

**République Algérienne Démocratique et Populaire**

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique Université**

**Abderrahmane MIRA de Bejaia**

**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biotechnologie  
Filière : Biotechnologie  
Option : Biotechnologie et Santé**



**Réf : .....**

**Mémoire de Fin de Cycle  
En vue de l'obtention du diplôme**

**MASTER**

**Thème**

**Isolement des cellules souches mésenchymateuses dérivées  
de tissu adipeux des souris**

Présenté par :

**MAAFA Lydia et MESSAOUDENE Assia**

**Soutenu le : 7 juillet 2025**

Devant le jury composé de :

<b>MEZIANI S.</b>	<b>MCA</b>	<b>Présidente</b>
<b>REMILA S.</b>	<b>MCB</b>	<b>Examinateur</b>
<b>AIT ALI D.</b>	<b>MCA</b>	<b>Encadreur</b>
<b>GHIDOUCHE A.</b>	<b>MCA</b>	<b>Co-encadrant</b>

**Année universitaire : 2024/2025**

# **Remerciements**

*Avant tout, nous rendons grâce à **Dieu Tout-Puissant**, pour nous avoir donné la patience, la force et la persévérance nécessaires tout au long de ce parcours. C'est par sa volonté et sa miséricorde que ce travail a pu voir le jour.*

*Nous tenons à exprimer notre **profonde gratitude** à **Madame Ait Ali. D**, notre encadrante, pour son accompagnement bienveillant, ses conseils précieux, sa disponibilité constante et sa rigueur scientifique. Son soutien nous a été d'une grande aide tout au long de cette recherche. Nous la remercions sincèrement pour sa confiance et pour l'attention particulière qu'elle a portée à notre travail.*

*Nos remerciements les plus sincères vont également à **Monsieur Ghidouche. A** notre Co-encadrant, pour son encadrement méthodique, ses remarques constructives et ses encouragements qui ont enrichi ce travail. Sa présence et son implication ont été déterminantes dans l'avancement de ce mémoire.*

*À ce titre, nous tenons à adresser nos **remerciements particuliers** à **Madame Hakima et Madame Lynda**, ingénieures au laboratoire de **médecine** situé à **Aboudaou**, pour leur précieuse assistance, leur disponibilité et leur soutien tout au long de mes travaux pratiques. Leur professionnalisme et leur générosité ont largement facilité mes recherches et enrichi mon expérience.*

*Enfin, nous dédions ce travail à **l'ensemble des enseignants** du département **SNV** ainsi que toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail, notamment le personnel des laboratoires, pour leur accueil, leur aide technique et leur gentillesse.*

*Nos sincères remerciements pour les **membres du jury** d'avoir accepté d'évaluer ce modeste travail.*

*On tient à exprimer nos remerciements et notre gratitude à nos **chers parents, familles et amis**, qui nous ont tous soutenues pour en arriver à ce stade.*

**ASSIA & LYDIA**

# ***Dédicace***

*En terme de reconnaissances de leurs sacrifices et amour je dédie ce travail à:*

## ***Mon cher père:***

*Rien au monde ne peut exprimer tes efforts fourmis jour et nuit pour mon éducation. Merci pour votre soutien et encouragements. Je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur, Que Dieu vous protège.*

## ***Ma chère maman :***

*Ma lumière dans l'obscurité, ma force dans les épreuves, Aucune dédicace, ne pourrait exprimer l'amour, l'estime que j'ai pour toi. Que Dieu la garde pour moi et soit avec elle à tout moment.*

## ***Mon cher et unique frère FAROUK***

*Tu as toujours été bien plus qu'un frère. Tu es mon modèle de force et de loyauté. Merci d'être la toujours avec moi ta présence dans ma vie c'est un trésor avec tes petites étoiles **DJILDON** et **MAYAS** qui illuminent notre maison.*

## ***A mes sœurs :***

***LAMIA & KENZA (Et leurs enfants), NABILA, NACIMA***

*Pour leur présence et leur encouragement. Votre soutien, même à distance, a été très précieux pour moi.*

## ***A mon binôme ASSIA***

*Qui a partagé avec moi ce travail, la joie, le stress et la fatigue, et d'apprendre beaucoup de chose durant ce stage.*

## ***A HAMI***

*Mon bras droit, mon soutien sans conditions. Tu m'as portée dans tous mes états, essuyé mes tempêtes, et jamais tu n'as lâché ma main.*

**LYDIA**

# ***Dédicace***

*En termes de reconnaissances de leurs sacrifices et amour je dédie ce travail :*

## ***À Mon Dieu :***

*Source de force, de patience et d'espoir. C'est vers Toi que je me tourne dans chaque difficulté, et c'est grâce à toi que ce travail a pu voir le jour.*

## ***À mes chers parents :***

*Pour leur amour inconditionnel, leurs sacrifices silencieux et leur soutien sans faille. Rien ne serait possible sans vous.*

## ***À mes adorables sœurs***

*Lamia, Ouiza et Lydia, merci pour votre tendresse, votre écoute et votre présence constante dans ma vie.*

## ***À mon compagnon de route :***

*Guenfoud Yahya qui m'a soutenue dans les moments de doute et de fatigue.*

## ***À Monsieur Boukerouis Boubekour :***

*Je n'oublierai jamais Votre rigueur, votre passion et votre humanité ont marqué mon parcours*

## ***A mon premier guide :***

*Monsieur Ouzil Omar, mon instituteur d'école primaire. Merci d'avoir semé en moi la graine de la curiosité et de l'apprentissage.*

## ***A ma cher binôme,***

*Pour sa collaboration, sa patience et le partage de chaque étape de cette aventure académique. Ce travail est aussi le vôtre.*

## ***Et A tous mes profs***

**ASSIA**

## Table des matières

### Liste des abréviations

### Liste des figures

### Liste des tableaux

### Introduction..... 1

## **Chapitre I : Synthèse bibliographique**

### **I.1 Généralités sur les cellules souche..... 2**

I.1.1 Définition des cellules souches.....2

I.1.2 Classification des cellules souches .....2

I.1.2.1 Les cellules souches embryonnaires .....3

I.1.2.2 Les cellules souches induites (IPS) .....4

I.1.2.3 Les cellules souches adultes ..... 4

### **I.2 Les cellules souche mésenchymateuses .....5**

### **I.3 Les cellules souche mésenchymateuses dérive de tissu adipeux ..... 6**

I.3.1 La localisation des CSM dérivé de tissu adipeux .....6

I.3.2 La structure et la morphologie des CSM dérivé de tissu adipeux ..... 7

I.3.3 Les caractéristiques des CSM dérivé de tissu adipeux .....8

I.3.4 Les propriétés et les effets des CSM dérivé de tissu adipeux..... 9

I.3.5 Les différents milieux de cultures des CSM dérivé de tissu adipeux ..... 11

I.3.6 Les méthodes d'isollements des CSM dérivé de tissu adipeux..... 12

I.3.7 Les application des CSM dérive de tissu adipeux ..... 13

## **Chapitre II : Matériels et méthodes**

### **II.1 Matériel ..... 14**

II.1.1 Modèle animal ..... 14

### **II.2 Méthodes ..... 15**

II.2.1 Prise et analyse de poids ..... 15

II.2.2 Traitement des souris..... 15

II.2.2.1 Méthode d'euthanasie..... 15

II.2.3.2 Méthode de dissection et récupération des organes... 16

II.2.2 Traitement de cerveau ..... 18

II.2.4 Traitements de tissu adipeux..... 18

II.2.4 Préparation des lames avec la coloration ..... 20

II.2.5 Observation microscopiques..... 22

**Chapitre III : Résultats et discussions**

**III.1 Analyse différentielle du modèle animal. .... 23**

III.1.1 Effet de lait concentré sur le poids corporel et la consommation d'eau... .. 23

**III.2 Isolement et mise en culture des AD-MSCs..... 25**

**Conclusion & Perspectives ..... 31**

**Références bibliographiques ..... 32**

**Annexes**

**Résumé**

## Listes des figures

<b>Figure 1 :</b> Différents types cellulaires se développant à partir d'une cellule souche .....	2
<b>Figure 2 :</b> Les composants de tissu adipeux après une digestion mécanique ou enzymatique. 6	
<b>Figure 3 :</b> Observations microscopiques des AD-MSCs.....	7
<b>Figure 4 :</b> Une image d'une souris BALB/c .....	14
<b>Figure 5 :</b> Photographie originale de l'une des cages Hébergeant les souris.....	14
<b>Figure 6 :</b> Photographie originale des biberons de lait (200 ml de lait concentré) .....	14
<b>Figure 7 :</b> Photographies originales montre les étapes d'euthanasies... ..	15
<b>Figure 8 :</b> Photographies originales de l'étape de fixation d'une souris sur la plaque de dissection.....	16
<b>Figure 9 :</b> Photographie originale de l'étape de coupure lors de dissection d'une souris.....	16
<b>Figure 10:</b> Photographie originale de la 2ème étapes de dissection.....	17
<b>Figure 11 :</b> Photographie originale montre les dépôts de tissu adipeux récupéré .....	17
<b>Figure 12 :</b> Photographie originale de l'étape de récupérations de tissu adipeux... ..	17
<b>Figure 13 :</b> Photographie original des étapes d'exposition de cerveaux... ..	18
<b>Figure 14 :</b> Photographie originale de l'étape de récupérations de cerveaux .....	18
<b>Figure 15 :</b> Photographie originale de boite de culture.....	20
<b>Figure 16 :</b> Les étapes de la coloration (HE) Ethanol Eau Hématoxyline Eosine.....	21
<b>Figure 17 :</b> Coloration giemsa... ..	22
<b>Figure 18 :</b> Photographie originale de microscope optique de la marque Leica.....	22

**Liste des abréviations :**

**CSM** : Cellule Souche Méenchymateuse.

**AD-CSM** : Cellule Souche Méenchymateuse Dérivées du tissu Adipeux.

**RPMI**: Institut Commémoratif Roswell Park.

**FBS** : Sérum Fœtal Bovin

**PFA** : Para formaldéhyde.

**HE** : Hématoxyline-Eosine

**SPi** : Cellules Souches Pluripotentes Induites

**CSM-MO** : Cellules Souches Méenchymateuses de la Moelle Osseuse

**AD-MSCs** : Cellules Souches Méenchymateuses dérivées du tissu adipeux

**CSA** : Cellules Souches Adultes

**CSH** : Cellules Souches Hématopoïétiques

**OCT4**: Facteur de transcription liant l'octamère 4

**SOX2**: Facteur de transcription SRY-box 2

**KLF4**: Facteur de type Kruppel-like 4

**C-MYC**: Proto-oncogène c-Myc

**Nanog**: Gène homéobox Nanog

**E-Ras**: Ras embryonnaire

**Zfp296**: Protéine à doigt de zinc 296

**Cripto** : Facteur de croissance dérivé de tératocarcinome 1

**SSEA-1**: Antigène embryonnaire spécifique de stade- 1

**SSEA-3**: Antigène embryonnaire spécifique de stade- 3

**SSEA-4** : Antigène embryonnaire spécifique de stade- 4

**TRA-1-60** : Antigène tumoral associé 1-60

**TRA-1-81** : Antigène tumoral associé 1-81

**CD34** : Cluster de différenciation 34

**CD133** : Cluster de différenciation 133

**ALP** : Phosphatase alcaline

**BMP-2** : Protéine morphogénétique osseuse 2

**Runx2** : Facteur de transcription apparenté à Runt 2

**TGF- $\beta$**  : Facteur de croissance transformant bêta

**HGF** : Facteur de croissance des hépatocytes

**CD77** : Cluster de différenciation 77

**CD90** : Cluster de différenciation 90

**CD105** : Cluster de différenciation 105

**CD45** : Cluster de différenciation 45

**CXCR4** : Récepteur 4 des chimiokines C-X-C

**IL-10** : Interleukine-10

**PGE2** : Prostaglandine E2

**IDO** : Indoleamine 2,3-dioxygénase

**TNF- $\alpha$**  : Facteur de nécrose tumorale alpha

**IL-6** : Interleukine-6

**ROS** : Espèces réactives de l'oxygène

**NF- $\kappa$ B** : Facteur nucléaire kappa B des cellules B

**VEGF** : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

**IGF-1** : Facteur de croissance analogue à l'insuline 1

**FGF-2** : Facteur de croissance des fibroblastes 2

**ARNm** : Acide ribonucléique messager

**Micro ARN** : Micro acide ribonucléique

**DMEM** : Milieu de culture modifié de Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

**$\alpha$ -MEM** : Milieu essentiel minimum alpha

**FBS** : Sérum fœtal bovin

**hPL** : Lysat plaquettaire humain

**GMP** : Bonnes pratiques de fabrication

**EDTA** : Acide éthylènediaminetétraacétique

**Liste des tableaux**

**Tableau I :** Présente les types de cellules souches, leurs plasticités et leurs origines ..... 3

**Tableau II :** Comparaison des méthodes d'isollements des cellules souches mésenchymateuses  
issu de tissu adipeux (AD-CSM) ..... 12

**Tableau III :** Présente les volume de la trypsine EDTA utilisée selon le poids de tissu..... 19



# **Introduction**

## **Introduction**

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) sont des cellules matures multipotentes qui ont la capacité de s'autorenouveler et de se transformer en divers types cellulaires, tels que les adipocytes, les ostéoblastes et les chondrocytes (**Pittenger *et al.*, 1999**). Depuis leur apparition, elles ont attiré de plus en plus l'attention dans le domaine de la médecine régénérative en raison de leur capacité à moduler les réponses immunitaires, trophiques et anti-inflammatoires (**Caplan, 1991**).

Parmi les différentes sources de CSM, le tissu adipeux a été démontré comme étant particulièrement riche en cellules souches mésenchymateuses et facilement accessible, ce qui en fait une option attrayante par rapport à la moelle osseuse pour l'extraction des cellules souches (**Zuk *et al.*, 2001**). Mesenchymal stem cells from adipose tissue (AD-MSCs) have considerable advantages: they are abundant, easily isolatable and retain good potential for proliferation and differentiation in vitro (**Bunnell *et al.*, 2021**).

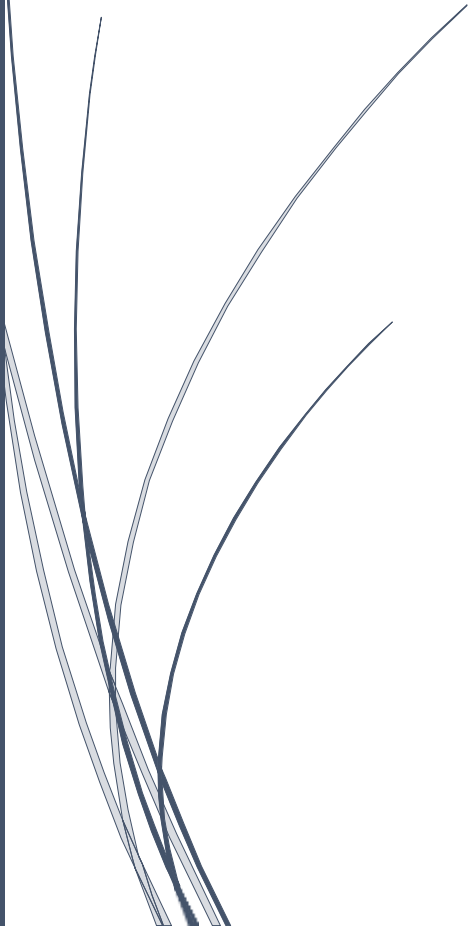
Dans ce projet, nous avons utilisé des souris de souche BALB/c, qui est une lignée fréquemment utilisée dans les études immunologiques et précliniques en raison de sa stabilité génétique et de sa capacité à supporter la manipulation expérimentale. L'isolement des AD-MSCs à partir de ce type de souris fournit un modèle reproductible pour examiner les mécanismes cellulaires impliqués dans la réparation des tissus.

