

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Djilali LIABES Sidi-Bel-Abbès
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie



*Cours de Cellules souches et
différenciation cellulaire*

Destiné aux étudiants :

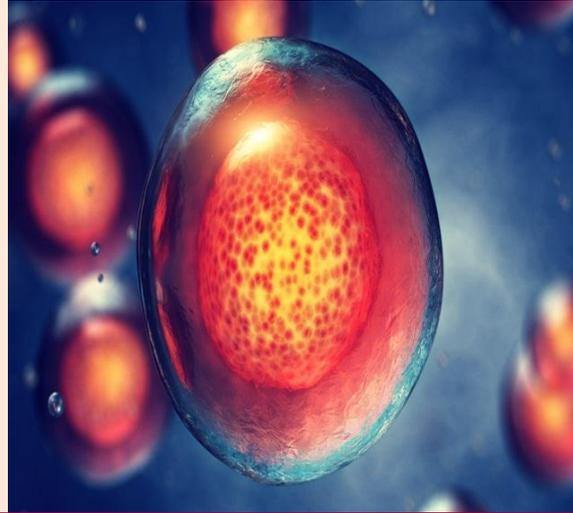
*Master I Biologie et physiologie de la reproduction / biologie et
physiologie cellulaire*

Dr. BENALIA .A

Année Universitaire 2021-2022

Cellules

souches et différenciation Cellulaire



Dr Benalia Abdelkrim, Enseignant-Chercheur

Département de biologie, Université Djillali Liabès, Sidi Bel Abbès Algérie

Laboratoire de recherche en environnement et Santé LRES, faculté de médecine, Université Djillali Liabès, Sidi Bel Abbès, Algérie

Avant-propos

Ce cours s'adresse aux étudiants du deuxième cycle qui suivent un cursus de biologie et physiologie de la reproduction et de biologie et physiologie cellulaire. Afin de mieux appréhender l'ensemble des connaissances présentées dans ce support, l'étudiant doit disposer de connaissances de base en génétique, biologie cellulaire et moléculaire. Le contenu de ce support est scindé en cinq chapitres, qui partent des notions de bases concernant les cellules souches aux mécanismes complexes qui gèrent la détermination du destin cellulaire et la différenciation de cellules sans aucune spécificité structurelle ou fonctionnelle en cellules hautement spécialisées. Les principaux points pris en considération sont les facteurs et les mécanismes moléculaires impliqués dans le processus de transformation de cellules souches en cellules différenciées. Nous traitons deux principaux exemples, les cellules souches hématopoïétiques et les cellules souches germinales primordiales qui suivent au départ le même chemin de détermination avant de s'engager dans des voies différentes leur permettant d'acquérir des caractéristiques particulières qui leur sont propres. A l'issue de ce cours, l'étudiants sera capable de comprendre ces mécanismes, leurs conséquences sur le plan épigénétique et de se familiariser avec les possibles applications de ces concepts dans le domaine de la recherche en sciences médicales. Une deuxième partie de ce cours traitera de la notion des cellules souches adultes, les applications thérapeutiques des cellules souches et les enjeux éthiques y afférents.

BENALIA Abdelkrim, Mars 2022

Sommaire :

Chapitre I : Notion de cellule souche

I.	Introduction	1
II.	Définition de cellule souche.....	1
II.1	Types de cellules souches	1
II.1.1	Les cellules souches embryonnaires.....	2
II.1.2	Les cellules souches fœtales.....	2
II.1.3	Les cellules souches adultes.....	3
III.	Rôles physiologiques des cellules souches.....	5
IV.	Les degrés de potence cellulaire	6
IV.1	Cellules souches totipotentes	6
IV.2	Cellules souches pluripotentes	6
a.	Les cellules embryonnaires de carcinome (ECC)	6
b.	Les cellules souches embryonnaires (ESC).....	6
c.	Les cellules souches de l'épiblaste (EpiSC).....	7
d.	Les cellules germinales primordiales (PGC).....	7
IV.3	Cellules souches multipotentes	7
IV.4	Cellules souches unipotentes.....	7
V.	Notion de plasticité cellulaire	7

Chapitre II: L'embryologie humaine

I.	Introduction	10
II.	Principales étapes de l'embryogenèse chez l'homme.....	10
II.1	La segmentation.....	10
II.2	La formation du blastocyste	10
II.3	La prégastrulation.....	11
II.4	La gastrulation.....	11
II.5	L'organogenèse	12
III.	Devenir d'une cellule au cours de l'embryogenèse.....	13
IV.	Notion de détermination et du lignage cellulaire	13
IV.1	La détermination cellulaire.....	13
IV.1.1	Mécanismes d'hétérochromatinisation	14
IV.2	Le lignage cellulaire.....	15
V.	La différenciation cellulaire.....	16
VI.	Modalités de détermination et de différenciation cellulaire	16

VI.1	Division mitotiques asymétriques	16
VI.2	Induction de détermination/différenciation	16
VI.3	Expression des facteurs de transcription.....	17

Chapitre III: Modèle de cellules souches hématopoïtiques

I.	Introduction	19
II.	Les éléments figurés du sang	19
II.1	Caractéristiques généraux des éléments figurés	19
II.1.1	Les globules rouges.....	19
II.1.2	Les plaquettes	20
II.1.3	Les globules blancs.....	20
II.1.4	Aspect des différents types de leucocytes sous microscope optique :	22
III.	L'hématopoïèse.....	22
III.1	Ontogenèse des cellules souches hématopoïétiques	22
III.2	Chronologie et sites de l'hématopoïèse.....	23
III.2.1	Avant la 6 ^{ème} semaine	23
III.2.2	De la 6 ^{ème} semaine au 6 ^{ème} mois.....	24
III.2.3	Du 6 ^{ème} mois à la naissance	24
III.2.4	A l'enfance.....	24
III.2.5	De l'enfance à l'âge adulte	24
III.3	Déroulement de l'hématopoïèse	25
III.3.1	Notion de progéniteurs	25
III.3.2	Les blastes :	26

Chapitre IV : Microenvironnement et régulation de l'hématopoïèse

I.	Introduction	29
II.	Stroma médullaire et niches hématopoïétiques	29
II.1	Notion de niche hématopoïétique	30
II.2	Types de niches hématopoïétiques.....	30
II.2.1	Les niches ostéoblastiques.....	31
II.2.2	Les niches vasculaires.....	31
III.	Hématopoïèse et facteurs de croissance hématopoïétiques	32
III.1	Processus contrôlés par les facteurs hématopoïétiques	32
III.2	Classification des facteurs de croissance hématopoïétiques selon leurs cibles.....	33

Chapitre V: Gamètes et cellules souches

I.	Introduction.....	36
II.	Déterminisme génétique du sexe.....	36
III.	Première étape (développement identique chez les deux sexes).....	37
III.1	Ontogenèse des cellules germinales primordiales.....	38
III.1.1	Origine des CGP.....	38
III.1.2	Etapas de l'ontogenèse des CGP.....	39
III.1.3	Caractéristiques des CGP.....	44
III.1.4	Marqueurs moléculaires des CGP.....	44
IV.	Différenciation des gonades.....	45
IV.1	Chez le mâle.....	45
IV.2	Chez la femelle.....	46
IV.3	Différences entre les deux voies de différenciation Masculine et féminine des CGP.....	46
V.	Différenciation des gonades.....	47
V.1	A partir de la 6 ^{ème} semaine de la vie embryonnaire.....	47
V.1.1	Chez la femelle :.....	47
V.1.2	Chez le mâle :.....	48
VI.	Production des gamètes femelles <i>in vitro</i>	48
VI.1	Cycle entier <i>in vitro</i> des gamètes femelles.....	48
VI.1.1	Inconvénient des ovocytes produits <i>in vitro</i>	49
VI.2	Production des spermatides <i>In vitro</i>	50

Références bibliographiques

Chapitre I : Notion de cellule souche

I. Introduction

La capacité d'un ver de terre, ou d'une planaire à régénérer en entier, son corps amputé à partir de l'une de ces parties est sans doute un phénomène spectaculaire qui suscite notre curiosité. De plus, chez des animaux plus complexes comme le lézard, de telles capacités de régénération sont de même conservées. Un lézard qui sacrifie sa queue pour échapper un prédateur, ne tarde pas à l'efficacement régénérer.

Bien qu'une régénération d'une telle importance semble être impossible chez les animaux supérieurs, ils ont de même une capacité de réparation et de renouvellement cellulaire qui fait partie de leur fonctionnement physiologique normal.

Les différents organismes multicellulaires sont donc dotés d'une capacité de régénération qui s'exprime avec des niveaux plus au moins importants à partir d'un type particulier de cellules régénératrices; les cellules souches.

II. Définition de cellule souche

Au sens large, les cellules souches sont des cellules indifférenciées capables de donner naissance à un ou plusieurs types de cellules matures (différenciées) en suivant une voie de différenciation.

Cette définition inclus de même les cellules souches embryonnaires, à partir desquelles un nouveau individu peut être formé en entier.

Les cellules souches sont des cellules indifférenciées, capables de se multiplier à l'identique et de se différencier en cellules spécialisées. La prolifération des cellules souches assurent leur auto-renouvellement (ce qui leur confère une immortalité virtuelle).

NB : *In vivo*, la prolifération des cellules souches embryonnaires est limitée dans le temps.

II.1 Types de cellules souches

Il existe plusieurs types de cellules souches selon le moment et la procédure de leur obtention ; dont on distingue :

II.1.1 Les cellules souches embryonnaires

Ce sont des cellules souches obtenues tout au début du développement embryonnaire à partir du bouton embryonnaire du **blastocyste** (voir chapitre II).

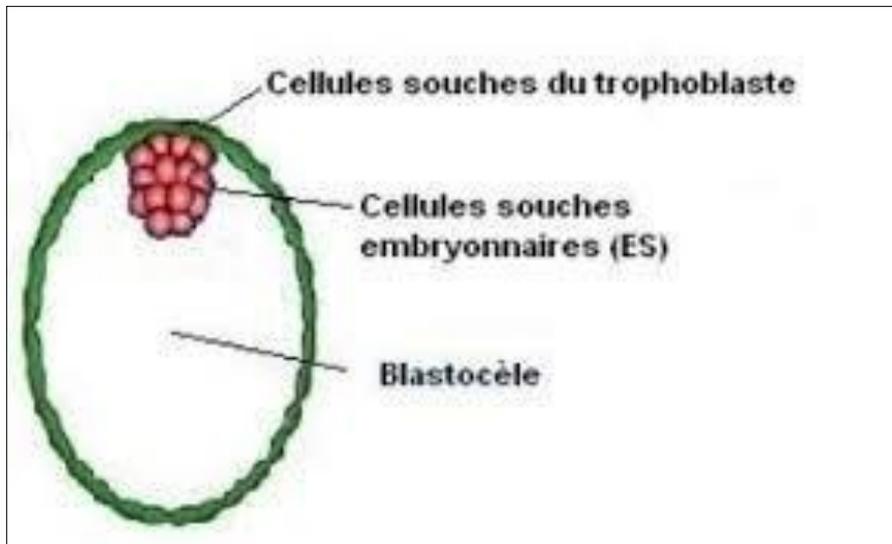


Figure 1 Les cellules souches embryonnaires

II.1.2 Les cellules souches fœtales

Il est bel et bien évident qu'au cours du développement embryonnaire ultérieur et du développement fœtal, un grand nombre de cellules sont à des niveaux plus au moins avancés de différenciations, et que certaines cellules gardent des propriétés permettant de les considérer comme des cellules souches fœtales. Dans le domaine de la recherche scientifique, les fœtus avortés spontanément constituent une source de cellules souches fœtales qui font l'objet de plusieurs travaux de recherche en médecine régénérative.

Exemples de cellules souches fœtales : Les cellules germinales primordiales, les précurseurs hématopoïétiques, les cellules souches neurales...etc.

II.1.3 Les cellules souches adultes

Chez l'adulte, des cellules souches d'une capacité moindre en terme de potentiel à générer des cellules spécialisées sont localisées un petit peu partout dans l'organisme.

La plupart des cellules somatiques différenciées de l'organisme ont une courte durée de vie et doivent être remplacées continuellement afin de rajeunir les différents tissus et organes correspondants.

-Les cellules souches adultes assurent donc le remplacement des cellules mortes et maintenir ainsi une homéostasie cellulaire indispensable à la survie de l'organisme entier.

II.1.3.1 Exemples de cellules souches adultes

Les cellules souches hématopoïétiques qui remplacent les **éléments figurés du sang*** dont les durées de vie sont variables :(neutrophiles : 6-10 jours, plaquettes : 10 jours, hématies 120 jours...etc).

***Les éléments figurés du sang** correspondent aux différentes cellules composant le sang, et qui sont en suspension dans un liquide ; le plasma sanguin.

