



**HAL**  
open science

## **Isolement et caractérisation des vésicules extracellulaires sécrétées par les cellules souches humaines MuStem : rôle potentiel en médecine régénératrice ?**

Alice Rannou, Marine Charrier, Isabelle Leroux, Laurence de Beaurepaire,  
Denis Chrétien, Karl Rouger, Laetitia Guevel

### ► To cite this version:

Alice Rannou, Marine Charrier, Isabelle Leroux, Laurence de Beaurepaire, Denis Chrétien, et al.. Isolement et caractérisation des vésicules extracellulaires sécrétées par les cellules souches humaines MuStem : rôle potentiel en médecine régénératrice ?. XXXème congrès de l'AFH: les nouveaux mondes de l'histologie, Jun 2017, Nantes, France. 2017. hal-01595117

**HAL Id: hal-01595117**

**<https://hal.science/hal-01595117>**

Submitted on 5 Jun 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

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



Distributed under a Creative Commons Attribution - ShareAlike 4.0 International License

# Isolement et caractérisation des vésicules extracellulaires secrétées par les cellules souches humaines MuStem : rôle potentiel en médecine régénératrice ?

Alice RANNOU<sup>1,2</sup>, Marine CHARRIER<sup>1,2</sup>, Isabelle LEROUX<sup>1</sup>, Laurence DE BEAUREPAIRE<sup>3</sup>, Denis CHRETIEN<sup>4</sup>, Karl ROUGER<sup>1</sup> & Laëticia GUEVEL<sup>1,2</sup>

(1) PANTher, INRA, École nationale vétérinaire, agro-alimentaire et de l'alimentation Nantes-Atlantique (Oniris), Université Bretagne Loire, (UBL), Nantes, France  
 (2) Université de Nantes, Nantes, France  
 (3) IECM, INRA, Oniris, Nantes, France  
 (4) IGDR, CNRS UMR6290, Université de Rennes 1, Rennes, France ; MRIC-Biosit, CNRS UMS3480, Université de Rennes 1, Rennes, France

## Introduction

La **Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD)** est une des plus importantes pathologies génétiques humaines, de part son incidence élevée avec **1/5000 garçons nouveau-nés**, et son évolution clinique invalidante dès l'enfance et fatale chez le jeune adulte (Emery, 1991 ; Hoffman and Connor, 2013). Dans 90 % des cas, la mutation du gène de la dystrophine aboutit à l'absence de la protéine dystrophine ce qui provoque une instabilité membranaire aboutissant à une nécrose des fibres musculaires. Un remplacement du tissu musculaire par du tissu fibreux et adipeux engendre une faiblesse musculaire. De nos jours, il n'existe aucun traitement curatif de la DMD (Vulin *et al.*, 2012 ; Meregalli *et al.*, 2013).

L'UMR 703 a identifié une population de cellules souches résidentes du tissu musculaire, les **cellules MuStem**, qui ont montré leur efficacité thérapeutique chez le **chien GRMD** (Rouger *et al.*, 2011). Le chien, suite à l'injection par voie systémique de ces cellules, présente une **amélioration clinique majeure et persistante** avec une limitation des altérations du tissu musculaire, une augmentation de l'activité de régénération malgré une faible restauration de l'expression de la protéine dystrophine (<6 %). Cet impact clinique est dû à des **effets directs et indirects** des cellules, directs via la fusion des cellules avec les fibres endogènes et indirects via le remodelage complet du tissu avec l'activation de nombreuses voies via la **secrétion cellulaire** (Robriquet *et al.*, 2015, 2016 ; Lardenois *et al.*, 2016). Suite à ces résultats, une étude du sécrétome et plus particulièrement des **propriétés immunomodulatrices** des cellules MuStem a été mise en place au laboratoire. Ces différents éléments permettent de positionner la cellule MuStem comme **candidat prometteur** dans une stratégie de **thérapie cellulaire innovante**.

L'**objectif principal de cette étude a été, dans un premier temps, d'isoler et de caractériser les vésicules extracellulaires provenant des cellules MuStem et dans un second temps, d'analyser l'activité biologique de ces vésicules en testant leur effet sur des myoblastes afin de déterminer leur rôle potentiel en médecine régénératrice.**

### Contexte scientifique

#### Cellules MuStem

**Origine :**

- Muscle squelettique sain (Chien, Homme) ; définies par un déficit d'adhérence initial
- Progéniteurs myogéniques d'origine périvasculaire mésenchymateuse

**Propriétés des cellules canines**

**Preuve de concept :**

**Administration systémique de cellules allogéniques**

**Bénéfice clinique et tissulaire** dans un modèle canin de la dystrophie musculaire de Duchenne (GRMD)

Impact dû à des effets directs et indirects (sécrétome)

(Rouger *et al.*, 2011; Robriquet *et al.*, 2015,2016; Lardenois *et al.*, 2016)

**Propriétés des cellules humaines**

**Isolement et expansion :**

Procédé de production compatible avec la clinique

**Caractérisation** (n > 15)

- Oligopotence
- Potentiel de prolifération
- Clonogénicité
- Phénotype myogénique
- Propriétés immunomodulatrices

(Lorant *et al.*, in revision)