La collagénase est utilisée pour la dégradation enzymatique du tissu adipeux. Cependant, dans notre protocole, nous avons choisi d'utiliser la trypsine, une protéase rarement utilisée en culture cellulaire, qui dissocie le tissu tout en étant plus facile à contrôler et moins coûteuse. Cette décision nous a permis d'explorer la possibilité d'extraire les ADMSCs murines à l'aide d'une méthode enzymatique alternative, convenant à des projets de recherche avec des ressources limitées.

L'objectif principal de ce mémoire est d'isoler les cellules souches mésenchymateuses provenant du tissu adipeux murin (souche BALB/c) en utilisant la trypsine. Ce travail s'inscrit dans une démarche visant à élaborer des protocoles simplifiés pour la recherche fondamentale ainsi que pour les applications thérapeutiques future.

**Chapitre I**

# **Synthèse bibliographique**

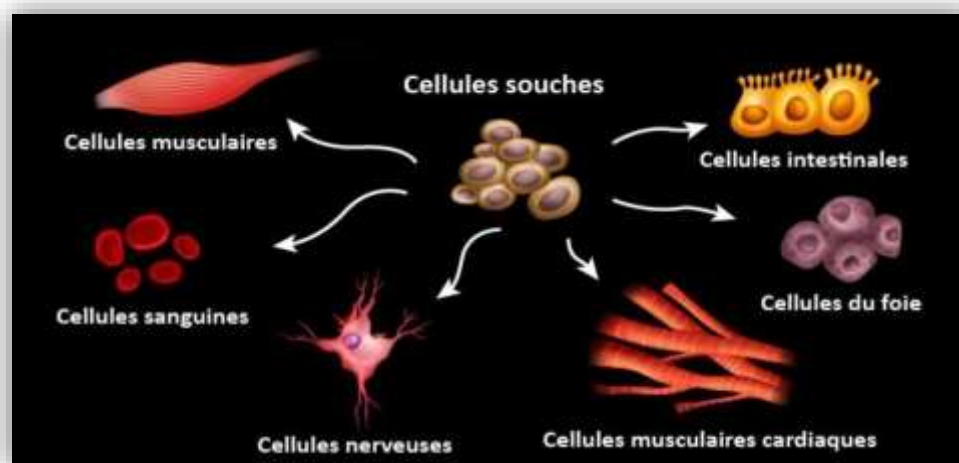


## I.1 Les cellules souches

### I.1.1 Définition

Les cellules souches (CS), sont des cellules non spécialisées qui peuvent se renouveler sans avoir des modifications significatives de leurs propriétés (Wei *et al.*, 2013). Pour qu'on puisse les considérer comme CS, elles doivent représenter trois critères principaux qui sont : l'hétérogénéité, l'immatunité et une capacité de prolifération et de donner naissance au moins à une cellule fille identique à la cellule mère (Zipori, 2011).

Les CS ont une capacité de se différencier en différentes cellules, y compris les cellules intestinales, cellules sanguines, cellules du foie (Figure 1) (Lan., 2021).



**Figure 1** : Différents types cellulaires se développant à partir d'une cellule souche

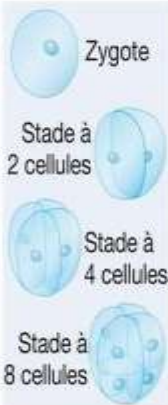
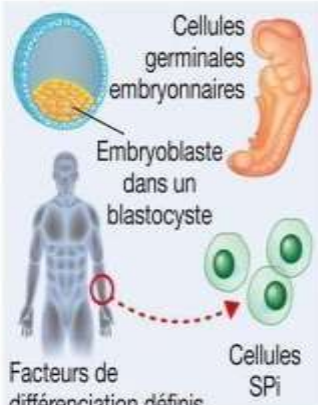
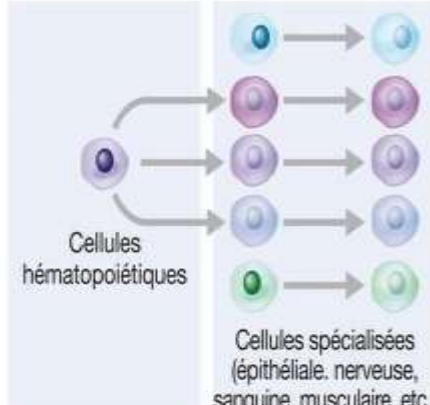
(<https://www.simplyscience.ch/fr/jeunes/geneabc/cellules-souches>)

### I.1.2 Classification des cellules souches :

Les cellules souches sont classées généralement selon leurs origines, leurs plasticités et leurs capacités de se différencier (Tableau I). Certaines, telles que les cellules souches embryonnaires (CSE) et les cellules souches pluripotentes induites (SPi), présentent une capacité pluripotente ou totipotente. Cela signifie qu'elles peuvent se transformer en tous les types de cellules nécessaires à la création d'un organisme complet (Yakhou *et al.*, 2024). Contrairement à la multipotence chez les cellules souches adultes (CSA) qui désigne la capacité d'une cellule souche à se transformer en divers types de cellules, mais uniquement au sein d'un éventail restreint de lignées étroitement liées (Sobhani *et al.*, 2017).

**Tableau I** : les différents types de cellules souches, leurs plasticités et leurs origines

(<https://monde.ccdmd.qc.ca/ressource/?id=121369&demande=desc>)

Cellules souches				
Types	Totipotentes	Pluripotentes	Multipotentes	Unipotentes
Plasticité	Très grande	Grande	Moyenne	Faible
Origine	CSE	CSE, cellules germinales embryonnaires, cellules de carcinome embryonnaire, SPi	Cellules souches fœtales, cellules amniotiques, cellules souches adultes	Cellules souches adultes
Exemple	 <p>Zygote Stade à 2 cellules Stade à 4 cellules Stade à 8 cellules</p>	 <p>Cellules germinales embryonnaires Embryoblaste dans un blastocyste Facteurs de différenciation définis Cellules SPi</p>	 <p>Cellules hématopoïétiques Cellules spécialisées (épithéliale, nerveuse, sanguine, musculaire, etc.)</p>	

### I.1.2.1 Cellules souches embryonnaires :

Les cellules souches embryonnaires sont des cellules pluripotentes qui se différencient en plusieurs types cellulaires, y compris les cellules neuronales, les cellules du muscle cardiaque, les cellules graisseuses et les cellules sanguines. Les CES ont été isolés pour la première fois en 1998 (**Thomson, 2006**). Ce type de cellules est dissocié généralement par une manipulation des embryons humains, car elles sont issues aussi de l'œuf fécondé et des quatre premiers blastomères, après quatre ou cinq jours de développement (**Klimanskaya, 2007**). Elles sont extraites majoritairement par la technique d'immuno-chirurgie, qui utilise le système immunitaire (anticorps) pour éliminer certaines cellules indésirables. Cette méthode permet une séparation ciblée, grâce à l'utilisation des éléments de complément porcins ou aux anticorps antisérum (**Vazin et al., 2010**). Ces cellules ont des marqueurs

spécifiques tels que SSEA-3 et SSA-4, et d'autres facteurs de transcription comme l'Oct-3, Oct-4 et Nanog (**Vazin et al., 2010**).

### I.1.2.2 Les cellules souches induites (SPi)

Les cellules souches induites, sont des cellules somatiques adultes reprogrammées par les facteurs de transcription appelés facteurs de Yamanaka (OCT4, SOX2, KLF4, c-MYC) (**Takahachshi et al., 2007**). Ces facteurs sont introduits dans les cellules à l'aide de rétrovirus (**Pan et al., 2022**), pour qu'elles puissent adopter les propriétés des cellules souches embryonnaires et ainsi se différencier soit en ectoderme, mésoderme ou endoderme (**Seki et al., 2010**). Après la reprogrammation, les SPi expriment les marqueurs clés de la pluripotente. Chez l'Homme, elles expriment les facteurs de transcription OCT4, SOX2, NANOG et les antigènes de surface SSEA-3, SSEA-4, TAR-1-60, TAR-1-81, qui sont similaires à ceux des cellules souches embryonnaires (**Montserrat et al., 2012**). Par contre chez les murins les facteurs de transcription exprimés sont Oct4, Sox2, Nanog, E-Ras, Cripto, Zfp296 en plus d'autres marqueurs tels que l'antigène SSEA-1, la phosphatase alcaline ainsi que les facteurs impliqués dans la reprogrammation KLF4, c-MYC, qui sont généralement utilisés pour l'identification des cellules souches embryonnaires chez les souris. (**Takahachshi et al., 2007**).

### I.1.2.3 Cellules souches adultes (CSA)

Les cellules souches adultes sont des cellules multipotentes qui incluent les cellules souches hématopoïétiques (CSH) qui sont des cellules issues du sang périphérique et du sang de cordon, qui différencient pour donner les cellules sanguines. Elles sont découvertes, dans les années 60 chez les souris irradiées et transplantées (**Yusoff et al., 2025**). La spécificité de ces cellules hématopoïétiques, c'est leurs capacités de produire chez l'adulte toute les seconde environ  $1,5 \times 10^6$  de n'importe quelle cellule sanguine, notamment les myéloblastes (dont les basophiles, neutrophiles et éosinophiles), les érythroblastes et les monoblastes. Les marqueurs de surface membranaire tels que SSAE-1, CD34 et CD133 existent seulement chez les CSH, ce qui permet leur identification. (**Wognum et al., 2003**) Parmi les CSM nous retrouvons également les Ainsi que les cellules souches mésenchymateuses (CSM) qui seront détaillées dans la partie suivante.

## I.2 Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) :

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) sont des cellules multipotentes non hématopoïétiques. Ces cellules sont isolées pour la première fois dans les années 60 et caractérisées en 1976 par le **Dr. Alexander Friedenstein (Friedenstein *et al.*, 1968)**. Le nom de « cellules souches mésenchymateuses » est proposé par Al. Caplan en 1991 (**Caplan, 1991**). Ces cellules jouent un rôle majeur du fait de leurs capacités de se différencier en cellules osseuses, cellules de cartilage, musculaires, tendon, ligament et tissu conjonctif. (**Caplan, 2007**). Les CSM sont isolés à partir de plusieurs tissus telles que le tissu fœtal et le sang périphérique (**Brown *et al.*, 2019**). Il existe d'autres sources alternatives y compris le sang de cordon ombilical, placenta, membrane synoviale, liquide synoviale, sang menstruel, la pulpe dentaire et la peau (**Rossignol *et al.*, 2013 ; Kern *et al.*, 2006**) ainsi que le cordon ombilical, la moelle osseuse et le tissu adipeux qui sont les plus utilisés dans les recherches et les essais cliniques (**Pitenger *et al.*, 2002 ; Reine *et al.*, 2014**).

Les cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse (CSM-MO) sont les premières cellules mésenchymateuses découvertes (**Tokcaer *et al.*, 2009**). Elle se retrouve dans la moelle osseuse, et sont généralement prélevées à partir de la crête iliaque (**Kern *et al.*, 2006**). Elles possèdent une capacité de se transformer en ostéocytes, adipocytes, chondrocytes, myocytes et cardiomyocytes (**Tokcaer *et al.*, 2009**).

Ces cellules montrent une forte expression de marqueurs associés à l'ostéogenèse, tels que Runx2, ALP et BMP-2. Cela indique une capacité élevée à générer le tissu osseux (**Sacchetti *et al.*, 2007 ; Zheng *et al.*, 2014**). De plus, elles manifestent une expression augmentée de gènes liés à la formation des cellules sanguines et à la régulation de l'environnement médullaire (**Sethe *et al.*, 2006**).

Étant donné que la moelle osseuse est un lieu de remodelage osseux actif, donc les CSM-MO ont naturellement tendance à se différencier en ostéoblastes (**Ugarte *et al.*, 2013 ; Wagner *et al.*, 2005**).

En raison de leur origine et de leur potentiel pour la formation osseuse, les CSM-MO sont couramment utilisées en orthopédie. Elles sont explorées pour traiter les fractures, l'ostéonécrose, ainsi que pour le renforcement des os (**Hernigou *et al.*, 2005**).

Les cellules souches mésenchymateuses de tissu adipeux appelées les cellules souches stromales adipocytaires seront décrites dans la section suivante.

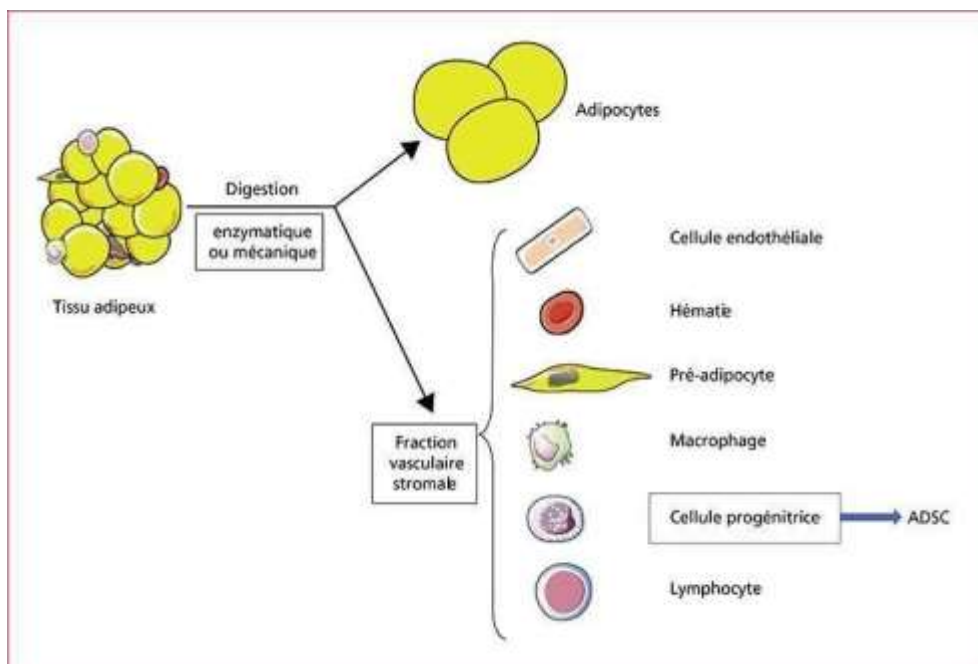
### I.3 Cellules souches mésenchymateuses de tissus adipeux AD-MSCs

Les AD-MSCs sont isolées chez les souris à partir du tissu adipeux de plusieurs régions sous-cutanées telles que la région inguinale, le scapulaire dorsal au haut du dos et dans l'interscapulaire (El-Husseiny *et al.*, 2023). Elles se trouvent également dans les régions viscérales y compris la cavité abdominale, l'épididymaire autour des testicules chez le mâle et dans la région qui entoure les ovaires chez les femelles, et se trouve aussi dans le péritonéal entre les plis de l'intestin (Tholpady *et al.*, 2003).