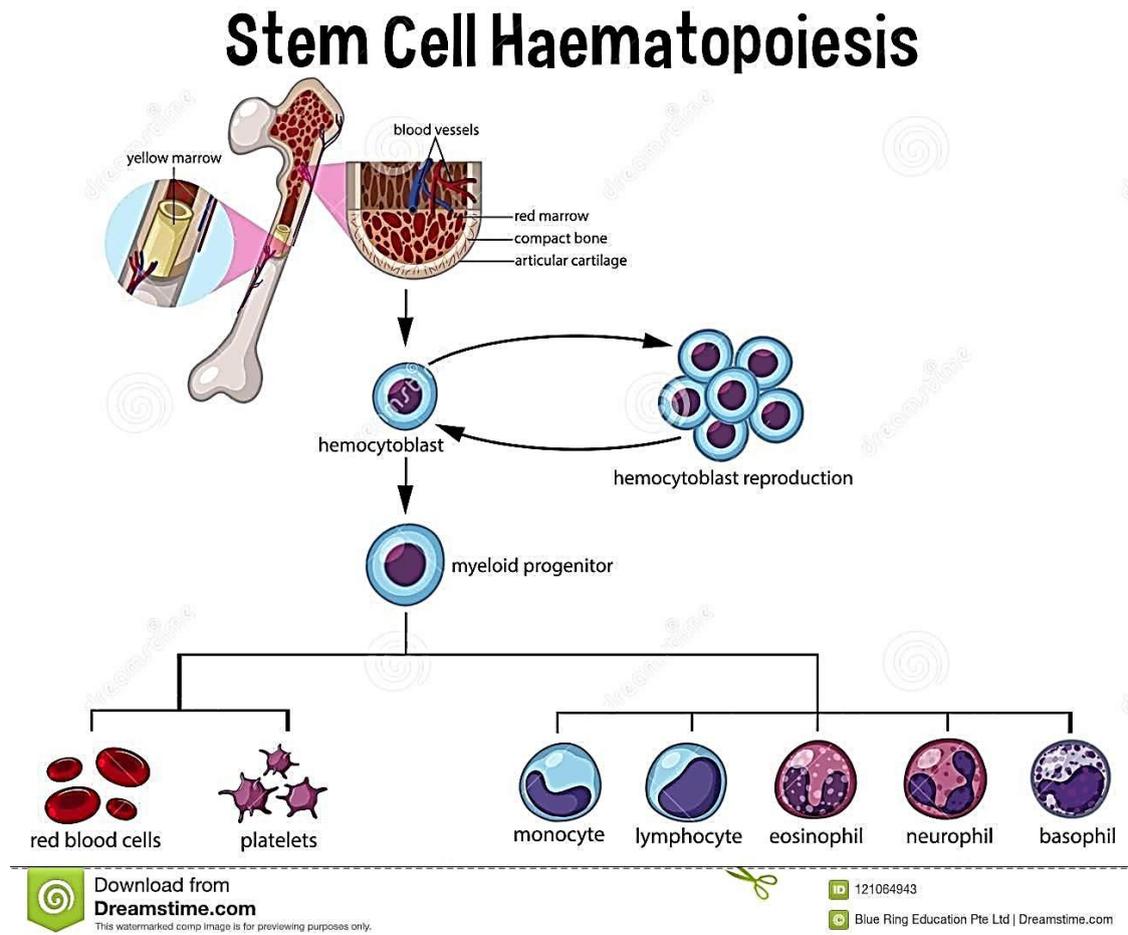


Figure 2 Les cellules souches hématopoïétiques et les éléments figurés du sang

II.1.3.2 Les cellules souches de la peau

La peau constitue la première ligne de défense et de protection du corps contre les différentes agressions venant de son environnement. L'épiderme, la couche la plus externe de la peau est composée de kératinocytes qui lui confèrent des propriétés d'imperméabilité et de résistance mécanique.

Elles doivent être remplacées continuellement, à partir des cellules souches de la peau : Les kératinocytes du stratum germinativum (ou stratum basale), la couche la plus profonde de l'épiderme.

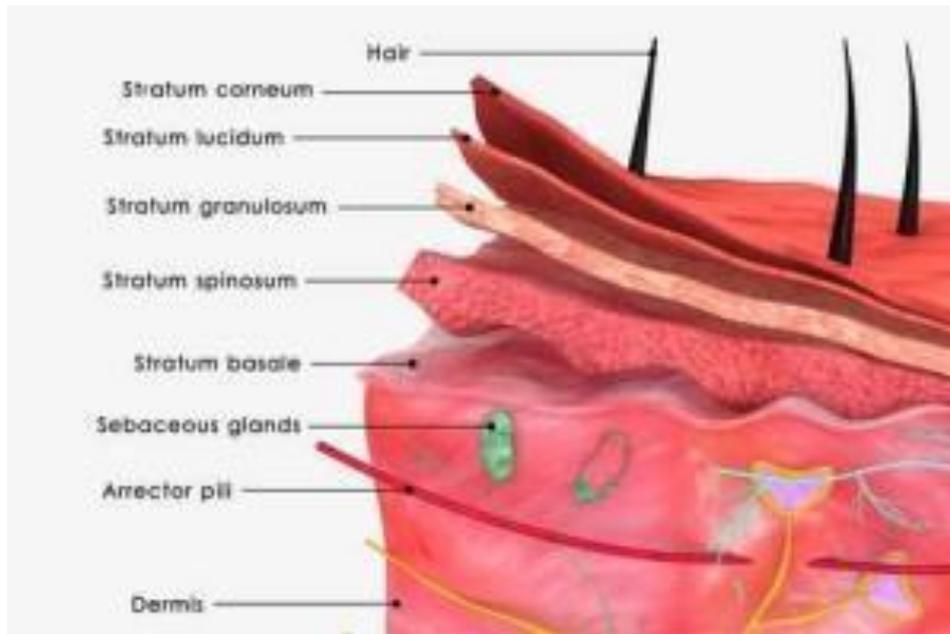


Figure 3 Les différentes couches (stratum) de l'épiderme

II.1.3.3 Les cellules souches pluripotentes induites

Les cellules souches pluripotentes induites (SCPi) sont des cellules souches issues de cellules somatiques spécialisées, suite à un traitement particulier impliquant des facteurs de croissance et de transcription permettant la **dédifférenciation*** des cellules somatiques en cellules souches pluripotente *in vitro*.

*La **dédifférenciation** désigne la perte des caractères de cellules somatiques différenciées qui retournent vers un état comparable à celui des cellules souches embryonnaires (cellules non différenciées).

III. Rôles physiologiques des cellules souches

Les cellules souches ont pour rôles :

- ✓ La production de toutes les cellules de l'organisme, différenciées ou non, au cours du développement embryonnaire et fœtal.
- ✓ Chez l'adulte, elles ont un rôle de renouvellement naturel d'un grand nombre de cellules spécialisées renouvelables

(notamment les cellules du sang, de l'épithélium intestinal et de l'épiderme).

- ✓ Elles assurent une fonction de réparation de quelques tissus et organes.
- ✓ Elles assurent l'homéostasie cellulaire en remplaçant les cellules mortes.
- ✓ En s'auto-renouvelant, elles assurent une source inépuisable de cellules souches dans l'organisme.

IV. Les degrés de potence cellulaire

Selon leur degré de potence cellulaire, désignant leur capacité de différenciation en un ou plusieurs autres types de cellules spécialisées, les cellules souches sont classées en :

IV.1 Cellules souches totipotentes

Il s'agit d'un cas particulier correspondant aux premières cellules (blastomères) issues de la division de l'œuf fécondé (le zygote). Chez l'homme, la totipotence est conservée jusqu'au stade 8 blastomères. Elle désigne la capacité de donner les différents types de cellules de l'embryon ainsi que de ces annexes (le placenta ; l'allantoïde...etc).

IV.2 Cellules souches pluripotentes

Ce sont les cellules souches embryonnaires qui sont dotées de cette capacité. La pluripotence correspond à la capacité d'une cellule à donner tous les types cellulaires de l'embryon. Il existe en fait, cinq type de cellules pluripotentes :

a. Les cellules embryonnaires de carcinome (ECC)

Elles se développent à partir de cellules tumorales issues de tératocarcinomes (tumeur maligne des gonades).

b. Les cellules souches embryonnaires (ESC)

Issues du bouton embryonnaires (voir plus haut).

c. Les cellules souches de l'épiblaste (EpiSC)

Au début du développement embryonnaire, le bouton embryonnaire se divise en deux disques superposés, l'épiblaste et l'hypoblaste. L'épiblaste est en effet pluripotent, et formera plus tard lors du développement embryonnaire, trois autres feuillettes (mésoderme, endoderme et ectoderme) à l'origine de tous les tissus et organes de l'embryon.

d. Les cellules germinales primordiales (PGC)

Les cellules germinales primordiales (PGC) sont les précurseurs des cellules souches germinales (ovogonies et spermatogonies). Avant de coloniser l'ébauche des organes génitaux et se différencier en cellules souches germinales, les PGC sont pluripotentes.

e. Les cellules pluripotentes induites (CSPi) (voir plus haut)**IV.3 Cellules souches multipotentes**

Ce sont les cellules capables de se différencier en un certain nombre de cellules faisant partie du même tissu (Cas des cellules souches hématopoïétiques).

IV.4 Cellules souches unipotentes

Ce sont des cellules souches qui ne se différencient qu'en un seul type de cellules spécialisées (Les spermatogonies, les kératinocytes...etc).

V. Notion de plasticité cellulaire

-En biologie cellulaire, la plasticité désigne la capacité d'une cellule de modifier son identité et de se changer en un autre type cellulaire.

-Cette plasticité englobe donc les différents étapes de différenciation que les cellules souches subissent afin qu'elles deviennent spécialisées.

-L'état de cellule différenciée est lui aussi instable et peut suivre une reprogrammation conduisant son dédifférenciation en cellules souches.

-On peut dire ainsi d'une cellule souche pluripotente est plus plastique car

elle à un grand potentiel de différenciation en un grand nombre de cellules différenciées.

Il s'ajoute à ceci, la **transdifférenciation** qui est le processus par lequel un précurseur déjà engagé dans une voie de différenciation ou encore plus une cellule différenciée peut se transformer en un autre type cellule différenciée d'un autre type cellulaire.

La fusion cellulaire peut aussi être considérée comme un processus les

Exemple : la fusion des myoblastes pour former des fibres musculaires avec un grand nombre de noyaux.

<p>Plasticité cellulaire = différenciation, dédifférenciation, transdifférenciation, fusion cellulaire.</p>
--

Chapitre II : L'embryogenèse humaine

I. Introduction

Chez tous les organismes multicellulaires, l'ensemble des cellules qui les composent partagent le même programme génétique (ADN), caractéristique de chaque espèce, et c'est ainsi que la diversité est assurée dans le monde du vivant (Drosophile :6 chromosomes, rat 42 chromosomes, homme 46 chromosomes...etc)..

Bien que leur matériel génétique demeure inchangé, les cellules de la même espèce apparaissent cependant très différentes les unes des autres (différences structurelle et fonctionnelle). En effet, c'est au cours de l'embryogenèse que chaque groupe de cellules commencent à suivre une voie de développement qui détermine leur spécialisation sur le plan cellulaire tissulaire. A partir des cellules embryonnaires pluripotentes, toutes les cellules de l'organisme seront donc former en suivant divers programmes de différenciations en fonction des signaux intra et extracellulaires auxquels le matériel génétiques de la cellule est soumis. La conséquence sera donc une expression différents des gènes au sein des groupes cellulaires du même organisme ; leur attribuant des caractéristiques qui leur sont propres (synthèse de l'hémoglobine dans les globules rouges, de la testostérone dans les cellules de Leydig ou de l'insuline : celle bêta pancréatique, forme des neurones...etc).

II. Principales étapes de l'embryogenèse chez l'homme

II.1 La segmentation

Juste après la fécondation, le zygote (œuf fécondé) entre en une série de divisions mitotiques le segmentant en plusieurs blastomères. En fait, c'est l'étape de la segmentation qui aura lieu lors de la migration de l'œuf dans la trompe de Fallope vers le site de la nidation dans l'utérus (première semaine de développement chez l'homme).

II.2 La formation du blastocyste

Après plusieurs cycles de divisions, les blastomères devenant de plus de plus petit se trouvent compactés les uns contre les autres suite à l'expression de molécules d'adhérence cellulaire. Les cellules périphériques deviennent aplaties, expriment plus de molécules d'adhérence entre elles, et forment ensemble une couche périphérique appelée Trophoblaste (à l'origine d'une partie du placenta). Les cellules centrales forment cependant un amas de cellules au centre du blastocyste, appelée embryoblaste. Au 6^{ème} jour de développement embryonnaire, l'apparition d'une cavité remplie de

liquide au sein du blastocyste séparant en partie les deux structures (trophoblaste et embryoblaste) marque la fin de la blastulation.

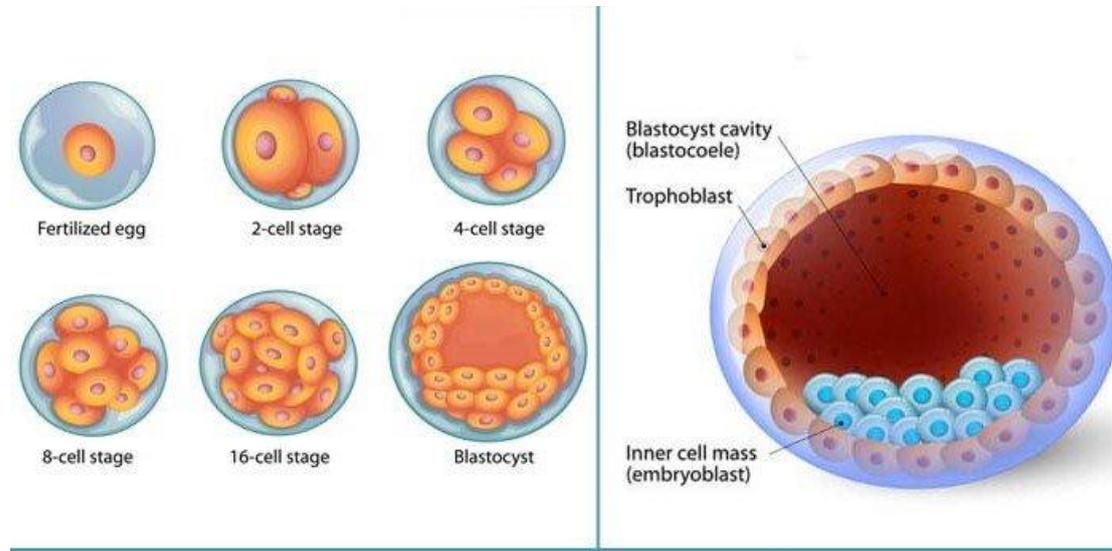


Figure 01 : segmentation et formation du blastocyste

II.3 La prégastrulation

L'embryoblaste, ou encore plus 'bouton embryonnaire' se transforme en un disque, et ne tarde pas à s'individualiser en deux couches, une externe, l'épiblaste et l'autre interne l'hypoblaste. Ces deux structures se forment au début de la deuxième semaine du développement lorsque l'embryon est en pleine nidation.

La prégastrulation prépare l'embryon pour la gastrulation, et la formation des annexes embryonnaires associées au placenta (Cavité amniotique, lécithocèle secondaire, cordon ombilical...etc).

