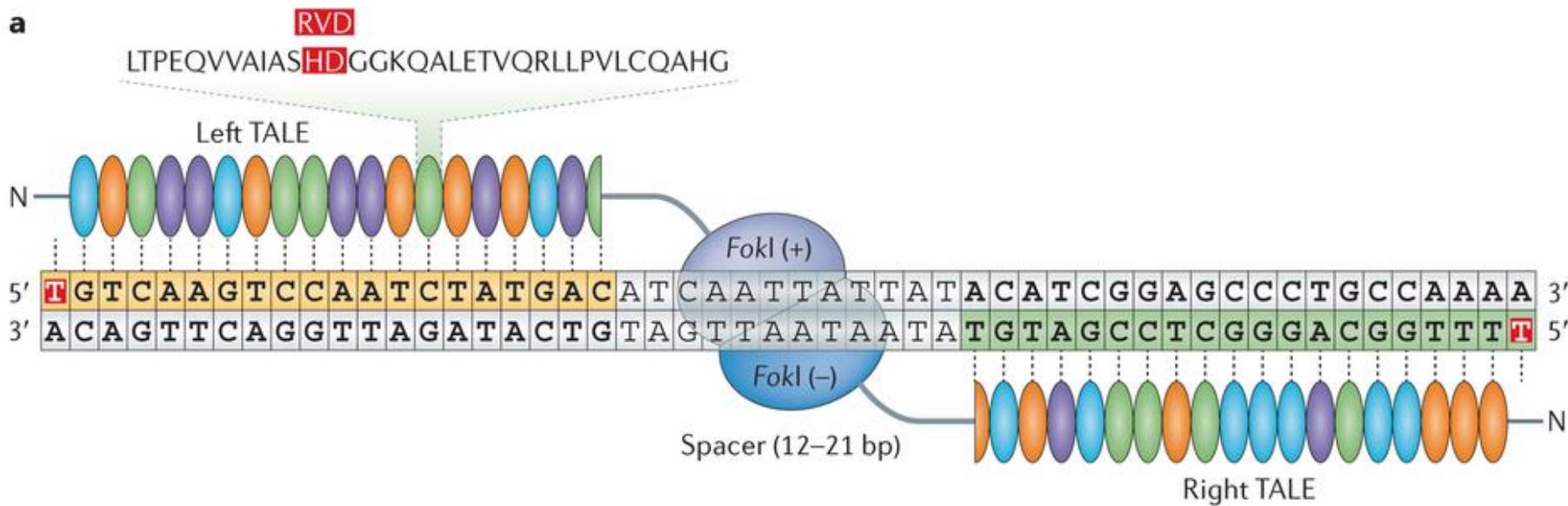
Nature Reviews | Genetics

Kim et al., Nat Rev dans Gen.2014

3 générations différentes de nucléases

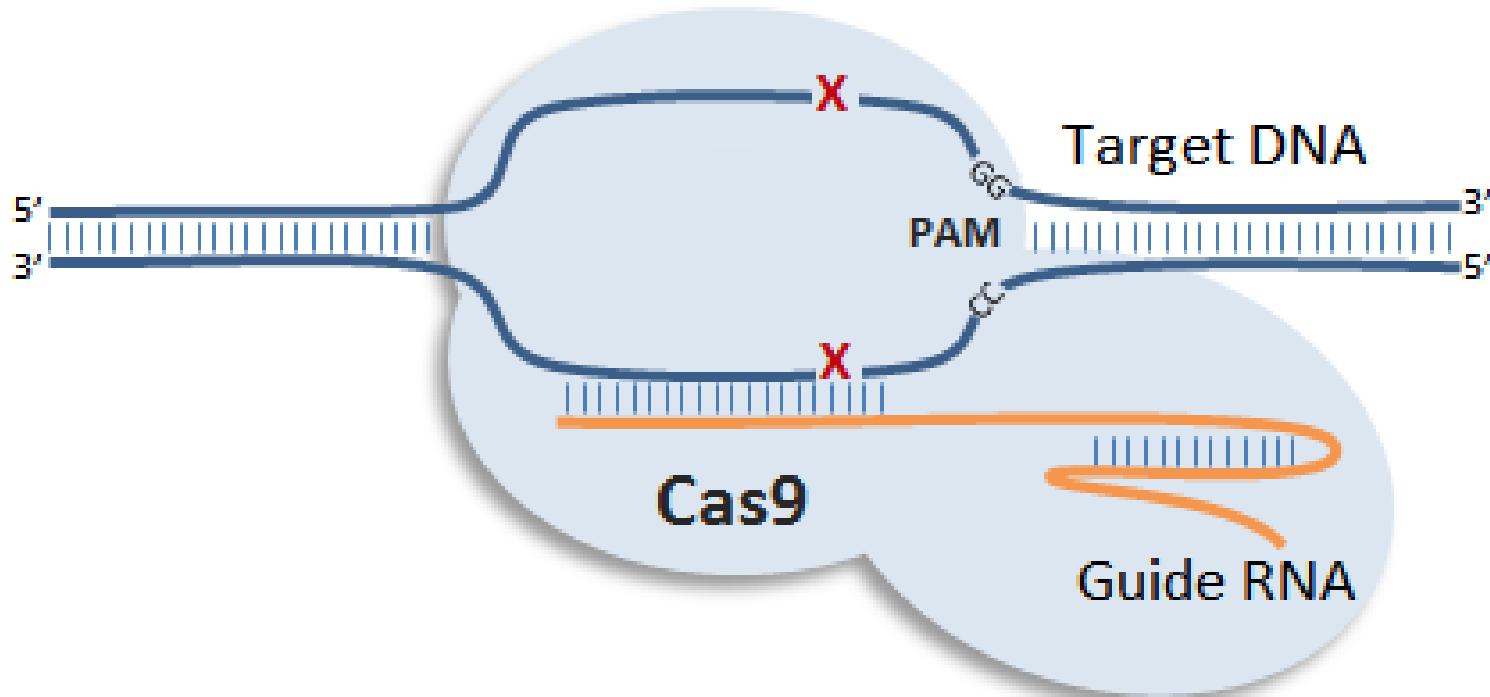
2. Nucléases effectrices de type activateur de transcription (TALEN)