Les AD-MSCs offrent une alternative efficace par rapport aux autres sources classiques comme les CSM-MO, avec des avantages majeurs en termes d'accessibilité, de rendement et de potentiel thérapeutique, tels que leurs efficacités dans la régénération tissulaire et la réparation osseuse (Zhong *et al.*, 2022). Elles ont la capacité de se différencier en cellules mésodermiques, ostéocytes, adipocytes, chondrocytes et myocytes (Claire, 2012).

#### I.3.1 Localisation des AD-MSCs

Suite à la dégradation enzymatique d'un échantillon de tissu adipeux blanc, deux composants distincts sont isolés : les adipocytes, qui constituent les cellules graisseuses elles-mêmes, et la fraction stromale vasculaire (FSV) qui englobe une diversité de cellules, notamment les cellules souches mésenchymateuses (Figure 2) (Seale *et al.*, 2011).



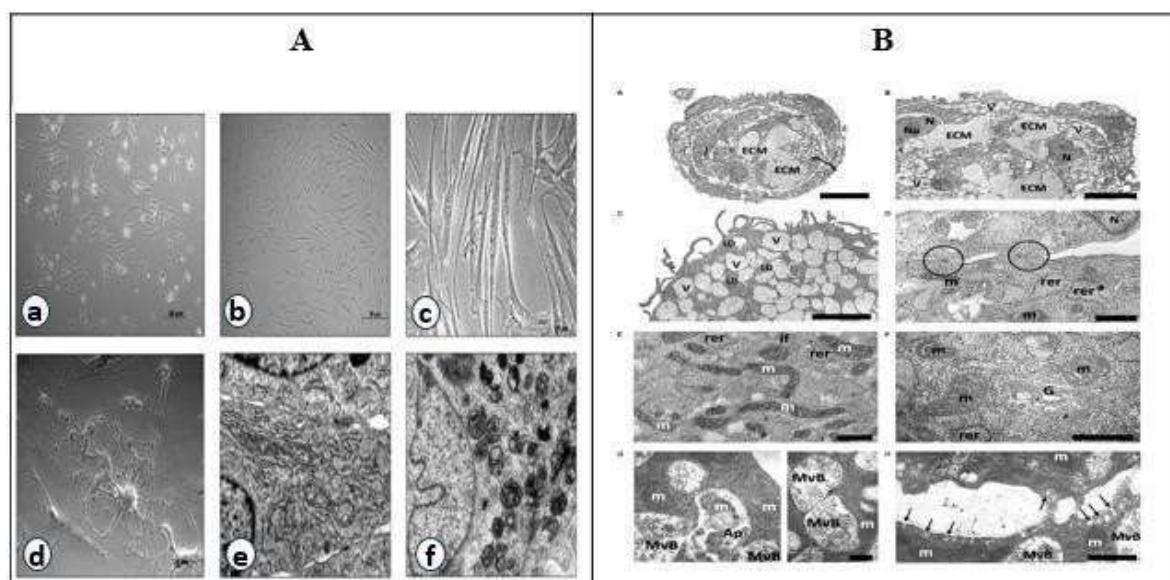
**Figure 2 :** Les composants de tissu adipeux après une digestion mécanique ou enzymatique

([https://www.jle.com/e-docs/00/04/ED/21/HPG\\_295\\_0565\\_im001.jpg](https://www.jle.com/e-docs/00/04/ED/21/HPG_295_0565_im001.jpg))

### I.3.2 Structure et morphologies des CSM dérivés de tissu adipeux

Les AD-MSC observées sous microscope électronique présentent un noyau euchromatique de grande taille, avec un cytoplasme riche en mitochondries allongées, un réticulum endoplasmique rugueux dilaté et un appareil de Golgi bien développé qui indiquent une synthèse protéique plus active (**Figure 3A**) (**Kyryk et al., 2023**).

En culture, elles adoptent une forme allongée fusiforme, qui adhère aux surfaces plastiques, créant des tapis cellulaires similaires aux fibroblastes (**Figure 3B**) (**Danisovic et al., 2017**). En outre, elles expriment des marqueurs phénotypiques de cellules souches, incluant CD77, CD90 et CD105, tandis que les marqueurs phénotypiques des cellules souches hématopoïétiques, tels que CD34 et CD45, sont absents (**Danisovic et al., 2017**). Leur morphologie commence à changer après le septième passage en culture. Les cellules deviennent plus volumineuses et le nombre de projections cytoplasmiques s'élargit. Au fur et à mesure des passages, leurs morphologies continuent d'évoluer, jusqu'à l'apparition de débris dans le milieu de culture après 20 à 30 passages (**Danisovic et al., 2017**).



**Figure 3** : Observations microscopiques des AD-MSCs. **A**, Observation microscopique d'un tapis cellulaire forme par les AD-MSCs (**Danisovic et al., 2017**). (a) Observation au début de la culture cellulaire ; (b) Observation entre 1 passage et 6<sup>ème</sup> passage ; (c) Observation après 7<sup>ème</sup> passage ; (d) Observation aux 10<sup>ème</sup> passage ; (e) Observation de tissu adipeux entre 1P et 6 P ; (f) Observation de T.A entre 25P et 30P. **B**, Illustre la structure des sphéroïdes issus des cellules stromales mésenchymateuses dérivées du tissu adipeux de souris après 14 jours de culture. (**Kyryk et al., 2023**). Noyau (N) ; Nucléole (nu) ; vacuoles (V) ; Cytoplasme contenant des corps multivésiculaires endosomaux tardifs (MvB) mitochondries (m) ; Appareil de Golgi bien développé (G) ; Gouttelettes lipidiques (LD) ; Un fragment de mitochondrie est visible dans un autophagosome (Ap) ; Un réticulum endoplasmique rugueux (rer)

### I.3.3 Les Caractéristiques des AD-MSCs

L'utilisation du tissu adipeux comme source de cellules souches mésenchymateuses présente plusieurs avantages. Tout d'abord, ce tissu est facilement accessible et moins invasif que la moelle osseuse. Ensuite, le rendement en cellules souches mésenchymateuses est supérieur, atteignant entre 350 000 et 1 000 000 par gramme, alors qu'il ne varie que de 500 à 50 000 par gramme dans la moelle osseuse (**Carrona et al., 2007**). De plus, les CSM issus de tissu adipeux conservent leurs potentiels de différenciation même après de nombreux passages en culture.

Les cellules souches mésenchymateuses issues du tissu adipeux possèdent une forte capacité d'adhérence au plastique, ainsi qu'une prolifération rapide (**Faraser et al., 2006**). Elles présentent également un potentiel immunosuppresseur élevé et expriment en plus des quantités élevées de médiateurs anti-inflammatoires par rapport à celles dérivées de la moelle osseuse. De plus, elles affichent une faible expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II, ce qui permet une transplantation allogénique avec un risque de rejet immunitaire réduit, et donc une immunogénicité moins importante (**Najar et al., 2010**).

### I.3.4 Les Propriétés et les effets des AD-MSCs

Les AD-MSCs sont particulièrement intéressantes en médecine régénérative du fait de leurs propriétés immunomodulatrices, paracrine et leurs capacités de migrer vers les tissus endommagés. Ainsi que leurs effets anti-inflammatoires et anti-fibroniques.

Les cellules souches mésenchymateuses provenant du tissu adipeux (AD-MSCs) possèdent de puissantes aptitudes à moduler le système immunitaire, principalement en interagissant avec différents types de cellules immunitaires. Ces interactions leur permettent de moduler à la fois les réponses immunitaires innées et adaptatives, ce qui les rend particulièrement intéressantes dans le contexte thérapeutique notamment dans le traitement des maladies inflammatoires et auto-immunes (**Prockop et al., 2009 ; Guillén et al., 2018**).

En effet, des études ont montré que les AD-MSCs réduisent la multiplication des lymphocytes T activés, contribuant ainsi à contrôler l'expansion des réponses immunitaires spécifiques (**Prockop et al., 2009**). De plus, elles exercent un effet inhibiteur sur l'activité des cellules tueuses naturelles (NK) et sur le développement des cellules dendritiques, réduisant ainsi l'activation des réponses immunitaires innées (**Prockop et al., 2009**).

En outre, les AD-MSCs favorisent la transformation des macrophages vers un type M2, reconnu pour ses propriétés anti-inflammatoires et réparatrices, par contraste avec les macrophages de type M1, qui induisent une inflammation (Guillén *et al.*, 2018). Ce changement de phénotype contribue à un microenvironnement plus favorable à la résolution de l'inflammation (Guillén *et al.*, 2018). À l'échelle moléculaire, les effets immunosuppresseurs des AD-MSCs proviennent en grande partie de la libération de cytokines et de facteurs paracrines. Parmi ceux-ci, l'interleukine-10 (IL-10) est particulièrement étudiée, car elle inhibe la fabrication de cytokines pro-inflammatoires et limite l'activation des cellules du système immunitaire (Prockop *et al.*, 2009 ; Guillén *et al.*, 2018). Le facteur de croissance transformant  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), également libéré par les ADMSCs, joue un rôle clé dans la tolérance immunitaire et la répression des lymphocytes T (Prockop *et al.*, 2009). D'autres médiateurs importants incluent la prostaglandine E2 (PGE2), qui module l'activité des cellules dendritiques et des macrophages, ainsi que l'enzyme indole amine 2,3-dioxygénase (IDO), qui limite la prolifération des lymphocytes T en dégradant le tryptophane, un acide aminé essentiel à leur activation (Guillén *et al.*, 2018).

Les AD-MSCs possèdent des propriétés anti-inflammatoires importantes. Ils agissent directement sur les cellules du système immunitaire et indirectement via la modulation du microenvironnement inflammatoire (Guillén *et al.*, 2018). Elles provoquent en particulier une diminution significative de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$  (Facteur de Nécrose Tumorale-alpha) et l'IL-6 (Interleukine-6), ce qui aide à réduire l'inflammation généralisée (Saldaña *et al.*, 2019). En outre, les AD-MSCs empêchent l'accumulation de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS), qui sont des indicateurs de stress oxydatif, et limitent l'activation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B, un des régulateurs essentiels d'inflammation (Guillén *et al.*, 2018). Ces effets permettent également de prévenir le vieillissement des cellules immunitaires confrontées à un stress oxydatif, préservant ainsi leur fonctionnalité et maintenant leur efficacité (Saldaña *et al.*, 2019).

Les AD-MSCs jouent un rôle crucial dans le domaine thérapeutique grâce à leur activité paracrine notable, via la sécrétion de facteurs solubles et de vésicules extracellulaires (Zhao *et al.*, 2023). Parmi les principaux éléments sécrétés, on trouve le VEGF (facteur de croissance endothélial vasculaire), l'HGF (facteur de croissance des hépatocytes), l'IGF-1 (facteur de croissance apparenté à l'insuline-1) et le FGF-2 (facteur de croissance des fibroblastes-2), tous actifs dans le processus de régénération des tissus, la protection des

cellules et la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (**Zhao et al., 2023**).

En plus de ces facteurs solubles, les AD-MSCs libèrent des vésicules extracellulaires, comme des exosomes et des microvésicules, qui jouent un rôle essentiel dans la communication entre les cellules (**Cheng et al., 2020**). Ces vésicules transportent une variété de biomolécules actives, y compris des protéines, de l'ARN messager et des microARN, qui ont la capacité d'influencer le comportement des cellules cibles (**Cheng et al., 2020**).

Une des propriétés essentielles des AD-MSCs est leur capacité de se déplacer activement vers les zones de lésion ou d'inflammation, un phénomène appelé "homing" (**Rombouts et al., 2003**). Ce penchant pour des tissus spécifiques est principalement facilité par la présence du récepteur CXCR4 sur la membrane des cellules, qui se lie à la chimiokine SDF-1 (CXCL12), présente en grande quantité dans les tissus lésés (**Rombouts et al., 2003**). Ce déplacement ciblé est crucial pour garantir la contribution des AD-MSCs aux mécanismes de réparation des tissus.

Dans divers modèles précliniques, les AD-MSCs ont prouvé leur capacité à diminuer le développement de la fibrose, notamment dans des organes comme les poumons, le foie ou les reins (**Khalifa et al., 2022**). Cette capacité anti-fibrotique repose sur plusieurs mécanismes, y compris l'inhibition de la transformation des fibroblastes en myofibroblastes, qui sont les cellules responsables de la contraction et de la production en excès de matrice extracellulaire (**Akyurekli et al., 2015**). Par ailleurs, les AD-MSCs participent à la réduction de la production de composants de la matrice, tels que le collagène de type I et la fibronectine, ce qui limite l'accumulation de tissu cicatriciel et préserve la fonctionnalité des organes (**Khalifa et al., 2022**).

### **I.3.5 Les différents milieux de cultures des AD-MSCs**

Le milieu de culture est crucial pour la prolifération et la spécialisation des AD-MSCs. La sélection du milieu influence directement la qualité, la sécurité et l'efficacité des cellules, surtout dans un cadre thérapeutique. Voici les milieux de culture généralement utilisés :

### **I.3.5.1 Milieux standards contenant du sérum de veau foetal (FBS)**

Traditionnellement, des milieux de culture tels que le Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ou le Minimum Essential Medium Alpha ( $\alpha$ -MEM), supplémentés de 10 à 20 % de sérum de veau foetal (FBS), ont été employés pour la culture des AD-MSCs. Ces milieux sont propices à la croissance et à la différenciation des cellules (**Bieback *et al.*, 2008**).

### **I.3.5.2 Milieux xeno-free (sans sérum animal) :**

Dans le contexte des applications cliniques, on privilégie les alternatives sans xénobiotiques au FBS. Par exemple, le lysat plaquettaire humain (hPL), qui est riche en facteurs de croissance, stimule l'expansion des AD-MSCs tout en minimisant les dangers immunologiques associés au FBS (**Schallmoser *et al.*, 2007**). L'usage de hPL favorise la multiplication et la préservation du phénotype des AD-MSCs sans nuire à leur capacité de différenciation (**Chieregato *et al.*, 2011**).

### **I.3.5.3 Substituts commerciaux au FBS**

Certaines études ont exploré l'utilisation de suppléments commerciaux tels que l'Ultroser G (un substitut de sérum d'origine humaine), qui améliore la prolifération des ADMSCs tout en préservant leurs propriétés biologiques, comme leur capacité de différenciation et leur phénotype. (**El-Saqi *et al.*, 2014**).