II.4 La gastrulation

La gastrulation correspond à la transformation de l'embryon didermique en un embryon « tridermique » composé de trois feuilletts embryonnaires superposées qui seront à l'origine de tous les tissus et organes de l'embryon.

Au cours de la gastrulation, les cellules de l'épiblaste prolifèrent et migrent à travers la ligne primitive et le nœud de Hensen pour former juste en dessous de l'épiblaste, deux autres feuilletts :

- L'endoderme (qui remplace l'hypoblaste dégénérée)
- Le mésoderme (feuillettement nouvellement formé)

- Les cellules épiblastiques qui ne migrent pas constitue le troisième feuillet, l'ectoderme.

Une partie des cellules épiblastiques en migration se dirigent vers l'allantoïde, une structure extra-embryonnaire, pour le coloniser et former les cellules germinales primordiales (Cellules souches sexuelles) (Voir Chapitre V).

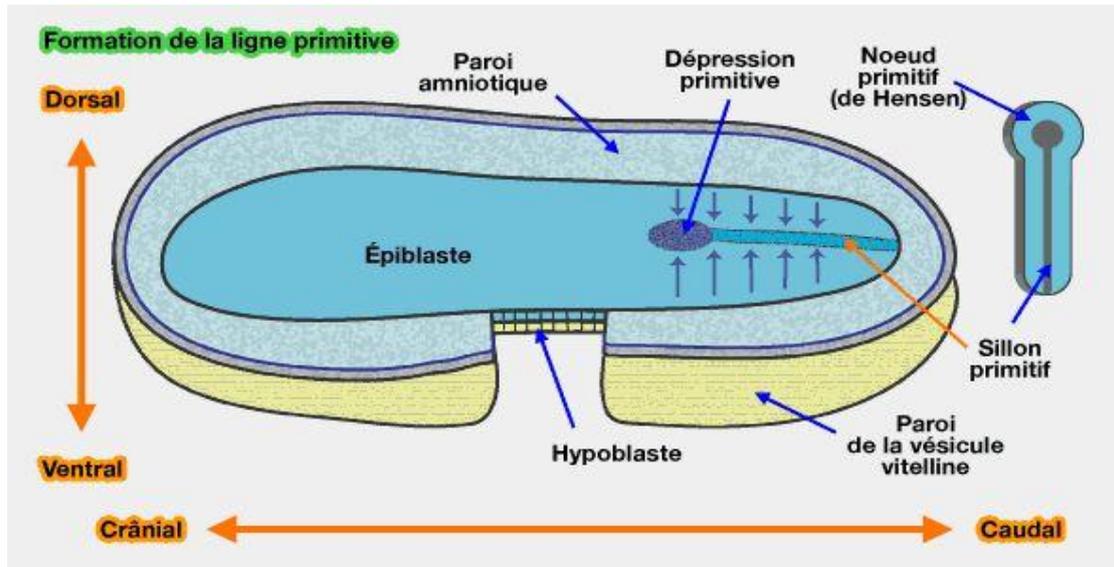


Figure 02 : Mécanisme de la gastrulation

II.5 L'organogenèse

L'organogenèse est la dernière étape de l'embryogenèse. A partir des trois feuillets formés lors de la gastrulation, l'ensemble des organes et systèmes de l'embryon seront formés. Chaque feuillet donne naissance à un certain nombre d'ébauches à partir desquels un groupe d'organes sera formé.

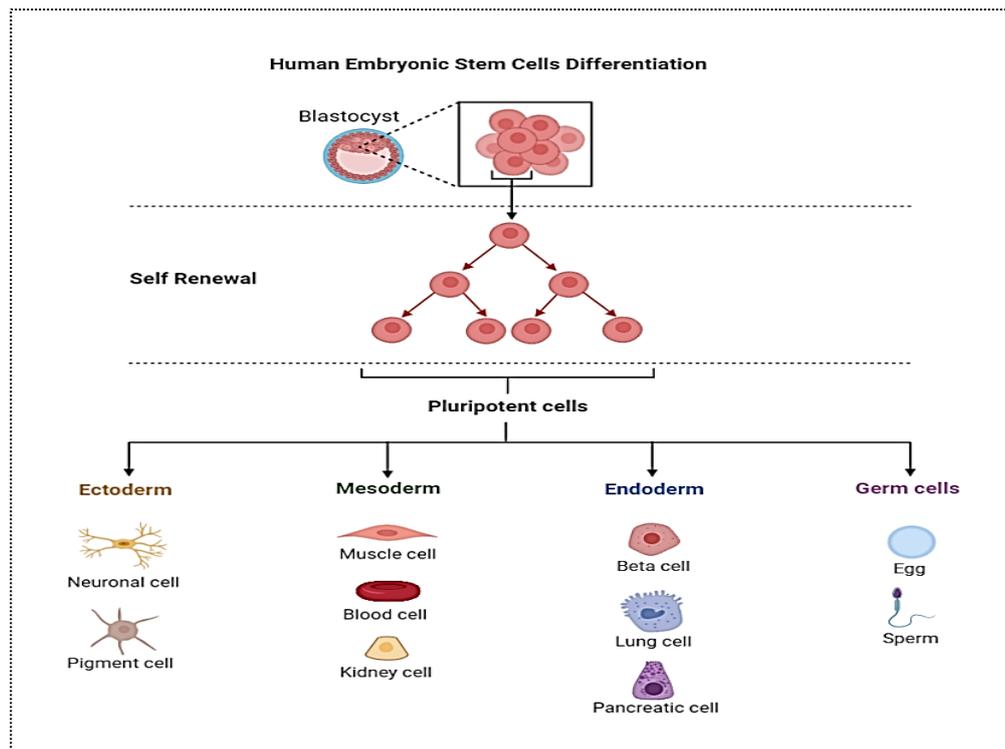


Figure 03 : Exemples de cellules issues des trois feuillets lors de l'embryogenèse

III. Devenir d'une cellule au cours de l'embryogenèse

Une cellule embryonnaire peut avoir trois destins en fonction de son microenvironnement et des signaux qu'elle reçoit au cours du développement :

- Elle peut continuer à proliférer par division mitotique (prolifération cellulaire)
- Elle peut suivre une voie de détermination et de différenciation (voir plus bas)
- Elle peut être éliminée par apoptose.

En réalité, ces trois destins cellulaires sont combinés pour permettre un bon développement embryonnaire.

IV. Notion de détermination et du lignage cellulaire

IV.1 La détermination cellulaire

La détermination d'une cellule souche correspond à son engagement dans un lignage cellulaire en limitant son potentiel de différenciation en terme de nombre de cellules spécialisées qu'elle peut s'en transformer.

Le passage des cellules souches d'un état de totipotence à un état cellulaire spécialisé nécessite le passage par plusieurs cycles de détermination suivies d'une différenciation.

Exemple :

- ✚ Détermination cytotrophoblastique et embryoblastique (voir plus haut)
- ✚ Détermination des feuilletts embryonnaires
- ✚ Détermination des lignages cellulaires à partir des feuilletts embryonnaires.

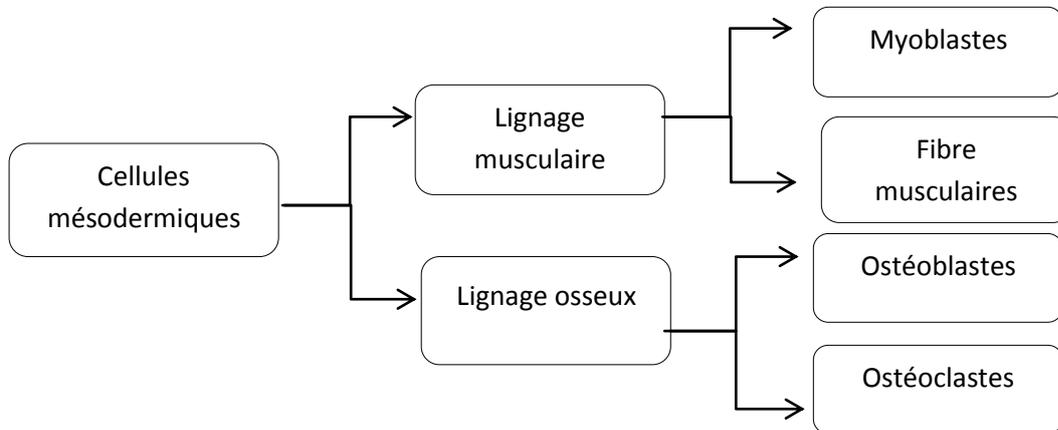


Figure 04 : Détermination et différenciation du mésoderme.

A chaque cycle de détermination qui se produit, une cellule déterminée ne peut plus être à l'origine que d'un nombre limité de types cellulaires ayant des caractéristiques proches.

L'acquisition par la cellule d'un état déterminé est un phénomène progressif et irréversible. Ce passage progressif de cellules souches totipotentes à des cellules de moins de moins potentes est dû à une **hétérochromatinisation** qui limite leur capacité d'expression génétique progressivement.

Néanmoins, les cellules déterminées n'ont pas une spécificité structurelle et/ou fonctionnelle bien distincte.

IV.1.1 Mécanismes d'hétérochromatinisation

L'hétérochromatinisation correspond à la transformation d'Euchromatine en hétérochromatine)

Euchromatine : La partie de la chromatine cellulaire exprimée par la cellule. Autrement dit, c'est la partie de la chromatine qui constitue le génome cellulaire actif, accessible aux enzymes de transcription (ARN polymérase). Elle a un aspect clair sous microscope électronique.

Hétérochromatine : Elle est divisée en deux types :

L'hétérochromatine constitutive : très compacte, elle ne contient pas de gènes dès le départ, et ne change pas son état quel que soit le stade de développement dans lequel se trouvent les cellules d'un organisme.

L'hétérochromatine facultative : Au départ euchromatine, elle se transforme en hétérochromatine au cours du développement en fonction des facteurs de développement que la cellule reçoit. Son état d'hétérochromatinisation est réversible dans des situations particulières comme la « transdifférenciation », ou lors de la production des cellules souches pluripotentes induites (voir chapitre I).

L'hétérochromatinisation est assurée par deux principaux mécanismes :

Dé-acétylation des histones :

Les molécules d'ADN sont chargées négativement. Les histones de la euchromatine sont acétylées (ajout de radical acétyle) afin de supprimer la charge électrique positive de ces protéines qui risque de créer une force d'attraction de l'ADN, et donc d'un état compacté de ce dernier.

Sous cette forme, l'ADN est "relaxé" et accessible aux enzymes de transcription.

La dé-acétylation des histones résulte en une récupération de charge positive (+), et un état compacté de la chromatine par attraction électrique entre Histones et ADN.

Le résultat de la dé-acétylation c'est donc la transformation de l'euchromatine en hétérochromatine facultative ce qui va rendre l'information génétique inaccessible.

Méthylation d'ADN

La fixation d'un groupement méthyle sur les Cytosines de l'ADN concurrencent la liaison des ARN polymérase sur l'ADN.

Résultat : Répression de la transcription de l'ADN.

IV.2 Le lignage cellulaire

Un lignage cellulaire correspond à l'ensemble des cellules déterminées appelées précurseurs cellulaires, et qui aboutissent à la formation de cellules spécialisées après une différenciation.

Un lignage cellulaire remonte jusqu'aux cellules souches embryonnaires à l'origine des cellules différenciées.

Exemple de lignage cellulaire :

Lignage de lymphocyte B : Cellule souche embryonnaire.....cellule épiblastique.....cellule mésodermique.....cellule souche hématopoïétique..... cellule souche lymphoïde.....pré-lymphocyte B.

V. La différenciation cellulaire

La différenciation cellulaire se traduit par un passage de la cellule à un état hautement spécialisées sur le plan structurel et fonctionnel.

Cette différenciation cellulaire est facilement remarquable lors que des cellules différenciées sont étudiées. La distinction entre des fibres musculaires et des hépatocytes, des cellules adipeuses ou nerveuses peut se faire par simple observation microscopique.

VI. Modalités de détermination et de différenciation cellulaire

VI.1 Division mitotiques asymétriques

Les divisions cellulaires asymétriques aboutissent à la formation de cellules filles aux caractéristiques différentes par un partage inégal de déterminants de différenciation.

VI.2 Induction de détermination/différenciation

Elle se fait par une communication entre les cellules suivant plusieurs mécanismes :

- Induction paracrine (Facteurs de croissance : IFG, EGF, BMP, TGF...etc)
- Induction autocrine (Exemple : Effet des produits du gène SOX9 sur les cellules de Sertoli qui l'expriment: Voir chapitre V).
- Induction directe via des molécules d'adhérences (Exemple : individualisation du trophoblaste).

VI.3 Expression des facteurs de transcription

Un facteur de transcription est une protéine qui se fixe sur une séquence spécifique de l'ADN pour contrôler la transcription de ces gènes en impliquant des voies de signalisation intracellulaires.

Les facteurs de transcription, et en fonction du microenvironnement cellulaire, activent ou inhibent le recrutement de l'ARN polymérase sur des gènes spécifiques induisant ainsi une spécificité de l'expression du génome dans les différentes cellules.

**Chapitre III : Modèle des cellules souches
hématopoïétiques**

I. Introduction

Le sang est un liquide vital qui circule en permanence dans le corps afin d'assurer un grand nombre de fonctions à savoir les échanges gazeux, la nutrition et l'épuration, ainsi que la défense immunitaire de l'organisme et son homéostasie.

En effet, le sang est composé de cellules sanguines en suspension dans un liquide appelé plasma. Si le plasma est considéré comme une matière extracellulaire dans laquelle les cellules sanguines sont émergées, cela permet de comparer le sang à un tissu conjonctif. La particularité du sang est que sa matrice extracellulaire est de consistance fluide, et Il est considéré donc comme un tissu particulier ; « Un tissu conjonctif liquide ».

Assurant un grand nombre de fonctions, les cellules sanguines sont sujettes à un renouvellement continu à partir de cellules souches dites « hématopoïétiques ».

II. Les éléments figurés du sang

Les cellules sanguines en suspension dans le plasma, et représentant 45% du volume total du sang (correspondant à l'hématocrite) sont connues sous le nom d'éléments figurés du sang.

Les éléments figurés du sang sont : Les globules rouges, les globules blancs, et les plaquettes.