a



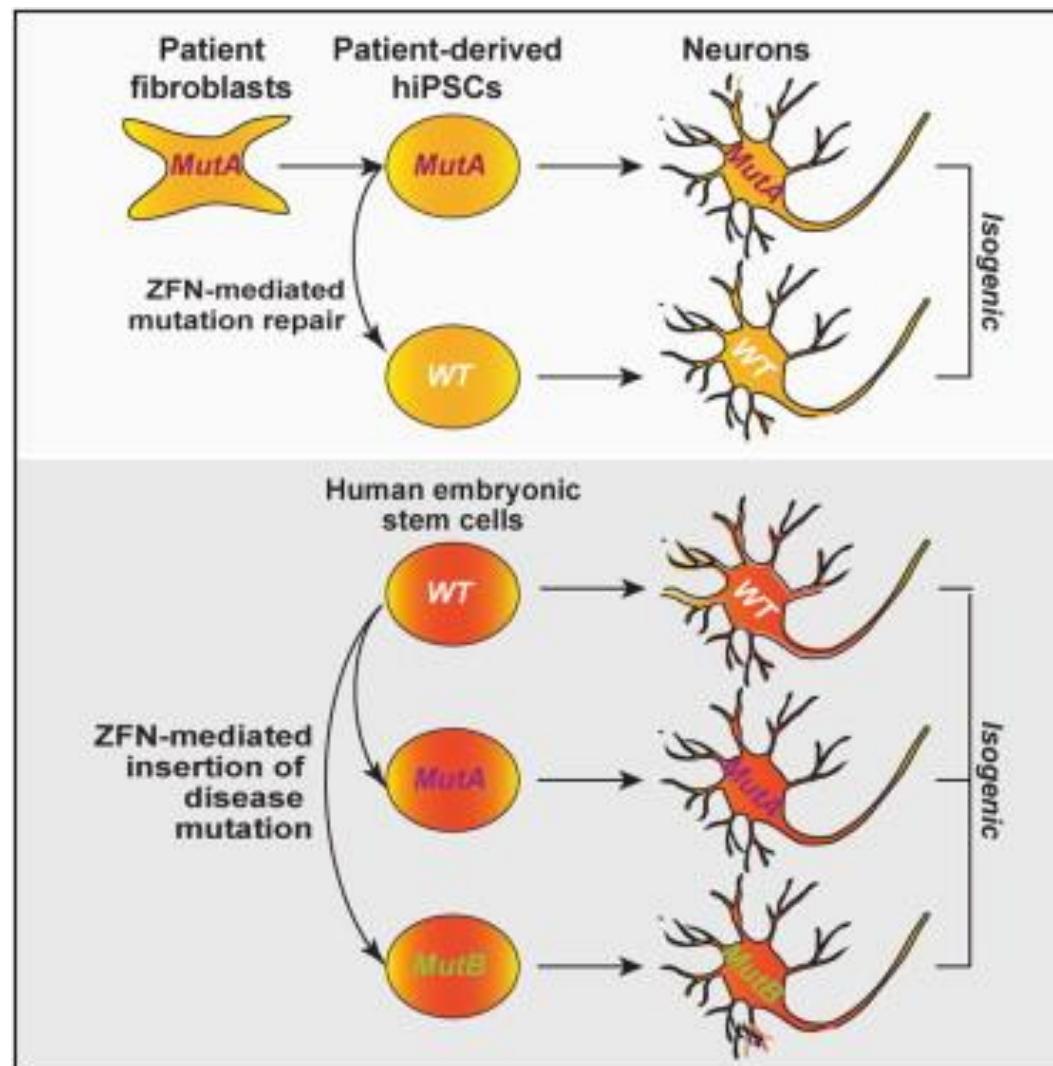
3 générations différentes de nucléases

3. Nucléases CRISPR-Cas9



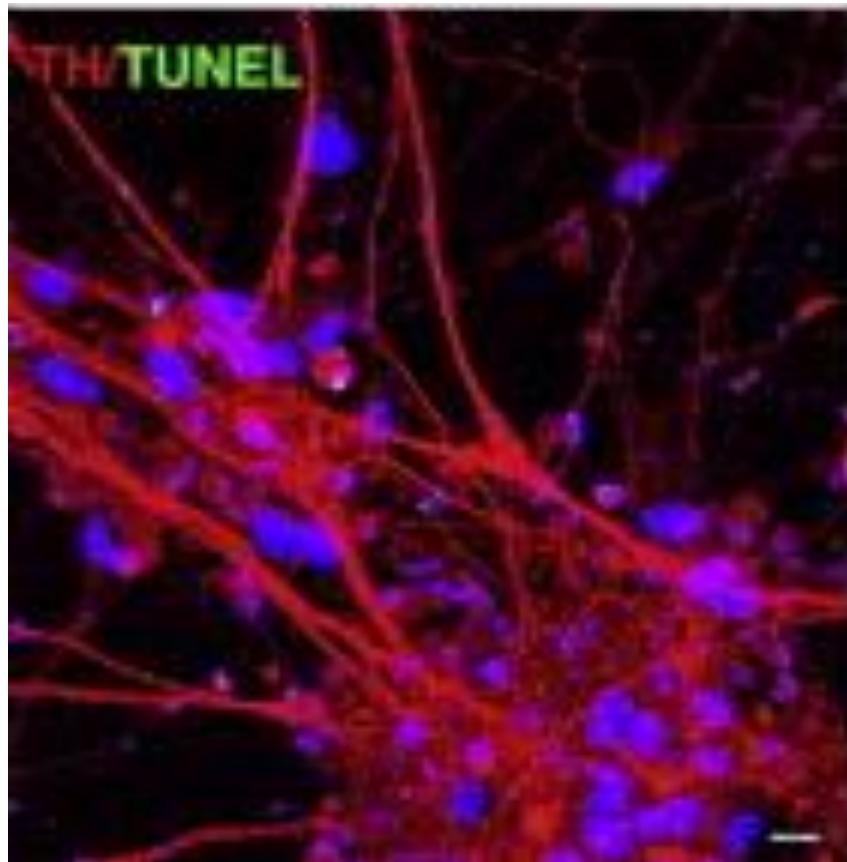
Fin de la 2^{ème} partie

Modèle d'édition du génome de la maladie de Parkinson

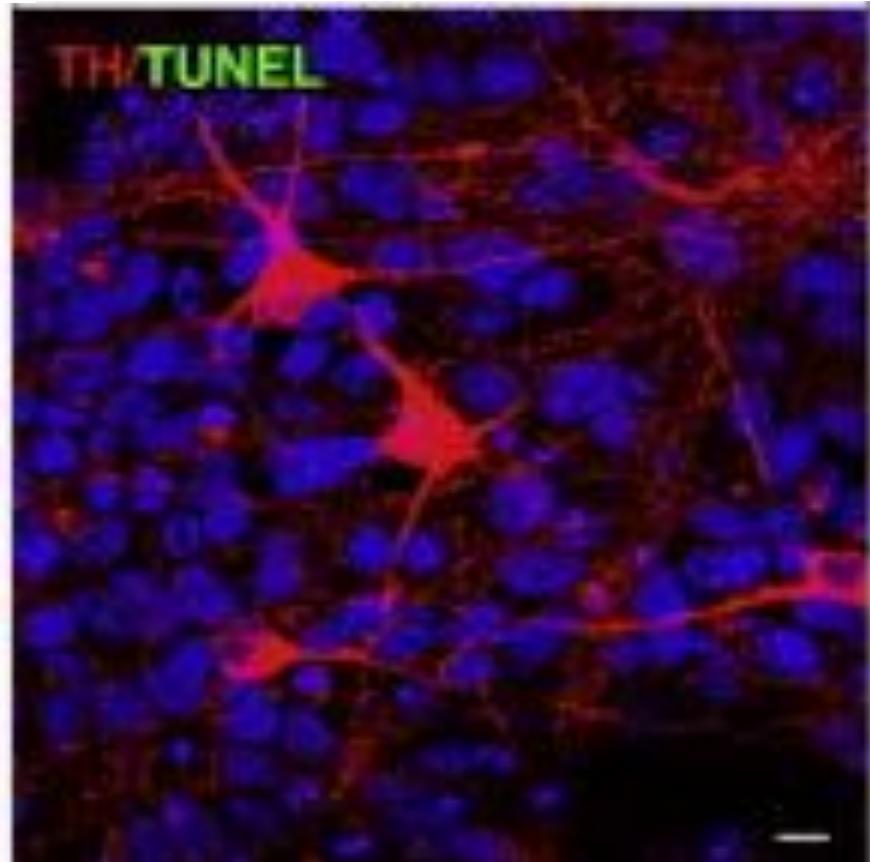


Modèle d'édition du génome de la maladie de Parkinson

Mutation ponctuelle corrigée

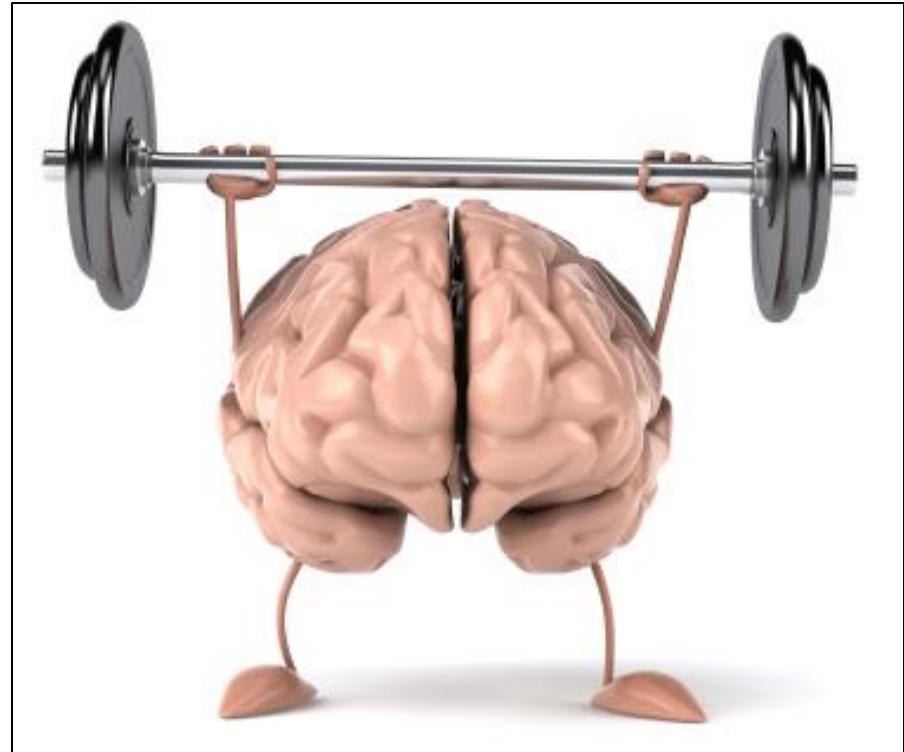
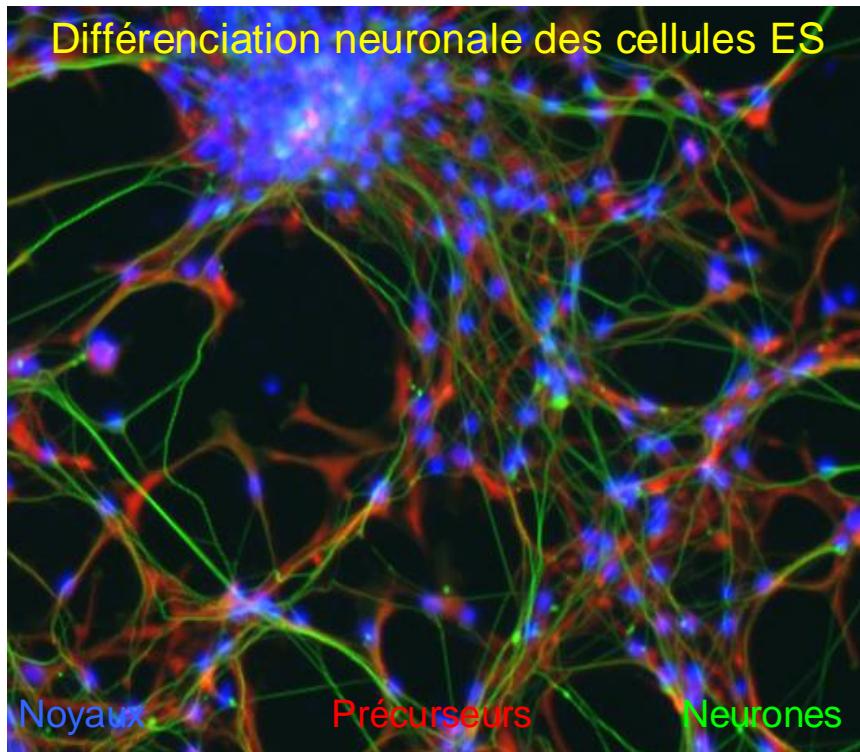