### **I.3.5.4 Milieux spécifiques de différenciation**

La différenciation des AD-MSCs demande l'utilisation de milieux spécifiques en fonction du lignage désiré, y compris l'ostéogénèse qui nécessite une composition comprenant la dexaméthasone, l'acide ascorbique et la  $\beta$ -glycérophosphate qui stimule la création de la matrice osseuse (**Pittenger *et al.*, 1999**). Ainsi que l'adipogénèse qui se fait en présence d'une combinaison d'insuline, dexaméthasone et d'indométacine qui favorise la création d'adipocytes (**Zuk *et al.*, 2001**). De plus, la Chondrogenèse se réalise en présence de TGF- $\beta$ 3 pour favoriser une différenciation réussie en chondrocytes (**Barry *et al.*, 2001**).

### I.3.6 Les différentes méthodes d'isolement et de des AD-MSCs

Les AD-MSCs sont isolées par plusieurs méthodes différentes où chaque méthode présente des avantages et des inconvénients par rapport aux autres. (**Tableau II**)

**Tableau II** : Comparatif des méthodes d'isolement des AD-MSCs :

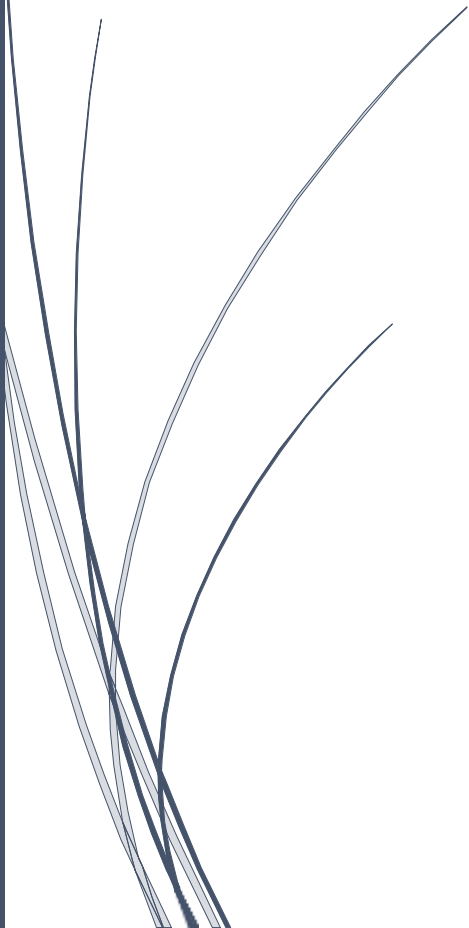
Méthodes	Principe	Avantages	Inconvénients	Applications	Références
Enzymatique	La digestion de tissu adipeux se fait par des enzymes y compris la collagénase de type I ou II.	- Haut rendement cellulaire - Haute viabilité - Population homogène	- Coût élevé - Usage d'enzymes d'origine animale - Moins conforme GMP	Appliquer dans la recherche fondamentale	(Zuk <i>et al.</i> , 2002 ; Bourin <i>et al.</i> , 2013)
Mécanique	Ce fait par une fragmentation physique : agitation, filtration, centrifugation	- Rapide et simple Sans enzyme - Compatible GMP	- Moins de cellules - Population hétérogène	Appliquée dans la Chirurgie régénérative	(Raposio et Ciliberti, 2017 ; Aronowitz <i>et al.</i> , 2015)
Chimique	Ce fait par l'utilisation de détergents doux ou chélateurs (EDTA, trypsine)	- Moins agressif . - Peut remplacer les enzymes animales	- Rendement variable. - Moins étudiée	Appliquer dans le domaine du développement	(Shah <i>et al.</i> , 2013 ; Condé-Green <i>et al.</i> , 2016)
Combinée	Ce fait par une Association mécanique et enzymatique à faible concentration	- Rendement optimisé. - Moins d'enzymes utilisées - Meilleure conformité	Besoin d'équipements spécifiques, Coût, moyen/élevé	Appliquer dans les recherches précliniques et cliniques	(Markarian <i>et al.</i> , 2014 ; Aronowitz et Ellenhorn, 2013)

### I.3.7. Applications des AD-MSCs

Les AD-MSCs sont utilisées comme modèle cellulaire dans le domaine de la recherche pour étudier la différenciation, les interactions cellulaires et les mécanismes moléculaires impliqués dans diverses pathologies (**Bar-Nur *et al.*, 2011**). En plus, les AD-MSCs ont un fort potentiel de différenciation (ostéogénique, chondrogénique, adipogénique) et sont donc largement utilisées pour la réparation des tissus, notamment dans les thérapies osseuses et cartilagineuses en médecine régénérative (**Pittenger *et al.*, 2019**). Les AD-MSCs ont été utilisés aussi pour les traitements des maladies auto-immunes, des troubles neurologiques et des affections inflammatoires chroniques grâce à leurs propriétés immunomodulatrices et anti-inflammatoires (**Uccelli *et al.*, 2008**).

**Chapitre II**

# **Matériels et méthodes**



## II.1 Matériel

### Modèle animal

Des souris consanguines de souche albinos BALB/C mâles (**Figure 4**), âgées de 10 à 12 semaines, fournies par l'institut Pasteur d'Alger, ont été utilisées comme modèle animal et gardées au niveau de l'animalerie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie (SNV) de l'Université A. MIRA (Campus Targa-Ouzemour).

Les souris ont été élevées dans des cages en polypropylène (**Figure 5**) (nettoyées chaque trois jours), dans une salle régulée à une température de  $25 \pm 5$  °C et à une humidité de  $60\% \pm 5$ , avec un cycle de lumière/obscurité 12h/12h, avec un accès libre à l'eau par les biberons (**Figure 06**) et à la nourriture.



**Figure 4 :** Image d'une souris BALB/C



**Figure 5 :** Photographie originale de l'une des cages Hébergeant les souris



**Figure 6 :** Photographie originale des biberons de lait (200 ml de lait concentré)

Pour le matériel chimique et organique utilisé ainsi que les instruments voir **l'Annexe 1 et 2**.

## II.2 Méthodes

### II.2.1 Prise et analyse de poids

Cinq souris ont été sélectionnées parmi diverses cages pour recevoir du lait concentré. Leur poids a été évalué régulièrement afin de comparer leur évolution à celle des autres souris du groupe contrôle.

Deux doses différentes de lait concentré ont été testées. Une première dose de 5g /L a été administrée chaque 3 jours pendant 21 jours puis une seconde dose supérieure 10g/L a été donnée par la suite.

De plus, un volume de 300 ml d'eau a été distribué aux souris témoins (cages témoins), tandis que 200 ml de lait concentré ont été fournis aux souris traitées. Cette étape visait à évaluer si les souris consomment la même quantité de liquide ou non.

La préparation de solution lait concentré a 5g/l et a 10g/l, ainsi que sa composition sont décrites dans l'**Annexe 3**.

La préparation des solutions qui sont utilisées pour le traitement des organes (tissu adipeux et cerveaux) est mentionné dans l'**Annexe 4**.

### II.2.2 Traitement des souris :

#### II.2.2.1 Euthanasie :

Prépare la boîte en plaçant le papier avec des petits trous au milieu de la boîte pour la diviser en deux parties, mettre la souris d'un côté et un morceau de gaze de l'autre côté après l'avoir trempé dans un tube qui contient de chloroforme, ferme bien la boîte après deux minutes, on constate la mort de la souris. (**Figure 7**).

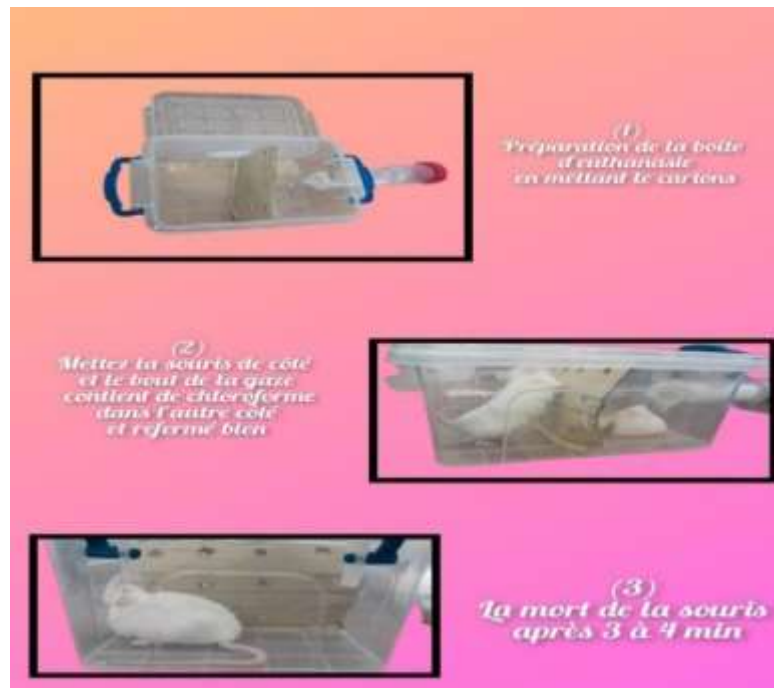


Figure 7 : photographies originales montre les étapes d'euthanasies

### II.2.2.2 La dissection de la souris :

Après l'euthanasie de la souris, on va la récupérer pour la dissection, après avoir nettoyé et désinfecté bien avec l'éthanol la payasse de la PSM et les instruments utilisé lors de la dissection.

Sur une plaque de dissection bien nettoyer, on place la souris en décubitus dorsal (sur le dos), en suite on va fixer bien ces pattes avec de épingles pour stabiliser son corps, et désinfecté la surface de l'abdomen bien exposé avec l'éthanol (**figure 8**).

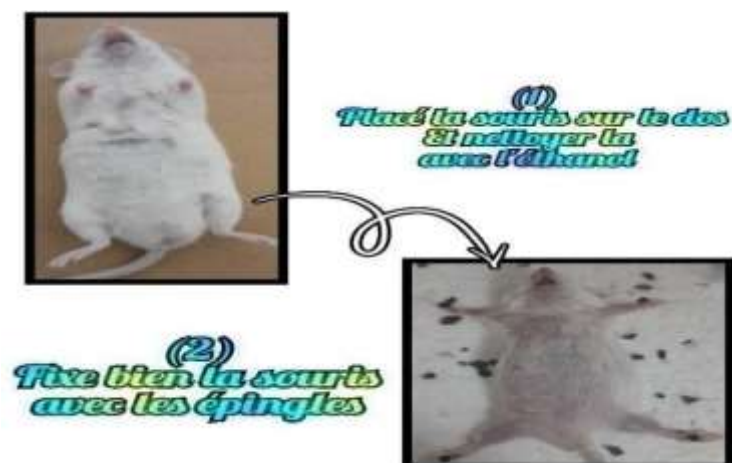


Figure 8 : photographies originales de l'étape de fixation d'une souris sur la plaque de dissection

Soulevé la peau avec une pince puis réalisé une petite coupure en bas à l'aide des Ciseaux, Incéré une sonde de la région pubienne jusqu'au thorax puis réalisé une première incision cutanée en suivant la sone Inséré. (Figure 9)

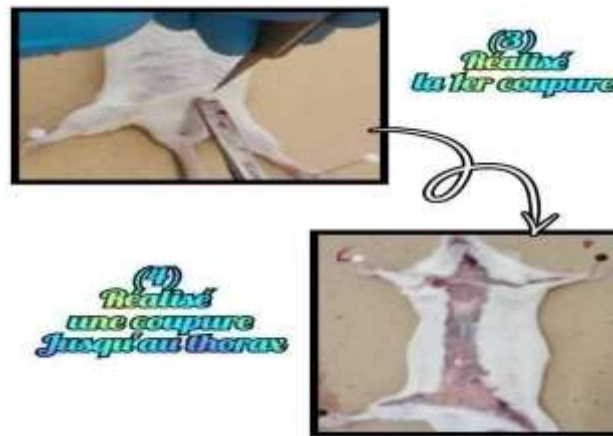


Figure 9 : Photographie originale de l'étape de coupure lors de dissection d'une souris

Séparé doucement la peau des muscles sous-jacents à l'aide des pinces, écarte bien la peau vers les cotes et fixe-la avec des épingles pour mieux exposée les muscles et la cavité abdominale. (Figure 10 photos 01).

Ouvrir la paroi abdominale en incisant les muscles abdominaux le long de la ligne médiane, son touches les organes (figure 10 photos 02).

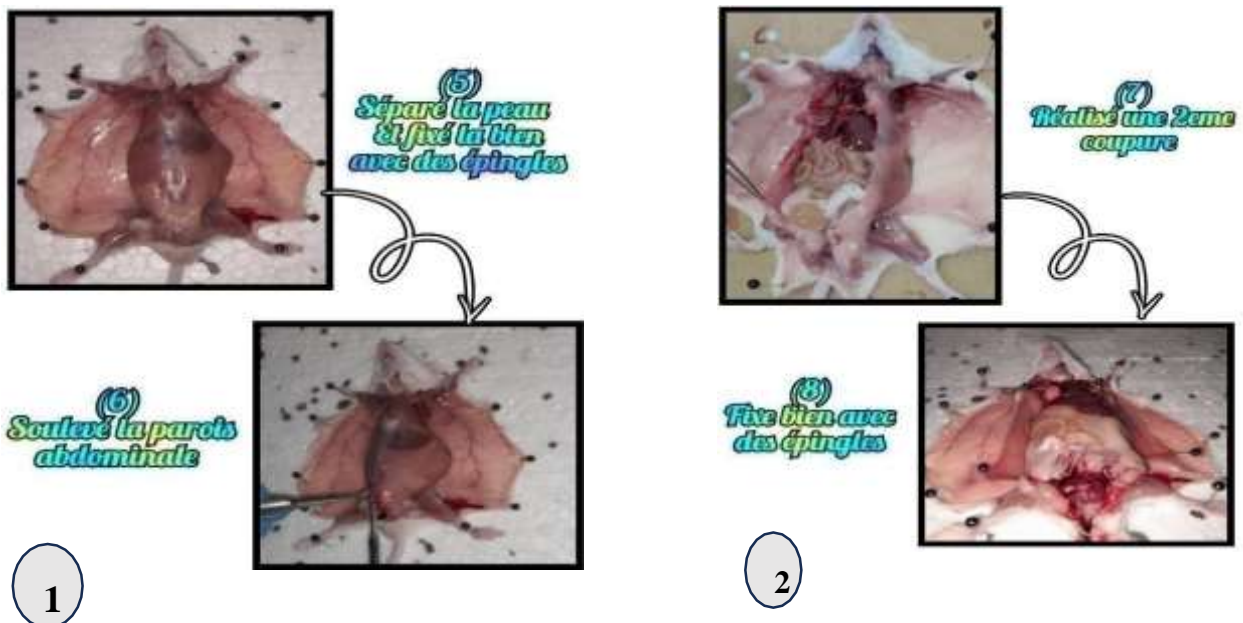


Figure 10: Photographie originale de la 2ème étapes de dissection

**Récupération des organes :**

Récupéré le tissu adipeux (**figure 11**) qui se dépose dans plusieurs régions (**figure 12**).



