

Université de Franche-Comté – UFR des Sciences et Techniques

**DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE FRANCHE COMTE**

Ecole doctorale Homme, Environnement, Santé

**EXPLORATION DU POTENTIEL NEURAL DES CELLULES  
DU SANG DE CORDON OMBILICAL HUMAIN**

**THESE**

Présentée et soutenue publiquement

Le 22 Décembre 2008

**Pour l'obtention du Titre de Docteur ès Sciences**

Par

**Vincent ZANGIACOMI**

**JURY**

Pr DOUAY Luc (Rapporteur)

Pr PRIVAT Alain (Rapporteur)

Pr TIBERGHIEEN Pierre (Examineur)

Pr VERSAUX-BOTTERI Claudine (Directeur de thèse)

Dr DESCHASEAUX Frédéric (Directeur de thèse)



Université de Franche-Comté – UFR des Sciences et Techniques

**DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE FRANCHE COMTE**

Ecole doctorale Homme, Environnement, Santé

**EXPLORATION DU POTENTIEL NEURAL DES CELLULES  
DU SANG DE CORDON OMBILICAL HUMAIN**

**THESE**

Présentée et soutenue publiquement

Le 22 Décembre 2008

**Pour l'obtention du Diplôme de Docteur ès Sciences**

Par

**Vincent ZANGIACOMI**

**JURY**

Pr DOUAY Luc (Rapporteur)

Pr PRIVAT Alain (Rapporteur)

Pr TIBERGHIEEN Pierre (Examineur)

Pr VERSAUX-BOTTERI Claudine (Directeur de thèse)

Dr DESCHASEAUX Frédéric (Directeur de thèse)



*A mon évidence pour aujourd'hui comme pour demain,  
à ma solitude...*

« LA VRAIE GENEROSITE ENVERS L'AVENIR  
CONSISTE A TOUT DONNER AU PRESENT »

*Albert Camus 1913-1960*

# **REMERCIEMENTS**

*Je remercie sincèrement le Professeur Pierre Tiberghien de m'avoir fait l'honneur d'être le président de jury de ma thèse. J'exprime ma profonde reconnaissance aux Professeurs Luc Douay et Alain Privat d'avoir accepté, malgré leurs nombreuses responsabilités et sollicitations, d'être les rapporteurs de mon travail.*

*Un grand merci au Professeur Claudine Versaux-Botteri et au Docteur Frédéric Deschaseaux de m'avoir accueilli au sein de leurs laboratoires et d'avoir supervisé mes travaux lors de mon Master 2 et de ma thèse. Je souhaite leur exprimer toute ma reconnaissance. Sans eux, je ne serais certainement pas devenu le « jeune » chercheur que je suis. Par leur soutien et leur encadrement sans faille, de gré ou de force, dans des moments plus ou moins difficiles, et par leur ouverture d'esprit autant sur le plan scientifique qu'humain, ils ont su m'inculquer des valeurs précieuses que je ne suis pas prêt d'oublier.*

*Je remercie les Professeurs Francine Behar-Cohen, Rémy Schlichter, Valérie Lapière, ainsi que les Docteurs Stéphane Maddens et Pascale Adami, pour l'aimable collaboration que nous avons entretenue au cours de ce travail. Merci pour leur soutien théorique et technique.*

*Je tiens également à remercier toute l'équipe de l'AICT de l'Établissement Français du Sang de Besançon : Isabelle, Joëlle, Nathalie, Fabrice et Bertrand, pour leur disponibilité et pour avoir mis à ma disposition les prélèvements nécessaires à tous mes travaux.*

*Merci profondément à Laurent Bermont (mon père nourricier et spirituel) et à Norbert (pour son soutien et ses conseils précieux dans les premiers moments).*

*A tous mes collègues, plus ou moins proches de l'IBCT et de l'EFS, merci d'avoir égayé ou gâché mes journées pendant ces 4 dernières années. Compagnons de galère et pour certains néanmoins « amis »... libres à vous de compartimenter ce paragraphe, certains s'en chargent déjà très bien. Merci à Catherine (pour sa sympathie et pour le déménagement), Christine « kiki » Pôtô (ma rockeuse de diamant...), Pacou (pour son énergie plus que débordante), Mymi (pour pauses tendresse), Audrey (pour avoir retrouvé Gugu en chair et en os à Hong-Kong), Amélie (sa soeurette pour les coups qu'elle m'a donné sous le PSM), Magali (sa 2<sup>e</sup> soeurette ?), Jean-René (le ch'ti), Oliv' H., Céline B. (qui a su s'arrêter, pour nous comme pour elle, avant qu'il ne soit trop tard), Emilie (pour sa bonne humeur et son sang froid légendaire), Claudine (pace et salute per voi), Virginie (pour son abnégation face à l'impossible), David (pour ses conseils et ses longues discussions dans la langue de Shakespeare, « Dr Smackhead »), Dominique (pour sa technique gestuelle de cité), Chantal (pour ses absences même quand elle était là), Fanny, Carole (la plus belle ambassadrice Givenchy qu'il m'est été donné de connaître à ce jour), Nicolas (le poilu de France), Francis (fournisseur de*



comté à trous pleins), Camille (pour sa sagesse), Jeremy (pour sa discrétion pas toujours très discrète), Amélie (pour son nez en mousse), Eléonore (malgré le peu de temps passé à ses côtés), Chafika (pour ses piments et ses LBA qui bouchaient le cytomètre), Alfonsine, Valérie P., Rachid (pour son soutien), Emad, Dzenan (pour son amitié et sa ténacité), Tewfik (pour sa volonté sans faille), Alioune (le nordiste) et Arash (mon p'tit coco).

Enfin, je n'oublierai pas Zélie (qui m'a appris que mon approche des femmes pouvait parfois être perçue comme pathologique malgré tous les efforts consentis à rester crédible), Sophie (pour m'avoir fait regretter d'arriver 10 ans trop tard), Jean-Sébastien (qui s'est dépêché de passer sa thèse avant moi, pour me dévaloriser ou se valoriser? on ne le saura jamais), Lucille (pour ces innombrables 3 à 4 et non pas 5 à 7 et sa formation à l'ELISA), Romain (mon confident, ami, graphiste et comédien à ses heures perdues, *i will never forget you dude*), Zohair (pour son amitié, pour la distance qu'il a su mettre entre nous et pour avoir touché la corde sensible des « 5 sexless years », c'est aussi à toi qu'je cause, arigatô) et Claudy Focan (directeur, manager, marketing des abattoirs d'Anderlecht).

A Pascal (ami de longue date, celui sur qui j'ai toujours pu compter quand j'avais besoin de travailler le brachial antérieur en Larry Scott afin de ressembler un peu plus encore à mon idole Samir Bannout), Thomas V. (pour ses pichets), Flavien (compère d'harmonica lors des longues soirées d'été en Suisse), Jeremy L., Thomas S. et Jérôme C. (mes 3 compères de fac qui ont fait de ces années communes des moments inoubliables).

Un grand merci tout particulier à Ingrid qui m'a supporté (et insupporté aussi) tant qu'elle a pu. Cette thèse c'est essentiellement grâce à toi que j'ai trouvé la force de la mener à bien...

A mes deux frères Jean-Baptiste et Jean-François « Hanson », au fond tout aussi inconscients que moi mais pour bien d'autres raisons...

Ma dernière pensée ira à ceux sans qui cette thèse (et moi non plus par la même occasion) n'aurait jamais pu voir le jour. A mes parents qui m'ont soutenu et qui m'ont été de l'aide la plus précieuse pour mener à bien mon projet scolaire sans fin. Ne t'inquiète pas maman... un jour j'aurai un vrai travail !!!

## RESUME

### EXPLORATION DU POTENTIEL NEURAL DES CELLULES DU SANG DE CORDON OMBILICAL HUMAIN

Ces dernières décennies, la demande croissante en greffons de moëlle osseuse utilisés en clinique pour le traitement des hémopathies a soulevé un problème de disponibilité restreinte ne permettant pas la prise en charge systématique de tous les patients. La recherche de nouvelles sources de cellules souches a permis de mettre en exergue la capacité du sang placentaire à régénérer le compartiment hématopoïétique des malades après greffe. Des études complémentaires ont également permis de mettre en évidence la possible différenciation *in vitro* des cellules du sang de cordon ombilical en cellules autres qu'hématopoïétiques, et en particulier en cellules neuronales. Cependant, l'origine de ces cellules susceptibles de se différencier en neurones est encore floue à l'heure actuelle.

Grâce à des tris immunomagnétiques dirigés contre différents marqueurs de cellules souches, nous avons mis en évidence que le compartiment cellulaire à l'origine des cellules neuronales *in vitro* était caractérisé par le phénotype souche CD133+ / CD34-. De plus, ces cellules nécessitent un contact cellulaire étroit avec des cellules facilitatrices afin d'initier leur différenciation neuronale. Ainsi, le tri via le CD133 permet un enrichissement en cellules neurogéniques à partir du sang de cordon ombilical humain.

Dans un deuxième temps, nous avons également étudié la fonctionnalité d'un neurotransmetteur, l'acide gamma-aminobutyrique (GABA), sur les cellules du sang placentaire humain. En plus d'exprimer différentes sous-unités des récepteurs au GABA, les cellules du sang placentaire sont capables de migrer activement en réponse à un gradient de GABA. De plus, la fraction cellulaire qui a migré est enrichie en cellules neurogéniques et hématopoïétiques.

Nos résultats ont donc permis d'obtenir de nouvelles données phénotypiques et fonctionnelles sur les cellules souches du sang de cordon ombilical humain douées d'un potentiel neurogénique. Ces données suggèrent que le sang de cordon possède des cellules souches dont le potentiel régénératif dépasse le seul cadre de l'hématopoïèse. Cela augmente l'intérêt de leur utilisation dans la mise en place de protocoles de thérapie cellulaire notamment dans les dégénérescences du système nerveux central et périphérique.

## **ABSTRACT**

### **INVESTIGATIONS OF NEURAL POTENTIAL OF HUMAN UMBILICAL CORD BLOOD-DERIVED CELLS**

During the last decade treatment of malignancies has involved stem cell transplantation primarily using a limited supply of bone marrow donors. The use of other sources of stem cells such as cord blood has indirectly led to the discovery that certain stem cells within this population can give rise to other non-haematopoietic lineages such as neuronal cells. The progenitors that give rise to these cells have not been fully characterized.

In this study, we observed that the neuronal lineage is derived from CD133+ / CD34- cells fraction and furthermore, close contact is also needed with facilitating cells for the differentiation to proceed.

We also investigated the function of the neurotransmitter gamma amino-butyric acid (GABA) on cord blood cells. The GABA receptors are widely expressed within cord blood cells and cells migrate along a GABA gradient. The migration capacity can also be used to enrich for both haematopoietic and neurogenic cells.

In conclusion, our results shed light on phenotypic and functional properties of cord blood stem cells and may increase their utilisation in cellular therapy protocol.

# TABLE DES MATIERES

<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	Page 14
<b>INTRODUCTION</b> .....	Page 15
<b>1. LES CELLULES SOUCHES : GENERALITES</b> .....	Page 16
<b>2. LES DIFFERENTES SOURCES DE CELLULES SOUCHES</b> .....	Page 19
2.1 Les cellules souches embryonnaires (cellules ES) .....	Page 19
2.2 Les cellules souches foetales .....	Page 20
2.3 Les cellules souches adultes .....	Page 20
2.4 Les cellules iPS (induced pluripotent cells ) .....	Page 20
<b>3. CARACTERISTIQUES DES CELLULES SOUCHES</b> .....	Page 23
3.1 La migration cellulaire .....	Page 23
3.1.1 Processus de chimiotaxie et chimiokinèse .....	Page 23
3.1.2 Les différents récepteurs impliqués dans le chimiotactisme .....	Page 24
3.1.3 Les différentes chimiokines impliquées dans le chimiotactisme .....	Page 25
3.1.4 Rôle physiologique des chimiokines .....	Page 26
3.2 Utilisation des cellules souches en thérapie cellulaire .....	Page 28
3.2.1 Les cellules ES .....	Page 28
3.2.2 Les cellules souches adultes .....	Page 28
3.2.3 Les cellules souches d'origine foetale .....	Page 29
<b>4. LES CELLULES DU SANG PLACENTAIRE</b> .....	Page 31
4.1 Organisation des banques françaises de sang placentaire .....	Page 31
4.2 Modalités de prélèvement .....	Page 34
4.3 Les cellules souches du sang placentaire .....	Page 35
4.3.1 Les cellules souches hématopoïétiques .....	Page 35
4.3.2 Les cellules souches multipotentes .....	Page 39
4.4 Utilisation du sang placentaire en thérapie cellulaire .....	Page 39
4.4.1 Les greffes allogéniques extra-familiales .....	Page 39
4.4.2 Les greffes allogéniques intra-familiales .....	Page 40
4.4.3 Les greffes autologues .....	Page 41
4.5 Utilisation du sang placentaire en recherche .....	Page 42
<b>5. LA THERAPIE CELLULAIRE ET LES MALADIES NEURODEGENERATIVES</b> .....	Page 44
5.1 Le système nerveux : Généralités .....	Page 44
5.1.1 Le système nerveux central .....	Page 45
5.1.2 Le système nerveux périphérique .....	Page 45
5.1.3 La neurotransmission au sein du système nerveux central .....	Page 48
5.1.3.1 La neurotransmission gabaergique .....	Page 49
5.1.3.1.1 Le métabolisme du GABA .....	Page 49
5.1.3.1.2 Stockage et libération du GABA .....	Page 50
5.1.3.1.3 Recapture du GABA .....	Page 52
5.1.3.2 Récepteurs au GABA .....	Page 53
5.1.3.2.1 Récepteurs ionotropiques GABA <sub>A</sub> et GABA <sub>C</sub> .....	Page 53
5.1.3.2.2 Récepteurs métabotropiques GABA <sub>B</sub> .....	Page 57
5.1.4 Implication du GABA dans l'embryogenèse du système nerveux central .....	Page 62
5.2 Maladies neuro-dégénératives du système nerveux central .....	Page 66
5.2.1 Maladies neuro-dégénératives de la rétine .....	Page 67
5.2.2 Traitements des maladies neuro-dégénératives rétinienne .....	Page 68
5.2.3 Différenciation neurale in vitro des cellules issues du sang placentaire .....	Page 71
5.2.4 Sang placentaire et thérapie cellulaire .....	Page 73
5.2.5 Modèles murins de pathologies neuro-dégénératives .....	Page 74
<b>6. OBJECTIFS</b> .....	Page 78
<b>MATERIEL &amp; METHODES</b> .....	Page 78
1. Culture cellulaire .....	Page 79
1.1 Cultures primaires et lignées cellulaires .....	Page 79
1.2 Protocoles de culture cellulaire .....	Page 81
1.3 Marquage membranaire avant culture .....	Page 82
2. Analyses immunocytochimiques .....	Page 82

3. Western blotting .....	Page 85
4. RT-PCR .....	Page 86
5. Test de fonctionnalité neuronale au calcium .....	Page 88
6. Test de migration en chambres de Boyden .....	Page 88
7. Injection de cellules souches dans la rétine de souris .....	Page 89
<b>RESULTATS</b> .....	Page 90
1. Cord blood-derived neurons are originated from CD133+/CD34- stem/progenitor cells in a cell to cell contact dependent manner .....	Page 91
2. Human cord blood-derived hematopoietic and neural-like stem/progenitor cells are attracted by the neurotransmitter GABA .....	Page 105
3. Caractérisation neurale des cellules du sang de cordon ombilical humain : application à la médecine régénérative .....	Page 135
<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES</b> .....	Page 146
1. Etude de la différenciation neurale in vitro des cellules du sang de cordon ombilical humain .....	Page 147
2. Etude des cellules GABAergiques du sang de cordon ombilical humain .....	Page 159
3. Caractérisation neurale des cellules du sang de cordon ombilical humain : application à la médecine régénérative .....	Page 165
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	Page 170
<b>ANNEXE</b> .....	Page 185
Annexe 1 : Injection de cellules souches CD133+ dans le vitré de souris balb/c photolésées .....	Page 186
Annexe 2 : Injection de cellules souches CD133+ dans le vitré de souris rd10 .....	Page 187