Mutation ponctuelle causant la maladie de Parkinson



Limitations de la différenciation in vitro des CSE pour modéliser les maladies

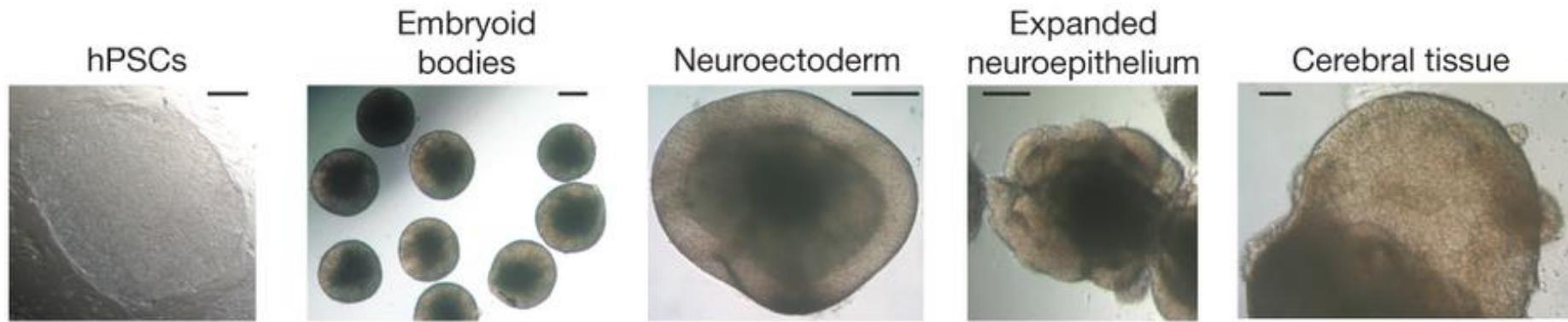
La différenciation des CSE en culture est "désordonnée"



Différenciation 3D pour générer des organoïdes

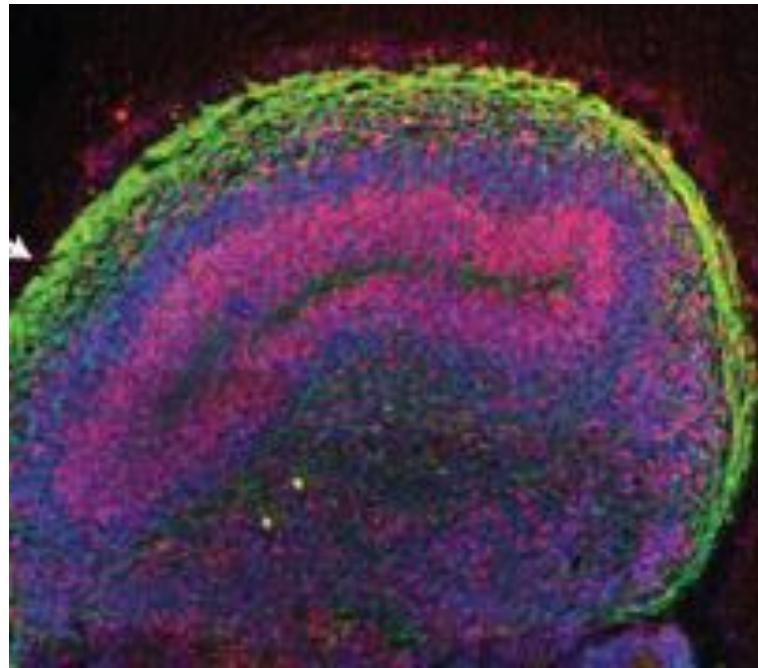
→ Les cellules souches peuvent être différencierées en structures 3D pour former des structures semblables à des organes

“Minicerveaux” générés à partir de CSE humaines

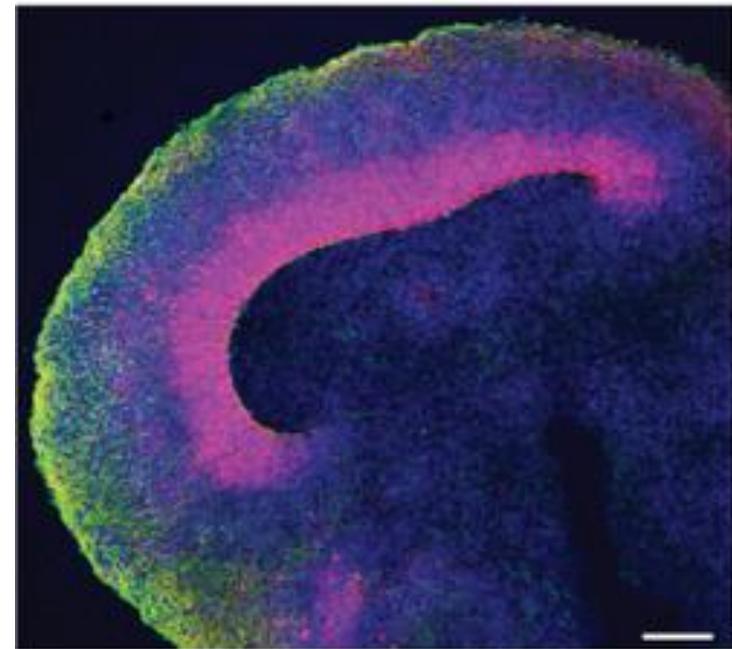


“Minicerveaux” générés à partir de CSE humaines

Minicerveaux



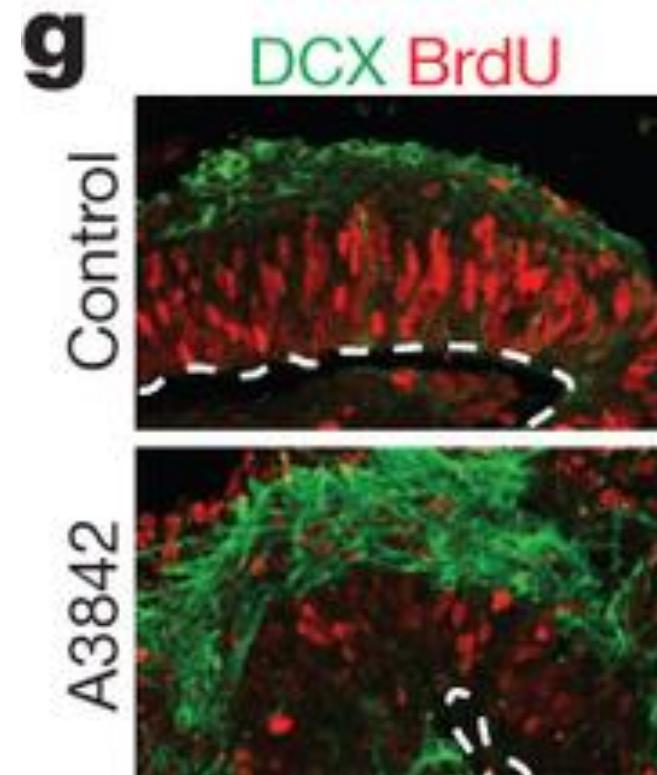
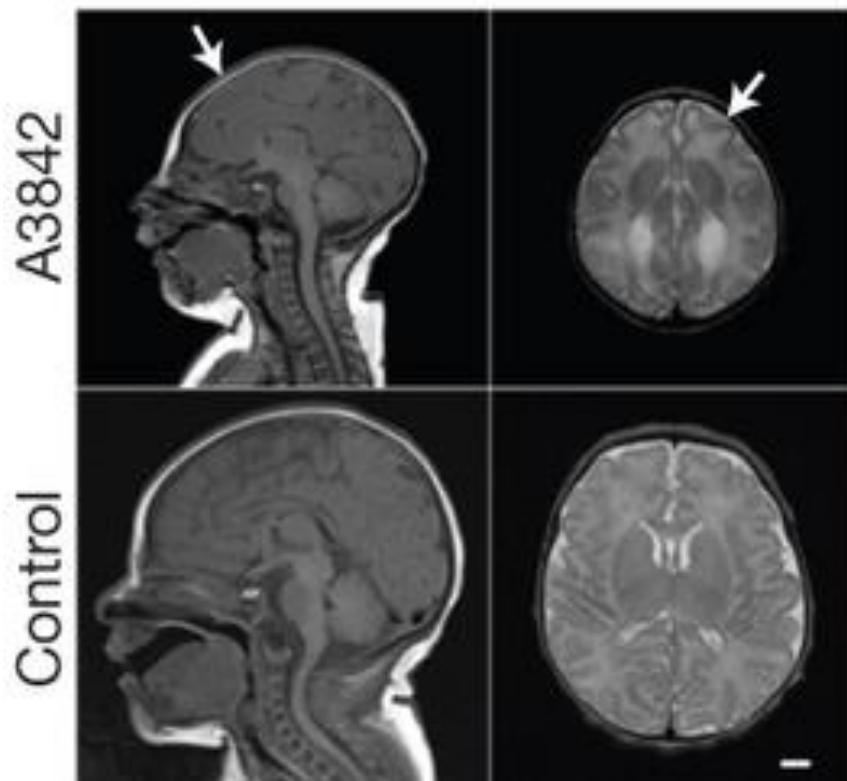
Cerveau fœtal humain