**Figure 11 :** Photographie originale montre les dépôts de tissu adipeux



**Figure 12 :** Photographie originale de l'étape de récupérations de tissu adipeux récupéré

Pour récupérer le cerveau, on place la souris sur le ventre puis on fixe ces pattes et sa tête avec des épingles avec désinfection de la tête par l'éthanol 70%, puis on réalise une incision le long du cuir chevelu à l'aide des ciseaux pour bien exposer le crâne, par la suite on le coupe délicatement pour éviter d'endommager le tissu cérébral (**figure 13**). Ecarte les oses du crâne et soulevé le cerveau à l'aide d'une spatule après avoir coupé les nerfs avec des ciseaux (**figure 14**).



**Figure 13 :** Photographie originale des étapes d'exposition de cerveaux



**Figure 14 :** Photographie originale de l'étape de récupérations de cerveaux

### II.2.2.3 Traitement de cerveau

Une fois l'animale euthanasie et disséquer le cerveau est récupéré et placer dans un tube de 50 ml contient du RPMI complet ( avec le glutamine et les antibiotiques ). L'organe est par la suite découpé en petits morceaux puis incubés à 4°C pendant 2 à 3h afin de récupérer les facteurs neuronaux nécessaires à la culture de nos cellules. Une fois l'incubation terminée le tube est centrifugé à 1200 rpm pendant 6 min. Le surnagent est récupéré et placer dans un autre tube à l'aide d'une micropipette que l'on garde à 4°C jusqu'à son utilisation.

### II.2.2.4 Traitement de tissu adipeux pour isoler les cellules souches mésoenchymateuses

Après dissection, le tissu adipeux est pesé afin d'évaluer la quantité de trypsine à ajouter pour la digestion et l'isolation des cellules (**Tableau III**).

**Tableau III:** Volumes de trypsine-EDTA utilisés selon le poids de tissu adipeux récupéré.

Numéro de la souris	1	2	3	4	5	6	7	8
Poids de tissu récupéré (g)	1,4	1,97	3,49	1,81	2,06	2,55	2,06	1,18
Volume de la solution trypsine-EDTA rajouté (ml)	7	9,85	17,45	9,05	10,3	12,75	10,3	5,9

Sous Poste de Sécurité Microbiologique (PSM) à flux laminaire, trois lavages successifs du tissu adipeux sont effectués à l'aide de solution physiologique stérile afin d'éliminer les traces de sang. Le tissu est ensuite transféré dans un tube contenant une petite quantité de solution physiologique, puis découpé en petits fragments à l'aide de ciseaux stériles.

Le mélange (tissu fragmenté + solution physiologique) est centrifugé à 1000 rpm pendant 7 minutes à 4 °C. Le culot obtenu est ensuite traité avec un volume prédéterminé de solution de trypsine. La suspension est transférée dans une boîte de Pétri, où le tissu est soigneusement dissocié mécaniquement. La boîte est incubée à 37 °C pendant 20 minutes afin de permettre l'action enzymatique.

À la fin de l'incubation, le contenu de la boîte est récupéré à l'aide d'une micropipette et transféré dans un tube de 50 ml. Afin de neutraliser l'effet de la trypsine rajouter 10ml de l'eau physiologique. Le mélange est vortexé, puis centrifugé à 1000 rpm pendant 5 minutes à 4 °C.

Le culot cellulaire est ensuite remis en suspension dans du milieu RPMI, vortexé, puis centrifugé de nouveau à 1000 rpm pendant 7 minutes à 4 °C. Cette étape est répétée trois fois afin d'éliminer toute trace résiduelle de trypsine-EDTA. Les cellules obtenues sont alors prêtes pour l'étape de culture.

### II.2.3 Culture cellulaire

Les cellules isolées sont remises en suspension dans un mélange de 5 ml de surnageant cérébral (préalablement récupéré) et 5 ml de milieu RPMI complet (enrichi en glutamine et antibiotiques). Après avoir été vortexé, la suspension cellulaire est transférée dans une boîte de Pétri, puis incubée à 37 °C dans une atmosphère à 5 % de CO<sub>2</sub> pendant 48 heures. (**Figure 15**)



**Figure 15** : Photographie originale de boîte de culture

#### Remarque

Pour les souris 07 et 08, les tissus adipeux ont été additionnés et traités ensemble dans un même tube. Lors de la mise en culture, le surnageant cérébral combiné des deux souris, préalablement traité avec du RPMI complet, a été ajouté à la boîte de Pétri.

### II.2.4 Préparations des lames microscopiques

Les cellules des cultures 1 et 2 sont suspendues dans du para formaldéhyde (PFA) 4% puis déposées sur lames afin d'être observées au microscope optique.

Les cellules des cultures 3, 4, 5, 6 et 7+8 ont été colorées par deux méthodes différentes : coloration à l'Hématoxyline Eosine (HE) et coloration Geimsa.

### Coloration à l'Héματοxyline Eosine (HE)

Les cellules sont étalées sur lames puis placées dans de l'éthanol 96% pendant 20 minutes pour assurer la fixation des échantillons. Elles ont ensuite été rincées à l'eau distillée, puis immergées dans de l'héματοxyline de Harris pendant 3 à 4 minutes afin de colorer les noyaux en violet. Après un nouveau rinçage, les lames ont été plongées dans l'éosine pendant 1 à 3 minutes pour permettre la coloration du cytoplasme en rose.

Les lames ont ensuite suivi une série de déshydratations successives dans l'éthanol, puis dans un bain d'éthanol-xylène, avant d'être clarifiées au xylène pur. Le montage final des échantillons a été effectué en déposant une lamelle à l'aide d'un l'eukit de montage adapté. Après quelques minutes de séchage, les lames ont été observées au microscope optique.

Pour les cultures 4, 5 et 6, cinq lames ont été préparées pour chaque culture en utilisant la même procédure de coloration HE, soit un total de 15 lames. **(Figure 16)**



Éthanol

Eau

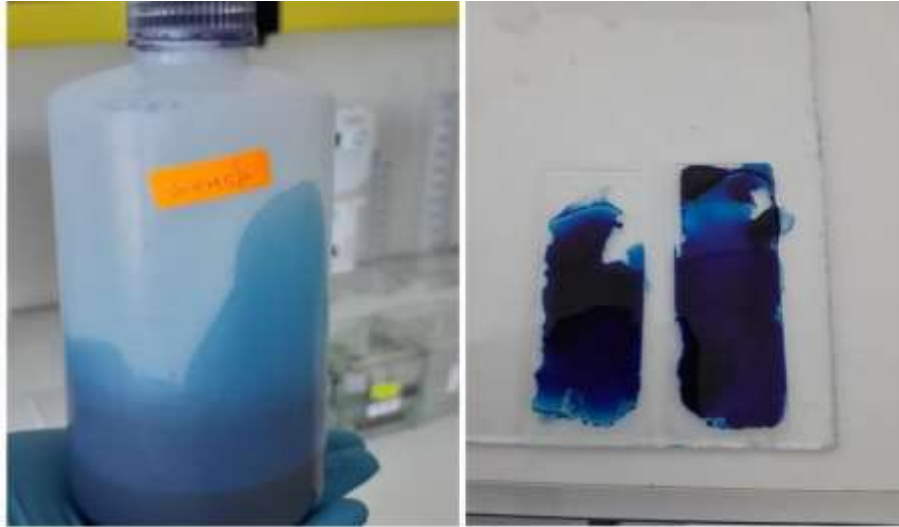
Héματοxyline

Eosine

**Figure 16** : Les étapes de la coloration (HE) Ethanol Eau Héματοxyline Eosine

### Coloration Giemsa :

Une sixième lame a été préparée pour chaque culture (Souris 4, 5 et 6) pour une coloration différentielle au Giemsa. Une goutte de suspension cellulaire a été étalée sur chaque lame, puis colorée avec du Giemsa pendant 4 minutes. Les lames ont ensuite été rincées avec de l'eau, montées à l'aide de l'eukit, puis observées au microscope. **(Figure 17)**



**Figure 17 :** Coloration giemsa

### II.2.5 Observation microscopique

Ce microscope inversé permet l'analyse des cellules grâce à un système de contraste de phase, idéal pour visualiser la morphologie cellulaire sans coloration (**Figure 18**)



**Figure 18 :** Photographie originale de microscope optique de la marque Leica

**Type de microscope :** microscope optique inversé

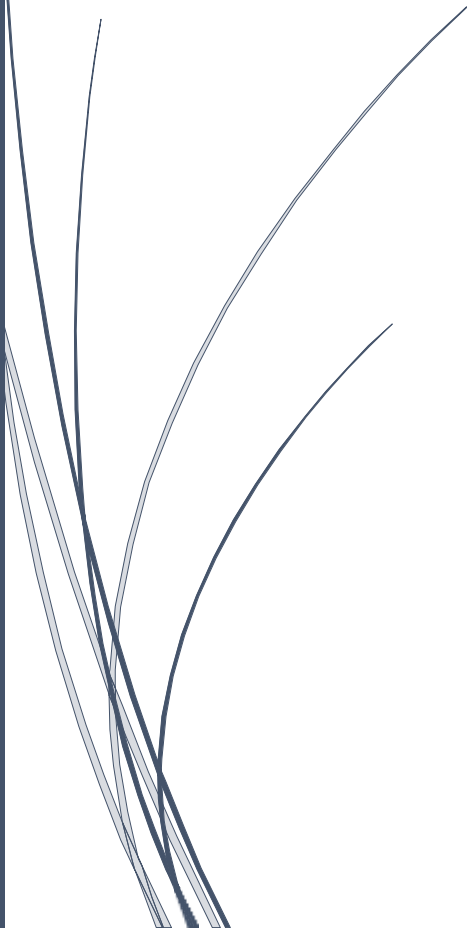
**Marque/ modèle :** Leica Microsystems-modèle typique

**Technique d'observation :** contraste de phase (ou lumière transmise, selon configuration)

**Grossissement utilisé :** X4 jusqu'à X100

**Chapitre III**

# **Résultats Et discussion**

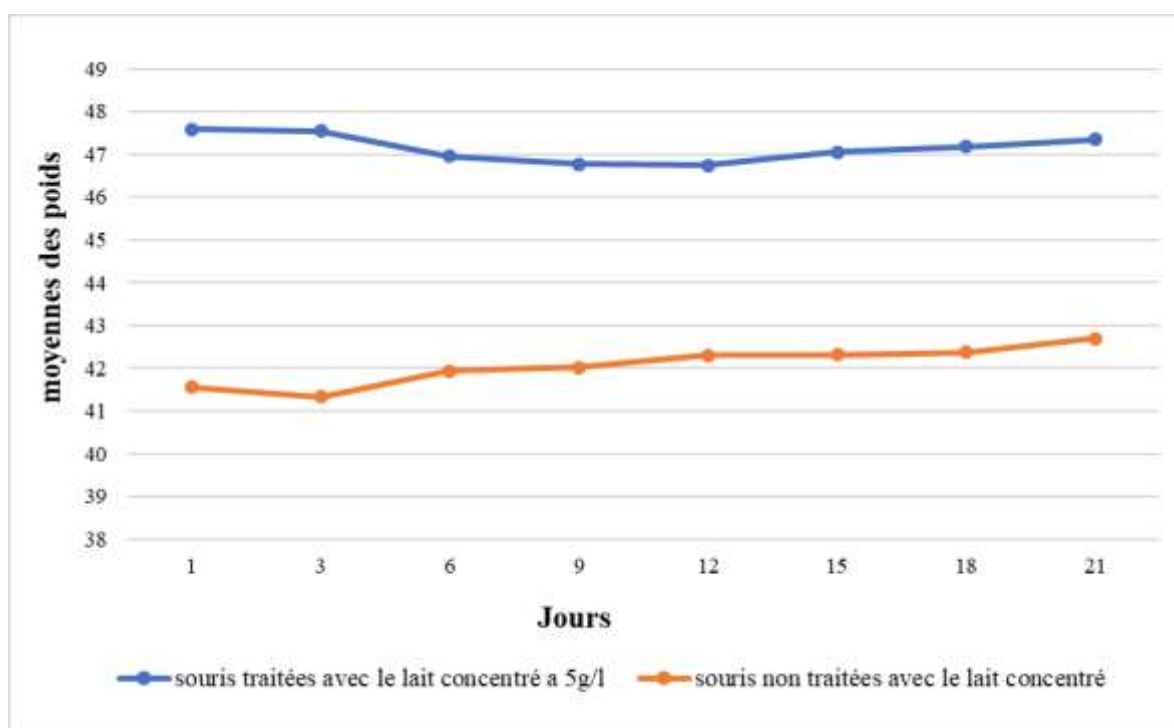


### III.1 Analyse différentielle du modèle animal

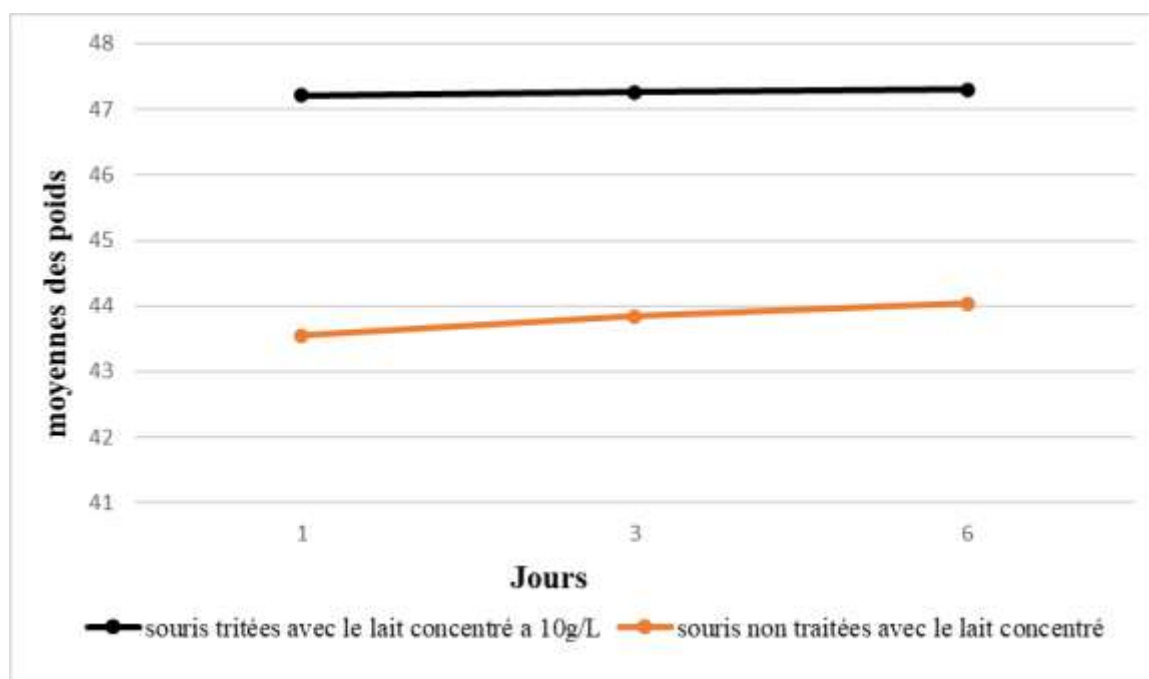
#### III.1.1 Effet de lait concentré sur le poids corporel des souris

Dans l'évaluation de la prise de poids, cinq souris ont été soumises à un traitement avec du lait concentré à deux doses différentes, la première étant de 5 g/l et la seconde de 10 g/l. La pesée des souris mâles BALB/c ainsi que leur consommation d'eau a été réalisée tous les 3 jours pendant l'expérimentation.