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>5-AVA</b> : Acide-5-Aminoalérrique	<b>GABA<sub>A</sub></b> : Récepteur GABA <sub>A</sub>
<b>α-CG</b> : Alpha Cetoglutarate	<b>GABA<sub>B</sub></b> : Récepteur GABA <sub>B</sub>
<b>AC</b> : Adenylate Cyclase	<b>GABA<sub>C</sub></b> : Récepteur GABA <sub>C</sub>
<b>ADN</b> : Acide Déoxyribonucléique	<b>GABA-T</b> : GABA Aminotransférase
<b>ADNc</b> : ADN complémentaire	<b>GAD</b> : Glutamate Décarboxylase
<b>ADP</b> : Adenosine Biphosphate	<b>GC</b> : Guanylate Cyclase
<b>AICT</b> : Activité d'Ingénierie Cellulaire et Tissulaire	<b>GFAP</b> : Glial Fibrillary Acidic Protein
<b>AMPc</b> : Adénosine Monophosphate Cyclique	<b>GMPc</b> : Guanosine Monophosphate cyclique
<b>AP – HP</b> : Assistance Publique – Hôpitaux Publics	<b>GVH</b> : réaction du greffon contre l'hôte
<b>ARN</b> : Acide Ribonucléique	<b>H<sup>+</sup></b> : Hydrogène
<b>ARNm</b> : ARN messenger	<b>H<sub>2</sub>O</b> : Eau
<b>ATCC</b> : American Type Culture Collection	<b>IGF</b> : Insulin-like Growth Factor
<b>ATP</b> : Adenosine Triphosphate	<b>IP3</b> : Inositol triphosphate
<b>β-NGF</b> : Neural Growth Factor-β	<b>iPS (cells)</b> : induced pluripotent stem (cells)
<b>BDNF</b> : Brain Derived Neurotrophic Factor	<b>K<sup>+</sup></b> : ion Potassium
<b>bFGF</b> : basal Fibroblast Growth Factor	<b>mL</b> : millilitre
<b>C</b> : Sous-unité Catalytique	<b>nm</b> : nanomètre
<b>Ca<sup>2+</sup></b> : ion Calcium	<b>P</b> : Groupement Phosphate
<b>CCG</b> : Couche des Cellules Ganglionnaires	<b>PBMCs</b> : Peripheral Blood Mononuclear Cells
<b>Cellules ES</b> : Cellules Souches Embryonnaires	<b>PBS</b> : Ca <sup>2+</sup> -free Phosphate Buffer Saline
<b>CFU</b> : Colony Forming Unit	<b>PDE</b> : Phosphodiesterase
<b>CFU-GEMM</b> : CFU Granulocyte Erythrocyte Mononuclear Macrophage	<b>PDGF-BB</b> : Platelet Derived Growth Factor-BB
<b>CHU</b> : Centre Hospitalier Universitaire	<b>PFA</b> : Paraformaldéhyde
<b>C</b> : Sous-unité Catalytique	<b>PKA</b> : Protein Kinase A
<b>CdCl<sub>2</sub></b> : Chlorure de cadmium	<b>PKC</b> : Protein Kinase C
<b>Cl<sup>-</sup></b> : ion Chlore	<b>PIP3</b> : phosphatidylinositol 1,4,5-triphosphate
<b>CO<sub>2</sub></b> : Dioxyde de Carbone	<b>PIP<sub>2</sub></b> : Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
<b>CNE</b> : Couche Nucléaire Externe	<b>PL</b> : Phospholipase
<b>CNI</b> : Couche Nucléaire Interne	<b>PLC</b> : Phospholipase C
<b>CPE</b> : Couche Plexiforme Externe	<b>PLP</b> : Phosphate de Pyridoxal
<b>CPI</b> : Couche Plexiforme Interne	<b>R</b> : Sous-unité Régulatrice
<b>CS</b> : Cellules Souches	<b>R1</b> : Sous-unité R1 du récepteur GABA <sub>B</sub>
<b>CSn</b> : Cellules Souches Neurales	<b>R2</b> : Sous-unité R2 du récepteur GABA <sub>B</sub>
<b>CSG</b> : Cellules Souches Germinales	<b>RT</b> : Reverse Transcriptase
<b>CSS</b> : Cellules Souches Somatiques	<b>SDS</b> : Sodium Dodecyl Sulfate
<b>CST</b> : Cellules Souches Totipotentes	<b>SDS-PAGE</b> : SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
<b>DAG</b> : Diacylglycerol	<b>SDF-1</b> : Stromal cell Derived Factor-1
<b>DAPI</b> : 4'-6 diamino-2-phenylindole	<b>SN</b> : Substance Noire
<b>DMLA</b> : Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age	<b>SNC</b> : Système Nerveux Central
<b>EGF</b> : Epidermal Growth Factor	<b>SNP</b> : Système Nerveux Périphérique
<b>EFS / BFC</b> : Etablissement Français du Sang Bourgogne Franche-Comté	<b>SSA-D</b> : Enzyme Acide Succinique Semi-Aldéhyde Déshydrogénase
<b>EPR</b> : Epithélium Pigmentaire Rétinien	<b>SVF</b> : Sérum de Veau Fœtal
<b>GABA</b> : Acide Gamma Amino-Butyrique	<b>TGF-β</b> : Transforming Growth Factor-β
	<b>TH</b> : Tyroxine Hydroxylase

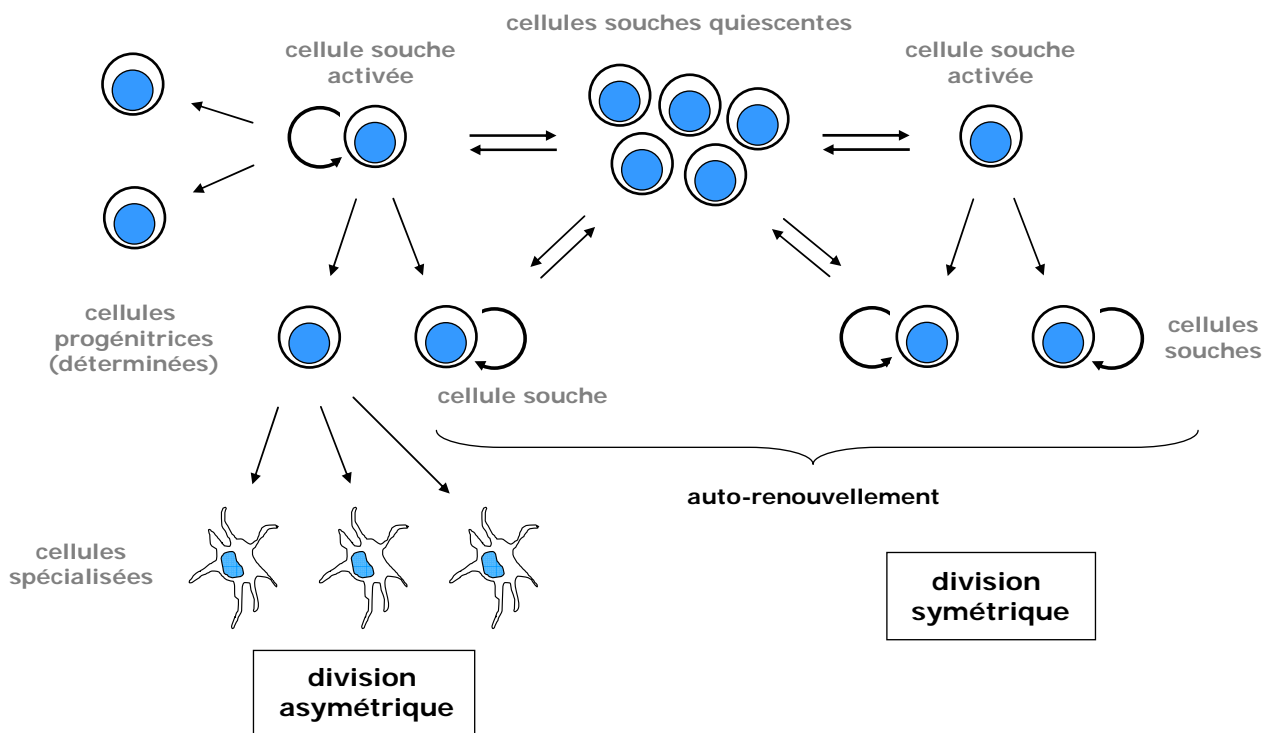
# **INTRODUCTION**

Ce travail de thèse s'inscrit dans la mise en place d'un modèle de thérapie cellulaire, axé sur la réparation des lésions du système nerveux, à partir des cellules souches du sang de cordon ombilical humain. Nous nous intéresserons plus particulièrement au traitement des pathologies neuro-dégénératives touchant les photorécepteurs rétiniens. Nous aborderons en premier lieu les généralités concernant les cellules souches, le sang de cordon ombilical, et le système nerveux central avant de faire un état des lieux de l'utilisation des cellules souches du sang de cordon ombilical dans le traitement des maladies neuro-dégénératives.

## **1. LES CELLULES SOUCHES : GENERALITES**

Les cellules souches (CS) sont des cellules non différenciées, douées d'auto-renouvellement (*i.e.* multiplication à l'identique quasi indéfiniment) et capables de générer un voire plusieurs types de cellules déterminées tout au long de la vie d'un individu. Le stock de cellules souches au sein de l'organisme est régulé par les balances auto-renouvellement / apoptose ou auto-renouvellement / différenciation. L'auto-renouvellement permet de régénérer le compartiment des cellules souches. Ce processus entraîne la duplication d'une cellule souche qui peut, soit se diviser en donnant deux cellules souches (division symétrique) permettant ainsi d'augmenter le pool de cellules souches, soit se diviser en donnant d'une part une cellule souche et d'autre part une cellule progénitrice (division asymétrique) (*cf.* Figure 1), soit donner deux cellules progénitrices (diminution du pool de cellules souches). Cette cellule dite progénitrice est, quant à elle, pré-déterminée. Elle produira un grand nombre de cellules qui se différencieront en cellules spécialisées permettant le maintien des différentes fonctions cellulaires de l'organisme.

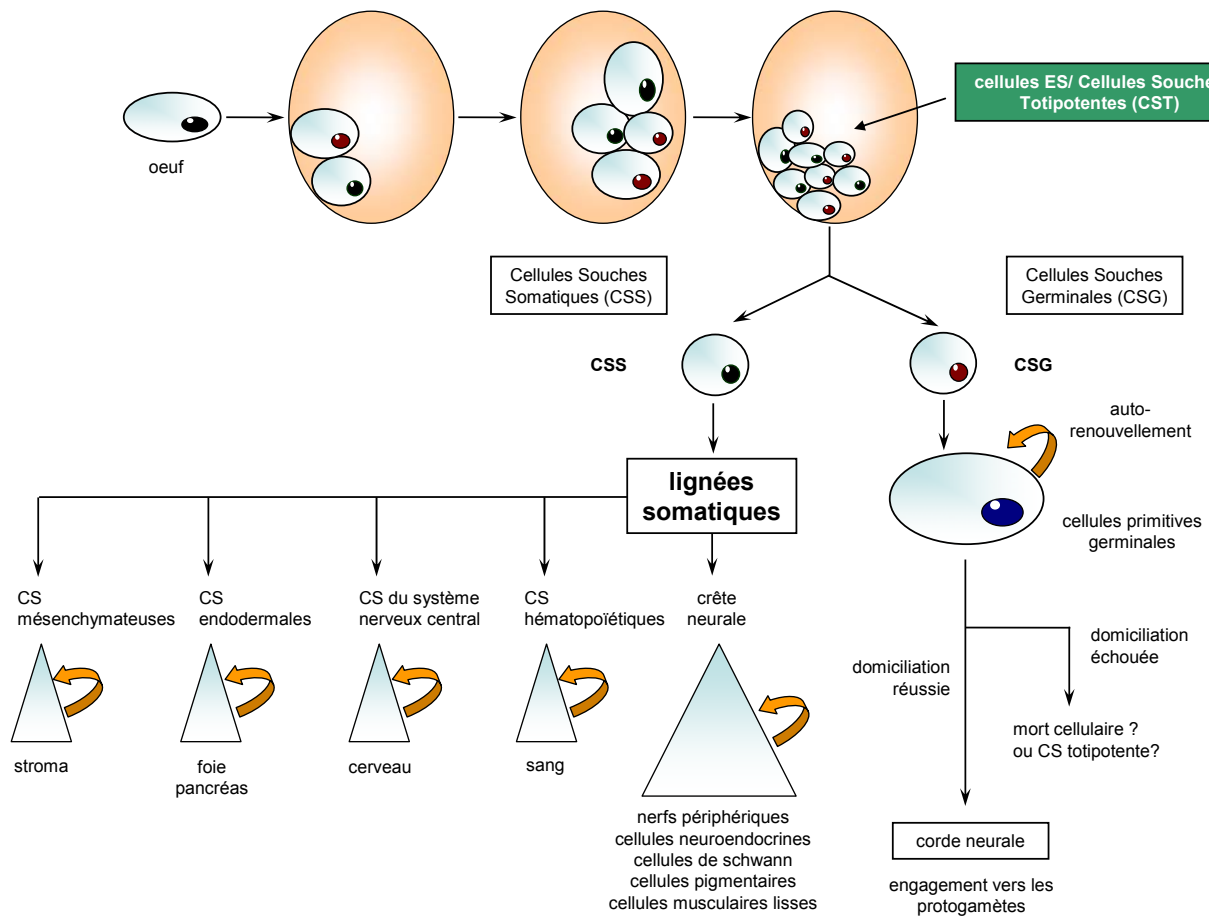




**Figure 1 : Modèle de duplication des cellules souches**

Une cellule souche activée peut se diviser en donnant, soit deux cellules souches identiques (division symétrique), soit une cellule souche et une cellule progénitrice (division asymétrique), soit deux cellules progénitric. La cellule progénitrice, déterminée, produira un nombre défini de cellules spécialisées.

Au cours de la vie d'un individu, les cellules constitutives de nombreux organes sont sujettes à un renouvellement permanent (*i.e.* tissu sanguin, épiderme, intestin). Ce renouvellement est possible grâce à la présence de plusieurs types de cellules souches multipotentes au sein de ces différents tissus (*i.e.* cellules souches hématopoïétiques, cellules souches mésenchymateuses ; (Minguell, Erices et al. 2001); *cf.* Figure 2). On connaît à ce jour trois types de cellules souches dans l'organisme humain : les cellules souches embryonnaires, les cellules souches adultes et les cellules souches dites foetales.



**Figure 2 : Modèle de génération des différentes cellules souches à la base des lignées germinales et somatiques**

Les cellules souches totipotentes (CST) peuvent dériver en cellules germinales primitives (CSG) et en cellules souches tissulaires spécifiques, grâce à une cellule souche somatique commune (CSS). Les CST sont capables de générer tous les tissus adultes à l'exception des tissus annexes chez l'embryon (placenta, membrane amniotique). A gauche, les cellules souches spécifiques d'organes et de tissus qui seront utilisées en transplantation. A droite, les populations de CST qui pourraient éventuellement être utilisées comme des précurseurs de cellules souches spécifiques d'organes et de tissus (d'après (Weissman 2000)).

## 2. LES DIFFERENTES SOURCES DE CELLULES SOUCHES

Le zygote (œuf), stade initial de l'embryon, résultant de la fusion de deux gamètes haploïdes (*i.e.* ovocyte et spermatozoïde) est une cellule souche totipotente (*cf.* Figure 2). Cette cellule va être à l'origine de toutes les cellules de l'organisme en formation telles que les cellules de l'embryon, les cellules germinales et les cellules des tissus annexes (*i.e.* placenta, membrane amniotique).

Pendant le développement embryonnaire précoce, les cellules vont conserver leur aptitude à se différencier en de multiples types cellulaires. Ainsi, les cellules souches embryonnaires ou cellules ES, isolées de la masse cellulaire interne du blastocyste au stade 16-40 cellules (Evans and Kaufman 1981; Thomson, Itskovitz-Eldor et al. 1998) font également partie des rares cellules totipotentes. Ces cellules ES peuvent ainsi produire plus de 200 types cellulaires représentatifs au sein de l'organisme (Evans and Kaufman 1981; Thomson, Itskovitz-Eldor et al. 1998; Amit, Carpenter et al. 2000), en particulier les lignées germinales. Cependant, contrairement au zygote, les cellules ES sont incapables produire les cellules constitutives des tissus annexes (*cf.* Figure 2).