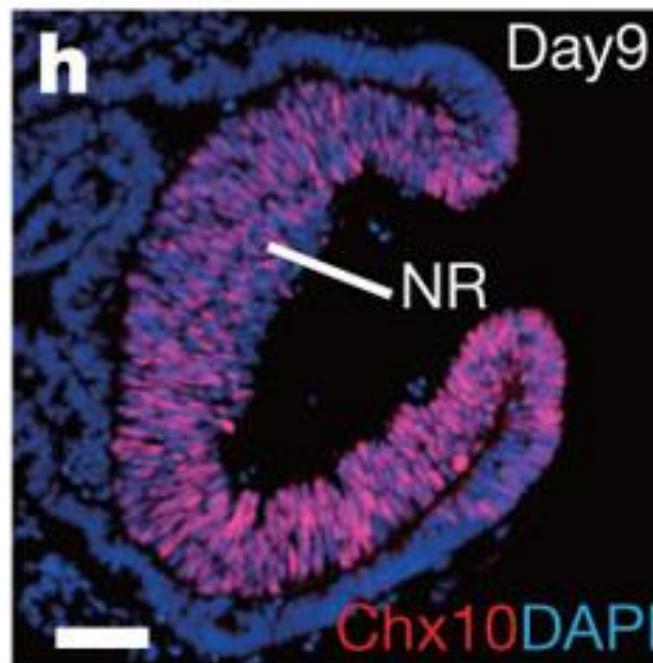
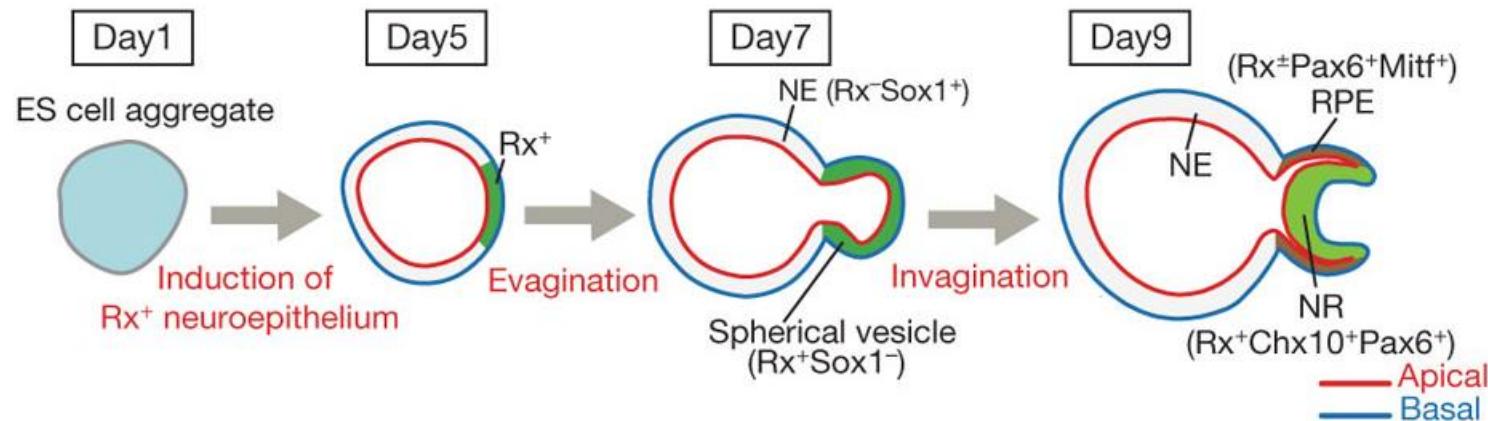
Rouge: progéniteurs neuronaux
Vert: neurones matures
Bleu: noyaux cellulaires

"Minicerveaux" pour modéliser des maladies humaines

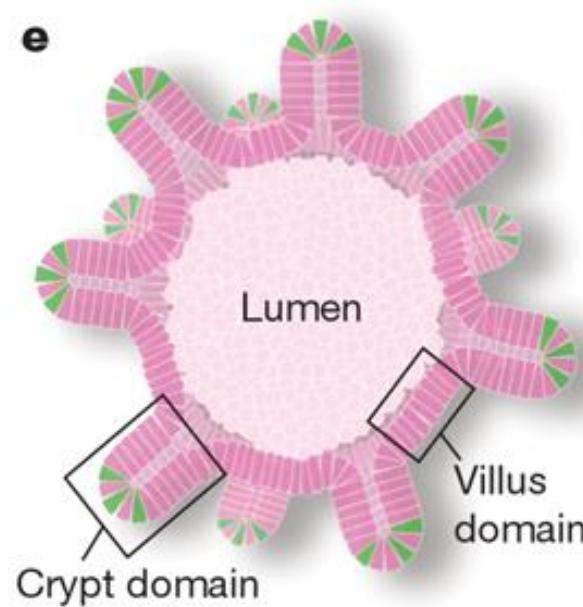
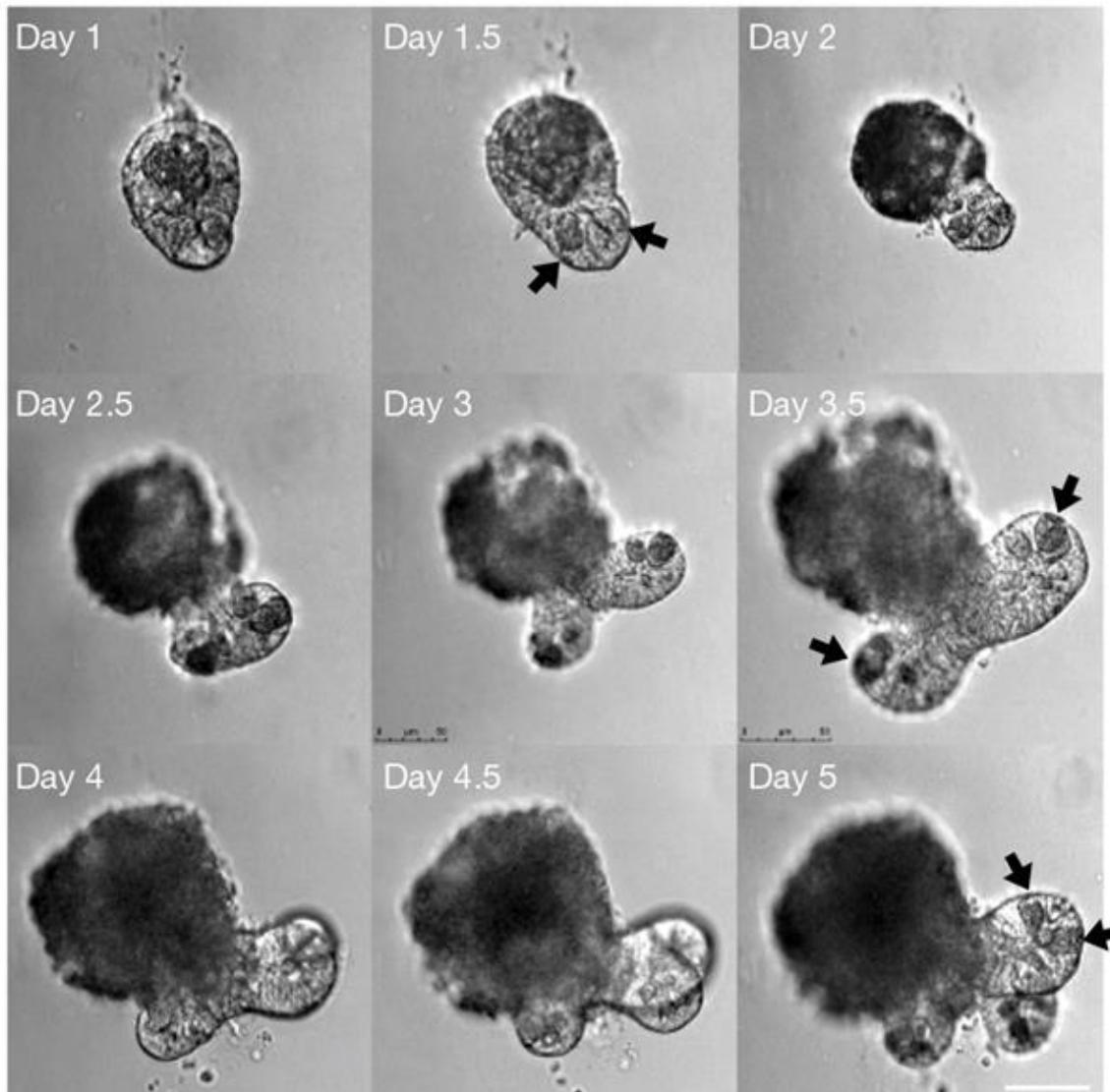
Cellules iPS humaines générées à partir d'un patient avec une mutation de la protéine CD5RAP2