Au cours des **21 jours** de la période expérimentale, une faible prise de poids a été observée chez les souris témoins non traitées (**Figure 19**). En revanche, les souris mâles BALB/c ayant reçu du lait concentré sucré aux concentrations de **5 g/L** et **10 g/L** n'ont pas présenté une augmentation de leur poids corporel. Le poids est resté relativement stable dans les deux groupes traités tout au long de l'expérimentation. Les données rapportées dans la **Figure 20** montrent que l'administration de lait concentré, quelle que soit la concentration, n'a pas entraîné de variation pondérale marquée chez les souris traitées par rapport au groupe témoin.



**Figure 19 :** Courbe montrant l'évolution des poids des souris durant la phase de traitement avec (5g/l) de lait concentré.



**Figure 20 :** Courbe montrant l'évolution des poids des souris durant la phase de traitement avec (10g/l) de lait concentré

Dans notre protocole, la dose initiale de 5 g/L, soit environ 1 g/kg/jour, et la dose secondaire de 10 g/L soit 2 g/kg/jour restent largement inférieures aux seuils d'efficacité rapportés dans des études précédentes réalisées sur des souris males C57BL/6 (Zhang *et al.*, 2015 ; Almeida *et al.*, 2017). En effet ces chercheurs ont montré que des effets métaboliques notables, tels que la prise de poids ou des troubles du métabolisme, nécessitent généralement des doses élevées, comprises entre 8 et 15 g/kg/jour.

De plus, de Montgomery *et al.* (2013) ont indiqué que la lignée BALB/c montre une résistance génétique significative à l'obésité causée par l'alimentation. En comparaison avec d'autres lignées comme les C57BL/6, les souris de type BALB/c exigent des protocoles plus rigoureux, combinant une forte teneur en graisses, un apport élevé de sucres et une période prolongée (souvent supérieure à **8 semaines**, et allant jusqu'à **20 semaines** dans certains modèles expérimentaux,) pour provoquer une prise de poids notable (Montgomery *et al.*, 2013). L'emploi de cette lignée résistante dans notre protocole représente donc une limitation importante à l'efficacité du traitement. La composition du lait concentré utilisé dans notre étude, qui est riche en sucres simples mais relativement déficiente en acides gras essentiels, pourrait aussi expliquer l'inefficacité du traitement.

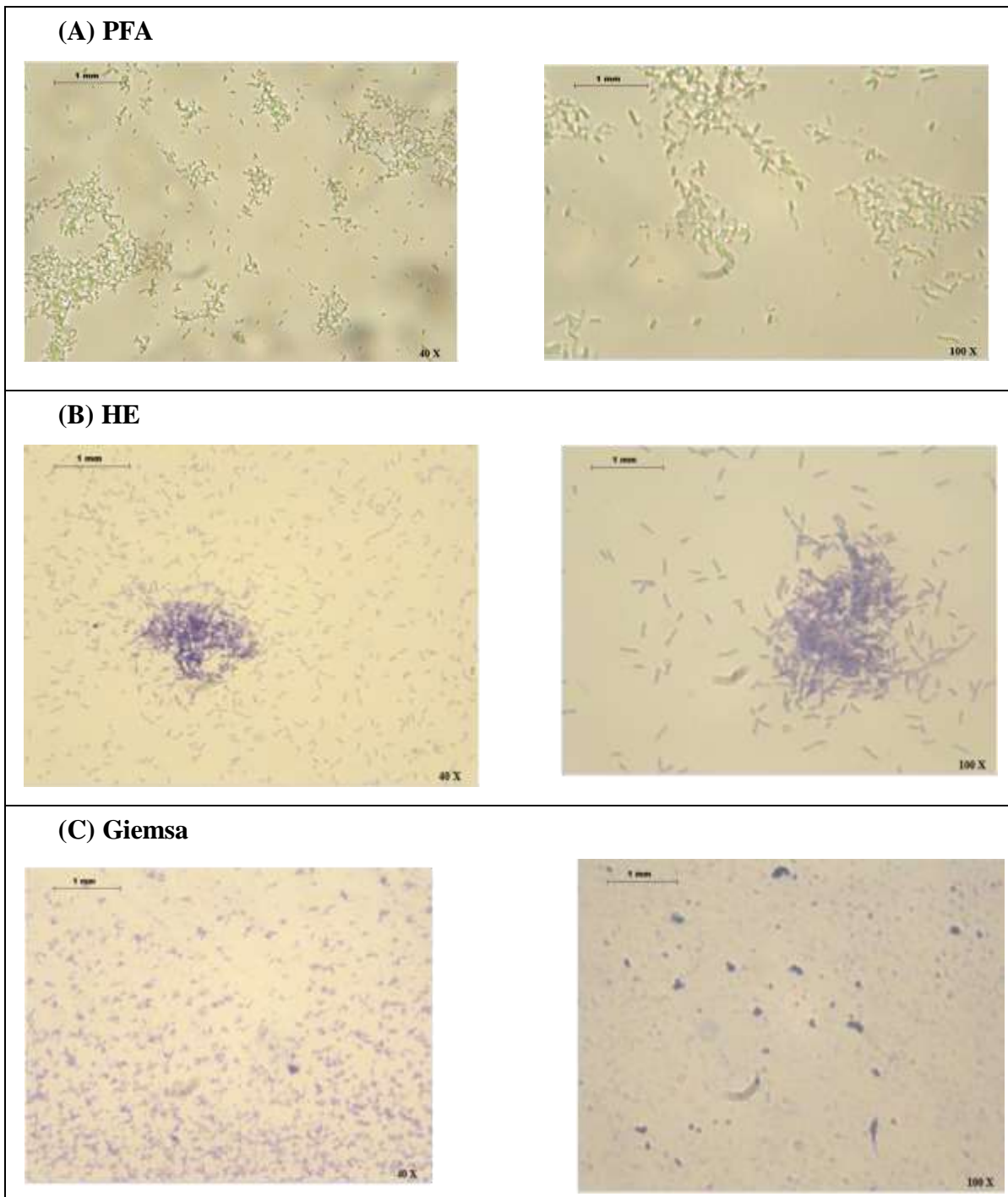
Certaines études suggèrent que les produits sucrés ultra-transformés, comme le lait concentré sucré, peuvent contribuer à l'apparition d'une inflammation métabolique de bas grade. Ce type d'inflammation est chronique, faible et se développe souvent sans symptômes visibles. Elle se manifeste principalement au niveau du tissu adipeux, du foie, de l'intestin et du pancréas, en réponse à un excès de sucres simples et/ou de graisses saturées dans l'alimentation. Cette inflammation entraîne l'activation de cellules immunitaires (comme les macrophages) qui produisent des molécules pro-inflammatoires telles que TNF- $\alpha$  et IL-6, pouvant perturber le métabolisme normal et favoriser des troubles comme la résistance à l'insuline, le diabète de type 2 (**Hotamisligil, 2006**).

Cependant, dans certaines conditions expérimentales, comme celles utilisées dans notre étude, l'administration de lait concentré sucré sans ajout de lipides n'a pas suffi à provoquer de prise de poids ou d'accumulation de graisses. Cela peut s'expliquer par l'absence d'éléments trophiques (par exemple, les acides gras saturés, le cholestérol, l'insuline, la leptine) connus pour stimuler l'adipogenèse dans des modèles de suralimentation (**Berryman et al., 2000 ; Almeida et al., 2017**). Bien que le lait concentré sucré puisse théoriquement participer à une réponse inflammatoire métabolique, son effet reste limité en l'absence de suralimentation lipidique, et aucun trouble métabolique clair n'a été observé dans ce protocole.

Enfin, l'utilisation de souris mâle présente également une contrainte. En effet, des études ont montré que les individus de sexe masculin montrent une moins bonne réaction à l'adipogenèse en l'absence de lipides exogènes ou d'interventions hormonales ciblées (**Rogers et al., 2015**).

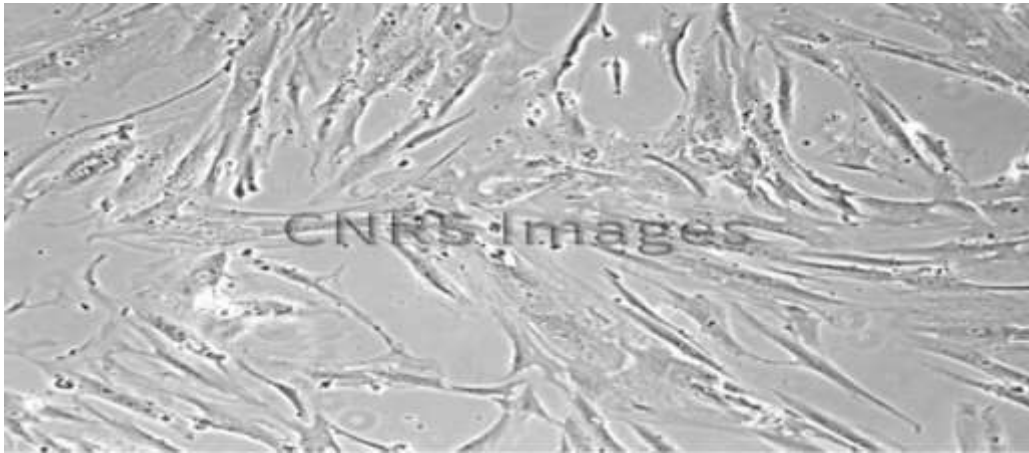
### III.2 Isolement et mise en culture des AD-CSM

Dans cette étude, des souris mâles de souches BALB/c ont été utilisées pour l'isolement et mise en culture des AD-CSM à partir du tissu adipeux. Les cellules étalées sur lames sont soit fixées au PFA 4 % soit colorées à hématoxyline/éosine ou Giemsa. L'observation microscopique au grossissement X 40 et X 100 (**Figure 21**), ne montre aucune morphologie ou une structure fusiforme ressemblant à la morphologie des AD -CSM observé dans la littérature (**Figure 22**).



**Figure 21 :** Photographies originales des lames sous un microscope optique

**A :** Résultat d'observation microscopique des cellules fixé par le PFA (Paraformaldéhyde) a deux grossissements x40 et x100 pour la même région. **B :** Résultat d'observation microscopique des cellules colorée par Hématoxyline Eosine (HE). **C :** Résultat d'observation microscopique des cellules colorée par le Giemsa



**Figure 22** : Culture de cellules souches mésenchymateuses de tissu adipeux. Contraste de phase (grossissement X20). (UMR 5018-Neurobiologie, plasticité tissulaire et métabolisme énergétique. (2004)

Plusieurs éléments peuvent expliquer l'absence d'AD-MSCs dans les cultures cellulaires réalisées dans cette étude.

D'une part, les souris BALB/c présente une quantité très réduite d'AD-MSCs dans leur tissu adipeux, par rapport à d'autres souches comme C57BL/6. Ces dernières en effet possèdent une densité supérieure d'AD-MSCs ainsi qu'une forte capacité de prolifération en culture (**Yoshimura *et al.*, 2006**). Donc le choix de la souche de souris pour l'isolement des cellules souches peut influencer sur les résultats négativement, en limitant le rendement cellulaire.

D'autres parts, l'âge et le poids des souris peuvent également influencer le rendement. Dans notre protocole, nous avons sélectionné des mâles BALB/c d'un âge compris entre 10 et 12 semaines (3 à 4 mois) et avec un poids variant de 40 à 50 g. Cependant, les recherches suggèrent que des souris plus jeunes (8 à 10 semaines) avec un poids compris entre 30 à 35 g sont mieux adaptées pour obtenir un rendement optimal des AD-MSCs (**Zuk *et al.*, 2002 ; Gao *et al.*, 2017**). En effet, un poids trop important peut indiquer une hypertrophie du tissu adipeux, ce qui s'accompagne de fibrose, d'infiltration de macrophages et d'altérations de l'environnement stromal. Ces modifications réduisent la quantité et la qualité des AD-MSCs récupérées (**Tchkonia *et al.*, 2013**). Par ailleurs, l'excès de poids altère la qualité du tissu adipeux, et provoque une diminution de la viabilité, de l'adhérence et du potentiel de différenciation des AD-MSCs chez les souris (**Gao *et al.*, 2017**). Même si les souris plus âgées ont plus de tissu adipeux, mais les souris jeunes sont généralement considérées comme plus adéquates pour garantir une isolation efficace (**Béarn *et al.*, 2013**).

Le sexe des animaux constitue également un facteur important. En effet, les souris mâles possèdent un tissu adipeux plus compact, plus fibreux et plus difficile à digérer, ce qui peut réduire l'efficacité d'isolement des CSM. De plus, les mâles disposent naturellement d'une quantité de CSM inférieure dans leur tissu graisseux par rapport aux femelles, dont le tissu est plus riche et plus souple (**Khoudhery et al., 2014**).

La méthode d'isolation peut également jouer un rôle crucial dans la qualité et rendement des cultures d'AD-MSCs. Dans notre étude, du a la non disponibilité de la collagénase, la trypsine (4%) fut choisie comme méthode de digestion du tissus adipeux. Bien que ces deux enzymes digestives soient similaires leurs modes d'action restent toutefois différents. En effet, la collagénase est une enzyme qui cible spécifiquement le collagène de types I et II, un des éléments principaux de la matrice extracellulaire dans le tissu adipeux. En dégradant cette structure de manière efficace, elle facilite une libération optimale des AD-MSCs, tout en préservant leur forme, leur viabilité et leur fonctionnement, ce qui permet un rendement cellulaire sera élevé. (**Zuk et al., 2001**). En revanche, la trypsine agit principalement sur les liaisons peptidiques et les protéines d'adhésion. Elle est couramment utilisée pour détacher les cellules en culture, mais elle n'est pas toujours appropriée pour dissocier un tissu complet. De ce fait, la trypsine n'est pas capable de décomposer convenablement la structure fibreuse du tissu adipeux, ni les protéines de la matrice extracellulaire, ce qui réduit considérablement la libération des AD-MSCs par rapport à la collagénase (**Markarian et al. 2014**).

Toutefois, la concentration de Trypsine utilisée peut permettre d'obtenir des résultats favorables, avec un rendement d'AD-MSCs satisfaisant, et une grande variabilité cellulaire. En effet, une concentration optimale de 0,25 %, proportionnelle au poids du tissu, est recommandée. Par contre des concentrations de trypsine inférieures (0,05 % - 0,125 %) peuvent se révéler inefficace pour dissocier un tissu complexe (**Markarian et al. 2014**). D'un autre cote, l'utilisation de concentration élevée (> 0,3 %) et c'été le cas dans notre étude, peut être cytotoxique et entraîner la mort cellulaire (**Strem et al., 2005 ; Tchkonja et al., 2013**). Par ailleurs, la durée d'incubation à la trypsine joue également un rôle important. En effet, une incubation de moins de 10 à 15 minutes peut être insuffisante pour dissocier efficacement le tissu adipeux, limitant ainsi la libération des cellules souches mésenchymateuses. Par contre si le temps est trop prolongé (Au-delà de 30 minutes) la trypsine commence à endommager les membranes cellulaires et à dégrader les protéines de surface. Cela diminue la viabilité, l'adhérence et la capacité de différenciation des CSMs (**Gao et al., 2017**).