Seules les cellules souches totipotentes sont ainsi capables de générer un individu dit « complet ». Les cellules souches pluripotentes ont la capacité de générer toutes les cellules d'un organisme hormis les cellules germinales tandis que les cellules souches multipotentes ne génèrent que les différentes cellules constitutives d'un tissu donné. La cellule souche unipotente ne pourra se différencier qu'en un seul type cellulaire (*i.e.* cellule souche de la crypte intestinale ; *cf.* Figure 2).

### 2.1 Les cellules souches embryonnaires (cellules ES)

Les cellules ES, directement issues d'un embryon en formation, sont prélevées au sein de la masse cellulaire interne du blastocyste, au stade embryonnaire précoce 16-40 cellules (Evans and Kaufman 1981; Thomson, Itskovitz-Eldor et al. 1998). Ces cellules ont pour avantage d'être les

seules cellules totipotentes utilisables à ce jour en recherche *via* leur expansion sur couche stromale dans des conditions de culture appropriées.

## **2.2 Les cellules souches fœtales**

Les cellules souches fœtales sont, le plus fréquemment, isolées à partir du sang de cordon ombilical, également appelé sang placentaire. D'autre part, certains constituants des annexes embryonnaires tels que le placenta, l'épithélium amniotique, le mésenchyme du cordon ombilical (*e.g.* gelée de Wharton), le tissu sub-endothélial de la veine ombilicale ainsi que le liquide amniotique peuvent également être utilisés comme source de cellules souches fœtales (Mitchell, Weiss et al. 2003; Delo, De Coppi et al. 2006; Fu, Cheng et al. 2006; Miki and Strom 2006; Kestendjieva, Kyurkchiev et al. 2008).

## **2.3 Les cellules souches adultes**

Les cellules souches adultes sont des cellules immatures présentes dans de nombreux tissus différenciés chez l'adulte, constituant ainsi un réservoir de cellules réparatrices. Ces réservoirs de cellules souches adultes sont présents, en particulier, dans la moelle osseuse, le foie, les muscles squelettiques, la glande mammaire, la peau, le système nerveux central (*e.g.* cortex, hippocampe et zone sous-ventriculaire) et le système nerveux périphérique (Altman 1962; McKay 1997; Gross 2000) (*cf.* Tableau 1).

## **2.4 Les cellules iPS (*induced pluripotent stem cells*)**

Les cellules iPs sont des cellules souches pluripotentes pouvant être générées à partir de cellules murines et humaines adultes telles que les fibroblastes, les hépatocytes, les cellules de l'estomac ou les lymphocytes (Okita, Ichisaka et al. 2007; Zaehres and Scholer 2007; Aoi, Yae et al. 2008; Eminli, Utikal et al. 2008; Nakagawa, Koyanagi et al. 2008). Les cellules ainsi obtenues ont des

caractéristiques similaires aux cellules ES en terme de prolifération, d'auto-renouvellement et de différenciation. Ce processus de dédifférenciation de cellules adultes en cellules souches a été mis en évidence très récemment par l'équipe du Pr Yamanaka (Takahashi, Okita et al. 2007; Takahashi, Tanabe et al. 2007). Elle est possible grâce à une reprogrammation génétique requérant l'introduction de plusieurs facteurs de transcription au sein de cellules adultes, caractéristiques des cellules embryonnaires : Oct3/4, Sox2, Klf4 et c-Myc. Récemment, Nakagawa *et al.* ont également démontré que le facteur de transcription c-Myc n'était pas indispensable au processus de dédifférenciation des fibroblastes humains en cellules iPS et que son absence, malgré une forte diminution de l'efficacité de transformation, permettait une induction plus spécifique de cellules iPS (Nakagawa, Koyanagi et al. 2008).

Cellules souches	Localisation	Cellules produites	Références
Hématopoïétiques	moelle osseuse	globules rouges lymphocytes, macrophages, plaquettes	Fukushima and Ohkawa, 1995 Lansdorp, 1995 Gussoni <i>et al.</i> , 1999 Petersen <i>et al.</i> , 1999
Neurales	Système Nerveux Central (SNC)	neurones, astrocytes, oligodendrocytes	McKay, 1997 Murphy <i>et al.</i> , 1997
Epithéliales	intestin épiderme	cellules des villosités de l'épithélium intestinal, cellules épidermiques	Bach <i>et al.</i> , 2000 Lowell <i>et al.</i> , 2000 Wright, 1997
Mésenchymateuses	moelle osseuse tissu adipeux	os, cartilage, tissu adipeux, tendons, muscles, cellules stromales, cellules neurales	Caplan, 1994 Kuznetsov <i>et al.</i> , 1997 Prockop, 1997 Kopen <i>et al.</i> , 1999

**Tableau 1 : Les différentes cellules souches adultes humaines**

Répertoire des différents réservoirs de cellules souches chez l'adulte sain, leur localisation respective ainsi que les cellules qui en dérivent (Lakshmipathy and Verfaillie 2005).

## **3. CARACTERISTIQUES DES CELLULES SOUCHES**

### **3.1 *La migration cellulaire***

La migration cellulaire est une des fonctions caractéristique mais non exclusive des cellules souches. Ce processus permet aux cellules de se positionner pour jouer divers rôles indispensables au bon fonctionnement de l'organisme du stade embryonnaire à l'âge adulte, en particulier dans les fonctions d'homéostasie, assurant ainsi la régénération des cellules différenciées dans un site différent de leur site de production. Cette motilité intervient également, entre autres, dans tous les phénomènes immunitaires, de mise en place des systèmes cellulaires complexes hiérarchisés en plusieurs couches, de colonisation ou de réparation tissulaire nécessitant une mobilisation des progéniteurs depuis leur foyer d'origine.

#### **3.1.1 Processus de chimiotaxie et de chimiokinèse**

Le processus de chimiotaxie repose sur la perception d'un gradient chimique par la cellule, étape indispensable au mouvement cellulaire. Ce déplacement actif et dirigé résulte de la distribution dynamique et polarisée des récepteurs membranaires et de leur activation grâce aux cytokines présentes dans l'environnement extra-cellulaire. L'activation des différents récepteurs par une chimiokine va provoquer la migration de la cellule en direction d'une concentration croissante de la substance ou dans la direction opposée.

Contrairement au chimiotactisme des bactéries, le mécanisme permettant le déplacement physique des cellules eucaryotes est encore peu connu. L'activation par un gradient chimiotactique extra-cellulaire des différents récepteurs, en fonction de leur localisation respective, va entraîner un gradient intra-cellulaire de phosphatidylinositol 1,4,5-triphosphate (PIP3) intracellulaire (Hannigan, Huang et al. 2004; von Philipsborn and Bastmeyer 2007). Cette variation de concentration en PIP3

intra-cellulaire va ensuite permettre la polymérisation dirigée des filaments d'actine. L'une des extrémités des filaments d'actine assurant une connection avec la surface interne de la membrane cytoplasmique, leur polymérisation va ainsi mener à la formation de pseudopodes et au déplacement de la cellule de façon séquentielle.

La chimiokinèse est également un processus de migration cellulaire exercé en réponse à la stimulation d'une cellule par une cytokine spécifique du milieu extra-cellulaire. Cependant, les mouvements cellulaires associés au phénomène de chimiokinèse, contrairement à la chimiotaxie, sont complètement aléatoires (Behar, Li et al. 1996). L'amplitude et la fréquence des mouvements effectués ainsi que la direction prise par la cellule n'est pas clairement définie dans ce cas là. Le comportement cellulaire est basé sur l'analyse des variations de l'environnement entre deux points distincts sur lesquels la cellule est passée au hasard de son déplacement.

### **3.1.2 Les différents récepteurs impliqués dans le chimiotactisme**

Chez les cellules eucaryotes, dans la majorité des cas, les stimuli chimiotactiques exercent leur action *via* des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G hétérotrimériques ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ). La majorité des récepteurs responsables de la chimiotaxie sont stimulés par des peptides formylés (formyl peptide receptors (FPR)), par les chimiokines (chemokine receptors (CCR ou CXCR)) ou par les leukotriènes (récepteurs aux leukotriènes BLT). D'autres molécules de signal ou cytokines peuvent également avoir un rôle d'induction du chimiotactisme comme le PDGF (Platelet Derived Growth Factor) et l'IGF (Insuline Growth Factor).



### 3.1.3 Les différentes chimiokines impliquées dans le chimiotactisme

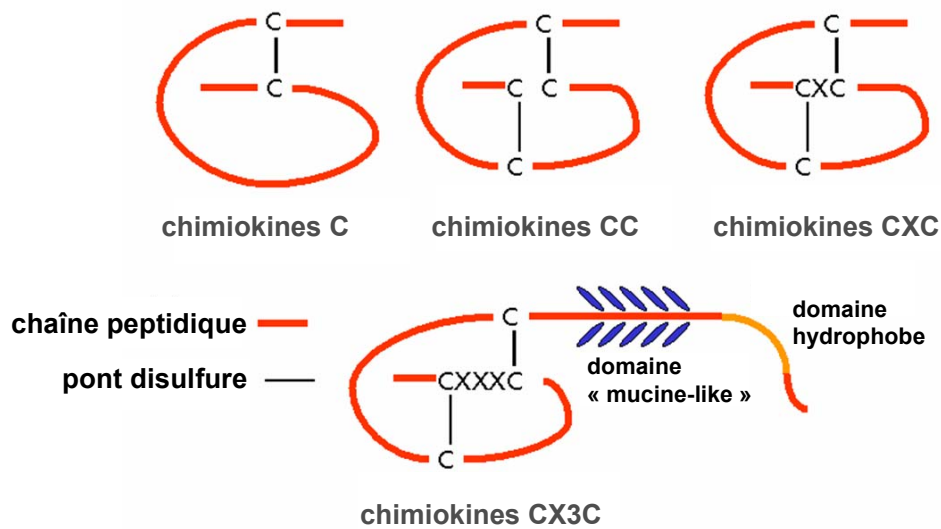
Le nombre de molécules capables de déclencher une réponse chimiotactique est relativement élevé (Tableau 2). Les chimiokines appartiennent à une classe spéciale de cytokines, les diverses familles de chimiokines (C, CC, CXC, CX3C) regroupant des molécules de structure similaire. Les chimiokines sont ainsi classées en fonction de la localisation des 2 premières cystéines (N-ter) établissant des ponts disulfure S-S au sein de la séquence amino-acidique primaire (*cf.* Figure 3). La spécificité de cible de ces 4 groupes est également différente, les chimiokines « CC » ayant une action directe sur les monocytes (*e.g.* RANTES) et les chimiokines « CXC » étant spécifiques des granulocytes neutrophiles (*e.g.* IL-8) (Schober and Zernecke 2007).

chimiokines	récepteurs de chimiokines	
CXCL8	CXCR1	CCR3
CXCL12	CXCR2	CCR4
CCL2	CXCR3	CCR5
CCL5	CXCR4	CCR6
CCL4	CXCR5	CCR7
CCL20	CXCR6	CCR8
CCL1	CXCR2	CCR9
CCL3	CCR1	CX3CR1
angiopoïétine 2	CCR2	CX3CL1

**Tableau 2 : Cytokines et récepteurs exprimés chez les cellules eucaryotes**

Liste non exhaustive des chimiokines et de leurs récepteurs les plus étudiés.

## structure des différentes classes de chimiokines



**Figure 3 : Les différentes familles de chimiokines**

Les familles de chimiokines ont été établies en fonction de la position des deux résidus cystéines situées en N-ter de la séquence primaire. On distingue à ce jour 4 familles de chimiokines différentes : C, CC, CXC et CX3C.

### 3.1.4 Rôle physiologique des chimiokines

Les chimiokines participent entre autre à l'établissement des structures cellulaires hiérarchisées en différentes couches au sein de divers compartiments tissulaires (*e.g.* système nerveux central, peau), en particulier lors de l'embryogenèse (Campbell, Kim et al. 2003). Ainsi, des souris transgéniques n'exprimant pas la chimiokine CXCL12 (SDF-1) meurent au stade embryonnaire. Ces molécules sont également connues pour leur intervention dans l'activation, la différenciation et la survie cellulaire, confirmant leur rôle majeur dans la mise en place et la différenciation de nombreux tissus (Sordi, Malosio et al. 2005). Elles participent notamment à l'homéostasie des cellules souches hématopoïétiques, le SDF-1 régulant la prolifération des précurseurs hématopoïétiques en inhibant l'apoptose et en favorisant la transition G0/G1 des cellules souches CD34+ (Lataillade, Clay et al. 2002).

Les cellules CD34<sup>+</sup> humaines issues du sang périphérique et transplantées par injection intraveineuse disparaissent rapidement de la circulation systémique du receveur. Dans les heures qui suivent l'injection, ces progéniteurs CD34<sup>+</sup> vont migrer vers différents organes tels que la rate, le foie ou les poumons (Hidalgo, Weiss et al. 2002; Kollet, Shivtiel et al. 2003; Hofmann, Wollert et al. 2005). Dans les jours qui suivent, ces cellules vont ensuite migrer jusqu'à la moelle osseuse, niche privilégiée des cellules souches mobilisables (Papayannopoulou 2003). Tous ces mouvements cellulaires *in vivo* sont étroitement liés à un phénomène de chimiotaxie des cellules souches dirigé par l'action de chimiokines spécifiques (Lapidot, Dar et al. 2005).

De plus, les chimiokines et leurs récepteurs occupent une place primordiale dans tous les phénomènes associés aux processus inflammatoires et traumatiques. L'activation de certains récepteurs aux chimiokines va permettre la mobilisation des leucocytes au niveau de la zone d'inflammation, d'infection ou de lésion (Miyasaka and Tanaka 2004). Ainsi, la chimiokine SDF-1 (CXCL12) associée à son récepteur CXCR4 est impliquée dans le déplacement des leucocytes au sein des tissus extra-vasculaires. De plus, lors de la croissance des tissus lésés, la quantité de SDF-1 locale augmente, permettant le recrutement des cellules de l'immunité (*i.e.* lymphocytes T CD4<sup>+</sup>) au niveau des sites d'inflammation (Havens, Chiu et al. 2008). Ces molécules sont également impliquées dans l'établissement de certains protocoles thérapeutiques, comme dans le cas des allogreffes à haut risque. Amescua *et al.* (2008) ont ainsi montré que la production de la chimiokine CXCL1/KC augmente dans les trois jours suivant une greffe de cornée vascularisée. De plus, dans les 10 jours suivant la greffe, une augmentation des chimiokines CXCL9/Mig et CXCL10/IP10 est également observée, corrélée au recrutement des cellules T CD4<sup>+</sup> allospécifiques au sein du greffon. Ces cellules CD4<sup>+</sup> recrutées vont reconnaître le greffon comme un organe du non-soi et en favoriser le rejet. Ainsi, la neutralisation de la chimiokine CXCL1/KC représenterait une option thérapeutique intéressante, permettant d'augmenter le taux de survie du greffon dans les allogreffes à haut risque via l'inhibition du recrutement des cellules T (Amescua, Collings et al. 2008).

## **3.2 Utilisation des cellules souches en thérapie cellulaire**

### **3.2.1 Les cellules ES**

Les cellules ES, totipotentes, ont la rare capacité de générer tous les tissus d'un individu. A ce jour, de nombreux laboratoires étudient le comportement de ces cellules afin de valider divers protocoles de thérapie cellulaire (Hedlund, Pruszek et al. 2008; Stanley and Elefanty 2008). Cependant, la récupération des cellules ES à des fins de recherche entraîne la destruction obligatoire des embryons utilisés soulevant ainsi des problèmes éthiques. Des lois contraignantes, limitant l'utilisation d'embryons ou de fœtus d'origine humaine dans les laboratoires de l'Union Européenne, ont ainsi vu le jour ces dernières années [lois de bioéthiques, Journal Officiel du 7 Août 2004]. Depuis, seuls quelques laboratoires européens ont reçu un agrément d'utilisation des cellules souches ES d'origine humaine pour des recherches à vocation thérapeutique uniquement et pour une période limitée à 5 ans. En plus des points restrictifs précédemment cités, leur transplantation semble induire la formation de tératomes, tumeurs formées par des cellules germinales pluripotentes (Okano 2002). Les modalités de transplantation et le devenir des cellules ES au sein de l'organisme transplanté devront être clairement définis et maîtrisés avant d'autoriser une quelconque utilisation thérapeutique de ces cellules ES en clinique.