Rétine humaine in vitro à partir d'organoides de CSE

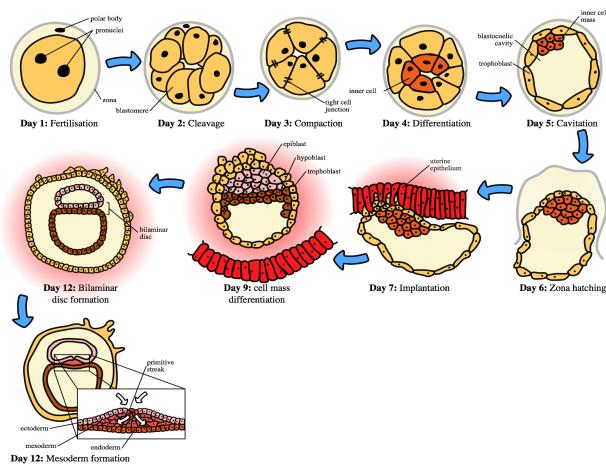


Organoides intestinaux à partir de cellules souches intestinales

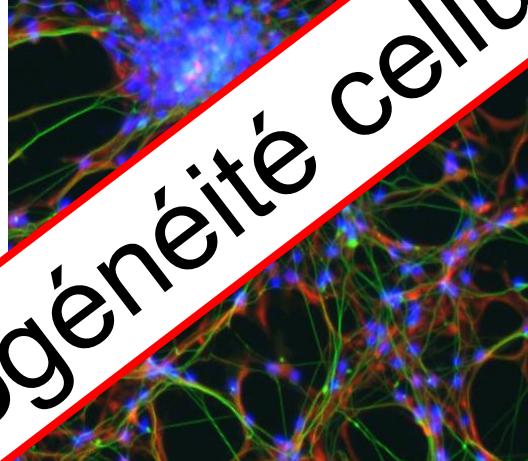


Comment pouvons-nous étudier des types spécifiques de cellules embryonnaires précoce?

In vivo?

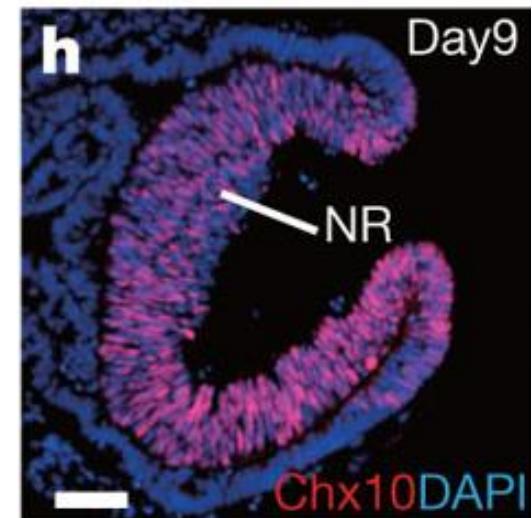


Culture 2D

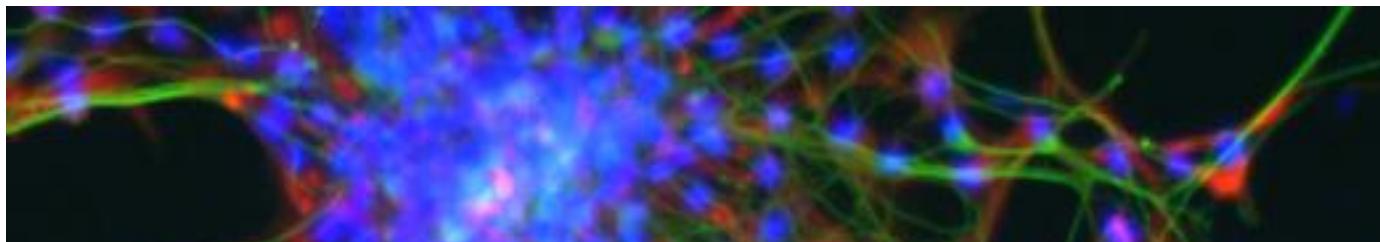


Hétérogénéité cellulaire

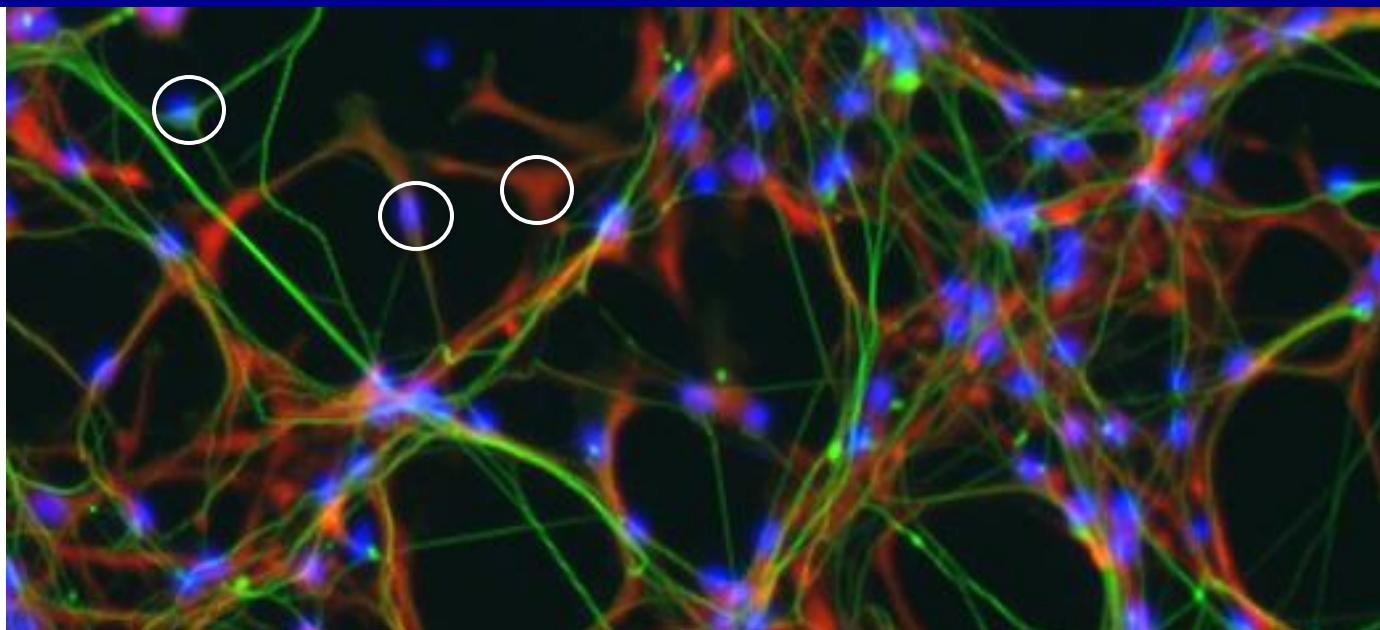
Culture 3D ?