La neutralisation de la trypsine est également un facteur crucial. Si elle est effectuée trop tard, de manière incomplète ou sans utiliser de sérum fœtal bovin (FBS), cela risque d'affecter les cellules isolées et de réduire le rendement (**Jacobsson et al., 1953**).

Les paramètres de centrifugation peuvent également jouer un rôle dans la qualité d'isolation des AD-MSCs. Dans l'étude de **Markarian et al., (2014)**, la vitesse de centrifugation utilisée est égale à 3000 rpm (1200xg), alors que dans notre cas la vitesse est de 1000 rpm (300-400xg). De plus la durée de centrifugation a moins de 5 min ainsi que la température trop basse (4°C)-ce qui peut entraîner une perte des cellules avec le surnageant du à une sédimentation incomplète.

Dans cette étude, faute d'autres milieux à notre disposition, le RPMI a été utilisé comme milieu de culture principal. Toutefois, des études ont montré que ce type de milieu convient plus utilisé pour les cellules lymphoïdes, et rarement pour les cellules souches mésenchymateuses, car il ne fournit pas les nutriments nécessaires. Comparé au milieu DMEM, on considère que le RPMI est plutôt déficient (**Zuk et al. 2002, Bieback et al. 2008**). Le RPMI contient des doses faibles en glucose (2g/l par contre dans le milieu DMEM 4,5g/l ce qui provoque un déficit en énergie), sodium pyruvate (qui est important pour la respiration cellulaire et la défense contre le stress oxydatif), certains acides aminés essentiels comme tryptophane ou la lysine (éléments clés pour la synthèse protéique et la division cellulaire), les vitamines et les cofacteurs qui jouent un rôle dans la stabilité cellulaire et l'adhérence (**Schop et al., 2009 ; Bajpai et al., 2008 ; Meszaros et al., 2016**). De plus, l'absence de FBS dans le milieu utilisé, sans aucune alternative ajoutée, pousse les cellules à entrer en apoptose, car le FBS apporte les protéines d'adhésion, les facteurs de croissance et même les nutriments essentiels pour le bon développement de ces cellules chez la souris (**Pitenger et al., 1999**). Par conséquent, Les AD-MSCs ne parviennent plus à se fixer au fond des récipients et leur croissance est interrompue (**Dominici et al., 2006**).

Dans notre protocole nous avons utilisé des boîtes Petri standards non modifiées pour la culture cellulaire, ce qui pourrait expliquer l'absence d'adhérence des cellules. En effet, Les AD-MSCs sont des cellules qui adhèrent fortement, et leur fixation est largement influencée par la polarité de leur surface, la charge électrostatique et la composition chimique du polymère utilisé (**Park et al., 2011**). Les plastiques en polystyrène non traité et même les boîtes pétris qu'on a utilisées ont une surface hydrophobe, ce qui rend difficile l'adsorption des protéines d'adhésion telles que la fibronectine et la vitronectine indispensables pour l'adhésion des AD-MSCs sur une surface (**Bacakova et al., 2004**). D'un autre côté, les boîtes

connues sous le nom de "*tissus culture treated*" (TC-treated) subissent un traitement à base de plasma d'oxygène ou d'ammoniac, créant ainsi une surface hydrophile et chargée négativement, qui favorise la liaison des protéines sériques et l'adhérence des cellules (**Kurosawa, 2007**). De nombreuses recherches ont prouvé que l'utilisation de surfaces non traitées réduit la survie, altère la morphologie et diminue la prolifération des AD-MSCs (**Sotiropoulou et al., 2006 ; Dominici et al., 2006**). Ce seul facteur pourrait largement compromettre l'efficacité de l'isolement et l'expansion des cellules, en particulier lors de la culture primaire où la phase initiale d'adhérence est essentielle.



# **Conclusion & perspectives**

## Conclusion et perspectives

L'extraction des cellules souches mésenchymateuses (CSM) à partir du tissu adipeux émerge actuellement comme une solution prometteuse et stratégique dans le domaine de la recherche biomédicale. En raison de sa facilité d'obtention, de sa richesse en cellules et de la faible morbidité pour le donneur, le tissu adipeux est devenu une ressource précieuse de cellules souches, surpassant parfois la moelle osseuse en termes de rendement et de praticité (**Fraser et al., 2006 ; Zuk et al, 2001**).

L'objectif de ce travail était d'isoler des cellules souches mésenchymateuses (CSM) à partir du tissu adipeux de souris mâles BALB/c, après un traitement au lait concentré sucré.

D'une part, le traitement pré optique avec le lait concentré sucré à dosages 5g/L et 10g/L n'a pas répondu au critère d'une prise de poids significative ce qui pourrait refléter une certaine résistance métabolique de la souche BALB/c ainsi que l'absence d'autres facteurs trophiques dans le régime alimentaire.

D'autre part, malgré l'application d'un protocole expérimental comprenant une digestion enzymatique à la trypsine, culture en RPMI et observations microscopiques colorées, aucune croissance cellulaire caractéristique des AD-MSCs n'a été notée, ce qui suggère une inappropriées des conditions d'isolement et/ou de culture cellulaire testées.

Ces résultats montrent qu'il sera nécessaire d'apporter certains changements aux paramètres expérimentaux tels que : le type d'enzyme de digestion utilisé ainsi que sa concentration, durée de digestion, composition du milieu et la période de traitement *in vivo* pour optimiser l'isolement des CSM lors des travaux futurs.



# **Références bibliographiques**

## Liste des références

1. Akyurekli, C., Le, Y., Richardson, R. B., Fergusson, D., Tay, J., & Allan, D. S. (2015). A systematic review of preclinical studies on MSCs for ischemic stroke: *Quality of evidence and translational perspectives*. *Stem Cell Reviews and Reports*, 11(6), 795–804. <https://doi.org/10.1007/s12015-015-9592-x>
2. Almeida, S., Vieira, E., & Cardoso, A. M. (2017). High-sugar diets and metabolic inflammation: Evidence from animal models. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 40, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2016.10.001>
3. Al-Saqi, S. H., Saliem, M., Asikainen, S., Quezada, H. C., Ekblad, A., Hovatta, O., Le Blanc, K., Jonasson, A. F., & Götherström, C. (2014). Defined serum-free media for in vitro expansion of adipose-derived mesenchymal stem cells. *Cytotherapy*, 16(7), 915–926.
4. Aronowitz, J. A., & Ellenhorn, J. D. I. (2013). Adipose stromal vascular fraction isolation: a head-to-head comparison of four commercial cell separation systems. *Plastic and reconstructive surgery*, 132(6), 932e–939e.
5. Aronowitz, R., Deener, A., Keene, D., Schnittker, J., & Tach, L. (2015). Cultural reflexivity in health research and practice. *American journal of public health*, 105 Suppl 3(Suppl 3), S403–S408.
6. Bacakova, L., Filová, E., Parizek, M., Ruml, T., & Svorčík, V. (2004). Adhesion and growth of vascular smooth muscle cells on surfaces modified by plasma treatment and protein immobilization. *Journal of Biomedical Materials Research*, 69(4), 674–682.
7. Bajpai, V. K. et al. (2008). Optimization of culture conditions for human mesenchymal stem cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 99(2), 527–534..
8. Bar-Nur, O., Russ, H. A., Efrat, S., & Benvenisty, N. (2011). Epigenetic memory and preferential lineage-specific differentiation in induced pluripotent stem cells derived from human pancreatic islet beta cells. *Cell stem cell*, 9(1), 17-23.
9. Barry, F. P., & Murphy, J. M. (2004). Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(4), 568–584.
10. Béarn, J., Lataillade, J.-J., Le Bousse-Kerdilès, M.-C., & Bensidhoum, M. (2013). Adipose-derived stromal cells: The promise of allogeneic cell therapies. *Transfusion Clinique et Biologique*, 20(3), 219–228. <https://doi.org/10.1016/j.tracli.2013.04.002>
11. Bernardo, M. E., & Fibbe, W. E. (2013). Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. *Cell Stem Cell*, 13(4), 392–402.
12. Berryman, D. E., List, E. O., Sackmann-Sala, L., Lubbers, E. R., Munn, R. D., Breyer, B., ... & Kopchick, J. J. (2000). Increased adiposity in transgenic mice expressing the bovine

- growth hormone gene. *Endocrinology*, 141(11), 3974-398  
<https://doi.org/10.1210/en.141.11.3974>
13. Bieback, K., Kern, S., Klüter, H., & Eichler, H. (2008). Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood.
  14. Bourin, P., Bunnell, B. A., Casteilla, L., Dominici, M., Katz, A. J., March, K. L., Redl, H., Rubin, J. P., Yoshimura, K., & Gimble, J. M. (2013). Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy*, 15(6), 641–648.
  15. Brown, C., McKee, C., Bakshi, S., Walker, K., Hakman, E., Halassy, S., Svinarich, D., Dodds, R., Govind, C., Chaudhry, G. R., & Vishwanatha, J. K. (2019). *Mesenchymal stem cells: Cell therapy and regeneration potential*. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 13(9), 1738–1755. <https://doi.org/10.1002/term.2913>
  16. Bunnell, B. A. (2021). Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Cells*, 10(12), 3433.
  17. Caplan, A. I. (1991). Mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research*, 9(5), 641-650
  18. Caplan, A. I. (2007). *Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine*. *Journal of Cellular Physiology*, 213(2), 341–347. <https://doi.org/10.1002/jcp.21200>
  19. Carrona, C., Bessea, L., Besseb, A., & Duranda, C. (2007). Biologie des cellules souches et perspectives thérapeutiques : enjeux interdits ? Stem cell biology and therapeutic hopes: forbidden game ? *Morphologie*, 91, 14-23.
  20. Cheng, A., Hardingham, T., Kimber, S., & Millward-Sadler, S. (2020). *Adipose-derived stem cells for cartilage tissue engineering: A review of recent advances*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 591792. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.591792>
  21. Chieragato, K., Castegnaro, S., Madeo, D., Astori, G., Pegoraro, M., & Rodeghiero, F. (2011). Epidermal growth factor, basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor-bb can substitute for fetal bovine serum and compete with human platelet-rich plasma in the ex vivo expansion of mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, 13(8), 933–943.
  22. Condé-Green, A., Marano, A. A., Lee, E. S., Reisler, T., Price, L. A., Milner, S. M., & Granick, M. S. (2016). Fat Grafting and Adipose-Derived Regenerative Cells in Burn Wound Healing and Scarring: A Systematic Review of the Literature. *Plastic and reconstructive surgery*, 137(1), 302–312.

23. Danisovic, L. et al. (2017). Effect of long-term culture on the biological and morphological characteristics of human adipose tissue-derived stem cells. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 68(2), 149–158.
24. Dominici, M. L. B. K., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., ... & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315-317.
25. El-Husseiny, H. M., Kaneda, M., Mady, E. A., Yoshida, T., Doghish, A. S., & Tanaka, R. (2023). Impact of adipose tissue depot harvesting site on the multilineage induction capacity of male rat adipose-derived mesenchymal stem cells: An in vitro study. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(8), 7513.
26. Fraser, J. K. et al. (2006). Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 24(4), 150–154.
27. Freshney, R. I. (2015). *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications*. John Wiley & Sons.
28. Friedenstein, A. J., Petrakova, K. V., Kurolesova, A. I., & Frolova, G. P. (1968). Heterotopic transplants of bone marrow. *Transplantation*, 6(2), 230-247.
29. Gao, J., Dennis, J. E., Muzic, R. F., Lundberg, M., & Caplan, A. I. (2017). The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells Tissues Organs*, 199(2-3), 131–140. <https://doi.org/10.1159/000460251> (ou lien correct selon l'article exact)
30. Guillén, M. I., Platas, J., Pérez Del Caz, M. D., & Alcaraz, M. J. (2018). *Paracrine anti-inflammatory effects of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in human monocytes*. *Frontiers in Physiology*, 9, 661. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00661>
31. Hernigou, P., Poignard, A., Beaujean, F., & Rouard, H. (2005). *Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells*. *Journal of Bone and Joint Surgery American Volume*, 87(7), 1430– 1437. <https://doi.org/10.2106/JBJS.D.02215>
32. Hotamisligil, G. S. (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, 444(7121), 860–867. <https://doi.org/10.1038/nature05485>.
33. Jacobsson, B., & Olsson, B. (1953). [Titre non disponible]. (Attention : il est conseillé de vérifier le titre exact et la revue de publication pour cette référence historique).
34. Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Klüter, H., & Bieback, K. (2006). Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem cells*, 24(5), 1294-1301.