### **3.2.2 Les cellules souches adultes**

Contrairement aux cellules ES, les cellules souches adultes sont déjà utilisées efficacement depuis de nombreuses années dans le cadre de diverses thérapies cellulaires (*i.e.* traitement de certaines leucémies, ischémies cardiaques, diabète de type I) (Tuch 2006). Les cellules souches adultes, multipotentes, peuvent ainsi contribuer à la néogenèse et à la réparation de tissus après lésions ou dégénérescences. Cet aspect est également mis en pratique pour la réalisation d'autogreffes (*i.e.* greffe dans un autre tissu du même individu ; (Thomas 1991; Young, Ray et al. 2000; Okano 2002).

La trans-différenciation de cellules adultes *in situ* est également possible. Ainsi, une cellule mésenchymateuse est capable, dans un premier temps, de régresser vers un stade de développement plus précoce puis de permettre l'établissement de nouvelles lignées (*e.g.* lignée neuronale ou musculaire ; (Sanchez-Ramos, Song et al. 2000; Krabbe, Zimmer et al. 2005). Les problèmes liés à la transplantation des cellules souches adultes reposent le plus souvent sur leur mode de prélèvement. En effet, la récupération de certaines de ces cellules en clinique est souvent liée à un acte opératoire traumatique (*e.g.* cellules issues de la moelle osseuse, du cerveau ou du coeur). De plus, leur disponibilité est relativement limitée.

### **3.2.3 Les cellules souches d'origine fœtale**

Le sang placentaire est riche en cellules souches hématopoïétiques qui permettent l'établissement *in vivo* des différentes lignées du tissu sanguin (*i.e.* leucocytes, hématies et plaquettes). Les prélèvements disponibles dans les banques sont, à ce jour, essentiellement utilisés dans le cadre des greffes de cellules hématopoïétiques, la première transplantation efficace remontant à 1988 (Gluckman and Rocha 2005). Le sang placentaire s'avère être une option thérapeutique novatrice et avantageuse dans le traitement de certaines leucémies, déficits immunitaires ou anémies sévères (Brown and Boussiotis 2008). Cette source de cellules présente de nombreux avantages : l'utilisation du sang de cordon ombilical ne soulève aucun problème éthique, les cellules étant prélevées sur un tissu qui est normalement détruit et qui est issu d'un don. Par ailleurs, les dépistages sérologiques systématiques révèlent que le sang placentaire contient rarement des agents infectieux, ce qui réduit les risques pathologiques relatifs à son utilisation en clinique (Bradley and Cairo 2005). Les cellules du sang de cordon étant peu immunogènes, les risques de réaction du greffon contre l'hôte (GVH) sont significativement réduits (Bradley and Cairo 2005). Il en résulte une compatibilité donneur-receveur accrue favorisant les allogreffes (d'un donneur à l'autre) et les xénogreffes (d'une espèce à l'autre) (Riordan, Chan et al. 2007). De plus, l'éventail des donneurs

est très large et la disponibilité en nouveaux greffons est élevée et quasi-constante. Cependant, le nombre de cellules souches utiles par prélèvement est tout de même limité et la durée d'aplasie dans le cadre d'une greffe de sang placentaire est de ce fait plus longue que pour une greffe de cellules issues de moelle osseuse (Bradley and Cairo 2005). Pour assurer le succès de la greffe, le greffon d'origine placentaire doit en effet contenir un nombre suffisant de cellules nucléées, ce qui limite en priorité le champ des receveurs aux jeunes sujets dont le poids est inférieur à 30 kg sauf quelques rares exceptions (*e.g.* groupe HLA rare disponible uniquement en sang de placentaire). A ce jour, des tests de transplantation simultanée de deux sangs placentaires (ou plus) issus de donneurs différents, permettant d'optimiser la reconstruction hématopoïétique en augmentant le nombre de cellules souches et nucléées par injection, ont été testés pour tenter de pallier à ce problème restrictif majeur (Haspel and Ballen 2006; Jaing, Yang et al. 2007).

## 4. LES CELLULES DU SANG PLACENTAIRE

### 4.1 Organisation des banques françaises de sang placentaire

L'Activité d'Ingénierie Cellulaire et Tissulaire (AICT) de l'Établissement Français du Sang Bourgogne / Franche-Comté (EFS BFC) à Besançon fait partie, avec Bordeaux, des deux seules banques publiques de sang placentaire en France. Ces centres assurent les activités de prélèvement, de contrôle de qualité et de cryoconservation initiale. Un site de conservation à long terme et de distribution des greffons validés a également été mis en place dans la ville d'Annemasse (*cf.* Tableau 3). Ce site d'Annemasse permet également le stockage des greffons en provenance des centres de prélèvements indépendants. Les banques de Besançon et Bordeaux étant équipées d'un système permettant la réduction du volume des greffons, la congélation et le stockage de ces unités dites « réduites » se fait désormais directement sur ces 2 sites. Ces banques publiques de greffons sont placées sous l'égide de l'Établissement Français du Sang, de l'Agence de Biomédecine et de l'Établissement Français des Greffes. Le réseau français de stockage des sangs placentaires est en étroite relation avec le réseau européen Eurocord qui gère le registre des greffes et définit leurs modalités, ainsi qu'avec le réseau mondial Netcord qui facilite les démarches de recherche de greffons compatibles en fonction de leurs groupes tissulaires (HLA) et met en place un système d'accréditation international.

Afin de répondre à la demande croissante du nombre de greffons en France, le développement de l'activité s'est concentré dans un premier temps sur l'extension du nombre de maternités assurant la collecte du sang de cordon ombilical dans les régions de Besançon et Bordeaux, et dans un second temps, à l'habilitation de plusieurs centres de prélèvements dans les villes de Paris et Marseille (*cf.* Tableau 3). Le développement de banques de sang placentaires privées comme il en existe plusieurs à l'heure actuelle en Angleterre (*e.g.* Virgin Health Bank) ou en Suisse est actuellement interdit en France par les lois de bioéthique [lois de bioéthiques, Journal Officiel du 7 Août 2004].

Chaque don est destiné au traitement de tout patient qui le nécessiterait, sans autre préférence que la meilleure correspondance entre les groupes tissulaires HLA respectifs du donneur et du receveur. Le registre international permet aux cliniciens de disposer du greffon le plus compatible pour chaque patient qui en aurait besoin, et ce quelque soit le pays où il se trouve stocké. Le conditionnement des greffons sous forme congelée facilitant l'acheminement par transport spécialisé dans les plus brefs délais, en cas de nécessité d'un greffon dans un pays autre que le lieu d'hospitalisation du patient, le délai d'acheminement est garanti en moins de 48h, dans le monde entier, et ce quelle que soit la destination finale.

Tous les prélèvements font l'objet d'un enregistrement obligatoire dans le registre international, contrôlé par l'Etablissement Français des Greffes. A ce jour, plus de 230.000 sangs placentaires y sont répertoriés (*i.e.* système HLA; (Watt, Austin et al. 2007). Au 1<sup>er</sup> Janvier 2007, 5.708 unités de sang placentaire étaient disponibles dans les banques Françaises. Le stockage moyen ces dernières années est d'environ 800 unités par an. Sept mille transplantations allogéniques de sang placentaire ont été réalisées au niveau mondial en 2006, dont 150 en France et 400 en Europe. En 2007, 335 greffes allogéniques de sang placentaire ont été réalisées en France ; sur les 335 greffons utilisés, 216 ont été importés d'un autre pays ; d'autre part, 74 unités prélevées sur le territoire national ont été envoyées à l'étranger, ce qui représente une dépendance en greffons de l'ordre de 64%. Le coût pour la Caisse Nationale d'Assurance Maladie se chiffre à plus de 4,2 millions d'Euro par an (Sources : France Greffe de Moelle, Etablissement Français du Sang, Essec). On note une augmentation croissante des besoins en greffons ces dernières années (+ 50% en 2 ans). Pour faire face à cette demande, l'Agence de Biomédecine souhaite ainsi augmenter les stocks, l'objectif étant d'atteindre environ 10.000 unités stockées sur le territoire national d'ici fin 2009.



Banques de sang placentaire	Maternités
<p align="center"><b>BESANCON</b> Etablissement Français du Sang Bourgogne Franche-Comté</p>	<p>CHU Jean Minjoz, Besançon CHU Saint-Jacques, Besançon Polyclinique De Franche-Comté, Besançon Centre Hospitalier de Belfort-Montbéliard Centre Hospitalier Louis Pasteur, Dôle CHU du Bocage, Dijon</p>
<p align="center"><b>BORDEAUX</b> Etablissement Français du Sang Aquitaine Limousin</p>	<p>CHU Pellegrin, Bordeaux Polyclinique Bordeaux Nord, Maternité Bel Air Polyclinique Bordeaux Rive droite, Clinique Cenon Clinique du CHU de Limoges</p>
<p align="center">Centres de prélèvements indépendants</p>	<p>CHU Robert Debré, Paris (AP-HP) CHU Saint-Louis, Paris (AP-HP) Centre Hospitalier St Vincent de Paul, Paris (AP-HP) Clinique Bouchard, Marseille</p>
<p align="center"><b>ANNEMASSE</b> Etablissement Français du Sang Rhône Alpes <b>(CENTRE NATIONAL DE CONSERVATION LONGUE DUREE)</b></p>	

**Tableau 3 : Banques de sang placentaire et centres de prélèvement habilités en France**

Répertoire des banques de sang placentaire en France ainsi que les différents sites de prélèvements qui y sont rattachés. Les prélèvements issus des établissements indépendants sont envoyés à la banque d'Annemasse, spécialisée dans le stockage et la conservation des unités à long terme (Source : Etablissement Français du Sang, 2008).

## **4.2 Modalités de prélèvement**

Avec en moyenne cent trente millions de naissances par an dans le monde entier, dont 800.000 en France pour l'année 2007, le sang placentaire s'avère être une source de cellules souches potentielles très intéressante. Effectuée avec le consentement préalable des parents, après la naissance de l'enfant et avant la délivrance, la collecte n'est pas douloureuse et ne comporte aucun danger, ni pour la mère, ni pour le nouveau-né, puisqu'elle ne modifie en aucun cas les gestes médicaux classiques de l'accouchement. Cet acte est libre, volontaire, anonyme, gratuit et altruiste.

Cinq conditions sont indispensables pour effectuer ce don :

- 1) un entretien avec un spécialiste doit avoir obligatoirement lieu pendant la grossesse ;
- 2) l'accouchement doit se faire dans une maternité habilitée pour le prélèvement des sangs placentaires (*cf.* Tableau 3) ;
- 3) un examen clinique complet de l'enfant doit avoir lieu au moment de la naissance et 3 mois après l'accouchement ;
- 4) une sérologie complète de la mère doit être effectuée afin de dépister une éventuelle maladie infectieuse. Ces analyses sont effectuées gratuitement à deux reprises: à l'accouchement et lors de la visite avec l'enfant au 3ème mois post-natal ;
- 5) le carnet de santé de l'enfant doit obligatoirement comporter une mention spéciale demandant d'informer, en cas de maladie grave, le Registre France Greffe de Moelle répertoriant tous les sangs placentaires prélevés en France.

Dans plusieurs cas précis, le prélèvement du sang placentaire est impossible : en particulier, si durant l'accouchement l'attention des sages-femmes doit se porter sur des gestes jugés médicalement prioritaires ou si un événement interdit l'utilisation du don (*i.e.* fièvre puerpérale consécutive à une infection à streptocoques, accouchement d'urgence par césarienne) ; ou en cas de

refus de prélèvement de la part de la parturiente ou de son conjoint au moment de l'accouchement, et ce même si le consentement écrit a été préalablement signé.

Le stockage des unités placentaires se fait uniquement dans de l'azote liquide, ce qui permet d'obtenir une température de congélation optimale de -196° C, indispensable à la survie et au maintien de la fonctionnalité des cellules souches à long terme. Ce type de stockage assure ainsi une très grande sécurité de conservation des échantillons.

Si le sang placentaire recueilli ne répond pas aux critères de conformité nécessaires à la transplantation (*e.g.* volume total sanguin insuffisant, nombre de cellules totales ou de cellules souches par unité placentaire jugé insuffisant), et uniquement dans le cas où les parents ne s'y seraient pas préalablement opposés, une utilisation de ces prélèvements dits « hors norme » à des fins de recherche sera dès lors possible.

### **4.3 Les cellules souches du sang placentaire**

#### **4.3.1 Les cellules souches hématopoïétiques**

Les cellules souches du sang de cordon ombilical humain sont caractérisées, comme toutes les cellules, par l'expression de plusieurs marqueurs membranaires spécifiques. Les cellules souches les plus immatures connues à ce jour sont les cellules exprimant la protéine Prominine ou CD133. Le marqueur CD133 est une protéine à 5 domaines transmembranaires originellement retrouvée chez les cellules souches hématopoïétiques et neurales d'origine humaine et murine (Yin, Miraglia et al. 1997; Keeney, Brown et al. 2003; Bonanno, Perillo et al. 2004; Shmelkov, St Clair et al. 2005). D'autres études ont également permis de mettre en évidence le rôle crucial de cette protéine dans l'organisation topologique de la membrane plasmique, via l'expression de prominine sur les

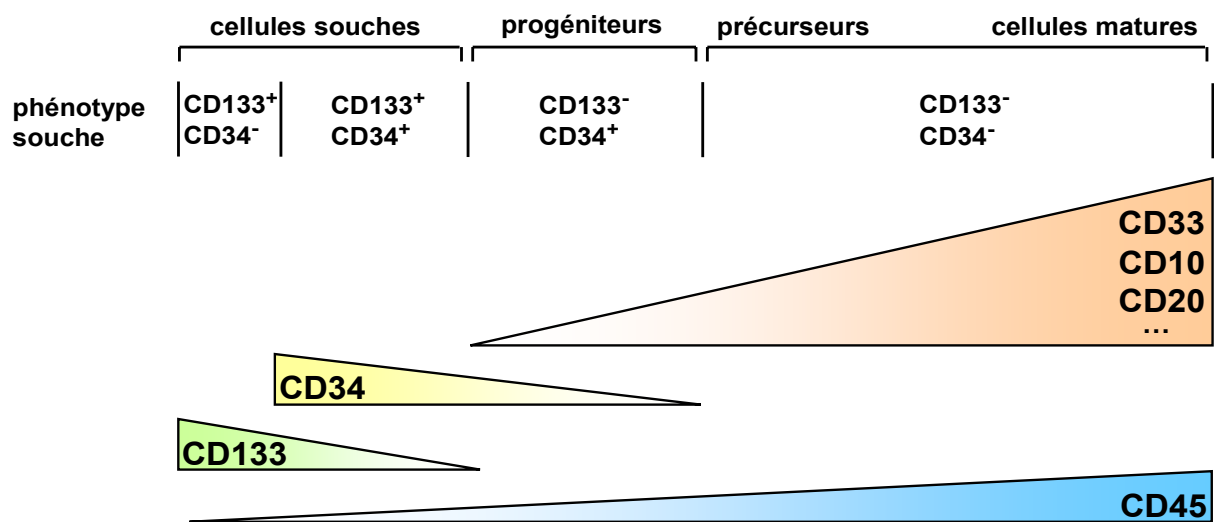
protrusions membranaires des cellules épithéliales (Mizrak, Brittan et al. 2008). La protéine CD133 est également fortement exprimée chez les cellules souches initiatrices de cancers chez l'humain (Florek, Haase et al. 2005; Seigel, Hackam et al. 2007; Zeppernick, Ahmadi et al. 2008). Lors de la détermination d'une cellule souche CD133+ dans une lignée spécifique, on observe en premier lieu l'apparition d'une co-expression du CD133 et de Sialomucine ou CD34 (*cf.* Figure 4 ; (Reinders, Rabelink et al. 2006; Nguyen, Furhapter et al. 2008). Chez l'humain et le murin, le marqueur CD34 est une glycoprotéine caractéristique du tissu sanguin immature au sens large du terme puisqu'il est exprimé, d'une part, par les cellules souches hématopoïétiques circulantes dont le réservoir se trouve essentiellement dans la moelle osseuse, et, d'autre part, par les cellules souches endothéliales vasculaires (Hergeth, Aicher et al. 2008; Narasipura, Wojciechowski et al. 2008).