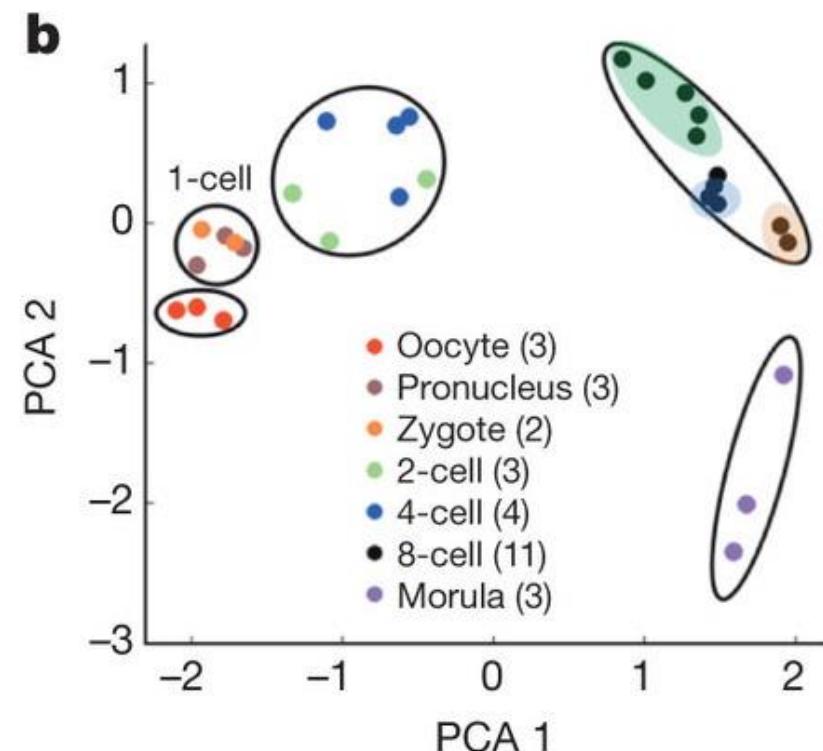
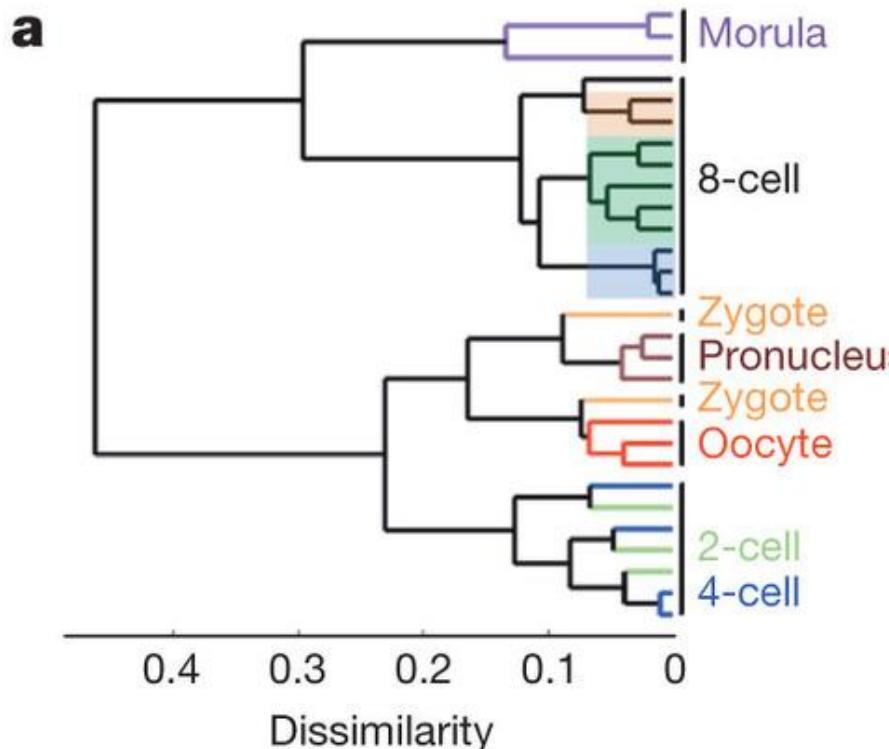
Pouvons-nous résoudre ce problème?