35. Khalifa, M., Shahin, R. M., Soliman, M. S., & Abdel-Rahman, R. F. (2022). *Adipose-derived stem cells: A promising stem cell population for regenerative medicine*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 146, 112518. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112518>
36. Khoudhery, M., Sivanathan, K. N., Patel, D. V., Cox, J., & Raghunath, M. (2014). The impact of culture conditions on the immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 5(3), 76. <https://doi.org/10.1186/scrt454>
37. Klimanskaya, I., Chung, Y., Meisner, L., Johnson, J., West, M. D., & Lanza, R. (2005). *Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres*. *Nature*, 444(7118), 481–485. <https://doi.org/10.1038/nature05142>
38. Kurosawa, H. (2007). *Methods for inducing embryoid body formation: in vitro differentiation system of embryonic stem cells*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 103(5), 389–398.
39. Kyryk, V., Tsupykov, O., Ustymenko, A., Smozhanik, E., Govbakh, I., Butenko, G., &
40. Lan, T., Luo, M., & Wei, X. (2021). Mesenchymal stem/stromal cells in cancer therapy. *Journal of Hematology & Oncology*, 14, 1-16.
41. Le Clainche, T. (2020). *Optimisation de microporteurs pour l'amplification de cellules souches mésenchymateuses et étude des propriétés ostéogéniques de nouveaux biomatériaux bactéricides* (Doctoral dissertation, Université Grenoble Alpes [2020-)
42. Markarian, F. M., Frey, G. Z., Silveira, M. D. C., et al. (2014). *Isolation of adiposederived stem cells: a comparison among different methods*. *Biotechnology Letters*, 36(4), 693–702.
43. Meszaros, E. et al. (2016). Comparison of different culture media for mesenchymal stem cell expansion. *Tissue Engineering Part C*, 22(4), 309–318.
44. Montgomery, M. K., Hallahan, N. L., Brown, S. H., Liu, M., Mitchell, T. W., & Turner, N. (2013). Mouse strain-dependent variation in obesity and glucose homeostasis in
45. Montserrat, N., Ramírez-Bajo, M. J., Xia, Y., Sancho-Martinez, I., Moya-Rull, D., Miquel-Serra, L., ... & Campistol, J. M. (2012). Generation of induced pluripotent stem cells from human renal proximal tubular cells with only two transcription factors, OCT4 and SOX2. *Journal of Biological Chemistry*, 287(29), 24131-24138.
46. Najar, M., Raicevic, G., Boufker, H. I., Fayyad-Kazan, H., De Bruyn, C., Meuleman, N., Bron, D., Toungouz, M., & Lagneaux, L. (2010). *Mesenchymal stromal cells and immunomodulation: A gathering of regulatory immune cells*. *Cytherapy*, 12(4), 377–388. <https://doi.org/10.3109/14653241003724246>
47. Pan, J., Hu, C., & Kong, L. (2022). *Advances and challenges in mesenchymal stem cell-based therapies for regenerative medicine*. *Stem Cell Research & Therapy*, 13(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s13287-022-02702-y>

48. Park, J. S., Suryaprakash, S., Lao, Y. H., & Leong, K. W. (2011). *Engineering mesenchymal stem cells for regenerative medicine and drug delivery*. *Methods in Molecular Biology*, 698, 247–258. [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-999-4\\_18](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-999-4_18)
49. Pittenger, M. F., Discher, D. E., Péault, B. M., Phinney, D. G., Hare, J. M., & Caplan, A. I. (2002). Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. *NPJ Regenerative medicine*, 4(1), 22.
50. Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., et al. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284(5411), 143–147.
51. Prockop, D. J., Kota, D. J., Bazhanov, N., & Reger, R. L. (2009). *Evolving paradigms for repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs)*. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(9), 2190–2199. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00865.x>
52. Rapisio, E., & Ciliberti, R. (2017). Clinical use of adipose-derived stem cells: European legislative issues. *Annals of medicine and surgery (2012)*, 24, 61–64.
53. Rein, M. F., Hammoud, S., & Rein, B. (2014). *MSC applications in regenerative medicine: Current status and perspectives*. *Regenerative Medicine*, 9(4), 435–447. <https://doi.org/10.2217/rme.14.23>
- response to high-fat feeding. *Diabetologia*, 56(5), 1129–
54. Rogers, N. H. (2015). Brown adipose tissue during puberty and with aging. *Annals of medicine*, 47(2), 142-149.
55. Rombouts, W. J. C., & Ploemacher, R. E. (2003). *Primary murine MSCs, but not their immortalized counterparts, generate hematopoietic stem cell supportive stromal microenvironments*. *Blood*, 101(12), 4996–5002. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-11-3530>
56. Rossignoli, F., Caselli, A., Grisendi, G., Piccinno, S., Burns, J. S., Murgia, A., & Dominici, M. (2013). Isolation, characterization, and transduction of endometrial decidual tissue multipotent mesenchymal stromal/stem cells from menstrual blood. *BioMed research international*, 2013(1), 901821.
57. Sacchetti, B., Funari, A., Michienzi, S., Di Cesare, S., Piersanti, S., Saggio, I., Tagliafico, E., Ferrari, S., Robey, P. G., Riminucci, M., & Bianco, P. (2007). *Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment*. *Cell*, 131(2), 324–336. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.025>
58. Saldaña, L., Bensiamar, F., Vallés, G., Mancebo, F. J., García-Rey, E., & Vilaboa, N. (2019). *Immunoregulatory potential of mesenchymal stem cells following activation by macrophage-derived soluble factors*. *Stem Cell Research & Therapy*, 10(1), 64. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1160-1>

59. Schallmoser, K., Rohde, E., Reinisch, A., Bartmann, C., Thaler, D., Drexler, C., Obenauf, A. C., Lanzer, G., Linkesch, W., & Strunk, D. (2007). Rapid large-scale expansion of functional mesenchymal stem cells from unmanipulated bone marrow without animal serum. *Tissue Engineering*, 13(8), 1853–1863.
60. Schop, D. et al. (2009). The effect of culture medium on proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells in vitro. *Biomaterials*, 30(27), 4783–4791.
61. Seale, P. (2010). Transcriptional control of brown adipocyte development and thermogenesis. *International journal of obesity*, 34(1), S17-S22.
62. Seale, P., Conroe, H. M., Estall, J., Kajimura, S., Frontini, A., Ishibashi, J., ... & Spiegelman, B. M. (2011). Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. *The Journal of clinical investigation*, 121(1), 96-105.
63. Seki, T., Hagiwara, H., & Matsumoto, T. (2010). *Regenerative therapy using adipose-derived stem cells*. *Human Cell*, 23(3), 97–104. <https://doi.org/10.1007/s13577-010-0011-x>
64. Sethe, S., Scutt, A., & Stolzing, A. (2006). *Aging of mesenchymal stem cells*. *Ageing Research Reviews*, 5(1), 91–116. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2005.10.001>
65. Shah, A. S., Langrish, J. P., Nair, H., McAllister, D. A., Hunter, A. L., Donaldson, K., Newby, D. E., & Mills, N. L. (2013). Global association of air pollution and heart failure: a systematic review and meta-analysis. *Lancet (London, England)*, 382(9897), 1039–1048.
- Skibo, G. (2023). Age-related ultrastructural changes in spheroids of the adiposederived multipotent mesenchymal stromal cells from ovariectomized mice. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 17, 1072750.
66. Sobhani, A., Khanlarkhani, N., Baazm, M., & Mohseni, R. (2017). *Multipotent mesenchymal stromal/stem cells from adipose tissue and bone marrow: A comparative study*. *World Journal of Plastic Surgery*, 6(1), 33–40. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5282431/>
67. Sotiropoulou, P. A., Perez, S. Á., & Papamichail, M. (2006). *Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells*. *Stem Cells*, 24(2), 462–471.
68. St. Clair, D. K., Wang, J., & Wan, X. S. (2012). *Cellular defense mechanisms against damage from reactive oxygen species*. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 17(1), 13–17. <https://doi.org/10.1038/jidsymp.2012.5>
69. *Stem Cells*, 26(2), 734–741.
70. Strem, B. M., Hicok, K. C., Zhu, M., et al. (2005). *Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells*. *Keio Journal of Medicine*, 54(3), 132–141.

71. Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *cell*, 126(4), 663-676.
72. Tchkonina, T., Thomou, T., Zhu, Y. I., Karagiannides, I., Pothoulakis, C., Jensen, M. D., & Kirkland, J. L. (2013). Mechanisms and metabolic implications of regional differences among fat depots. *Cell metabolism*, 17(5), 644-656.
73. Tholpady, S. S., Katz, A. J., & Ogle, R. C. (2003). Mesenchymal stem cells from rat visceral fat exhibit multipotential differentiation in vitro. *The Anatomical Record Part*
74. Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., & Jones, J. M. (1998). *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts*. *Science*, 282(5391), 1145–1147.
75. Tokcaer-Keskin, Z., Akar, A. R., Ayaloglu-Butun, F., Terzioglu-Kara, E., Durdu, S., Ozyurda, U., ... & Akcali, K. C. (2009). Timing of induction of cardiomyocyte differentiation for in vitro cultured mesenchymal stem cells: a perspective for emergencies. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 87(2), 143-150.
76. Uccelli, A., Moretta, L., & Pistoia, V. (2008). Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature reviews immunology*, 8(9), 726-736.
77. Ugarte, F., & Forsberg, E. C. (2013). *Comparison of mouse and human hematopoietic stem cells: Homology and divergence*. *Cell and Molecular Life Sciences*, 70, 1131–1144. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1122-9>
78. Vazin, T., & Freed, W. J. (2010). Human embryonic stem cells: derivation, culture, and differentiation: a review. *Restorative neurology and neuroscience*, 28(4), 589-603.
79. Wagner, W., Horn, P., Castoldi, M., Diehlmann, A., Bork, S., Saffrich, R., Benes, V., Blake, J., Pfister, S., Eckstein, V., & Ho, A. D. (2005). *Replicative senescence of mesenchymal stem cells: A continuous and organized process*. *PLoS ONE*, 3(5), e2213. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002213>
80. Wei, X., Yang, X., Han, Z. P., Qu, F. F., Shao, L., & Shi, Y. F. (2013). Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacologica Sinica*, 34(6), 747-754.
81. Wognum, A. W., Eaves, A. C., & Thomas, T. E. (2003). Identification and isolation of hematopoietic stem cells. *Archives of medical research*, 34(6), 461-475.
82. Yakhou, L., Azogui, A., Therizols, P., & Defosse, P. A. (2024). Comprendre la totipotence embryonnaire à partir des cellules 2C-like. *médecine/sciences*, 40(2), 147153.
83. Yoshimura, K., Shigeura, T., Matsumoto, D., Sato, T., Takaki, Y., Aiba-Kojima, E., ... & Sato, K. (2006). Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *Journal of Cellular Physiology*, 208(1), 64–76. <https://doi.org/10.1002/jcp.20636>

84. Yusoff, N. A., Abd Hamid, Z., Budin, S. B., & Taib, I. S. (2025). Hematopoietic stem cell discovery: unveiling the historical and future perspective of colony-forming units assay. *PeerJ*, *13*, e18854.
85. Zhao, X., Wu, J., Yuan, R., Li, Y., Yang, Q., Wu, B., ... & Zhu, N. (2023). Adipose-derived mesenchymal stem cell therapy for reverse bleomycin-induced experimental pulmonary fibrosis. *Scientific Reports*, *13*(1), 13183.
86. Zheng, B., Cao, B., Crisan, M., Sun, B., Li, G., Logar, A., Yap, S., Pollett, J. B., Drowley, L., Deasy, B. M., Gervasi, R., Huard, J., & Péault, B. (2014). *Prospective identification of myogenic endothelial cells in human skeletal muscle*. *Nature Biotechnology*, *25*(9), 1025–1034. <https://doi.org/10.1038/nbt1334>
87. Zhong, C., Liu, M., Pan, X., & Zhu, H. (2022). Tumorigenicity risk of iPSCs in vivo: nip it in the bud. *Precision clinical medicine*, *5*(1), pbac004.
88. Zipori, D. (2011). À la recherche d'une définition moléculaire plus que descriptive pour les cellules souches. *médecine/sciences*, *27*(3), 303-301.
89. Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D. A., Huang, J. I., Mizuno, H., ... & Hedrick, M. H. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular biology of the cell*, *13*(12), 4279-4295.
90. Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J. W., Katz, A. J., Benhaim, P., Lorenz, H. P., & Hedrick, M. H. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering*, *7*(2), 211–228.



# **Annexes**

## Annexe 1

### a) Lors d'élevage :

Lait concentré a 5g par litre, et a 10g par litre.

### b) La préparation de lait concentré et sa composition :

Pour préparer une solution de lait concentré on va peser d'abord 5g du lait concentré ; on va le verser dans 1L d'eau puis on agite (de 3 à 4 min).

On suite on va mettre 200ml de cette solution dans chaque biberon des souris sélectionnés.

Le lait concentré se compose de : lait entier et/ou lait entier reconstitué en poudre, sucre et lactose naturel du lait.



Photographie originale de lait concentré

## Annexe 2

### Matériel chimique et organique :

#### a) Lors de traitements au laboratoire :

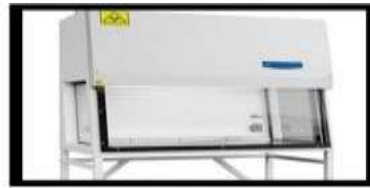
Chloroforme, Solution EDTA, la Trypsine, milieux de culture RPMI complet (avec les antibiotiques et la glutamine), éthanol a 70%, l'eau physiologique.

#### b) Organes utilisés : Le tissu adipeux et le cerveau.

## c) Les instruments :



PSM chimique



PSM de type 2



Fourre pasteur



Autoclave



Alcool 70%



Trousse de dissection



Gaze stérile



Boîte de milieu sensible à la chaleur séparé en 2 par un carton



Les épingles



Plaque de dissection



La gaze avec le flacon



Une pince

## Annexe 3

## I. Préparation des solutions

## a) Préparation de milieux de culture complète :

Sous la PSM, prendre une boîte de milieux RPMI, rajoute le des antibiotiques et la glutamine, pour avoir les milieux complets et prêt pour l'utilise.

## b) Préparation de l'EDTA :

Pesé 2,95g de la poudre d'EDTA, dissoudre dans 220ml d'eau distillé puis agite bien à l'aide d'une plaque agitatrice et un barreau magnétique pendant 2 à 3min, par la suite rajoute 25ml en cours d'agitation, et ajoute presque 5ml de NaOH et vérifier le PH avec un ph mètre ou bien les bonde de PH, pour avoir une solution EDTA avec un PH=8, lorsque la solution soit prête on va la mettre dans un autoclave pour la stérilisé.

**c) Préparation de la solution Trypsine-EDTA :**

Sous la PSM, pesé 1,38g de la trypsine à l'aide d'une balance, et mesure 34,5ml de la solution EDTA a l'aide d'un bécher graduer, verse la trypsine et la solution d'EDTA dans un tube de 50ml puis agite bien, lorsque la trypsine se dissoudre la solution sera prête à l'utilisation.

## **Résumé**

Ce travail expérimental a été consacré à l'isolement des cellules souches mésenchymateuses (CSM) à partir du tissu adipeux de souris mâles BALB/c. Les animaux ont d'abord été traités pendant 21 jours avec du lait concentré sucré administré par voie orale à deux concentrations (5 g/L et 10 g/L), afin de stimuler une prise de poids. Toutefois, aucun gain pondéral notable n'a été observé. Après le traitement, le tissu adipeux a été prélevé puis soumis à une digestion enzymatique à la trypsine. Le culot cellulaire obtenu a été mis en culture dans un milieu RPMI contenant de la glutamine et des antibiotiques. Par la suite, les cellules ont été fixées au paraformaldéhyde (PFA), étalées sur lame, puis colorées à l'hématoxyline-éosine (HE) ou au Giemsa pour une observation microscopique. Les résultats ont révélé un échec de l'isolement des cellules souches mésenchymateuses. Aucune prolifération cellulaire caractéristique n'a été détectée, indiquant que le protocole utilisé nécessite des ajustements pour permettre l'obtention de ces cellules.

**Les mots clé :** Cellules souches mésenchymateuses – Tissu adipeux – BALB/c – Lait concentré – Trypsine – Culture cellulaire – Échec d'isolement

## **Abstract**

This experimental work focused on the isolation of mesenchymal stem cells (MSCs) from the adipose tissue of male BALB/c mice. The animals were first treated orally for 21 days with sweetened condensed milk at two concentrations (5 g/L and 10 g/L), in an attempt to induce weight gain. However, no significant weight increase was observed. After treatment, the adipose tissue was collected and subjected to enzymatic digestion using trypsin. The resulting cell pellet was cultured in RPMI-1640 medium supplemented with glutamine and antibiotics. The cells were then fixed with paraformaldehyde (PFA), smeared onto slides, and stained with hematoxylin-eosin (HE) or Giemsa for microscopic examination. The results showed a failure to isolate mesenchymal stem cells. No characteristic cellular proliferation was observed, indicating that the protocol requires further optimization to successfully isolate these cells.

**Keywords:** Mesenchymal stem cells – Adipose tissue – BALB/c – Sweetened condensed milk – Trypsin – Cell culture – Isolation failure