Le marqueur CD34 est également exprimé sur des progéniteurs clonogéniques et sur certaines cellules endothéliales (Andrews, Singer et al. 1989; Krause, Fackler et al. 1996). A l'instar de la protéine CD133, la protéine sialomucine CD34 s'exprime pendant une durée limitée correspondant aux stades les plus précoces de l'hématopoïèse (*cf.* Figure 4). Cependant, ce marqueur CD34 est exprimé dans des stades moins immatures que la protéine prominine CD133 (*cf.* Figure 4,5). La protéine de surface CD34 encore présente au stade promyélocyte n'est plus détectable dès l'apparition des marqueurs de différenciation (Civin, Strauss et al. 1984). Au cours du processus de différenciation les cellules exprimant le marqueur CD34 vont ensuite perdre le marqueur précoce CD133 (Keeney, Brown et al. 2003). On observe ainsi une expression différentielle des marqueurs souches CD133 et CD34 en fonction de l'état de maturité des cellules (*cf.* Figure 4,5).

Toutes les cellules hématopoïétiques sont caractérisées par l'expression continue du marqueur pan-leucocytaire CD45, à l'exception des érythrocytes (Giesert, Almeida-Porada et al. 2001; Rutella, Bonanno et al. 2003; Huntington and Tarlinton 2004).

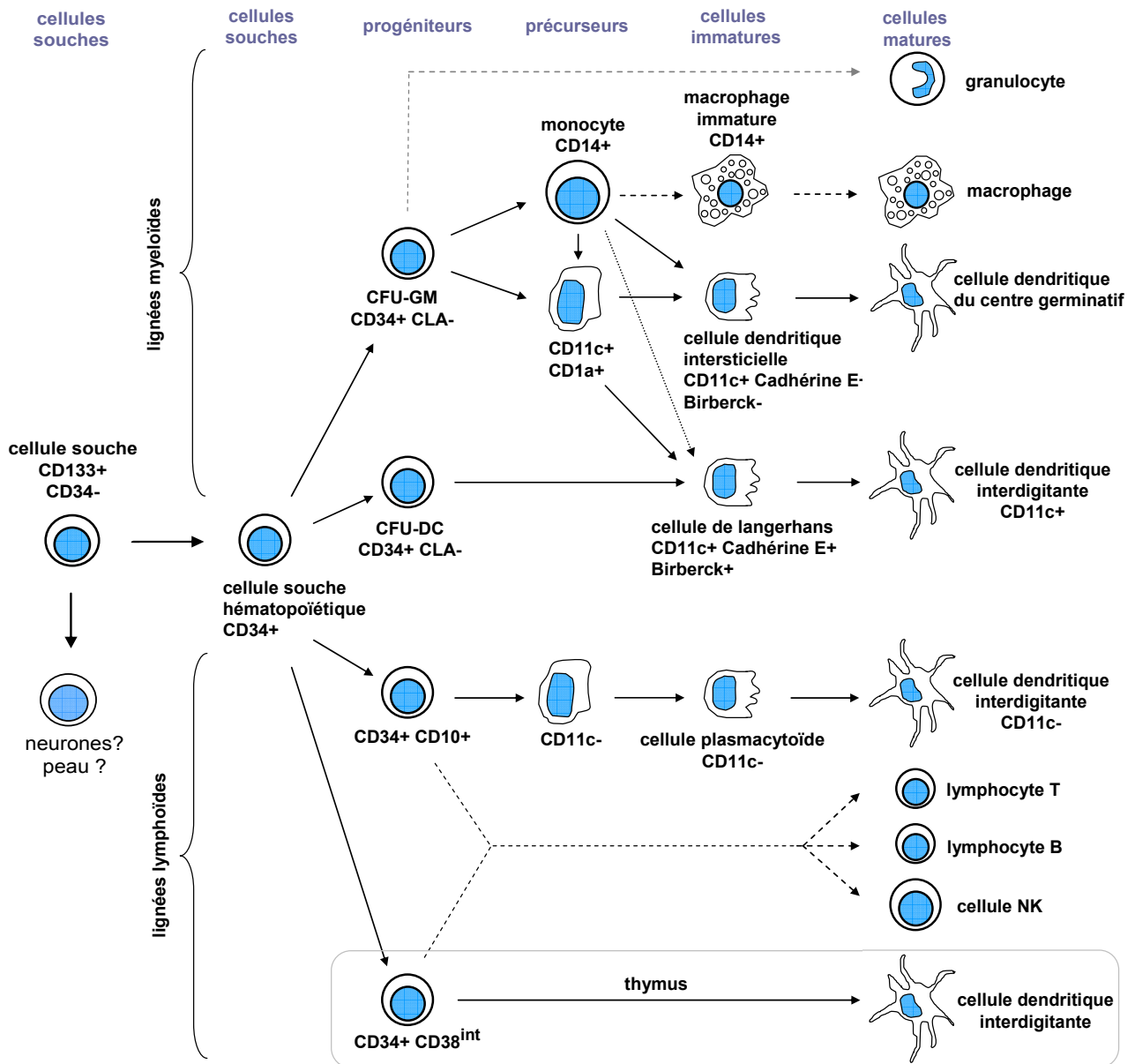
La différenciation d'une cellule souche hématopoïétique multipotente après sa mise en cycle va se faire soit vers la lignée lymphoïde, soit vers la lignée myéloïde (*cf.* Figure 5). Le progéniteur

lymphoïde possède un potentiel de différenciation vers les deux types de lymphocytes (B et T). Le progéniteur myéloïde, également appelée CFU-GEMM, conserve un potentiel de différenciation en granulocytes, érythrocytes, macrophages et mégacaryocytes. Cette cellule va poursuivre son programme de différenciation et donner naissance à des progéniteurs encore plus engagés (*cf.* Figure 5). Les progéniteurs hématopoïétiques ont perdu leur capacité d'auto-renouvellement et, au fur et à mesure de leur avancement dans la différenciation, ils acquièrent des marqueurs immunologiques de la lignée myéloïde (*e.g.* CD33 et HLA-DR) ou lymphoïde (*e.g.* CD10, CD20), en plus du CD34 déjà présent au stade cellule souche multipotente. Après différenciation, les cellules déterminées n'exprimeront plus ni le CD133, ni le CD34 (Sconocchia, Keyvanfar et al. 2005; Fadilah, Vuckovic et al. 2007; Osuji, Beiske et al. 2007; Six, Bonhomme et al. 2007; Ichii, Oritani et al. 2008).



**Figure 4 : Expression des marqueurs souches en fonction de l'état de différenciation**

On observe une expression différentielle des marqueurs souches (CD133 et CD34) en fonction de l'état de différenciation cellulaire. Le marqueur CD133 caractérise les cellules les plus immatures connues à ce jour. Lorsqu'une cellule est dite « mature » ou différenciée, elle n'exprime plus les marqueurs CD133 ou CD34.



**Figure 5 : Etablissement de la lignée hématopoïétique à partir d'une cellule souche : l'hématopoïèse**

Les cellules souches (CD133+ et CD34+) du sang circulant et du sang placentaire sont à l'origine de toutes les cellules de la lignée hématopoïétique (lignées myéloïdes et lymphoïdes). La différenciation en un type cellulaire donné est directement liée aux facteurs de croissance en présence (cytokines).

### **4.3.2 Les cellules souches multipotentes**

De nombreuses équipes ont également démontré la présence de cellules souches autres qu'hématopoïétiques au sein du sang de cordon ombilical humain. Ainsi, certains auteurs ont déjà décrit l'existence de cellules souches mésenchymateuses capables de différenciation ostéogénique ou neuronale *in vitro* (Hou, Cao et al. 2003; Park, Lee et al. 2006; Perdikogianni, Dimitriou et al. 2008). D'autre part, plusieurs équipes ont également décrit la capacité de cellules multipotentes du sang de cordon à se différencier en cellules neuronales et hépatocytaires, cependant l'origine souche des cellules capables d'une telle différenciation reste à ce jour parfois controversée (Jung, Ryu et al. 2008; McGuckin, Jurga et al. 2008; Moon, Lee et al. 2008). Ces cellules multipotentes non hématopoïétiques peuvent être obtenues après sélection de la fraction cellulaire n'exprimant aucun marqueur de différenciation hématopoïétique (*e.g.* CD45-, CD33-, CD7-, Glycophorine A [CD235a]-) et exprimant différents marqueurs souches (CXCR4+, SSEA-4+, Oct-4+, CD133+) (McGuckin, Jurga et al. 2008).

## **4.4 Utilisation du sang placentaire en thérapie cellulaire**

Le sang de cordon ombilical humain est déjà utilisé dans le traitement clinique de plus de 80 pathologies essentiellement associées aux systèmes hématopoïétique et immunitaire (McGuckin, Jurga et al. 2008).

### **4.4.1 Les greffes allogéniques extra-familiales**

Si les greffes allogéniques extra-familiales de sang placentaire sont encore peu fréquentes par rapport au nombre total de greffes de cellules souches hématopoïétiques issues de la moelle osseuse ou du sang périphérique, ce nombre devrait logiquement croître du fait des avantages

immunologiques du sang placentaire, notamment dans le cas des traitements urgents, en l'absence d'un donneur familial ou avec un donneur non apparenté HLA identique (plus de 60% de cas).

Les greffes de sang placentaire malgré une ou deux disparités HLA sont en effet possibles. Ces greffes entraînent une prise plus lente des neutrophiles et des plaquettes. On observe de ce fait une incidence de GVHD (*graft vs. host disease* : maladie du greffon contre l'hôte) aiguë ou chronique réduite, comparée aux greffes de moelle osseuse. D'autre part, la mortalité précoce liée à la greffe, la probabilité de rechute et la survie globale sont similaires aux résultats obtenus dans le cas de greffes de cellules d'origine médullaire et périphérique, aussi bien pour les enfants que pour les adultes malgré plusieurs disparités HLA (Rodriguez 2007). Ainsi, ces dernières années, le nombre de patients pouvant être greffés, y compris ceux qui ont des groupes HLA rares, a plus que doublé.

#### **4.4.2 Les greffes allogéniques intra-familiales**

La première greffe de type allogénique intra-familiale de cellules souches hématopoïétiques issues du sang de cordon ombilical humain a été réalisée avec succès en 1988 à l'hôpital Saint-Louis par le Pr Glückman, en collaboration avec le Pr Broxmeyer et le Dr Auerbach, chez un jeune patient atteint d'une anémie de Fanconi. L'enfant malade a reçu un greffon de sang placentaire de sa sœur nouvellement née, indemne de la maladie, dont le groupe HLA était strictement identique (Gluckman, Broxmeyer et al. 1989; Rodriguez 2007).

L'utilisation du sang de cordon pour les greffes allogéniques intra-familiales possède cependant quelques particularités puisqu'il s'agit avant tout d'un don dirigé. En effet, lorsqu'il n'y a pas de donneur, au sein de la famille proche, dont le groupe HLA est identique du receveur, une grossesse peut être programmée *via* la sélection d'embryons ou par diagnostic pré-implantatoire sur des critères de compatibilité tissulaire. Les conditions de prélèvement et d'utilisation du greffon sont également différentes de celles des greffons destinés à une utilisation extra-familiale. Un volume maximal de sang est prélevé sans qu'il soit question d'imposer un quelconque critère de qualité.



Même l'innocuité infectieuse du greffon peut être susceptible de dérogation dans ce cas. Il existera cependant, après la naissance de cet « individu donneur HLA-compatible », en cas de problème récurrent et si les circonstances le permettent, des alternatives de prélèvement (*e.g.* moelle osseuse ou sang périphérique). Le délai d'utilisation de ce sang placentaire est restreint puisqu'il n'est pas voué à être conservé à l'état congelé. Le nombre de ce type de greffe est réduit, d'une part parce que la probabilité d'avoir un donneur « HLA-identique » dans la fratrie est réduite et d'autre part parce que, dans le cas des maladies malignes, l'utilisation d'un greffon issu d'un donneur non apparenté et HLA-compatible présente l'avantage d'avoir un effet d'immunothérapie. Cependant, dans le cas de certaines maladies héréditaires, comme la drépanocytose, les greffes familiales de sang placentaire sont quasiment toujours efficaces.

#### **4.4.3 Les greffes autologues**

L'utilisation du sang placentaire dans le cadre de greffes autologues en est encore au stade de la réflexion. Deux types de pathologies ressortent à ce jour comme les plus indiquées dans l'utilisation de greffons autologues : les leucémies touchant l'enfant et les maladies dégénératives de l'adulte. Cependant des données faisant état de la présence de cellules malignes au sein du sang de cordon ombilical d'enfants ultérieurement atteints de leucémie laissent entrevoir des doutes quant à une telle utilisation thérapeutique autologue (Ford, Bennett et al. 1998). De plus, comme dans le cas des greffes allogéniques intra-familiales, l'effet d'immunothérapie nécessaire à certaines thérapies est absent.

Dans le cas du traitement des maladies dégénératives de l'adulte, le sang de cordon ombilical pourrait être conservé dans le but d'être utilisé ultérieurement comme une réserve de cellules souches autologues potentiellement différenciables en cellules matures de diverses lignées et utilisables dans le cadre d'une thérapie cellulaire régénératrice. De nombreux problèmes liés à cette

utilisation restent encore à être discutés. En effet, afin de faire profiter l'ensemble de la population de cette perspective, le prélèvement du sang placentaire et sa conservation devront être obligatoirement systématisés à la naissance de chaque individu. Dans cette hypothèse, le temps de stockage devra être prolongé dans la plupart des cas au-delà de deux décennies, à un terme où la fonctionnalité du greffon est encore inconnue à ce jour. Le coût de stockage et la nécessité d'une telle mise en place devront être préalablement évalués. Dès lors, qu'en sera-t-il de la disponibilité des greffons pour les allogreffes non familiales ? Les greffes autologues soulèvent donc de nouveaux problèmes éthiques. Il paraît donc important de rester prudent et de considérer le sang placentaire comme uniquement restreint à un usage public et à la meilleure compatibilité HLA tant que les pratiques relatives à la greffe autologue ne seront pas clairement délimitées.

#### **4.5 Utilisation du sang placentaire en recherche**

Sauf quelques rares exceptions, les travaux de recherche appliquée et fondamentale sont possibles en utilisant des unités de sang placentaire non qualifiées pour la greffe, du fait d'un volume insuffisant (poche, anti-coagulant et sang doivent avoir un poids supérieur ou égal à 124g pour être qualifiés, soit un volume minimum de sang placentaire de 70ml), du fait d'un nombre trop faible en cellules nucléées ou en cellules souches CD34+. Ces dernières années, deux champs d'investigations majeurs sur les cellules du sang placentaire ont été privilégiés. Le premier champ traite de l'étude des paramètres de fonctionnalité des cellules souches prélevées ainsi que de leur capacité d'expansion en fonction de différents critères de conservation. Ces recherches fondamentales et appliquées sont menées afin d'améliorer la probabilité et le délai de la prise de greffe et diminuer, à terme, la mortalité précoce liée à la greffe (Lazzari, Lucchi et al. 2001; Rodriguez 2007). A terme, il serait envisageable de multiplier *in vitro* la population des cellules souches d'un prélèvement afin de reconstituer plusieurs pools de cellules souches distincts, utilisables d'une part pour les greffes autologues et d'autre part pour les greffes allogéniques.

Le deuxième champ majeur d'investigation porte sur l'étude des cellules du sang placentaire et leur capacité à se différencier en différents types cellulaires, en vue d'être potentiellement utilisables dans des protocoles appliqués à la médecine régénérative. A ce jour, de nombreux protocoles de thérapie cellulaire, basés sur l'utilisation des cellules souches (*e.g.* hématopoïétiques, neurales ou mésenchymateuses) isolées à partir du sang placentaire, sont en cours de développement (McGuckin, Forraz et al. 2004; McGuckin, Forraz et al. 2006; Kim, Lee et al. 2008).