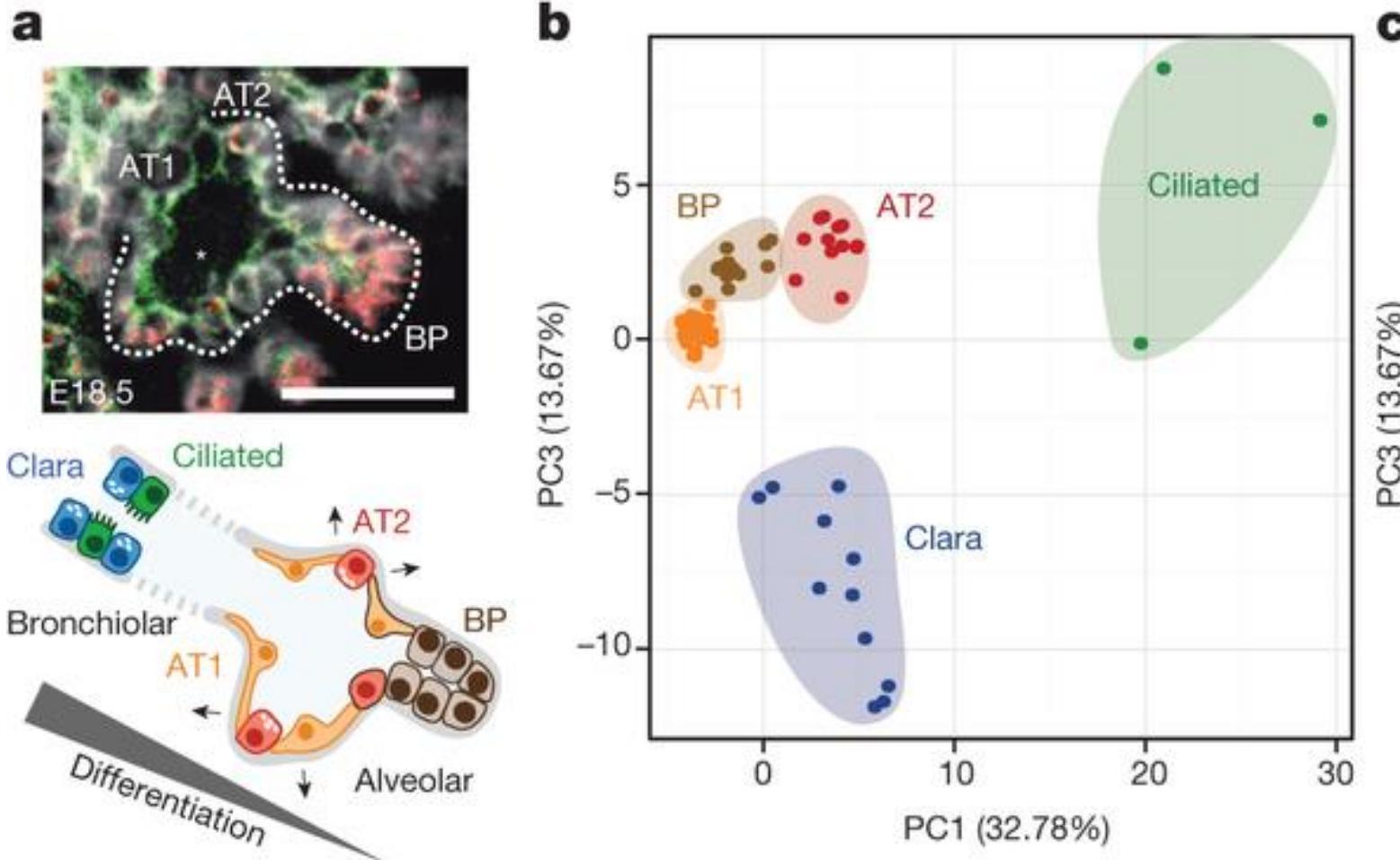
Analyse de cellules
individuelles



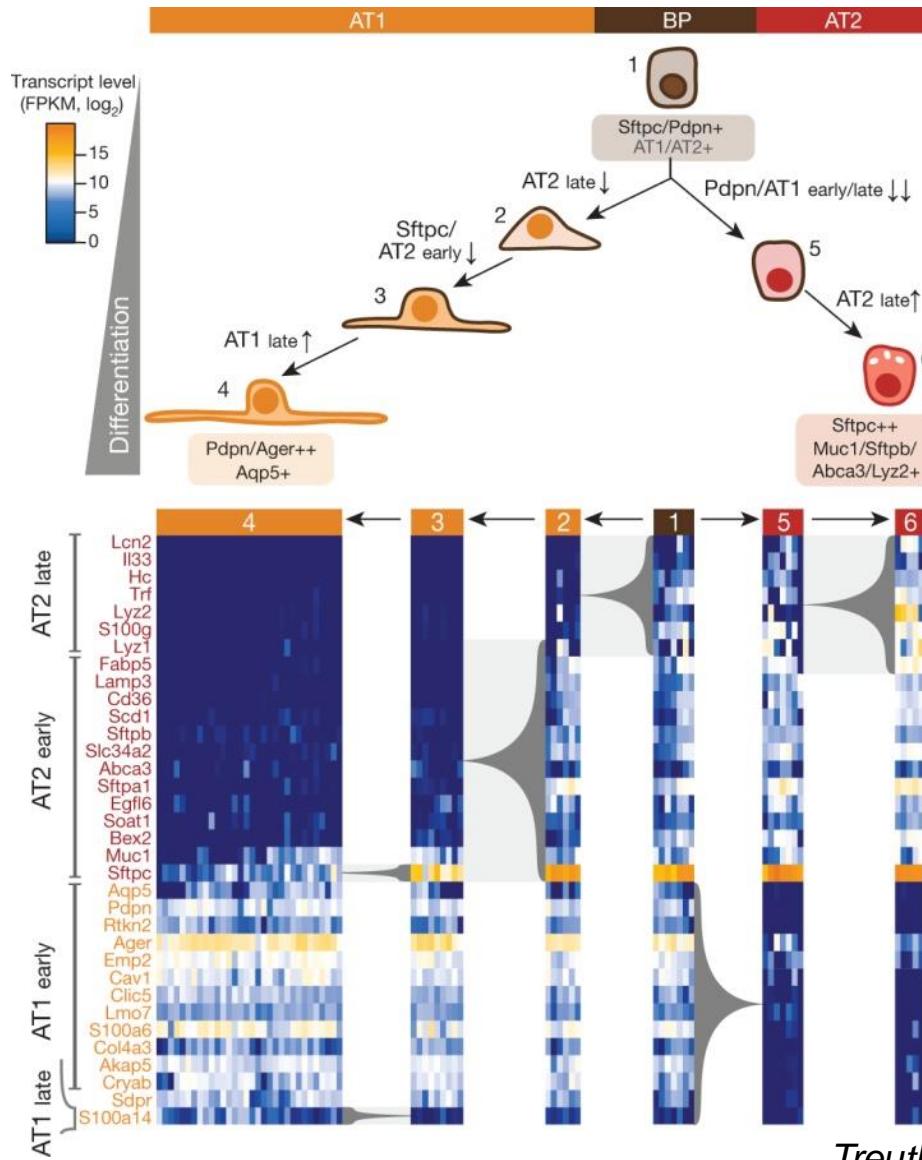
Analyse du transcriptome de cellules individuelles: embryon précoce



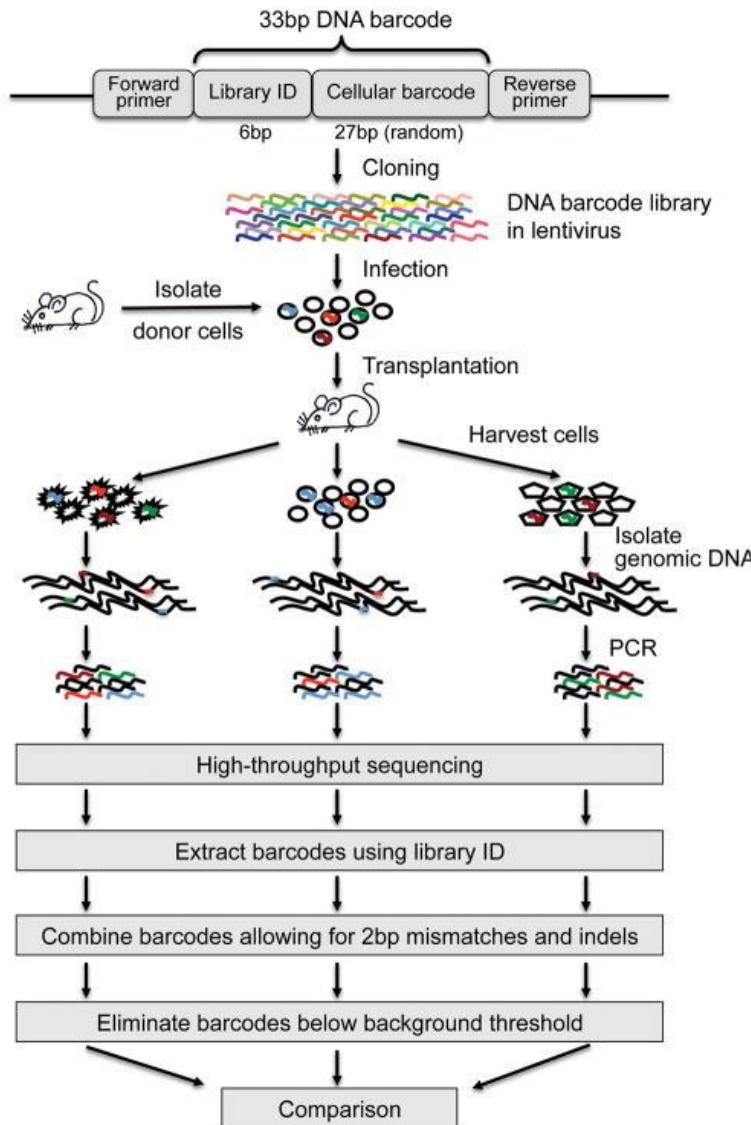
Transcriptome de cellules individuelles: reconstruction de la hiérarchie pulmonaire



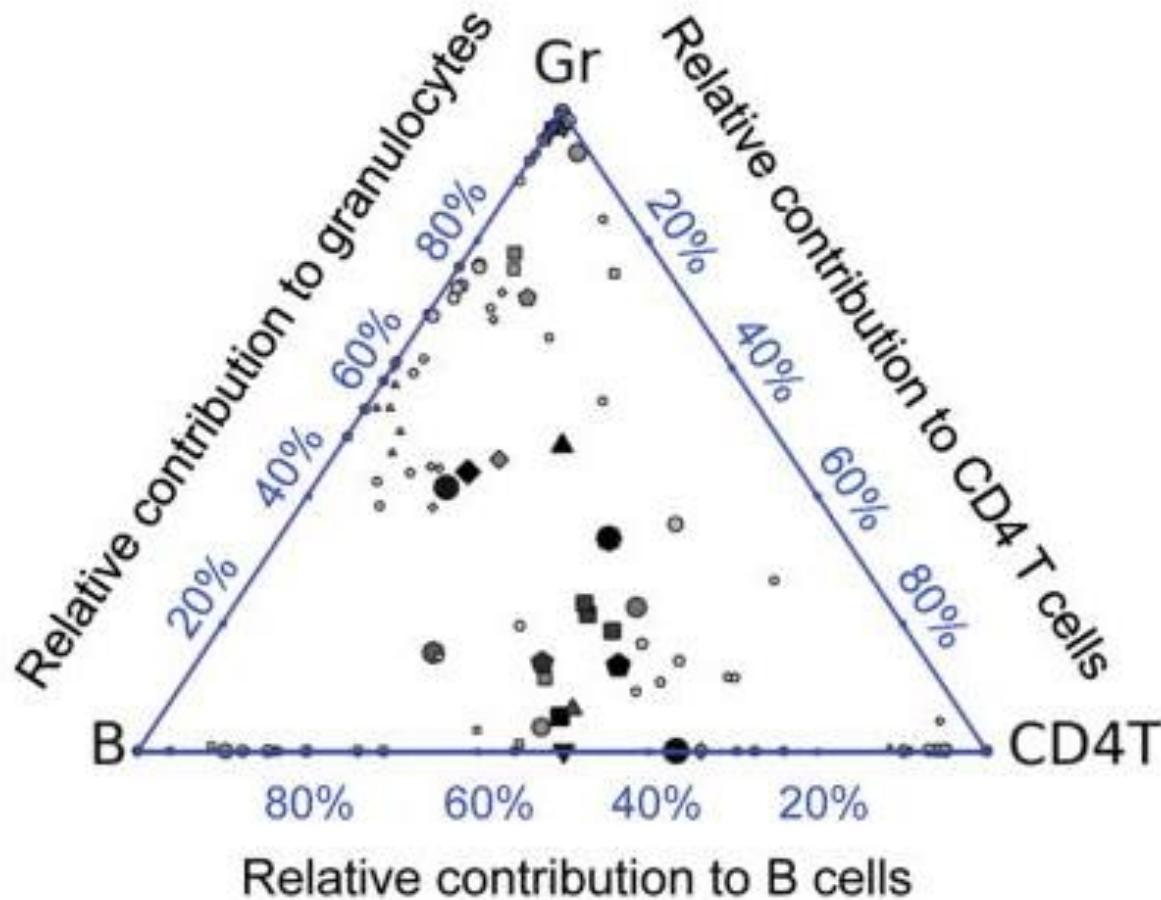
Analyse du transcriptome de cellules individuelles: reconstruction de la hiérarchie de la lignée pulmonaire