II.1 Caractéristiques généraux des éléments figurés

II.1.1 Les globules rouges

Appelé aussi, hématies ou érythrocytes, ce sont des cellules anucléées. Leur noyau est éjecté après pycnose lors de leur différenciation afin de laisser sa place à l'hémoglobine, la protéine assurant les échanges gazeux.

Rôle : Le rôle des hématies est d'assurer le transport de l'oxygène et du gaz carbonique (échanges gazeux) entre les alvéoles des poumons et les différents tissus de l'organisme.

Nombre : Leur nombre varie selon le sexe et l'âge, Ils sont compris entre 3.9

et $6.5 \times 10^{12}/L$.

Durée de vie : 120 jours

II.1.1.1 Forme et aspect sous microscope optique :

Ils ont la forme d'un disque biconcave (observable par microscopie électronique) de 6-8 μm de diamètre. Sous microscope optique, après coloration à MGG (May-Grünwald Giemsa), Elles correspondent à des cellules anucléées très abondantes et colorées en orange.

II.1.2 Les plaquettes

Appelés aussi thrombocytes, elles sont Issues d'une fragmentation cellulaire au cours de leur différenciation. Ces fragments cellulaires anucléés mesurent entre 0.5 et 3 μm de diamètre.

Rôle : Elles assurent un rôle d'hémostase. Leur agrégation en présence de la fibrine permet de fermer les plaies. De même, elles secrètent un certain nombre des cytokines, notamment le thromboxane, "un vasoconstricteur".

Nombre : 100-400 $\times 10^9/L$

Durée de vie : 10 jours.

II.1.2.1 Aspect sous microscope optique :

Toujours par coloration MGG, les plaquettes ont une allure de fragments fusiformes de couleur rose vif.

II.1.3 Les globules blancs

Les globules blancs ou leucocytes sont une population hétérogène de plusieurs types de cellules, de formes différentes et de fonctions diverses.

Nombre : Le nombre total des leucocytes incluant tous les types cités ci-dessous est compris entre 2 et $10 \times 10^9 /L$ en situation normale.

Fonction : Ensemble, ils assurent la fonction immunitaire de l'organisme. Les leucocytes recrutés varient en fonction de la nature de l'agent pathogène.

II.1.3.1 Les monocytes :

Ce sont des cellules volumineuses par rapport aux autres éléments figurés du sang, mesurant entre 12-20 μm .

Nombre : Ils représentent 2 à 10% des leucocytes.

Fonction : Ils jouent un rôle de phagocytose.

Durée de vie : 20-40 heures.

II.1.3.2 Les Granulocytes

Ils sont appelés ainsi à cause de la présence dans leur cytoplasme d'un grand nombre de granules leur attribuant un aspect granuleux sous microscope optique. On les appelle aussi, polynucléaire, car leur noyau est composé de plusieurs lobes.

Nombre : Ils représentent 40 à 80% des leucocytes.

-Selon leur aspect microscopique, on distingue trois types principaux de polynucléaires :

Les polynucléaires éosinophiles, neutrophiles et basophiles. Leur diamètre est compris entre 12-15 μm .

Rôle :

Neutrophile : Phagocytose

Basophile : Réaction allergique.

Éosinophile : Défense antiparasitaire

Durée de vie :

Neutrophile : 6-10 heures. Basophile : Quelques jours. Éosinophile Quelques jours.

II.1.3.3 Les lymphocytes

Les lymphocytes sont des cellules mononucléées avec une durée de vie très variable. Ils mesurent entre 7-9 μm au repos, et entre 12-20 μm une fois activés.

Nombre : Ils représentent 20 à 40% des leucocytes.

Rôle : Les lymphocytes, T et B sont impliqués dans la réponse immunitaire spécifique (adaptative), humorale et cellulaire.

Durée de vie : Quelques semaines à quelques années (Quelques années pour les

cellules mémoires).

II.1.4 Aspect des différents types de leucocytes sous microscope optique :

a. Les monocytes : Ils sont arrondis, avec un noyau volumineux en forme de fer à cheval (en forme d'haricot). Leur cytoplasme présente quelques granulations.

b. Les polynucléaires éosinophiles

-Ils ont un noyau le plus souvent bilobé (2 lobes). A une coloration MGG, leur cytoplasme d'aspect granuleux, apparaît en orange car le contenu de leurs granules (substances de pH basique) fixe les colorants acides. On dit alors qu'ils sont acidophiles.

c. Les polynucléaires basophiles :

-En microscopie optique, le noyau des basophiles est volumineux et irrégulier. Ils sont caractérisés par la présence d'un grand nombre de granulations contenant essentiellement de l'histamine. Cette dernière, étant acide, fixe d'avantage les colorants basiques (Bleu de méthylène et azur de méthylène), donnant ainsi au cytoplasme des basophiles une coloration bleue foncée qui masque souvent le noyau de la cellule, de la même couleur.

d. Les polynucléaires neutrophiles :

Ils sont plus abondants par rapport aux autres leucocytes. Leur noyau est généralement trilobé mais il peut présenter jusqu'à 5 lobes. Etant de pH neutre, leur granulation fixe à la fois les colorants basiques et acides et prennent ainsi une coloration violacée.

III. L'hématopoïèse

L'hématopoïèse est un processus complexe incluant des séries de divisions cellulaires et de différenciations aboutissant à la formation de l'ensemble des éléments figurés du sang à partir de cellules souches appelées « Cellules souches hématopoïétiques » (CSH).

Ce processus débute dès les premières semaines de la vie embryonnaire et assure dès lors un renouvellement continu des éléments figurés du sang tout au long de la vie.

III.1 Ontogenèse des cellules souches hématopoïétiques

Il a été bien pensé que, comme les cellules germinales primordiales, les cellules souches hématopoïétiques naissent dans le sac vitellin (une structure extra embryonnaire) et colonisent après les sites transitoires et définitifs de l'hématopoïèse.

L'embryologie expérimentale sur des embryons de poulet et de cailles a permis d'exclure le sac vitellin des éventuelles sources des précurseurs des CSH (Il sera colonisé par ces derniers : voir plus bas).

Le site réel de la production des premières cellules souches hématopoïétiques correspond à une structure commune : L'Aorte-gonade-mésonephros à partir de cette structure naît des cellules dites « Hémangioblastes ».

Il est bien établi que ces cellules constituent une origine commune du foie, de la rate et de l'os.

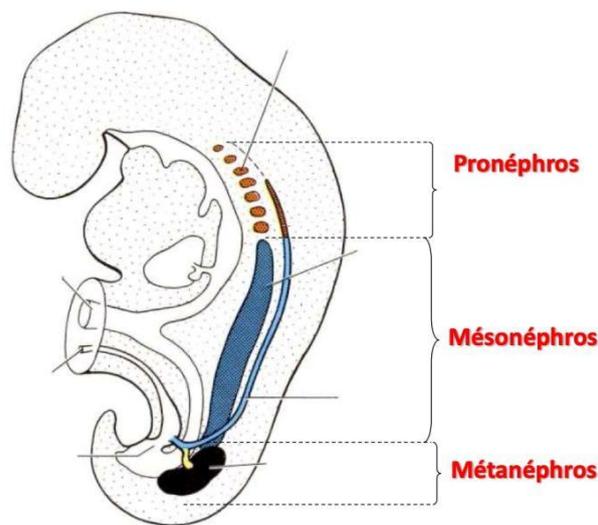


Figure 1 Emplacement du mésonephros dans l'embryon humain.

III.2 Chronologie et sites de l'hématopoïèse

III.2.1 Avant la 6^{ème} semaine

Tout au début de la vie embryonnaire, le sac vitellin, avant sa régression, est colonisé par les CSH, qui y forment des îlots sanguins dans

lesquels les premiers éléments figurés du sang embryonnaire seront formés.

III.2.2 De la 6^{ème} semaine au 6^{ème} mois

Ensuite, de la 6^{ème} semaine au 6-7^{ème} mois de la vie embryonnaire, le foie et la rate prennent le relai et remplacent le sac vitellin pour assurer la production des cellules sanguines.

III.2.3 Du 6^{ème} mois à la naissance

Après quoi, la moelle osseuse devient le site principal de l'hématopoïèse jusqu'à la naissance.

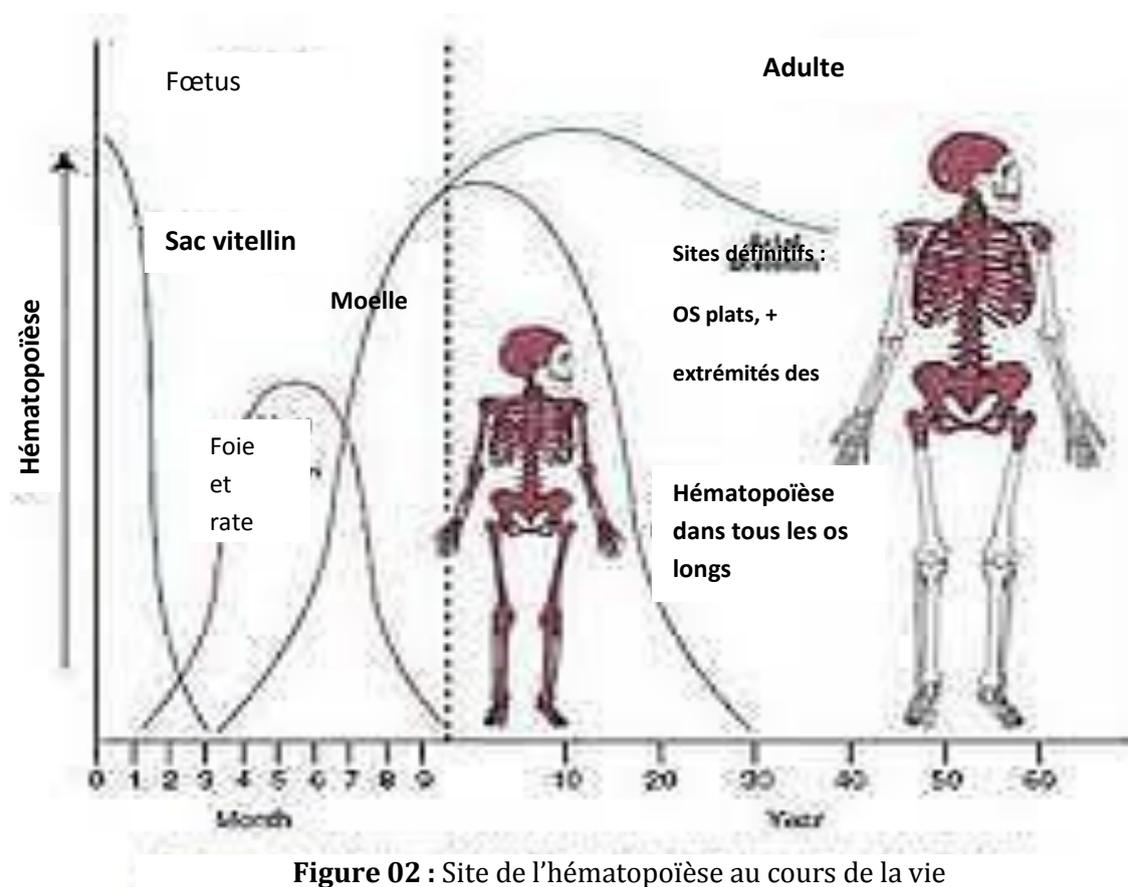
III.2.4 A l'enfance

A l'enfance, l'hématopoïèse concerne presque toute la moelle osseuse

III.2.5 De l'enfance à l'âge adulte

Pendant la croissance osseuse, de l'enfance à la puberté, la moelle osseuse sera remplacée progressivement par un tissu graisseux (moelle jaune) dans les os long.

-Chez l'adulte, la moelle osseuse concernée par l'hématopoïèse (moelle rouge) est confinée dans les extrémités proximales des os longs (Fémur et Humérus) et les os plats (crânes, côtes, sternum, os iliaques...etc).



III.3 Déroulement de l'hématopoïèse

A partir des CSH, les premières divisions sont toujours asymétriques, assurant d'une part un auto-renouvellement des CSH, et de l'autre part la production des progéniteurs des cellules sanguines.

III.3.1 Notion de progéniteurs

Les progéniteurs hématopoïétiques sont des cellules issues de la CSH et engagées dans des lignées sanguines différentes. Leur potentiel de développement en cellules sanguines est de plus en plus limité. Les progéniteurs les plus précoces sont le progéniteur Myéloïde et le progéniteur lymphoïde.

III.3.1.1 progéniteur Myéloïde :

Il est appelé ainsi en se référant à la moelle osseuse dans laquelle l'hématopoïèse toute entière a lieu. Il donne naissance à l'ensemble des éléments figurés de sang excepté les lymphocytes.

III.3.1.2 progéniteur lymphoïde :

Il est à l'origine des lymphocytes et des cellules NK (Natural killer). Nécessitant une maturation ultérieure et assurant une immunité spécifique, les lymphocytes sont issus d'un précurseur commun ; le progéniteur lymphoïde.

III.3.1.3 Progéniteurs tardifs :

A partir de ces deux derniers, d'autres progéniteurs communs ou spécifiques seront formés, et ils assurent la production des éléments figurés du sang après une dernière différenciation.

-Les CFUs (Colony forming unit) sont des progéniteurs uniques ou communs à une ou à plusieurs éléments figurés.

Exemples :

Le CFU-E, et le progéniteur des érythrocytes.

Le CFU-GM et un progéniteur commun aux granulocytes et au monocyte.

III.3.2 Les blastes :

Ce sont les cellules à partir desquelles les cellules spécialisées sont formées après une dernière différenciation.

Exemples : Monoblaste, lymphoblaste B et T, myéloblaste ...etc.