## 5. LA THÉRAPIE CELLULAIRE ET LES MALADIES NEURO-DEGENERATIVES

Malgré la mise en évidence de cellules souches neurales multipotentes, susceptibles de se différencier en neurones et cellules gliales au sein du système nerveux adulte (*cf.* Tableau 1), la différenciation spontanée de ces précurseurs après lésion chez l'adulte semble très limitée et restreinte aux deux seules structures nerveuses que sont le gyrus denté de l'hippocampe et le bulbe olfactif (Reynolds and Weiss 1996; Galli, Gritti et al. 2003). Ainsi la recherche de nouvelles sources de cellules souches exogènes susceptibles de se différencier en neurones *in vivo* après injection s'avère être une alternative incontournable dans la mise en place de traitements spécifiquement adaptés aux dégénérescences neuronales (Privat 2005).

### 5.1 Le système nerveux : Généralités

Le système nerveux est un réseau complexe constitué du cerveau, de la moelle épinière, des nerfs et des organes des sens. Il intervient, à différents niveaux, dans la coordination des mouvements musculaires, le contrôle du bon fonctionnement des organes et le transport des informations sensori-motrices. Chez les animaux dotés d'un cerveau limbique et cognitif, il permet la gestion des émotions et de l'intellect. Chez les Vertébrés, le système nerveux est constitué de deux entités dissociables : d'une part le système nerveux central (SNC), et d'autre part le système nerveux périphérique (*cf.* Figure 6).

### **5.1.1 Le système nerveux central**

Le SNC est constitué, d'une part, de l'encéphale, logé dans la boîte crânienne, du tronc cérébral et du cervelet, et d'autre part, de la moelle épinière. Il est isolé biochimiquement du reste de l'organisme grâce à la barrière hémato-encéphalique.

Le tronc cérébral permet la jonction entre le cerveau, le cervelet et la moelle épinière. Le cervelet, relié à la face dorsale du tronc cérébral, assure la gestion des fonctions associées au maintien de la posture, de l'équilibre, de la coordination des mouvements musculaires et de la mémoire gestuelle.

Le SNC est composé de cellules nerveuses hautement spécialisées appelées neurones et de cellules astrocytaires. Les neurones communiquent l'information entre elles via de multiples connexions appelées synapses (*cf.* Figure 7). Les axones du SNC sont parfois entourés d'une substance blanche, la gaine de myéline, générée par les oligodendrocytes. Cette gaine de myéline permet d'accélérer le transit de l'information électrique par conduction saltatoire, l'influx se propageant de nœud en nœud, ce qui augmente considérablement la vitesse de propagation de l'influx comparé à un axone non myélinisé.

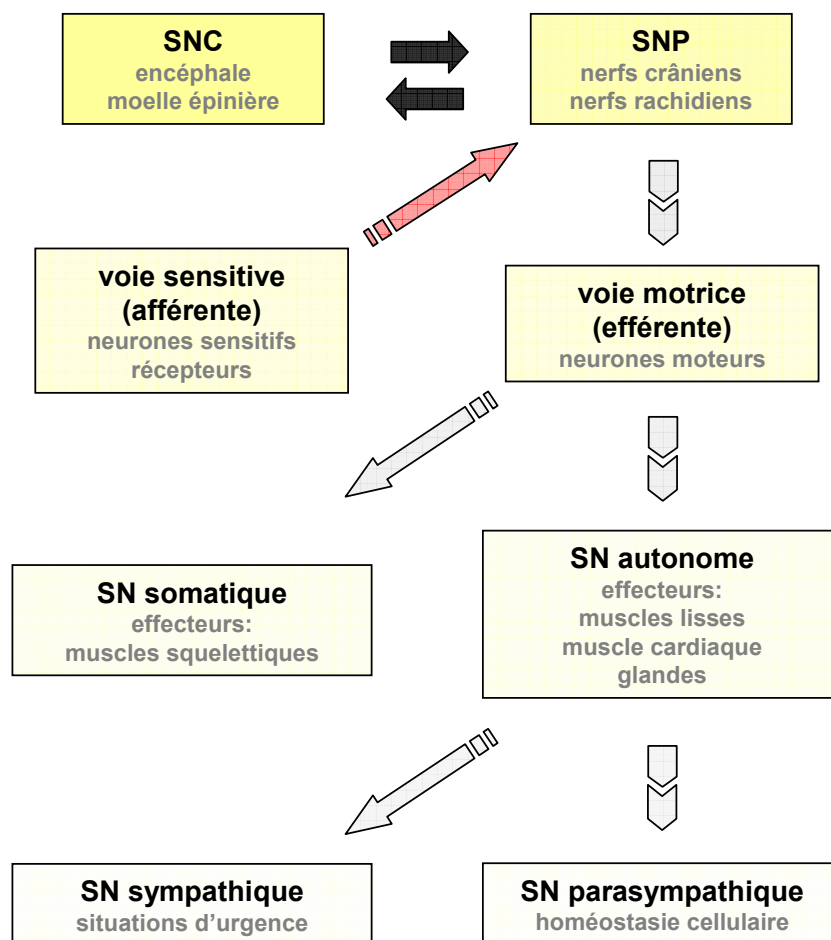
### **5.1.2 Le système nerveux périphérique**

Le système nerveux périphérique (SNP) est constitué des nerfs sensori-moteurs, des nerfs rachidiens et du système entérique. Cette partie du système nerveux permet l'acheminement de l'information entre les organes et le SNC, ainsi que la réalisation des commandes motrices (*cf.* Figure 6).

Le SNP est lui-même constitué du système nerveux somatique et du système nerveux autonome.

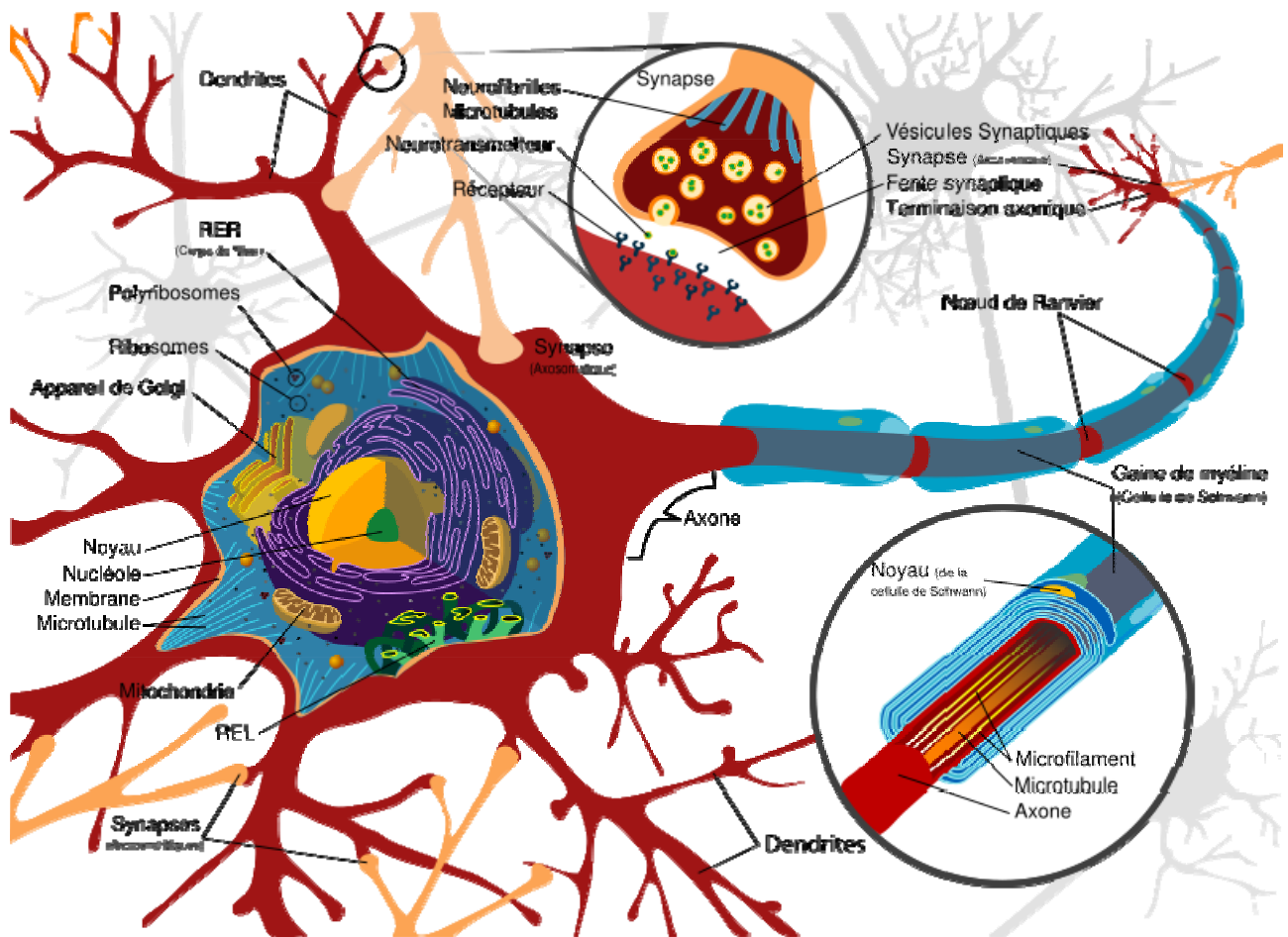
Le système nerveux somatique reçoit les fibres sensorielles de la peau, des muscles et articulations et regroupe les fibres motrices primaires des muscles. Il permet l'interaction avec le monde extérieur en participant à l'équilibre et à la motricité *via* le contrôle du tonus et de la contraction des

muscles squelettiques. Le système nerveux autonome qui comprend le système orthosympathique (conditions d’alerte) et le système parasympathique (conditions physiologiques) est, quant à lui, siège des fonctions internes telles que la nutrition et l’homéostasie cellulaire (cf. Figure 6). Il innerve essentiellement les organes internes et permet le transport des informations associées aux diverses fonctions viscérales jusqu’au SNC. La gaine de myéline recouvrant certains axones du SNP dérive des cellules gliales (*i.e.* cellules de Schwann ; cf. Figure 7).



**Figure 6 : Division et organisation du système nerveux**

Le système nerveux est constitué du système nerveux central (SNC) et du système nerveux périphérique (SNP). Les informations sensibles issues des récepteurs périphériques sont médiées au système nerveux central via le système nerveux périphérique. Le système nerveux périphérique transmet l’information envoyée par le système nerveux central jusqu’aux centres effecteurs périphériques. Les actions conjointes du SNC et du SNP permettent à l’organisme de s’adapter à tous les changements internes et environnementaux. Abréviations : SNC, système nerveux central ; SNP, système nerveux périphérique.



**Figure 7 : Représentation d'un neurone multipolaire et de ses inter-connexions au sein du système nerveux**

Le neurone est constitué d'une ou plusieurs dendrites et d'un seul axone. L'axone est le plus souvent recouvert d'une gaine de myéline, permettant d'accélérer la vitesse de propagation de l'influx nerveux de façon saltatoire au niveau de chaque nœud de Ranvier. La communication entre chaque neurone se fait au niveau des synapses à l'aide de divers neurotransmetteurs. **RER**, réticulum endoplasmique rugueux (ou granuleux), **REL**, réticulum endoplasmique lisse.

### 5.1.3 La neurotransmission au sein du système nerveux central

Les neurones du cerveau communiquent le plus souvent entre eux en libérant des substances chimiques, les neurotransmetteurs, au niveau des synapses, zones où les neurones forment des contacts morphologiques fonctionnels entre eux.

Les neurotransmetteurs sont synthétisés par les neurones et stockés dans des vésicules au niveau terminal. La libération des neurotransmetteurs est classiquement déclenchée par la stimulation des canaux voltage-dépendants. Ce phénomène d'exocytose se fait par fusion des vésicules synaptiques avec la membrane plasmique puis libération des neurotransmetteurs dans la fente synaptique.

Les neurotransmetteurs libérés par les terminaisons nerveuses au niveau pré-synaptique vont se lier à des récepteurs spécifiques au niveau post-synaptique et vont transduire des signaux électriques grâce à l'ouverture ou la fermeture des canaux ioniques membranaires. La nature excitatrice ou inhibitrice d'un neurotransmetteur sera déterminée par le type de canal ionique qu'il activera.

Il existe deux catégories de récepteurs : les récepteurs à couplage direct, où le récepteur et le canal sont constitués par les mêmes sous-unités protéiques (récepteurs ionotropiques), et les récepteurs à couplage indirect, où le récepteur et le canal sont distincts l'un de l'autre (récepteurs métabotropiques). Les récepteurs métabotropiques agissent sur les canaux ioniques post-synaptiques en activant des protéines transductrices, les protéines G. Ces protéines G vont modifier les propriétés des canaux ioniques qui leur sont associés et entraîner l'activation de voies intracellulaires *via* des seconds messagers qui pourront également exercer une modulation retro-contrôle sur les canaux. Après activation des récepteurs, les neurotransmetteurs sont rapidement éliminés de l'espace synaptique par un phénomène de recapture pré-synaptique ou de dégradation.

Les neurotransmetteurs sont répertoriés en fonction de leur constitution chimique et de leur effet (inhibiteur ou excitateur). On citera, parmi les plus connus, les monoamines (dopamine, noradrénaline, sérotonine), les acides aminés excitateurs (glutamate, aspartate, acide gamma amino-



butyrique (GABA) au cours du développement) ou inhibiteurs (GABA majoritairement chez l'adulte, glycine,...) et les neuropeptides (substance P, enképhalines).

### **5.1.3.1 La neurotransmission gabaergique**

Parmi les neurotransmetteurs inhibiteurs du SNC, le GABA joue un rôle primordial. On retrouve, par exemple, une grande quantité de terminaisons nerveuses GABAergiques au sein du cortex cérébral, de l'hippocampe, du cervelet, de la substance noire, du striatum et du globus pallidus.

#### **5.1.3.1.1 Le métabolisme du GABA**

Le GABA est synthétisé à partir du L-Glutamate en une seule étape catalysée par l'enzyme glutamate décarboxylase (GAD65, GAD67) utilisant le co-facteur phosphate de pyridoxal (PLP) dérivé de la vitamine B6 (*cf.* Figure 8). L'enzyme GAD est ainsi utilisée comme marqueur spécifique des neurones GABAergiques dans certains cas (Feldblum, Dumoulin et al. 1995; Wang, Krueger et al. 2003).

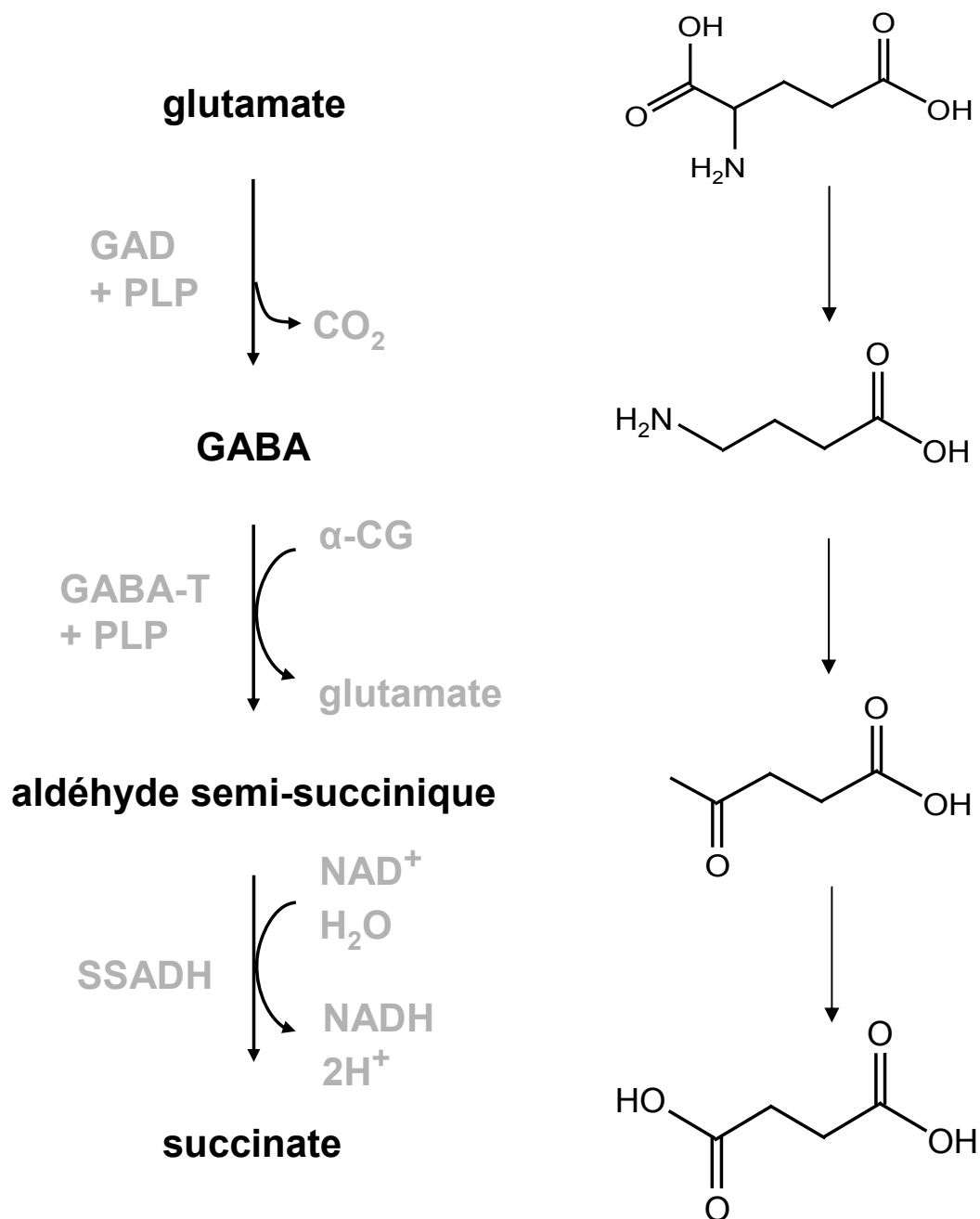
La disponibilité du glutamate dans les neurones GABAergiques est donc un facteur limitant de la synthèse du GABA et dépend de sa recapture directe au niveau synaptique ou de sa production par conversion de la glutamine en glutamate, au niveau des terminaisons axonales grâce à l'enzyme glutaminase. Le glutamate peut également provenir de la transamination de l'alpha-cétoglutarate ( $\alpha$ -CG), produit de la dégradation issu du cycle de Krebs, ou de l'ultime dégradation du GABA (Newsholme, Crabtree et al. 1985).