➡ **Population MuStem : candidat thérapeutique potentiel**

#### Profil sécrétoire des cellules MuStem : Propriétés immunomodulatrices

**Intérêts thérapeutiques majeurs :**

- Définition moins restrictive du couple donneur / receveur
- Diminution des traitements immunosuppresseurs
- Limitation du rejet de greffe / Augmentation de l'efficacité thérapeutique

(Baiguera *et al.*, 2012; English *et al.*, 2013)

**Action des cellules MuStem sur :**

- Un acteur de l'immunité innée
- Inhibition de la cascade du complément
- Un acteur de l'immunité adaptative
- Inhibition de la prolifération des lymphocytes

➡ **Sécrétion de molécules immunomodulatrices**

**Objectifs**

- Caractérisation des vésicules extracellulaires des cellules MuStem « EV<sup>hMuStem</sup> » obtenues après purification
- Analyse de l'activité biologique des EV<sup>hMuStem</sup> par des tests *in vitro* et *vivo*

### Protocol expérimental

#### Purification des EV<sup>hMuStem</sup> par centrifugation différentielle

**Conditionnement cellulaire :**

- Centrifugation de surnageants en contact **48h** avec des cellules confluentes
- Milieu supplémenté avec du **sérum humain dépleté en EV**
- Obtenu par ultracentrifugation à 100 000 g
- Viabilité cellulaire **≥ 90%**
- Minimise les contaminations avec des corps apoptotiques

#### Caractérisation des vésicules extracellulaires : Microvésicules & exosomes

- Taille de 50 nm à 2 µm
- Bourgeonnement de la membrane cellulaire
- Enrichies en ARNm et protéines
- Taille de 30 nm à 150 nm
- Origine endosomale
- Enrichis en microARN

#### Méthodes

- Marqueurs protéiques & ARN
- Concentration & taille qNano
- Morphologie & taille Cryo-TEM

Quelles sont les caractéristiques des EV<sup>hMuStem</sup> ?

### Résultats : Caractérisation des EV<sup>hMuStem</sup>

#### Protéines et profil ARN comme marqueurs des vésicules extracellulaires

**Marqueurs protéiques**

MW	EV	CC	SEV-
	+	+	-
	+	+	-
	+	+	-
	+	+	-
	+	+	-
	+	+	-
	+	+	-
	+	+	-
	+	+	-
	+	+	-

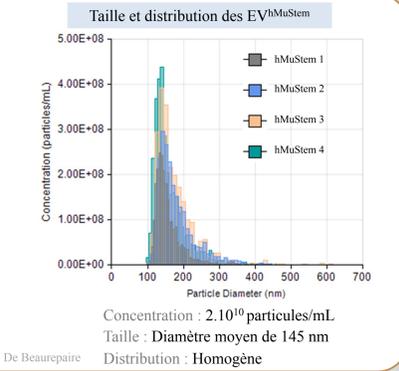
**Profil ARN**

EVs : **petites molécules d'ARN**  
 ➤ ARN ribosomaux dépletés

#### Taille et concentration des particules de la fraction EV<sup>hMuStem</sup> avec le qNano (IZON) et la technologie TRPS

**Technologie TRPS (Tunable Resistive Pulse Sensing) :**

- Permet d'acquérir des mesures de particules en suspension dans un électrolyte et d'obtenir :
  - La concentration en particules
  - La distribution de taille
- Application d'un courant à travers le fluide grâce aux électrodes d'argent



#### Cryo-tomographie électronique, une technique innovante pour la caractérisation des vésicules extracellulaires EV<sup>hMuStem</sup>

**Préparation des échantillons :**

- Permet de figer l'échantillon dans un état **non déformé** si la température ne dépasse pas -160°C

**Cryo-tomographie électronique :**

- Permet la reconstruction d'**images 3D non-déformées** et ainsi d'obtenir :
  - La taille des particules
  - La visualisation des éléments de la structure interne et externe à haute résolution

#### Tomogrammes des EV<sup>hMuStem</sup>

n= 32 vésicules

**95% de vésicules simples**  
 Taille : **Diamètre moyen de 79 nm**  
 De 26 nm à 174 nm

Présence de matériel amorphe

en collaboration avec D. Chrétien

### Perspectives

#### EV<sup>hMuStem</sup> : potentiel rôle en médecine régénératrice ?

**L'objectif** de cette étude est d'explorer la **capacité** des vésicules extracellulaires EV<sup>hMuStem</sup> à **moduler le contexte inflammatoire et à préparer le tissu** dans le but **d'augmenter le pourcentage de greffe des cellules MuStem** afin de **potentialiser l'effet thérapeutique**.

**Tests in vitro**

- Analyse de l'**activité biologique** des EV<sup>hMuStem</sup> sur les myoblastes
  - Test de prolifération
  - Test de migration
  - Potentiel myogénique
- Analyse des **propriétés immunomodulatrices** des EV<sup>hMuStem</sup>

avec M. Charrier (pH.D Student, UMR 703 INRA/ONIRIS)

**Tests in vivo**

Analyse de l'**activité de régénération** des cellules MuStem après l'administration des EV<sup>hMuStem</sup>

➤ Dans un **contexte de remodelage important du tissu musculaire**

**Dessin expérimental :**