Eléments figurés du sang

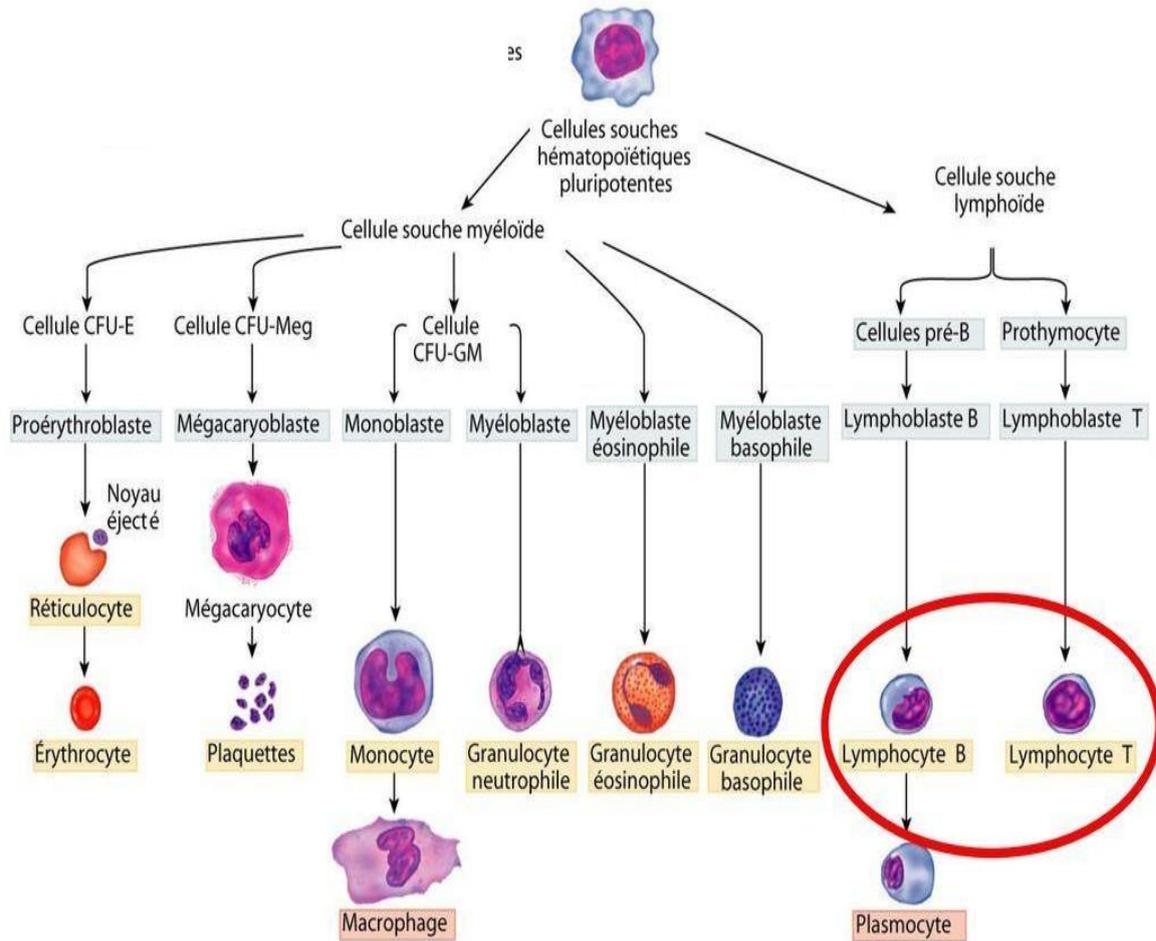


Figure 03 : Déroulement de l'hématopoïèse

**Chapitre IV : Microenvironnement et régulation
de l'hématopoïèse**

I. Introduction

A partir de la naissance où l'hématopoïèse concerne la quasi-totalité de la moelle osseuse, une régression des sites hématopoïétiques est associée à une transformation de la moelle rouge en moelle jaune dans les os longs, ce qui va aboutir à un confinement des cellules souches hématopoïétiques (CSH) dans des sites restreints dans le squelette central et les extrémités proximales des os longs.

Dans ces sites hématopoïétiques, les CSH se trouvent en association avec d'autres types cellulaires dont l'ensemble constitue les niches hématologiques. Un ensemble d'interactions entre les constituants des niches hématopoïétiques crée un microenvironnement de régulation de l'hématopoïèse via un certain nombre de signaux et d'interactions moléculaires. Ce microenvironnement est favorable à la survie, à l'autorenouvellement et à la différenciation des CSH.

II. Stroma médullaire et niches hématopoïétiques

On désigne par stroma médullaire l'ensemble des structures de soutien des CSH composé par une matrice extracellulaire et une association de cellules autres que les CSH. On distingue les cellules souches mésenchymateuses*, les fibroblastes, les cellules endothéliales, les ostéoblastes, les adipocytes (anciennes CSH transformées en adipocytes) et les macrophages résidents.

-Ces cellules interagissent avec les CSH et les progéniteurs hématopoïétiques afin d'assurer une régulation de l'hématopoïèse.

*** Les cellules souches mésenchymateuses :** sont des cellules progénitrices logées essentiellement dans la moelle osseuse et qui ont la capacité de se différencier en muscles, os et/ou cartilage. Autrement dit, ce sont des cellules souches communes du système locomoteur (appareil musculo-squelettique).

Moelle osseuse rouge (site de l'hématopoïèse) = Compartiment hématopoïétique + compartiment stromal

II.1 Notion de niche hématopoïétique

D'un point de vu général, une niche est un site anatomique contenant un ensemble de cellules souches qui agissent en réponse à des signaux émis par son microenvironnement, lui aussi sous le contrôle des facteurs systémiques.

Une cellule souche, se divise, suit un lignage déterminé et se différencie en réponse à ces signaux.

Les niches hématopoïétiques sont donc des CSH adultes en association avec des cellules du stroma médullaire avec lesquelles un ensemble de réactions sont possibles grâce aux facteurs de croissance et aux molécules d'adhésion assurant ce que l'on appelle « l'effet niche ».

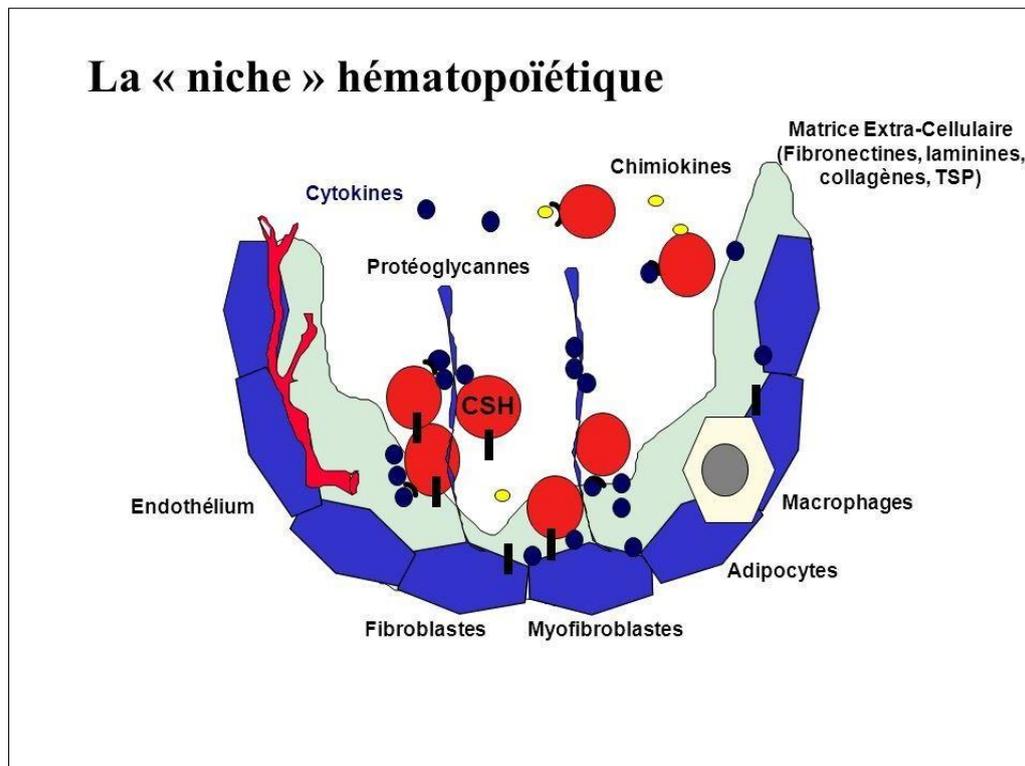


Figure 1 Niche hématopoïétiques et interaction CSH-Cellules stromales

II.2 Types de niches hématopoïétiques

En fonction de type des cellules qui bordent la niche, on distingue deux types de niche hématopoïétiques:

II.2.1 Les niches ostéoblastiques

Ce sont des niches très hétérogènes bordées par des ostéoblastes, des préostéoblastes et/ou des ostéocytes et des ostéoclastes. Ces cellules osseuses se trouvent associées à des adipocytes, des fibroblastes et des cellules souches mésenchymateuses dans la niche ostéoblastique (ou endostéale).

II.2.2 Les niches vasculaires

Ces niches sont présentes dans des régions très vascularisées de la moelle osseuse. Elles consistent en un réseau de sinusoides* (capillaires à paroi fine délimités par un endothélium) fenêtrés, formés par des cellules endothéliales provenant de cellules souches endothéliales (CSE). Le réseau capillaire maintiens une organisation fenêtrée qui permettent l'échange de cellules hématopoïétiques entre la circulation sanguine et la moelle osseuse.

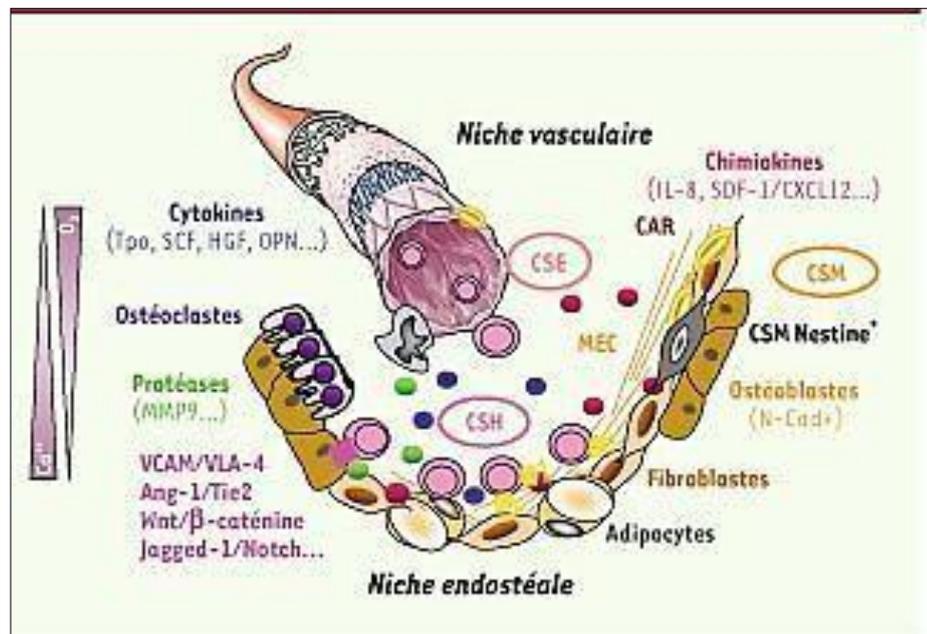


Figure 2 Organisation des niches hématopoïétiques ostéoblastique et vasculaire

* **Sinusoïdes** : Les sinusoïdes sont des capillaires sanguins de calibre irrégulier.

Ils présentent des pores et des zones de discontinuité entre les cellules endothéliales. Leur membrane basale est souvent discontinue. On dit donc qu'ils sont fenêtrés.

Exemples : Sinusoïdes hépatiques dans le foie, et les sinusoïdes médullaires dans la moelle osseuse.

III. Hématopoïèse et facteurs de croissance hématopoïétiques

Les facteurs de croissance hématopoïétiques sont un ensemble d'hormones glycoprotéiques et de cytokines qui assurent un dialogue entre les cellules stromales et les CSH dans les niches hématopoïétiques afin de contrôler le processus de l'hématopoïèse.

III.1 Processus contrôlés par les facteurs hématopoïétiques

Les facteurs hématopoïétiques contrôlent un certain nombre de processus cellulaires faisant partie de l'hématopoïèse ils peuvent induire, une prolifération, une détermination, une différenciation, une maturation, une activation fonctionnelle comme ils peuvent bloquer l'apoptose de la cellule. Ces facteurs contribuent au maintien d'un processus hématopoïétique normal et d'assurer une adaptation aux situations pathologiques.

Exemples :

1. Les signaux de la niche induisent, en association avec des signaux interne, une division asymétrique des cellules souches hématopoïétiques. Ils assurent ainsi, à partir des deux premières cellules filles :

✚ L'auto renouvellement de la SCH

✚ La production d'un progéniteur précoce (myéloïde ou lymphoïde).

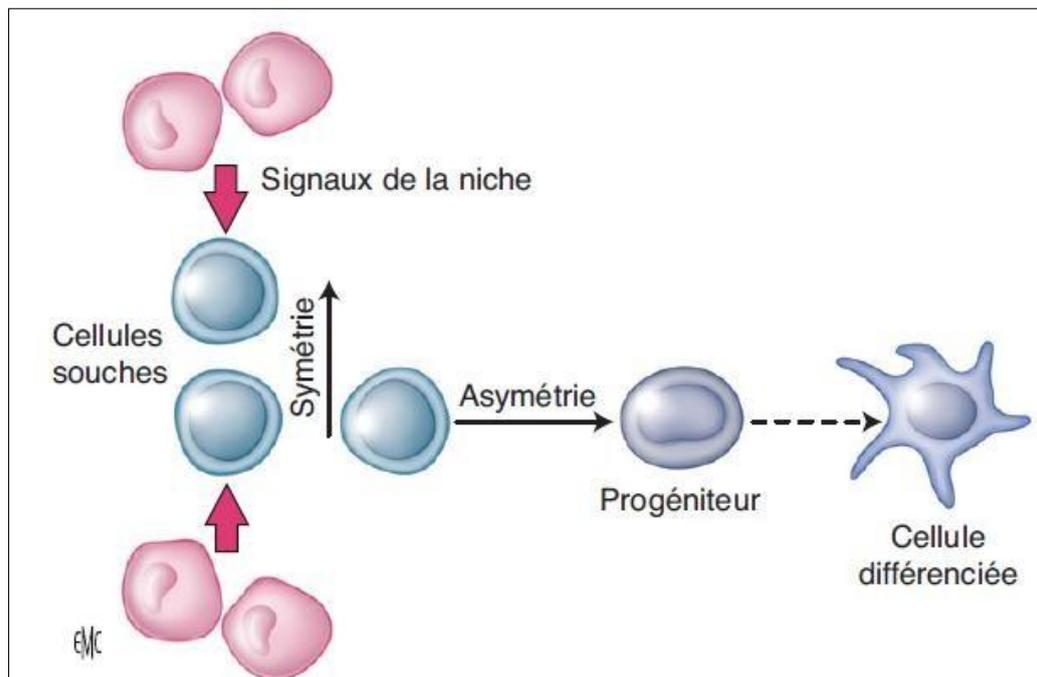


Figure 3 Induction de la division asymétrique des CSH par les signaux de la niche

2. Le G-CSF (Granulocyte colony stimulating factor), facteur stimulant les coloniesgranulocytaires, peut induire :
 - ✚ Une prolifération des progéniteurs CFU-GM (voir chapitre précédent).
 - ✚ Une différenciation des progéniteurs en granulocytes neutrophiles et le blocage de différenciation vers un sens monocyttaire.
 - ✚ Une maturation des Myéloblaste en neutrophile.
 - ✚ Une suppression de l'apoptose des progéniteurs myéloïdes
 - ✚ Une activation des granulocytes neutrophiles.