Le catabolisme du GABA débute par le transfert du groupe aminé du GABA sur l' $\alpha$ -CG, grâce à l'enzyme GABA-aminotransférase (GABA-T). Les produits de la réaction sont le glutamate et l'acide semi-succinique, lui-même rapidement oxydé en succinate par l'enzyme mitochondriale acide succinique semi-aldéhyde déshydrogénase (SSADH). La dégradation du GABA permet la

régénération directe de son précurseur. L'enzyme mitochondriale GABA-T nécessite, comme les protéines GAD, la présence du co-facteur PLP (*cf.* Figure 8) (Sims, Weitsen et al. 1972).

#### **5.1.3.1.2 Stockage et libération du GABA**

Le GABA est stocké dans les vésicules synaptiques grâce à un transporteur distinct de celui permettant sa recapture membranaire (*cf.* Figure 10). Sa libération des vésicules synaptiques se fait par un processus classique d'exocytose dépendante du calcium. Il n'est cependant pas exclu que, outre la libération vésiculaire, le GABA puisse être directement libéré à partir du compartiment cytoplasmique, *via* des transporteurs membranaires dont l'activité principale serait pourtant dédiée à sa recapture. De plus, des études réalisées *in vivo* par microdialyse intracérébrale dans la substance noire ont montré qu'une partie du GABA libéré proviendrait également de sources non neuronales, impliquant les cellules gliales (Biggs, Fowler et al. 1995).

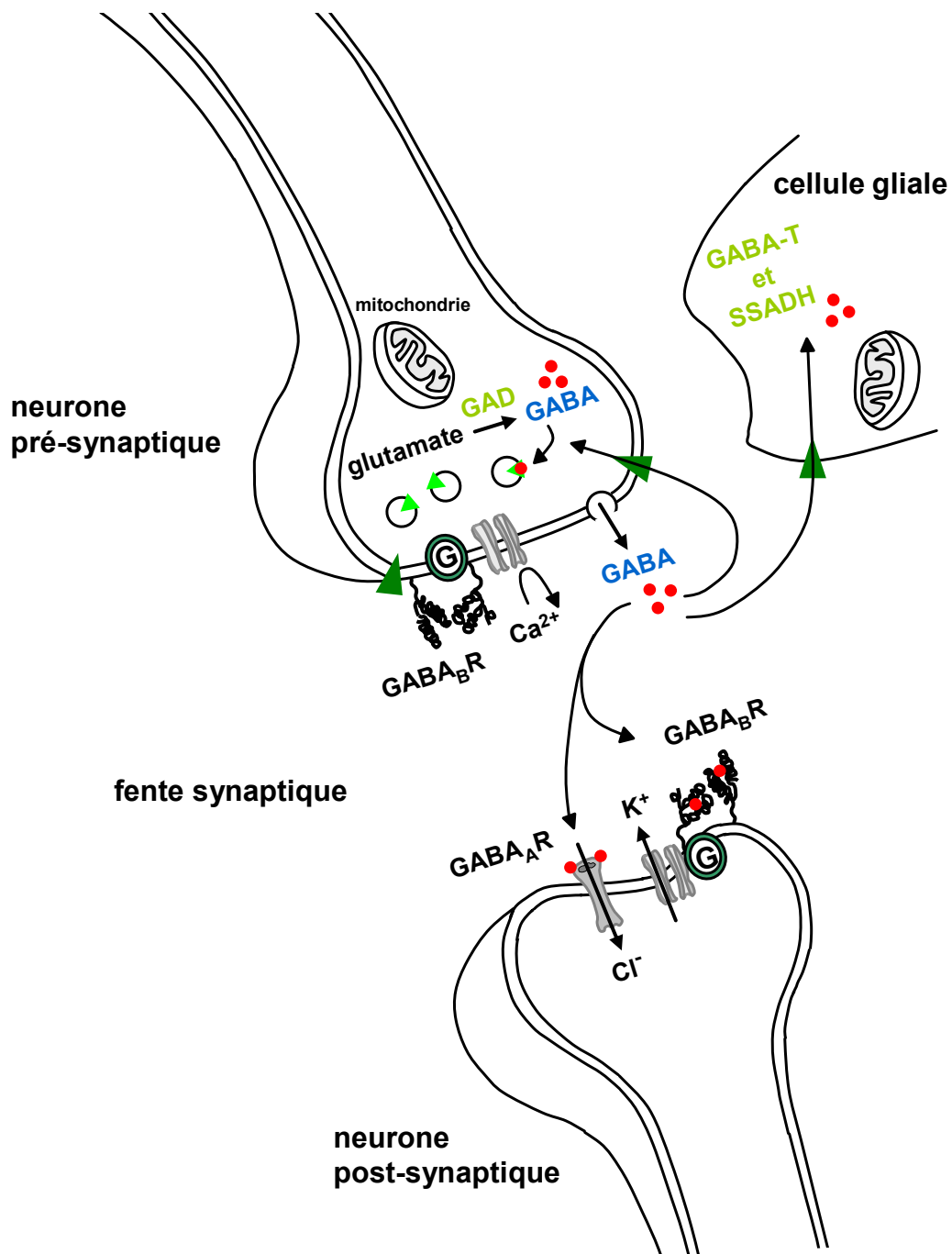


**Figure 8 : Métabolisme du GABA**

Le GABA est synthétisé à partir du glutamate et du co-facteur PLP (phosphate de pyridoxal) par l'enzyme glutamate décarboxylase (GAD). Le GABA est catabolisé par une enzyme, la GABA transférase (GABA-T) qui forme l'aldéhyde semi-succinique et régénère le précurseur glutamate à partir de l'alpha-cétoglutarate ( $\alpha$ -CG). La majorité de l'aldéhyde semi-succinique est convertie en succinate par l'enzyme acide succinique semi-aldéhyde déshydrogénase (SSADH), un intermédiaire du cycle de l'acide citrique.

### 5.1.3.1.3 Recapture du GABA

En dehors de sa dégradation enzymatique, le GABA libéré dans l'espace synaptique peut également être éliminé par recapture neuronale et gliale (*cf.* Figure 9). Ce phénomène implique des transporteurs sélectifs sensibles au sodium ( $\text{Na}^+$ ). Ce mécanisme de recapture du GABA dépend ainsi du gradient de sodium à travers la membrane cellulaire, dans un rapport de 2 ions  $\text{Na}^+$  pour une molécule de GABA transportée (symport). D'autre part, ces transporteurs peuvent également induire la sortie du GABA du neurone. Le transport du GABA peut donc s'effectuer dans les deux directions (Nicholls 1989). Une fois libéré dans la fente synaptique, le GABA peut se lier à différents types de récepteurs pharmacologiquement distincts : les récepteurs  $\text{GABA}_A$ ,  $\text{GABA}_B$  et  $\text{GABA}_C$  (Bowery 1993; Sieghart 1995).



**Figure 9 : Neurotransmission et métabolisme du GABA**

Transporteurs GABAergiques : ▲ ▲ ; GABA ●

Enzymes : **GAD**, glutamate décarboxylase ; **GABA-T**, GABA aminotransférase ; **SSADH** acide succinique semi-aldéhyde déshydrogénase.

Le GABA est libéré dans la fente synaptique, d'où il peut médier ses effets inhibiteurs en se liant à des récepteurs  $GABA_A$  ou  $GABA_B$ .

## 5.1.3.2 Récepteurs au GABA

### 5.1.3.2.1 Récepteurs ionotropiques GABA<sub>A</sub> et GABA<sub>C</sub>

Le GABA exerce son action inhibitrice *via* une augmentation de la conductance membranaire aux ions chlore, conduisant à une hyperpolarisation rapide de la membrane postsynaptique (*cf.* Figure 9). Cet effet spécifique résulte de l'activation des récepteurs de type GABA<sub>A</sub>, formant en leur centre un canal perméable à un certain nombre d'ions dont le chlore est le principal usager (Sieghart 1995).

L'agoniste et l'antagoniste compétitifs des récepteurs GABA<sub>A</sub> sont respectivement le muscimol et la bicuculline (*cf.* Tableau 4). Le récepteur GABA<sub>A</sub> possède également des antagonistes non spécifiques telle que la picrotoxine, bloquant le flux des ions chlore de manière spécifique.

Le récepteur GABA<sub>A</sub> possède, en outre, plusieurs sites de liaison pour différentes substances pharmacologiquement actives (benzodiazépines, barbituriques, neurostéroïdes et éthanol ; (Macdonald and Olsen 1994); *cf.* Figure 10a et 10b).

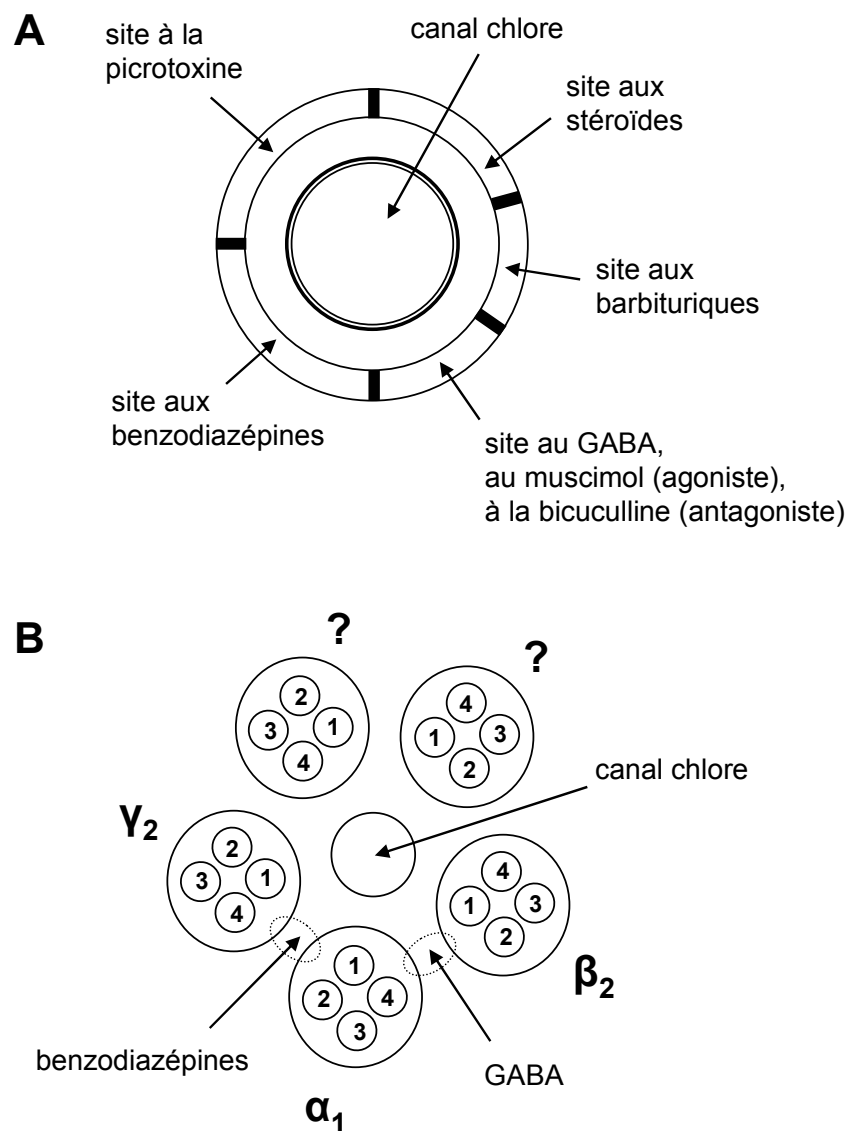
Le récepteur GABA<sub>A</sub> est une structure formée par l'association de 5 sous-unités (pentamère), délimitant en leur centre un pore qui constitue le canal chlore associé (*cf.* Figure 10a et 10b).

Les sous-unités identifiées sont réparties en 7 familles ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\pi$  et  $\rho$  ; (Sieghart 1995; Johnston 1996; Barnard, Skolnick et al. 1998). Les propriétés pharmacologiques des récepteurs GABA<sub>A</sub> sont déterminées par la composition des différentes sous-unités.

Dans le SNC, les récepteurs GABA<sub>A</sub> fonctionnels sont formés d'au moins une sous-unité  $\alpha$ , une sous-unité  $\beta$  et une sous-unité  $\gamma$  avec les sous-unités  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\pi$  et  $\rho$  pouvant substituer la sous-unité  $\gamma$  (Owens and Kriegstein 2002). La liaison coopérative du GABA sur le récepteur GABA<sub>A</sub> entraîne un changement de conformation des protéines constitutives du canal et l'ouverture du pore du récepteur, aboutissant ainsi à l'établissement d'un flux d'ions chlore et à l'hyperpolarisation de la

membrane qui lui est associée (Eldefrawi and Eldefrawi 1987). D'autre part, le domaine intracellulaire du récepteur GABA<sub>A</sub> peut être phosphorylé par différentes protéines kinases (PKA, PKC) permettant ainsi la régulation de l'activité du récepteur *via* une réduction de l'amplitude de l'hyperpolarisation consécutive à l'activation intrinsèque du récepteur (Browning, Endo et al. 1993; Krishek, Xie et al. 1994).

D'autres récepteurs GABAergiques insensibles à la bicuculline et au baclofen mais sensibles à l'action du muscimol et de la picrotoxine ont également été décrits. Dénommés récepteurs GABA<sub>C</sub>, la stimulation de ces récepteurs par le GABA lui-même ou par un agoniste au GABA produit un effet post-synaptique inhibiteur grâce à l'ouverture d'un canal chlore anionique. Ce type de récepteur GABA<sub>C</sub> semble être plus sensible à l'action du GABA que le récepteur GABA<sub>A</sub>. De plus, ces récepteurs semblent insensibles à l'action des benzodiazépines, des barbituriques et des neurostéroïdes (Johnston 1996). Ces récepteurs GABA<sub>C</sub> jouent un rôle particulier dans certaines structures spécifiques du SNC, en particulier au niveau de la rétine, de l'hippocampe, du cortex cérébral ou de la moelle épinière.

