

**Académie Roumaine**

**Institut de Biologie et Pathologie Cellulaire „Nicolae Simionescu”**

**THÈSE DE DOCTORAT**

**ÉTUDE DE LA PLATICITÉ DES CELLULES  
SOUCHES FŒTALES AYANT UN POTENTIEL  
THÉRAPEUTIQUE**

**Coordinateur scientifique:**

Acad. Maya Simionescu

**Doctorant:**

Andrei Constantinescu

Bucarest, 2013

# CONTENU

## I. INTRODUCTION

## II. ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES

### Chapitre 1. Les cellules souches et une thérapie cellulaire

- 1.1. Les cellules souches
  - 1.1.a. Les cellules souches classification
  - 1.1.b. Le rôle des cellules souches
  - 1.1.c. L'importance de cellules souches
- 1.2. Les cellules souches differetiation
  - 1.1.a. Les cellules souches totipotentes
  - 1.1.b. Les cellules souches pluripotentes
  - 1.1.c. Les cellules souches hématopoïétiques
  - 1.1.d. Les cellules souches mésenchymateuses
  - 1.1.e. Oligopotent cellules souches
  - 1.1.f. Les cellules souches unipotentes
  - 1.1.g. Cellules avec la pluripotence induite

### Chapitre 2. Les cellules souches sources

- 2.1. Les cellules souches embryonnaires
- 2.2. Cellules souches fœtales
- 2.3. Les cellules souches adultes

### Chapitre 3. L'utilisation de cellules souches

- 3.1. Les cellules souches de la recherche fondamentale
- 3.2. Les cellules souches dans la recherche pharmacologique
- 3.3. Applications thérapeutiques des cellules souches

## III. CONTRIBUTION D'ORIGINE

### Chapitre 1. Évaluation du potentiel de recellularization vasculaire de la tige du fœtus isolé de gelée de Wharton

- 1.1. Introduction
- 1.2. Objectifs
- 1.3. Méthodologie et résultats
  - 1.3.1. L'isolement et la caractérisation des cellules souches de gelée de Wharton
    - 1.3.1.a. Isolement de cellules souches
    - 1.3.1.b. Immunophénotypage de cellules souches
  - 1.3.2. La différenciation et la caractérisation des cellules souches de gelée de Wharton
    - 1.3.2.a. Différenciation endothéliale de cellules souches mésenchymateuses

- 1.3.2.b. Immunophénotypage des cellules progénitrices endothéliales
- 1.3.3. L'isolement et le traitement des artères du cordon ombilical
  - 1.3.3.a. Isolement des artères
  - 1.3.3.b. Décellularisation des artères
- 1.3.4. Évaluation du potentiel de recellularization vasculaire
  - 1.3.4.a. L'obtention de tissus cellules-vasculaire co-cultures
  - 1.3.4.b. L'analyse histologique
  - 1.3.4.c. Analyse par microscopie de fluorescence
  - 1.3.4.d. L'évaluation de immunophénotype
- 1.4. Discussions and conclusions

## **Chapter 2. Characterization and evaluation of the therapeutic potential of amniotic fluid cells**

- 2.1. Introduction
- 2.2. Objectifs
- 2.3. Méthodologie et résultats
  - 2.3.1. Caractérisation des cellules du liquide amniotique
    - 2.3.1.a. Caractérisation morphologique
    - 2.3.1.b. L'analyse ultrastructurale
    - 2.3.1.c. Cellules mezenchymal immunophénotypage
    - 2.3.1.d. Cellules mezenchymal profil transcriptimic
  - 2.3.2. Différenciation des cellules du liquide amniotique
    - 2.3.2.a. Différenciation endothéliale
    - 2.3.2.b. Les cellules endothéliales analyse ultrastructurale
    - 2.3.2.c. Les cellules endothéliales immunophénotypage
  - 2.3.3. Cellules positives CD117 tri du liquide amniotique
    - 2.3.3.a. La cytométrie de flux de tri de cellules
    - 2.3.3.b. Cellules positives pour CD117 analyse morphologique
    - 2.3.3.c. Analyse de immunophénotype des cellules triées
- 2.4. Discussions et conclusions