III.2 Classification des facteurs de croissance hématopoïétiques selon leurs cibles

Les principaux facteurs de croissance hématopoïétiques ainsi que leurs cibles respectives sont cités dans la figure ci-dessous.

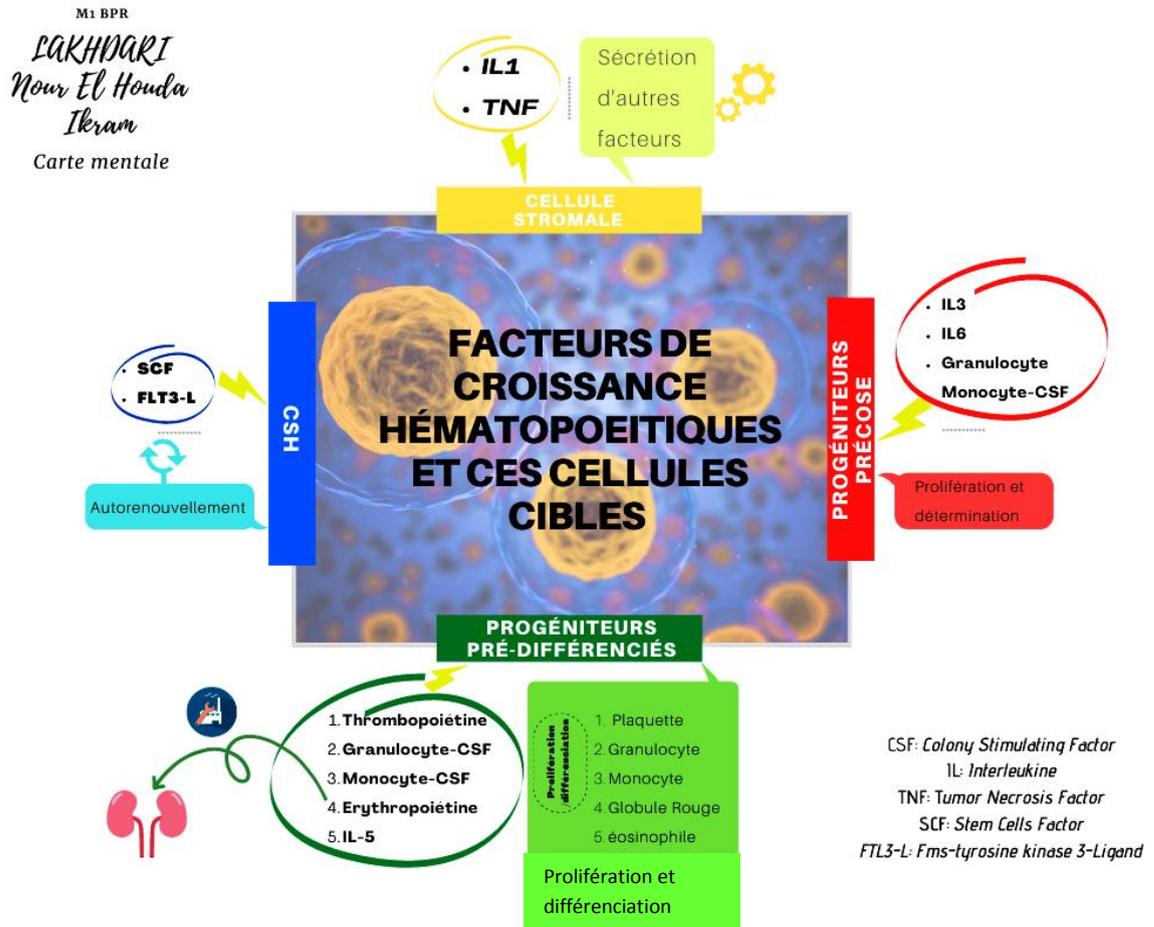


Figure 4 Facteur de croissances hématopoïétiques (Carte élaborée par Lakhdari N, étudiante en Master).

Chapitre V : Gamètes et cellules souches

I. Introduction

L'ontogenèse des appareils reproducteurs masculin et féminin ainsi que celle des cellules germinales primordiales (CGP), à l'origine des cellules souches des lignées germinales chez l'adulte, passent par plusieurs étapes successives qui impliquent une organisation spatiotemporelle des associations cellulaires au sein des ébauches gonadiques. Toutes ces étapes sont gérées par un tas de facteurs de croissance et de transcription génétique qui contrôlent chaque détail de cette ontogénèse notamment l'échappement des CGP au destin somatique que toutes les autres cellules de l'embryon parcourent, et leur retour dans l'organisme en développement au bon moment pour retrouver leur emplacement adéquat au sein des gonades déjà engagées dans l'organogenèse.

De nos jours, la connaissance d'une grande partie des mécanismes qui gèrent ces événements cellulaires et organiques a permis de reproduire effacement le cycle de formation des gamètes *in vitro* à partir des CGP, des cellules souches embryonnaires ou encore plus des cellules souches pluripotentes induites.

Ces progrès sont sur le point d'ouvrir de nouvelles pistes de la prise en charge des infertilités masculines et féminines voir même de procurer une chance de conception dans les cas les plus extrême de stérilité définitive.

II. Déterminisme génétique du sexe

Au cours de l'organogenèse des gonades des mammifères, plusieurs gènes et hormones sont impliqués dans la différenciation des gonades dans l'un des deux sens masculins et féminins à partir d'une ébauche neutre bipotente.

Cette différenciation est déterminée génétiquement en fonction des hétérochromosomes présents dans le zygote (XX ou XY). On parle désormais d'un déterminisme génétique.

Les gonosomes (hétérochromosomes) correspondant à la dernière paire (N 23) dans le caryotype humain déterminent le sexe génétique :

- ✚ Chez la femelle, la présence de deux chromosomes XX dans la dernière paire évoque un sexe génétique féminin
- ✚ Chez le mâle, l'association XY détermine le sexe génétique masculin.

Cette différence génétique va être traduite par une différenciation sexuelle phénotypique initiée par l'expression de certains gènes portés par le chromosome Y chez le mâle.

III. Première étape (développement identique chez les deux sexes)

-**La crête génitale***, ébauche de la formation des gonades issue du mésoderme intermédiaire, passe par un stade indifférencié où elle ne possède aucun caractère masculin ni féminin.

-Chez l'homme, la crête génitale correspond à un petit renflement au centre du corps du fœtus. Elle est formée autour de la 5^{ème} semaine du développement embryonnaire par une prolifération de l'épithélium coelomique et du mésonéphros (voir Chapitre III).

-Au départ, les crêtes génitales sont composées de mésenchyme (qui constitue la matrice de la gonade) recouvert par un épithélium monostratifié.

Ces crêtes ne contiennent aucune cellule germinale dans leur composition cellulaire initiale chez les deux sexes.

* **Crête génitale:** ébauche gonadique, une structure primitive à partir de laquelle les gonades (ovaires ou testicules) seront formées
Elle est appelée crête car elle ressemble à la crête du coq (excroissance charnue et dentelée sur la tête du Coq)

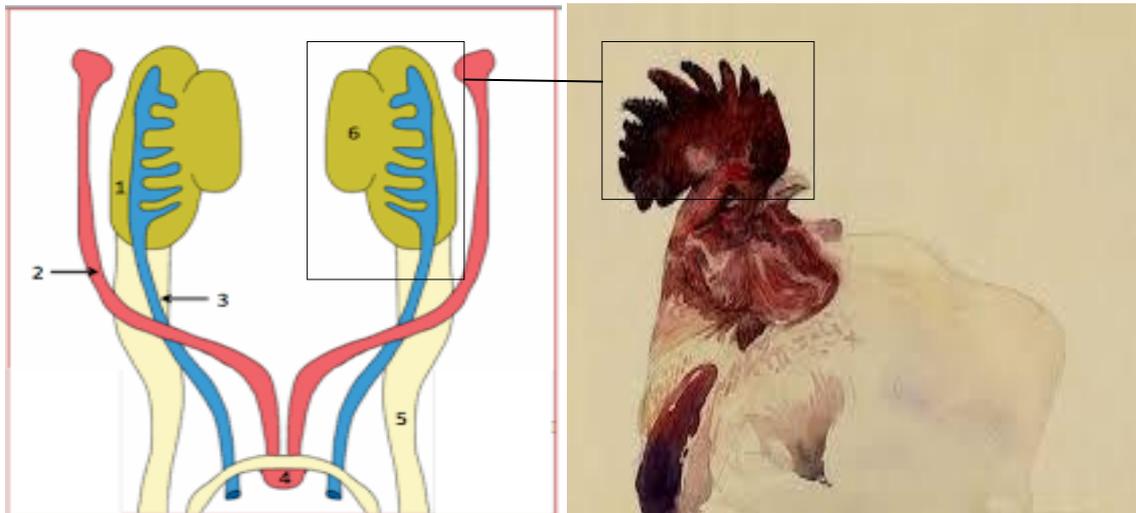


Figure 1 Ressemblance entre l'ébauche gonadique (crête génitale) et la crête du coq

III.1 Ontogenèse des cellules germinales primordiales

Les cellules germinales primordiales (CGP) sont les précurseurs indifférenciés des spermatogonies et des ovogonies. Chez l'être humain, elles sont identifiables à partir de la 3^{ème} semaine du développement embryonnaire à proximité de l'ébauche allantoïdienne*.

* **Allantoïde** : En embryologie humaine, l'allantoïde est un diverticule du sac vitellin qui traverse le pédicule embryonnaire, et contribue à la formation du cordon ombilical et de la vessie.

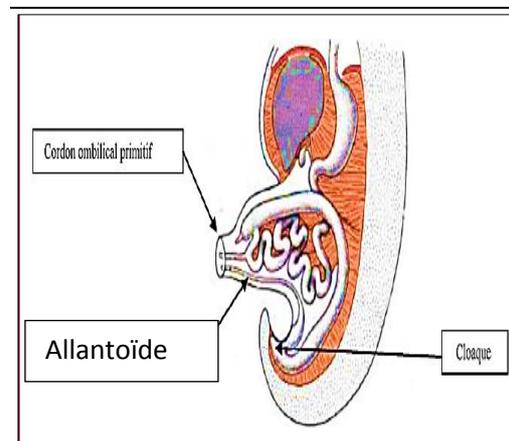


Figure 2 Emplacement de l'allantoïde

III.1.1 Origine des CGP

-Pour des raisons éthiques, les études sur les CGP chez l'être humain sont quasi-absentes.

- Les souris sont les principaux organismes utilisées dans ce genre d'étude.
- Les informations actuelles concernant l'ontogenèse des CGP sont déduites en se basant sur les résultats d'études sur les modèles murins (de la souris), des singes et des CGP humaines développées *in vitro*.
- Les CGP sont issues de **l'épiblaste** chez la souris, ou **l'annios** précoce chez le singe, lui aussi issu de l'épiblaste.

D'un point de vu général, nous pouvons dire que **l'épiblaste proche de l'allantoïde** est à l'origine des CGP.

III.1.2 Etapes de l'ontogenèse des CGP

La production des CGP au cours du développement embryonnaire passe par plusieurs étapes successives :

- ✚ Spécification des CGP à partir de l'épiblaste
- ✚ Migration des CGP dans l'allantoïde
- ✚ Migration des CGP de l'allantoïde vers les crêtes génitales
- ✚ Colonisation des crêtes génitales
- ✚ Prolifération et différenciation en spermatogonies/ovogonies

III.1.2.1 Spécification des CGP

Des signaux venants des cellules qui entourent les cellules épiblastiques destinées à devenir des CGP vont permettre une régulation épigénétique de ces dernières.

III.1.2.1.1 Principaux cytokines régulateurs de la spécification des CGP

- ✚ **Wnt3a Produits des gènes de la famille WNT**, gènes humains homologues des gènes WNT de la drosophile (Wingless-related INTegration site).

Wnt3a est impliqué dans la prolifération cellulaire et la détermination du destin cellulaire au cours du développement embryonnaire et des cancers.

Le Wnt3a qui influence les CGP est sécrété par le cytotrophoblaste proche de leur site de production.

- ✚ **Les protéines de la famille BMP (Bone morphogenesis proteins)** membres de la superfamille des TGF (transforming growth factors): exprimées chez l'embryon et chez l'adulte, ces molécules sont indispensables à la synthèse, au remodelage et à la réparation des os et du cartilage.

Au cours de l'ontogenèse des CGP, deux BMP sont impliquées :

BMP2 : sécrétée par le mésoderme extraembryonnaire

BMP4 : sécrétée par l'amnios.

- ✚ **L'acide rétinol** : dérivé naturel de la vitamine A, de diverses origines cellulaires essentiellement les cellules mésonephrotiques, il intervient dans la régulation épigénétique des CGP.