Utilisation de codes barres pour suivre le potentiel de cellules souches hématopoïétiques



Importante variabilité de la contribution de différentes cellules souches aux différentes cellules du sang



Utilisation de CRISPR pour le traçage de lignées

Principe: insertion de répétitions d'une séquence artificielle dans le génome, et expression à bas niveau de Cas9 et d'un gRNA qui cible cette séquence



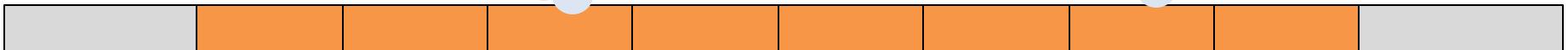
Génome

Séquence aritificialle

+ Cas9 et gRNA



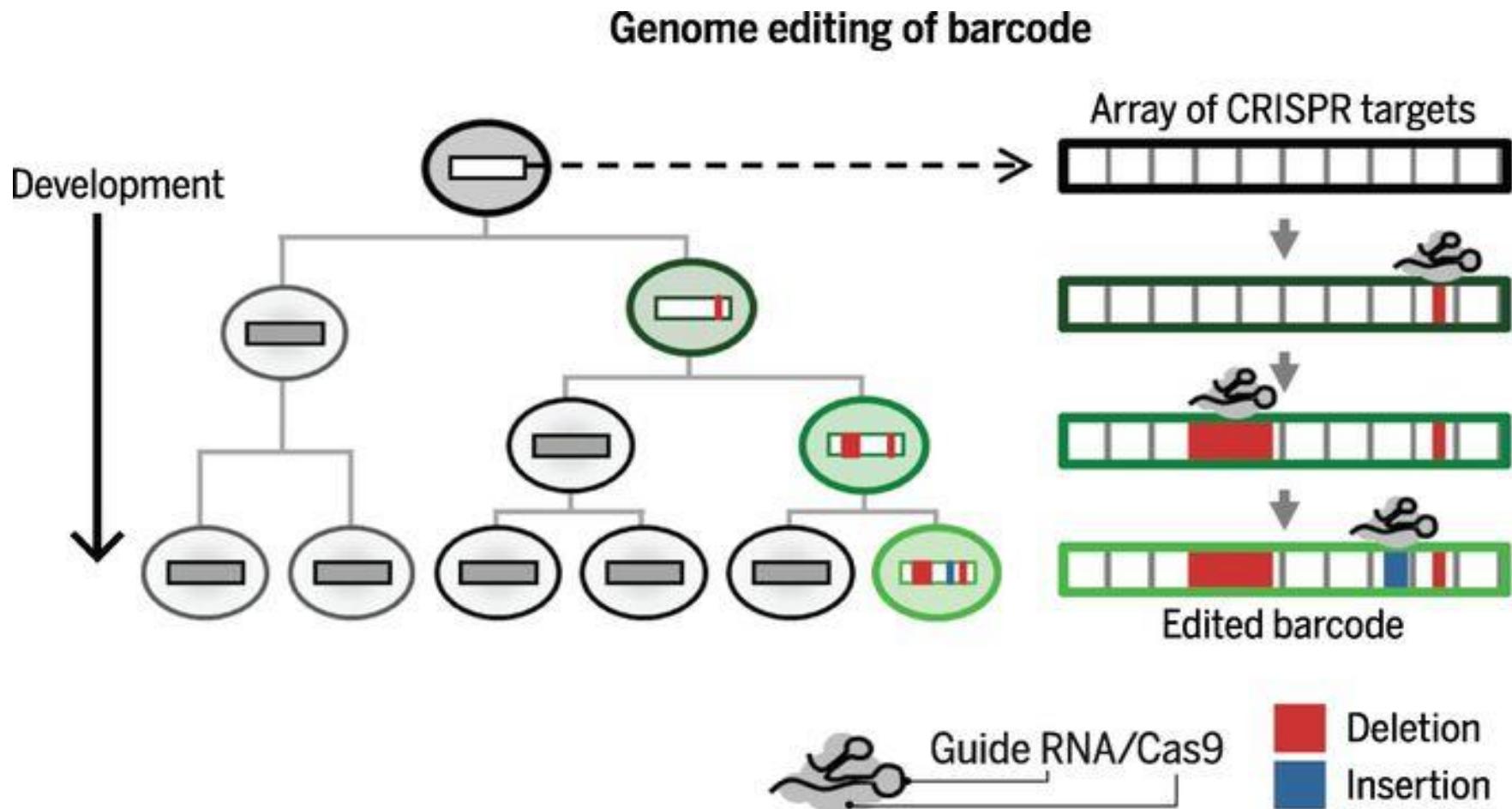
Cas9 coupe au hasard



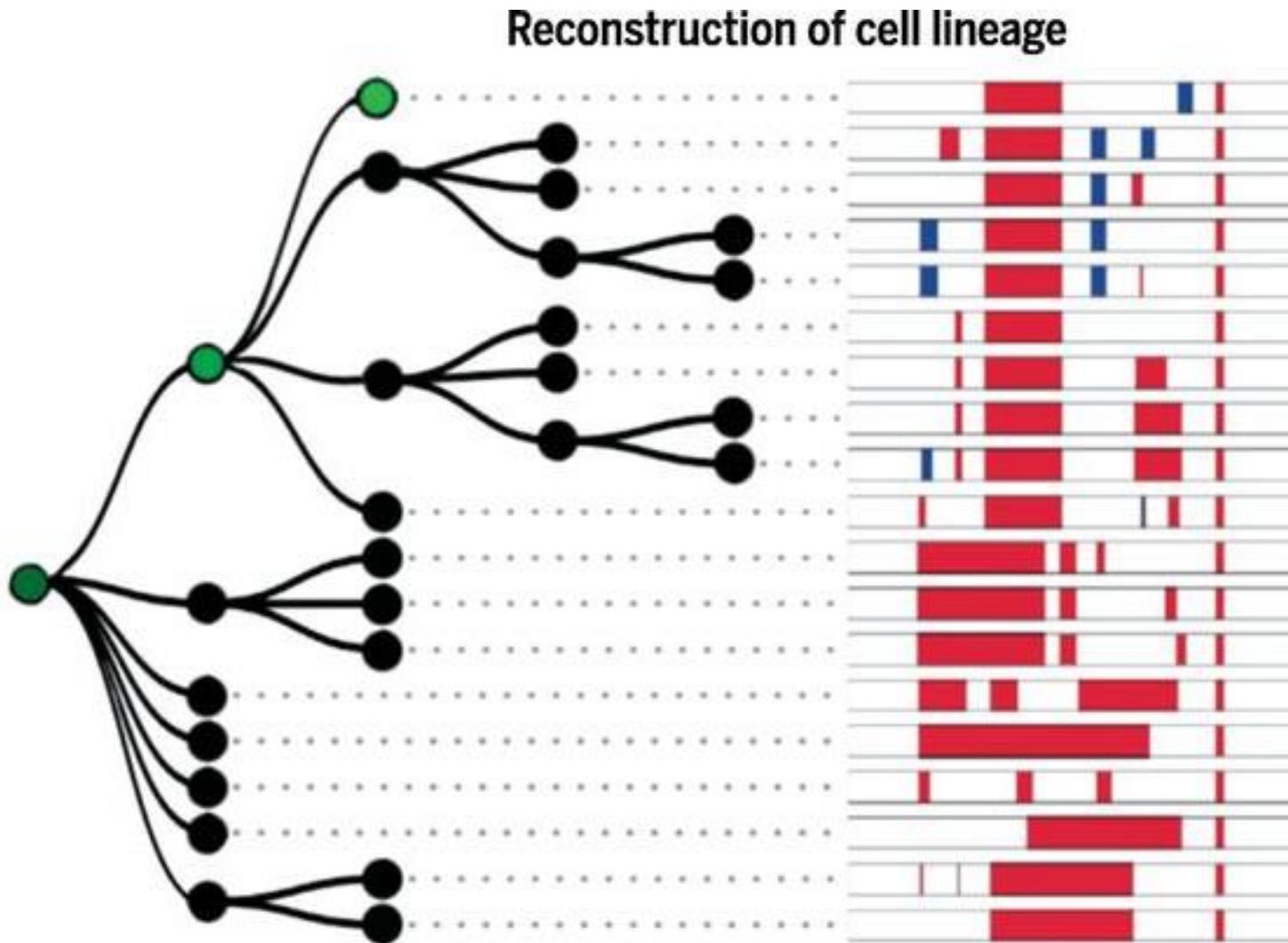
Génération de mutations



Utilisation de CRISPR pour le traçage de lignées



Utilisation de CRISPR pour le traçage de lignées



Joyeux Noël !

Adipocytes

Cellules souches mesenchyma