## **IV. CONCLUSIONS GÉNÉRALES**

## **V. PERSPECTIVES**

## **VI. RÉFÉRECES**

## **MOTS-CLÉS**

Cellules souches fœtales

Les cellules souches mésenchymateuses

Gelée de Wharton

Le liquide amniotique

Tissu vasculaire fœtal humain

Différenciation cellulaire

Des cellules progénitrices endothéliales

Eecellularization vasculaire

La cytométrie de flux

Tri cellulaire

## RÉSUMÉ

L'objectif de cette thèse est l'étude de la plasticité des cellules souches mésenchymateuses à partir de sources fœtus et d'évaluer le potentiel thérapeutique des cellules souches fœtales et leurs implications dans la médecine régénérative. Ainsi, nous avons voulu étudier la capacité de différenciation de cellules mésenchymateuses isolées à partir de la gelée de Wharton en cellules progénitrices endothéliales et pour évaluer le potentiel de régénération du tissu cardiovasculaire de celui-ci. À cette fin, nous avons l'intention d'établir un modèle in vitro basé sur le tissu vasculaire fœtal humain des artères du cordon ombilical d'étudier le potentiel des cellules progénitrices endothéliales recellularisation cellules souches mésenchymateuses foetales différenciables.

En outre, nous voulions étudier la plasticité des cellules souches mésenchymateuses à partir de liquide amniotique par l'analyse approfondie de leur capacité à se différencier en cellules progénitrices endothéliales pour évaluer le potentiel thérapeutique. À cette fin, nous avons voulu étudier à la fois immunophénotypique et le profil transcriptomique des cellules mésenchymateuses du liquide amniotique mais aussi cellules endothéliales détails ultrastructuraux différenciées des cellules mésenchymateuses de liquide amniotique.

La thèse est divisée en deux parties. Dans la première partie, l'état actuel des connaissances, est organisé en trois chapitres qui décrivent les aspects de cellules souches (chapitre 1 de l'étude actuelle de la connaissance) et la hiérarchie des cellules souches et de leur rôle (chapitre 1.1 de l'étude actuelle de la connaissance) et la capacité de faire la distinction (chapitre 1.2 de l'étude actuelle de la connaissance). Voici une description des types de cellules en fonction de la source d'où ils sont issus et un aperçu des méthodes d'isolement (chapitre 2 de l'étude actuelle de la connaissance), et le dernier chapitre est détaillé en utilisant des cellules souches à la fois dans la recherche fondamentale et dans la recherche pharmacologique et la médecine régénérative (chapitre 3 de l'étude actuelle de la connaissance).

Dans la deuxième partie de la thèse, contribution originale, les études ont été divisés en deux chapitres. Afin d'évaluer le potentiel de recellularisation vasculaire cellules souches fœtales isolées à partir de la gelée de Wharton (chapitre 1 de la contribution d'origine) J'ai regardé l'isolement, la caractérisation et diferetierea Wharton cellules mésenchymateuses de la gelée de la ligne de endothéliale et d'établir un modèle in vitro sur la base de foetus humain tissus vasculaires des artères du cordon ombilical. Nous avons donc voulu étudier le potentiel

des cellules progénitrices endothéliales recellularisation tant au niveau histologique et immunophénotypique.

Les résultats obtenus démontrent la capacité des cellules souches mésenchymateuses dans la gelée de Wharton se différencier des cellules endothéliales progenitoarea terapeutic avec un potentiel réel de la régénération vasculaire. Ces cellules pourraient avoir un impact majeur sur la médecine régénérative raison de la faible immunogénicité et therapeutic potentiel.

Dans l'étude regarding l'évaluation du potentiel thérapeutique des cellules du liquide amniotique (chapitre 2 de la contribution d'origine), nous avons cherché à obtenir une caractérisation complète de ces cellules à immunophénotypique, ultrastructurale et moléculaire. À cette fin, nous avons utilisé la cytométrie en flux pour enquêter sur la microscopie électronique à surface Maker et technique de PCR en temps réel (section 2.3.1 de la contribution d'origine). Dans le même temps, nous avons voulu évaluer le potentiel de différenciation des cellules du liquide amniotique par induction de la différenciation des cellules endothéliales (chapitre 2.3.2 de la contribution d'origine). Aussi, je regardais la détermination des cellules souches phénotype CD117 de liquide amniotique par tri positif et analyse immunophénotypique de cultures cellulaires provenant CD117 positif (chapitre 2.3.3 de la contribution d'origine).