III.1.2.1.2 Gènes cibles de la régulation des CGP

✚ **Le gène SOX 17 des CGP** : un gène situé sur le chromosome 8 chez les humains qui code pour un facteur de transcription SOX 17.

✚ **Le gène EOMES** : Un gène situé sur le chromosome 3 chez l'homme, qui code pour un facteur de transcription ; l'omesodermine, impliqué entre autres dans la différenciation du mésoderme, le développement des structure du système nerveux central (encéphale) et la différenciation des lymphocyte T chez l'adulte...etc.

✚ **Le gène DMPR1** : un gène situé sur le chromosome 6 chez l'être humain. Il code pour un facteur de transcription BLIMP1 (B-lymphocyte-induced maturation 1)

✚ **Le gène TFAP2c** : un gène situé sur le chromosome 20 chez l'homme, qui code pour le facteur de transcription « AP2 gamma » qui joue un rôle dans la prolifération cellulaire et le développement des gonades.

III.1.2.2 Régulation de la spécification des CGP

Les facteurs de transcription sécrétés par les structures voisine des précurseurs épiblastiques des CGP collaborent pour induire la différenciation des cellules épiblastiques proche de l'allantoïde en CGP :

-Le Wnt3 active l'expression de « EOMES » dans les cellules cytotrophoblastiques. Le produit de ce dernier, l'omesodermine active SOX17 des précurseurs des CGP.

-A son tour, le SOX 17 active l'expression de Blimp1 par le gène DMPR1 dans les précurseurs des CGP.

-Les facteurs BMP2 et BMP4 (exprimées respectivement par le « mésoderme extraembryonnaire » et « l'amnios ») stimulent ensemble l'expression du gène FTAP2C dans les CGP. L'AP2c, contribue à son tour à l'activation de SOX17.

-L'omesdodermine stimule également l'expression des récepteurs de l'acide rétinoïque par les précurseurs des CGP.

-L'acide rétinoïque une fois lié à ses récepteurs, assure une stimulation continue de FTAP2C.

Une fois tous exprimés, SOX 17, FTAP2C et DMPR1 vont créer un boucle de feedback positif entre eux, ce qui résulte en un renforcement de leur expression.

SOX17, AP2C et Blimp1 assurent la spécification des CGP via :

- ✚ Le maintien de la capacité proliférative
- ✚ L'échappement à l'action des gènes homéotiques HOX, qui déterminent le destin des cellules somatiques dans l'embryon en développement.
- ✚ L'activation du programme génétique des cellules germinales dans les CGP.

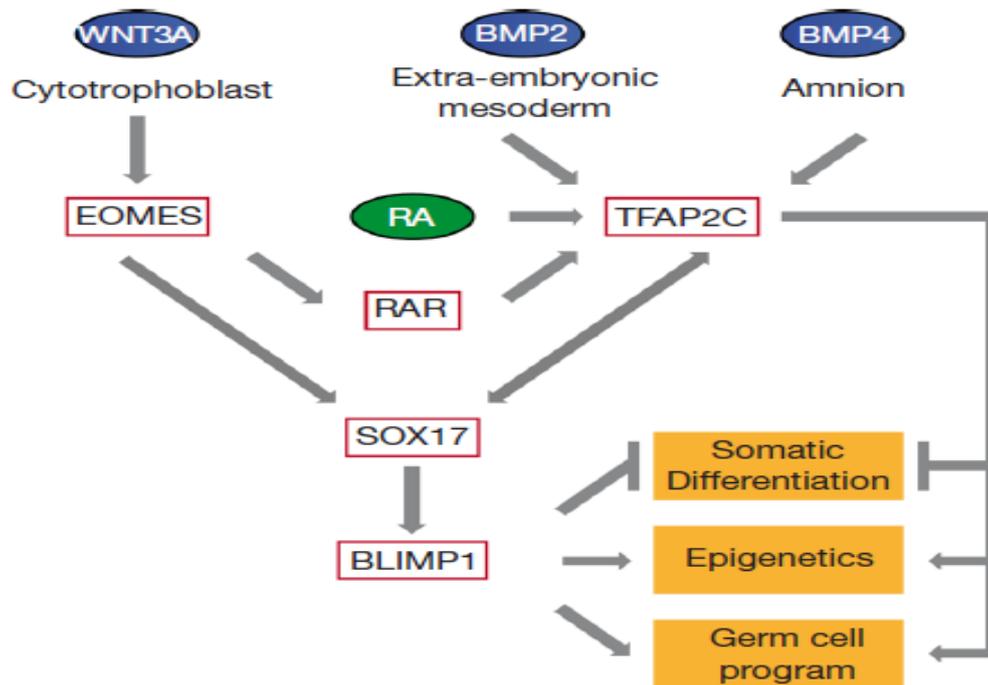


Figure 3 Signalisation cellulaire et régulation de la spécification des CGP

III.1.2.3 Migration des CGP

III.1.2.3.1 De l'épiblaste vers l'allantoïde

Les précurseurs des CGP d'origine épiblastique vont migrer à travers la ligne primitive pour coloniser l'allantoïde (même principe de la migration des cellules ectodermiques et mésodermiques au cours de la gastrulation (Voir Chapitre II).

III.1.2.3.2 De l'allantoïde vers les crêtes génitales

La migration des CGP vers les crêtes génitales se fait selon deux modes :

Le mode passif : lors de la délimitation embryonnaire et la formation de l'intestin primitif par tabulation, les CGP sont introduites passivement dans ce dernier grâce aux plicatures de l'embryon.

Le mode actif : La voie active de la migration des CGP implique des mouvements amiboïdes ces cellules qui se font grâce aux molécules d'adhésion indispensables à ce mode de mouvement cellulaire.

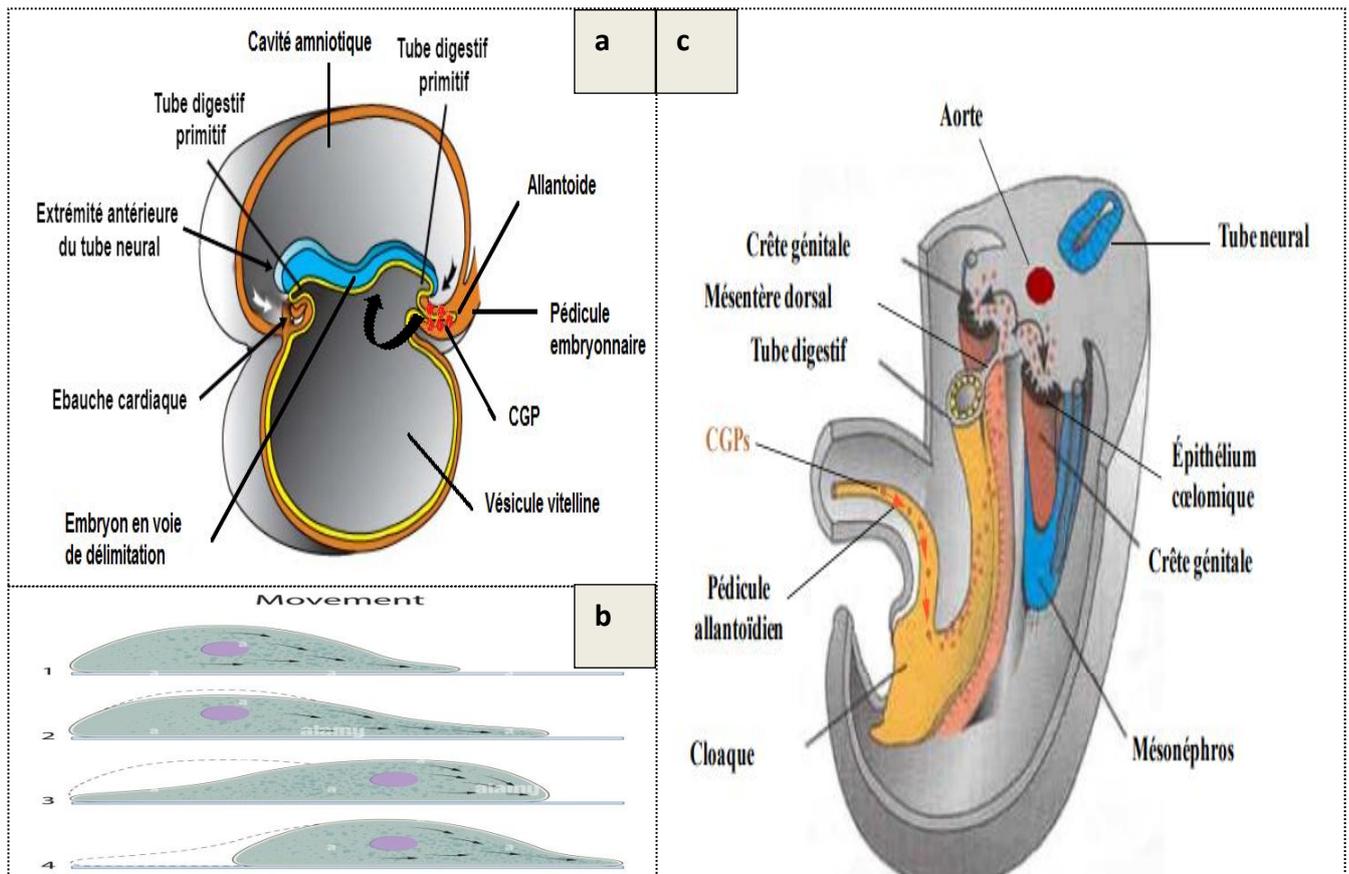


Figure 3 Modes de migration des CGP de l'allantoïde vers les crêtes génitales

Les points en rouge représentent les CGP ; a : migration passive, flèche noir : distance parcourue par les CGP suite à la plicature de l'embryon ; b : mouvement amiboïde ; c : récapitulatif de la migration des CGP

-Ce mouvement implique des molécules d'adhésion cellule-cellule, cellule-matrice extracellulaire dont essentiellement les intégrines les cadhérines et la β -caténine exprimées par les CGP en migration.

-La migration suit un chimiotactisme assuré par le SCF (stem cells factor) appelé aussi ligand Kit sécrété par les ébauches gonadiques.

Les CGP quitte l'intestin primitif pour gagner le mésentère dorsal et enfin rejoindre leur destination finale ; les crêtes génitales.

III.1.2.4 Colonisation des crêtes génitales

Chez l'embryon humain, la colonisation des ébauches gonadiques par les CGP est achevée à la 6^{ème} semaine du développement embryonnaire.

A partir de ce moment, les CGP vont suivre un programme de différenciation en spermatogonie ou en ovogonie en fonction des facteurs sécrétés par les cellules voisines.

III.1.3 Caractéristiques des CGP

Caractéristiques morphologiques

- ✚ Elles ont une grande taille comparées aux cellules voisines
- ✚ Leur noyau est volumineux, arrondi avec de gros nucléoles
- ✚ glycogène abondant et de nombreuses gouttelettes lipidiques dans leur cytoplasme
- ✚ elles sont chargées en phosphatase alcaline.

III.1.4 Marqueurs moléculaires des CGP

OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4), un facteur de transcription exprimé par les CGP. Il s'agit d'un marqueur de la pluripotence que même les cellules souches embryonnaires expriment. Il est exprimé pendant la spécification, la migration et la différenciation des CGP.

Blimp1: un facteur de transcription exprimé par les CGP en migration. Il est principalement impliqué dans la répression des gènes homéotiques (HOX) qui déterminent le destin des cellules somatiques.

Fragilis : Une protéine sécrétée par les CGP au stade prémigratoire et en migration. Elle contribue, avec Blimps1 à la suppression des gènes HOX.

Stella (developmental pluripotency-associated 3 (Dppa3), un marqueur exprimé par les CGP ultérieurement lors de leur migration, Son rôle exact n'est pas bien élucidé.

C-kit : un récepteur membranaire spécifique au ligand Kit qui assure le chimiotactisme qui guide les CGP vers les ébauches gonadiques au cours de leur migration (voir plus haut).

DAZL (Deleted In Azoospermia Like protein) Une protéine de liaison à l'ARN sécrétée par les CGP après la colonisation des gonades. Elle est impliquée dans la différenciation des CGP en spermatogonies ou en ovogonies. Les mutations au niveau de son gène, DAZ résulte en une stérilité chez les deux sexes.

Vasa : une protéine considérée comme marquer des CGP au stade post-migratoire et des cellules de la lignée germinales chez les deux sexes au cours du développement fœtal. Son rôle exact n'est pas encore bien connu.

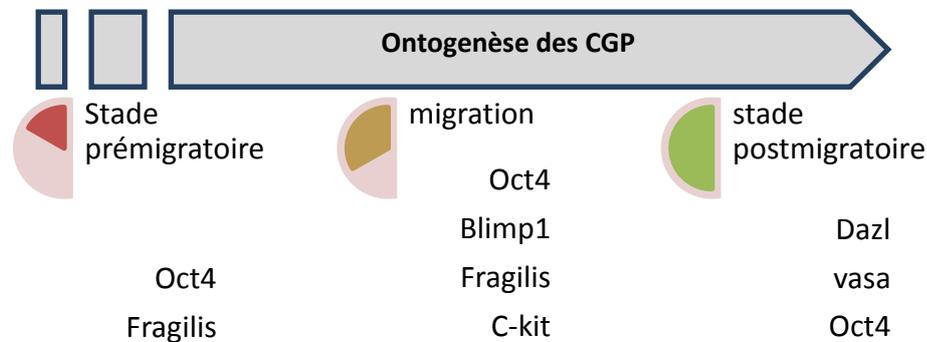


Figure 4 Marqueurs moléculaires des CGP au cours de leur ontogenèse

IV. Différenciation des gonades

IV.1 Chez le mâle

- A partir de la 6^{ème} semaine du développement embryonnaire, le gène SRY (Sex determining Region) situé sur le chromosome Y chez le mâle est activé.
- Les produits de ce gène stimulent la prolifération des cordons sexuels dans la gonade pour former les cordons séminifères, précurseurs des tubes séminifères.
- Les cordons englobent toutes les CGP qui ont migré sur la gonade.
- Le SRY assure la différenciation des cellules de Sertoli* à partir des cellules mésenchymateuse de l'ébauche gonadique.
- Les cellules de Sertoli induisent la différenciation des cellules de Leydig*, qui secrètent la **testostérone**.
- Les cellules de Sertoli expriment un autre gène le SOX9 (SRY-Box Transcription Factor 9), activé par le SRY.
- Sous l'effet de SOX9, les cellules de Sertoli commencent la sécrétion d'une autre hormone, l'**hormone antimüllérienne**.