Les résultats démontrent la capacité des cellules de liquide amniotique à se différencier en cellules endothéliales matures en présence de marqueurs de surface spécifiques de ces cellules, et en ce structures intracellulaires spécifiques, telles que des vésicules, Weibel-Palade plasmalemma et corpuscules. En outre, nous avons observé des différences immunophénotype des cellules positives CD117 dans hétérogène liquide de la population cellulaire à établir des relations positives entre les cellules CD117 et CD117 négatives sein d'une population hétérogène.

En conclusion, en ce qui concerne le potentiel de régénération des cellules isolées de la gelée de Wharton, nos résultats ont démontré que les artères décellularisées de cordon ombilical humain peut être utilisé comme une matrice acellulaire et est un bon modèle expérimental in vitro. Nous avons démontré que les PEC différenciées à partir des cellules souches mésenchymateuses de la gelée de Wharton peuvent repeupler le tissu vasculaire endommagé / decellularised en témoigne l'expression du phénotype endothélial de marqueurs spécifiques CD31 + / CD34 + / CD105 + / CD133 + artères recellularizate. Les données obtenues histologie et coulent suggère cytométrie que les PEC différenciées à partir de cellules souches mésenchymateuses d'origine foetale sont intalt potentiel thérapeutique grâce à leur capacité de repeupler les vaisseaux sanguins endommagés / greffes.

En ce qui concerne les cellules isolées à partir de liquide amniotique, on en conclure que ces cellules ont un immunophénotype spécifique du spécifique des cellules souches mésenchymateuses, en exprimant les marqueurs CD29, CD90 et CD73. Immunophénotype CD29 + / CD90 + / CD105 + / CD133 + / CD146 + de ces cellules suggère la présence de marqueurs spécifiques et d'autres types cellulaires telles que les cellules endothéliales et CD133 CD105 spécifique à la surface des cellules souches hématopoïétiques et les cellules progénitrices endothéliales. En dépit de la très grande capacité de prolifération des cellules dans le liquide amniotique, leurs changements immunophénotypiques après 10 jours de culture, et sont devenus CD29 + / + CD90-/CD105-/CD133-/CD146. Sur les sites de l'AFC au niveau moléculaire montre les deux marqueurs de cellules souches mésenchymateuses tels que PAC, BGLAP, COL2A1 et PPARG, et souches marqueurs transcriptomiques spécifiques de cellules embryonnaires tels que OCT4, REX1 SOX2 ou. Intéressant de noter la présence de marqueurs spécifiques telles que les cellules souches hématopoïétiques CD3D, CD4, CD8a ou MME et marqueurs spécifiques des cellules souches neurales telles que NCAM1, SIGMAR1 et S100B. Ces résultats nous conduisent à l'hypothèse de la présence d'un nombre limité de marqueurs spécifiques de toutes les lignées cellulaires à partir de cellules souches. Ce phénomène pourrait être corrélé avec un potentiel de différenciation que des réponses à des stimuli externes par l'existence de molécules " amorces " qui mènent la différenciation par des stimuli appliqués.

En outre, l'AFC présenter la capacité de différenciation en ligne et endothéliales. Ces cellules peuvent se différencier en maturité endothéliale immunophénotype de cellule spécifique comme cela a été démontré par cytométrie en flux, marqueurs endothéliaux CD31 cela, CD105 et CD144. Une nouveauté importante est l'analyse ultrastructurale de sites AFC différenciées qui a démontré la présence de structures de cellules endothéliales spécifiques tels que les vésicules intracellulaires, Weibel-Palade plasmalemme et corpuscules. Ainsi, ces cellules non seulement avoir la possibilité d'être guidé par ligne endothéliale, il peut même être des structures nécessaires à maturité des cellules endothéliales de la performance possible de leurs fonctions, telles que, par exemple, des vésicules de plasmalemme qui peuvent être impliqués dans le processus de transcytose.

Comme perspectives pour l'avenir, nous voulons étudier la capacité des cellules du liquide amniotique pour repeupler vaisseaux sanguins endommagés / greffes. En outre, nous proposons d'utiliser des cellules souches dans la co-culture de CD117 cellules progénitrices endothéliales positifs isolés à partir de sang de cordon pour enquêter sur la puissance

réparatrice de casse-cou sans utilisation de facteurs de croissance et de la différenciation in vitro de soutenir une stratégie thérapeutique possible de l'applicabilité clinique.