- Les CGP se différencient en pré-spermatogonies quiescentes vers le 4^{ème} mois (pas de division jusqu'à la période postnatale).

***Cellule de Sertoli :** Ce sont des cellules somatiques qui soutiennent les cellules germinales de la spermatogenèse dans les tubes séminifères. Elles assurent un rôle nutritif et protecteur des cellules sexuelles chez l'homme.

***Cellules de Leydig :** Des cellules endocrines qui secrètent la testostérone chez l'homme. Elles sont localisées autour des vaisseaux sanguins qui irriguent le tissu interstitiel conjonctif des testicules

IV.2 Chez la femelle

- Le facteur Wnt4 inhibe la différenciation de cellules stéroïdiennes de type mâle (Leydig) dans l'ovaire.
- La protéine FoxL2 ((Forkhead Box L2) empêche la différenciation de cellules de Sertoli et participe à la différenciation des cellules folliculaires.
- Les CGP sont toutes différenciées en ovogonies vers le 4^{ème} mois du développement embryonnaire.
- Les ovogonies entre en une série de mitoses successives jusqu'au 5^{ème} mois du développement.
- Entre le 5^{ème} et le 7^{ème} mois du développement, Elles entament la première division réductionnelle de la méiose (méiose I), avant qu'elles soient bloquées en prophase de la méiose I ; on parle désormais d'ovocyte I bloqués en métaphase I de la méiose.

IV.3 Différences entre les deux voies de différenciation Masculine et féminine des CGP

- Division mitotique et première division méiotique des ovocytes chez l'embryon du sexe féminin, elles sont toutes les deux stimulées par l'acide rétinoïque sécrété par les structures voisines des ovaires, essentiellement le mésonéphros, qui active le Stra8 (Stimulated By Retinoic Acid 8), responsable de ces événements (prolifération des ovogonies + méiose).
- Chez l'embryon masculin, les CGP se transforment et reste bloquées en pré-spermatogonies quiescentes (pas de division mitotique ni méiotique) par les

produits du gène Sox9, qui inhibe l'effet de Acide rétinoïque sur les pré-spermatogonies.

Les pré-spermatogonies deviennent des spermatogonies pendant la période postnatale.

Résultat : entrée en mitose, puis quiescence à nouveau jusqu'à la puberté.

V. Différenciation des gonades

Dans l'embryon humain, les ébauches gonadiques se développent à l'âge de 0 à 5 semaines.

Les CGP naissent en dehors des ébauches gonadiques puis migrent pour les coloniser, et se trouvent entourer par les cellules du mésenchyme gonadique (Cellules de Sertoli + Cellules de Leydig chez le mâle ; Cellules folliculaire chez la femelle).

V.1 A partir de la 6^{ème} semaine de la vie embryonnaire

-Les organes génitaux internes mâles et femelles se développent à partir de deux ébauches uni-potentiels.

-Les deux structures sont issues du mésonephros : le canal de Wolff (mâle) et le canal de Müller (femelle).

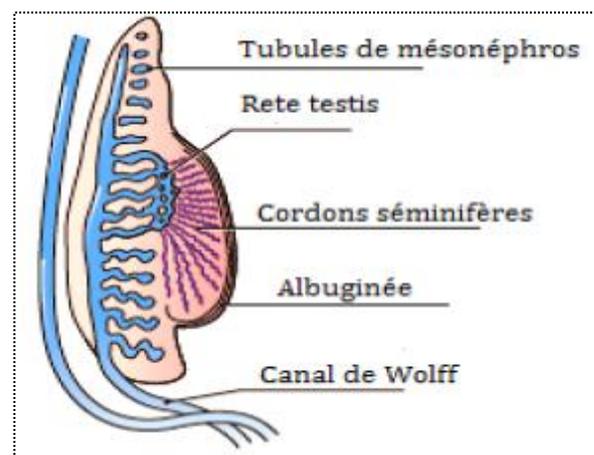


Figure 5 Ebauche neutre des appareils reproducteurs

V.1.1 Chez la femelle :

-Le canal de Wolff régresse spontanément.

-Le canal de Müller persiste et se développe pour former les oviductes, l'utérus, le col et le tiers supérieur du vagin.

NB : Aucune régulation hormonale n'est indispensable pour le développement vers un sens féminin.

V.1.2 Chez le mâle :

-La testostérone stimule le développement de l'épididyme, du canal déférent et des glandes annexes à partir du canal de Wolff.

-L'hormone HAM induit une régression du canal de Müller (d'où son nom : « Antimüllérienne »).

VI. Production des gamètes femelles *in vitro*

-Les ovocytes peuvent être obtenus à partir des CGP en appliquant les connaissances concernant la différenciation des CGP *in vivo*, discutées ci-dessus.

-La différenciation des CGP en ovocytes matures peut être effectuée :

- + *In vitro* dans des milieux de cultures spécifiques contenant des facteurs de différenciation,
- + Par transplantation des CGP associées aux cellules somatiques d'ovaires (CGP + cellules somatiques d'ovaires cultivées *in vitro* = ovaires reconstitués) (voir plus bas). En dessous des ovaires des souris femelles réceptives.

VI.1 Cycle entier *in vitro* des gamètes femelles

-Les CGP sont produites à partir de cellules souches embryonnaires (CSE) ou à partir des cellules souches pluripotentes induites (CSPi).

-Les cellules somatiques d'ovaires sont prélevées à partir du tissu interstitiel d'un ovaire adulte, puis cultivées avec les CGP dans des milieux de culture supplémenté avec **l'acide rétinoïque**.

-Des jonctions cellule/cellule vont être créées entre les deux types cellulaires pour former des « ovaires reconstitués » *in vitro*.

-La différenciation des CGP des ovaires reconstitués en ovocytes se fait dans des milieux α MEM (Minimum Essential Medium) contenant des facteurs de

croissances (facteur de cellule souche (CSF), Le facteur inhibiteur de la leucémie (LIF), **BMP4** (voir plus haut)).

-Des follicules au stade « follicule secondaire » sont sélectionnés et séparés des ovaires reconstitués.

-La maturation des Follicules secondaires contenant des ovocytes I est stimulée *in vitro* par la FSH.

-La fécondation *in vitro* de ces ovocytes est possible, et permet l'obtention d'embryons qui constituent une nouvelle source de CSE à partir desquelles ce cycle pourrait être lancé à nouveau.

NB : les ovaires reconstitués peuvent être directement transplantés en dessous des ovaires chez les femelles réceptives, ce qui induit une maturation de toutes les CGP en ovocytes I.

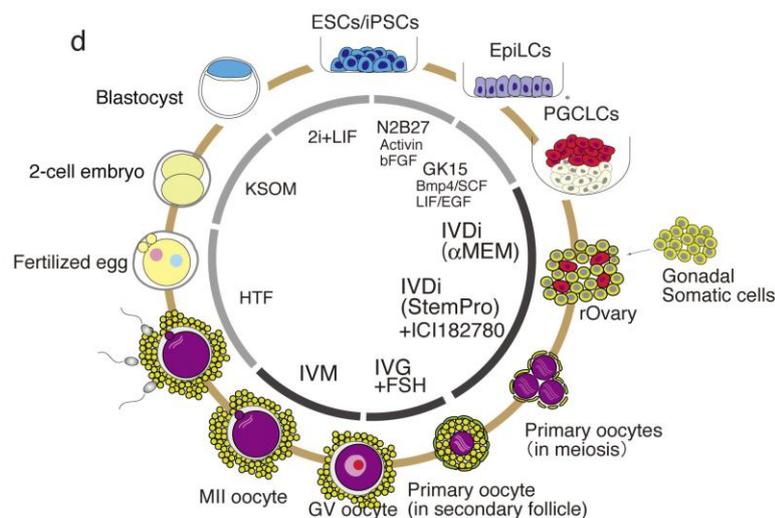


Figure 6 Cycle de production des ovocytes *in vitro*

VI.1.1 Inconvénient des ovocytes produits *in vitro*

- Cytosquelettes fragiles
- Nombre élevé des aneuploïdies
- Défauts d'expression de gènes (notamment le gène qui code pour la ZP1, protéine de la zone pellucide).

- Les Cumulus oophorus formés sont fragiles

VI.2 Production des spermatides *In vitro*

-Force est de savoir que les spermatozoïdes complètement différenciés n'ont jamais été produits *in vitro*.

-Les avancées actuelles dans ce domaine ont permis de produire des spermatides rondes ou allongés.

-Les protocoles de production des spermatides *in vitro* impliquent aussi l'utilisation des facteurs de croissance à savoir les **BMP4, 7 et 8**, des hormones « la testostérone »...etc.

-L'association des CGP avec des cellules de Sertoli *in vitro* permet l'obtention de « testicules reconstitués » dans lesquels les spermatides sont formées.

-Les modèles les plus développés *in vitro* sont des spermatides allongés issus de CSE de macaque et de souris.

-Ces spermatides sont utilisés pour féconder des ovocytes par la technique ICSI adaptés aux spermatides (intra-cytoplasmic sperm(atid) injection).

Références bibliographiques

- Assou, S., J. De Vos, et S. Hamamah. « Des cellules souches au gamète mâle : science-fiction ou avenir proche ? » *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 36, n° 9 (septembre 2008): 908-12. <https://doi.org/10.1016/j.gyobfe.2008.07.001>.
- Chazaud, Claire. « L'embryogenèse précoce des mammifères: Premières différenciations cellulaires et cellules souches ». *médecine/sciences* 24, n° 12 (décembre 2008): 1043-48. <https://doi.org/10.1051/medsci/200824121043>.
- Fuhrmann, G. « Production de cellules germinales à partir de cellules souches embryonnaires de souris en culture ». *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 33, n° 10 (1 octobre 2005): 813-18. <https://doi.org/10.1016/j.gyobfe.2005.07.039>.
- Gregoire, helene. « comparaison de deux types de cellules souches pluripotentes : embryonnaires et induites. » thèse de doctorat, universite toulouse iii paul sabatier, 2014.
- Hayashi, Katsuhiko, Sugako Ogushi, Kazuki Kurimoto, So Shimamoto, Hiroshi Ohta, et Mitinori Saitou. « Offspring from Oocytes Derived from in Vitro Primordial Germ Cell-like Cells in Mice ». *Science* 338, n° 6109 (16 novembre 2012): 971-75. <https://doi.org/10.1126/science.1226889>.
- Hikabe, Orié, Nobuhiko Hamazaki, Go Nagamatsu, Yayoi Obata, Yuji Hirao, Norio Hamada, So Shimamoto, et al. « Reconstitution in Vitro of the Entire Cycle of the Mouse Female Germ Line ». *Nature* 539, n° 7628 (novembre 2016): 299-303. <https://doi.org/10.1038/nature20104>.
- Hoffbrand, A. V., Paul A. H. Moss, et Philippe Casassus. *Hoffbrand: l'essentiel en hématologie*. Paris: Maloine, 2018.
- Hou, Jingmei, Shi Yang, Hao Yang, Yang Liu, Yun Liu, Yanan Hai, Zheng Chen, et al. « Generation of male differentiated germ cells from various types of stem cells ». *REPRODUCTION* 147, n° 6 (juin 2014): R179-88. <https://doi.org/10.1530/REP-13-0649>.
- Johnson, Martin H, et Barry J Everitt. *Reproduction*. Paris: De Boeck Universit??, 2002.
- Jostes, Sina, et Hubert Schor. « Signals and transcription factors for specification of human germ cells », *Stem Cell Investigation*, 5, n° 13 (2018): 1-5.
- Khampang, Sujittra, In Ki Cho, Kanchana Punyawai, Brittany Gill, Jacqueline N. Langmo, Shivangi Nath, Katherine W. Greeson, et al. « Blastocyst Development after Fertilization with in Vitro Spermatids Derived from Nonhuman Primate Embryonic Stem Cells ». *F&S Science* 2, n° 4 (novembre 2021): 365-75. <https://doi.org/10.1016/j.xfss.2021.09.001>.

- Le Douarin, Nicole. *Les cellules souches, porteuses d'immortalité*. Sciences. Paris: Odile Jacob, 2007.
- Machev, Nadejda, Guy Fuhrmann, et Stéphane Viville. « Ontogenèse des cellules germinales primordiales ». *médecine/sciences* 20, n° 12 (1 décembre 2004): 1091-95. <https://doi.org/10.1051/medsci/200420121091>.
- Marieb, Elaine Nicpon, et Jean-Pierre Artigau. *Anatomie et physiologie humaines*. Paris; Bruxelles: De Boeck Universit??, 1999.
- Marques-Mari, A.I., O. Lacham-Kaplan, J.V. Medrano, A. Pellicer, et C. Simon. « Differentiation of Germ Cells and Gametes from Stem Cells ». *Human Reproduction Update* 15, n° 3 (16 janvier 2009): 379-90. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmp001>.
- Moo-Young, Murray. *Comprehensive Biotechnology*. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier, 2011.
- Pugeat, M. « Déterminisme sexuel, différenciation gonadique et identité du genre ». *In Analysis* 5, n° 1 (1 mai 2021): 54-61. <https://doi.org/10.1016/j.inan.2020.11.005>.
- Quesnel, B. « Niches hématopoïétiques et cellules souches ». *EMC - Hématologie* 7, n° 4 (novembre 2012): 1-9. [https://doi.org/10.1016/S1155-1984\(12\)49947-2](https://doi.org/10.1016/S1155-1984(12)49947-2).
- Ratajczak, Mariusz Z. « Stem Cells: Therapeutic Applications », 2019.
- Tronik le roux, Diana. « Réponse des Cellules Souches Hématopoïétiques aux Radiations Ionisantes ». Thèse de Doctorat, UNIVERSITÉ PARIS XI, FACULTÉ DE MÉDECINE PARIS-SUD, 2008.