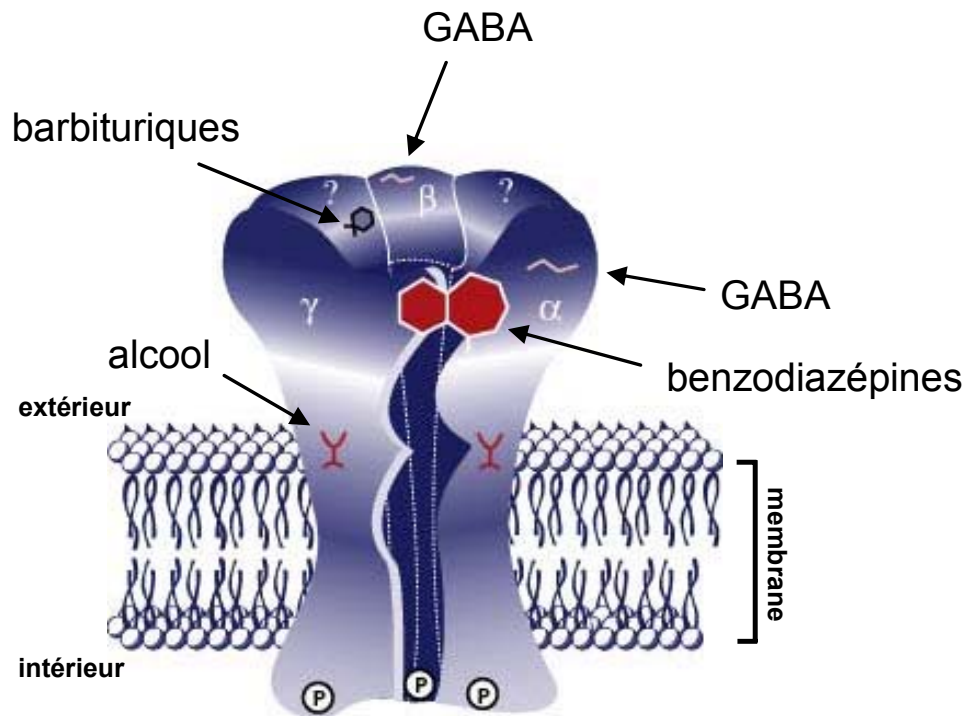


**Figure 10a : Le récepteur GABA<sub>A</sub> (vue supérieure)**

En haut (A) modèle schématique des sites de liaison sur le récepteur GABA<sub>A</sub>.

En bas (B) composition du récepteur GABA<sub>A</sub>. Le récepteur GABA<sub>A</sub> est une structure formée par l'association de 5 sous-unités (pentamère), chacune composée de 4 domaines transmembranaires (notés 1 à 4), délimitant en leur centre un pore qui constitue le canal chlore associé. Les segments transmembranaires 2 constituent les parois du canal. Les sous-unités identifiées sont réparties en 7 familles ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\pi$ , et  $\rho$ ), dont certaines possèdent plusieurs isoformes ( $\alpha_{1-6}$ ,  $\beta_{1-3}$ ,  $\gamma_{1-2}$ ). Le site de liaison du GABA est localisé entre les sous-unités  $\alpha_1$  et  $\beta_2$ .





**Figure 10b : Structure du récepteur GABA<sub>A</sub> (coupe sagittale)**

Le récepteur GABA<sub>A</sub> est une glycoprotéine transmembranaire formée de 5 sous-unités. Il est sensible au muscimol (agoniste) et à la bicuculline (antagoniste). Il existe plusieurs types de récepteurs GABA<sub>A</sub>, en fonction de l'agencement des différentes sous-unités.

Le récepteur GABA<sub>A</sub> présente, en dehors des sites récepteurs au GABA, une variété d'autres sites récepteurs topographiquement distincts, capables de reconnaître des substances pharmacologiquement actives comme : les benzodiazépines, les barbituriques, les neurostéroïdes ou l'alcool. Ces sites interagissent de manière allostérique avec les sites récepteurs au GABA et modulent la réponse du récepteur GABA<sub>A</sub>. P représente les groupements phosphate régulant l'activité du récepteur et la sensibilité du récepteur (D'après (Mihic and Harris 1997)).

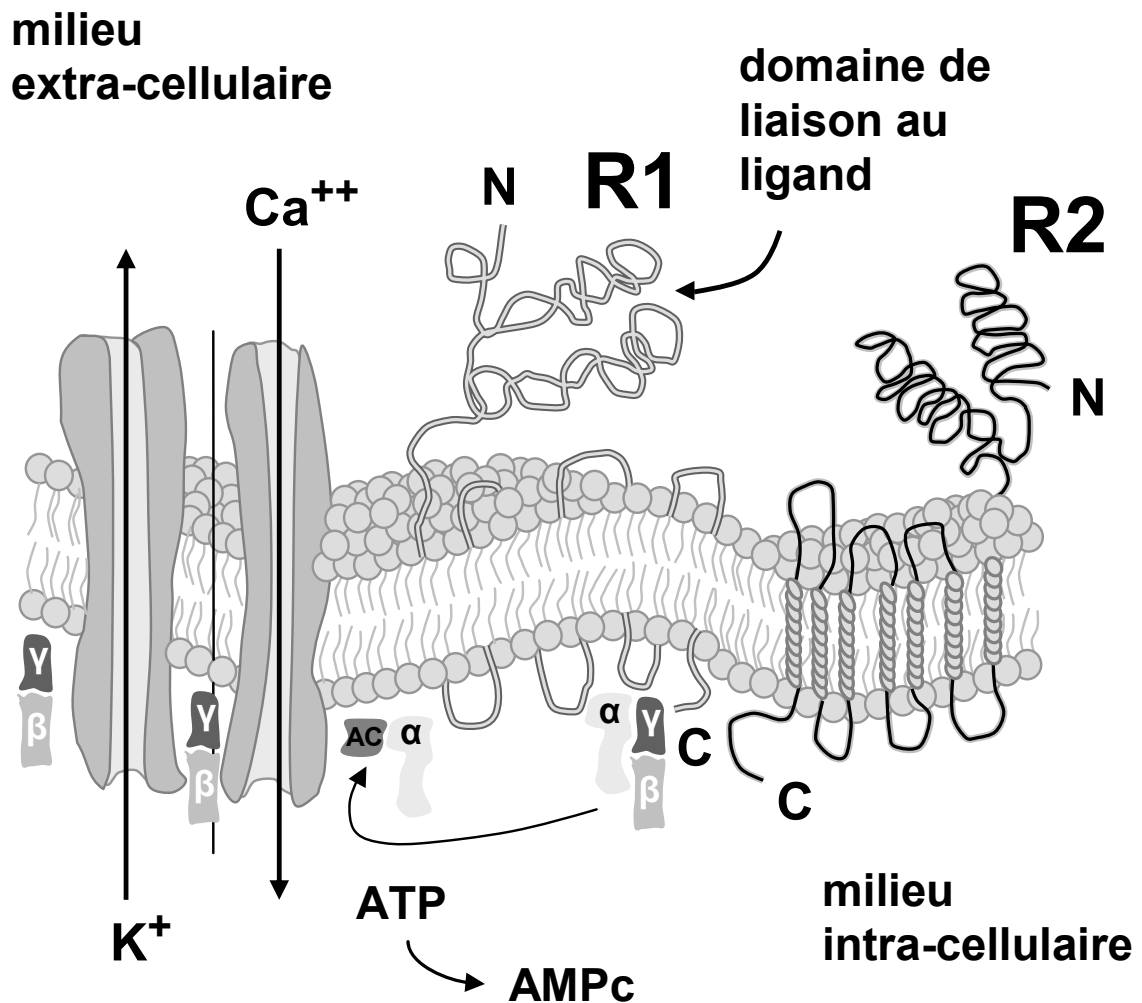
### 5.1.3.2.2 Récepteurs métabotropiques GABA<sub>B</sub>

La découverte des récepteurs GABA<sub>B</sub> repose sur l'étude des effets des agonistes et antagonistes chimiques du récepteur GABA<sub>A</sub>. En effet, l'hyperpolarisation membranaire attribuée au GABA n'étant pas obligatoirement bloquée par la bicuculline, antagoniste spécifique des récepteurs GABA<sub>A</sub>, et pouvant être reproduite par le baclofen chez certaines cellules, Hill et Bowery ont cherché à comparer les sites marqués respectivement par la bicuculline et le baclofen. Ces auteurs

ont ainsi démontré une localisation différente entre les sites marqués par la bicuculline et le baclofen. Ils ont donc attribué la dépolarisation membranaire consécutive à une stimulation par le baclofen à un autre type de récepteurs GABAergiques : les récepteurs GABA<sub>B</sub> (Hill and Bowery 1981; Misgeld, Bijak et al. 1995) ; *cf.* Tableau 4).

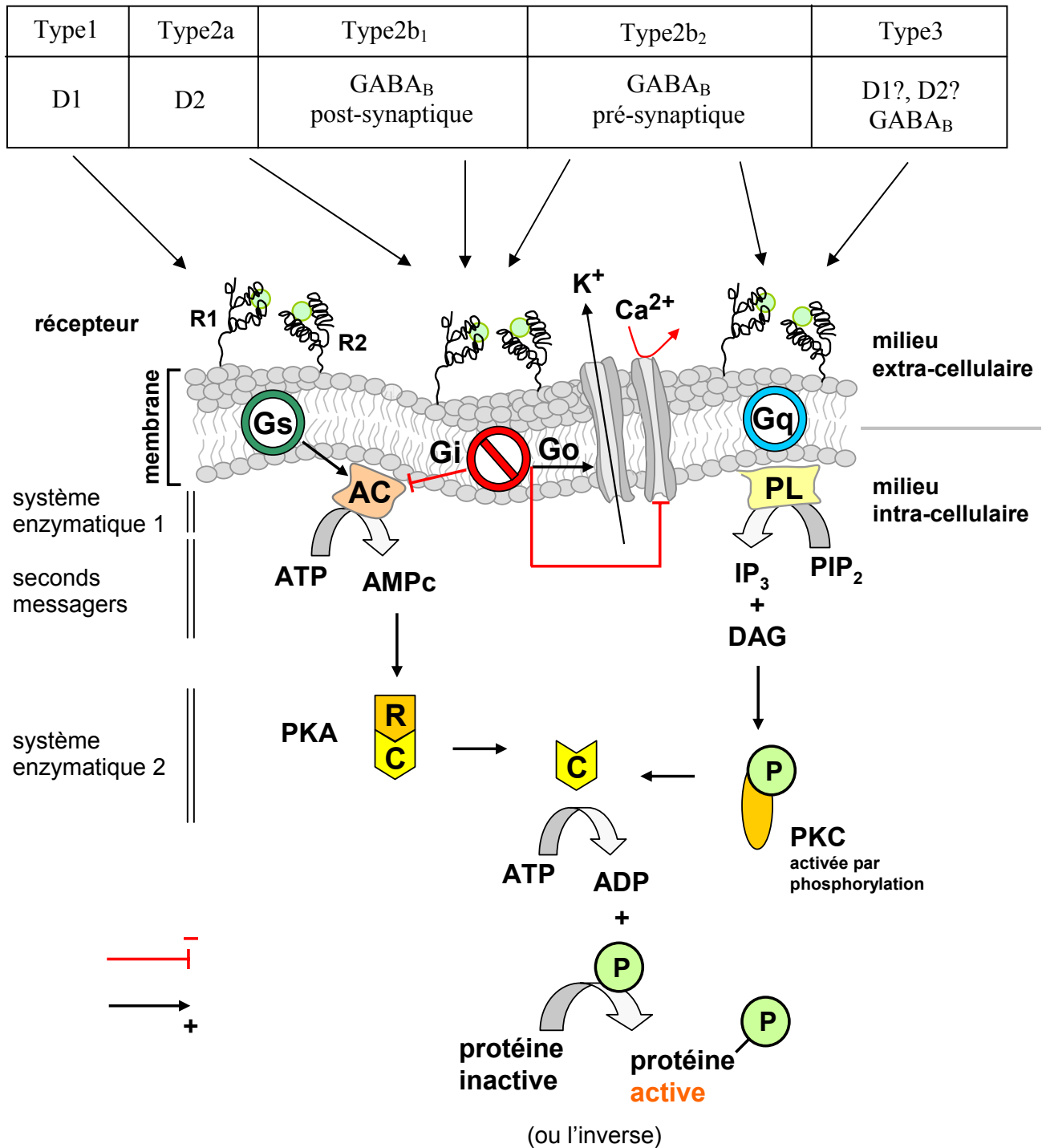
Les récepteurs GABA<sub>B</sub> font partie de la famille des récepteurs métabotropiques à 7 domaines transmembranaires (*cf.* Figure 11) qui utilisent des protéines G pour réguler les seconds messagers intra-cellulaires et ainsi réguler l'activité des canaux ioniques associés au récepteur (*cf.* Figure 12). Le récepteur GABA<sub>B</sub> possède deux isoformes R1 (R1a ou R1b) et R2 dont l'interaction physique (*cf.* Figure 11) permet la formation d'un complexe récepteur fonctionnel (Bettler and Tiao 2006).

Plusieurs études ont montré l'existence de différents sous-types de récepteurs GABA<sub>B</sub>, certains étant relativement insensibles au baclofen et présentant des sensibilités différentes aux divers antagonistes (Bonanno and Raiteri 1993; Misgeld, Bijak et al. 1995). La réponse à la stimulation du récepteur GABA<sub>B</sub> s'effectue grâce à différentes protéines G *via* plusieurs mécanismes (*cf.* Figure 12). L'activation de la protéine G<sub>o</sub> entraîne la fermeture des canaux calciques (Ca<sup>2+</sup>) au niveau pré-synaptique, induisant une diminution de la libération du neurotransmetteur et une ouverture des canaux potassiques (K<sup>+</sup>) au niveau post-synaptique. Cette action synergique provoque ainsi une hyperpolarisation membranaire. L'activation des protéines G<sub>i</sub> et G<sub>q</sub>, en réduisant respectivement la production des seconds messagers AMPc et DAG/IP<sub>3</sub>, entraîne une réduction de l'excitabilité cellulaire (Bowery 1993; Misgeld, Bijak et al. 1995).



**Figure 11 : Schéma des récepteurs métabotropiques GABA<sub>B</sub>**

Chaque récepteur GABA<sub>B</sub> est formé de 7 segments transmembranaires. Les 2 isoformes du récepteur GABA<sub>B</sub> R1 et R2 interagissent au niveau intracellulaire C-terminal, formant un complexe hétéromère physiologiquement fonctionnel (D'après (Marshall, Jones et al. 1999; Couve, Moss et al. 2000)).



**Figure 12 : Superfamille des récepteurs couplés aux protéines G**

Voies de communication intracellulaires : **AC**, adénylate cyclase ; **AMPc**, adénosine monophosphate cyclique ; **ATP**, adénosine triphosphate ; **C**, sous-unité catalytique ; **DAG**, diacyl glycérol ; **PIP<sub>2</sub>**, phosphatidyl inositol diphosphate ; **IP<sub>3</sub>**, inositol triphosphate ; **G**, protéine G ; **R**, sous-unité régulatrice ; **PKA**, protéine kinase A ; **PKC** protéine kinase C ; **PL**, phospholipase ; **TH**, tyrosine hydroxylase ; **(P)** , groupement phosphate.

	<b>GABA<sub>A</sub></b>	<b>GABA<sub>C</sub></b>	<b>GABA<sub>B</sub></b>
<b>agonistes</b>	muscimol	muscimol, TACA	baclofen
<b>antagonistes</b>	bicuculline gabazine	isoguvacine 3-APS	hydroxy-saclofen acide 5-aminovalérique (5-AVA)
<b>localisation</b>	hétérorécepteur (post-synaptique)	hétérorécepteur (post-synaptique)	hétérorécepteur, autorécepteur (pré- et post-synaptique)
<b>couplage</b>	direct (canal Cl <sup>-</sup> )	direct (canal Cl <sup>-</sup> )	indirect (via protéine G)
<b>association</b>	ouverture canal Cl <sup>-</sup> entrée ions Cl <sup>-</sup> ( hyperpolarisation)	ouverture canal Cl <sup>-</sup> entrée ions Cl <sup>-</sup> (hyperpolarisation)	<p>↗ AMPc</p> <p>↗ activité phospholipase A2<sup>-</sup></p> <p>↗ conductance K<sup>+</sup> (post-synaptique, ouverture du canal et sortie ions K<sup>+</sup>, hyperpolarisation)</p> <p>↘ conductance Ca<sup>2+</sup> (pré-synaptique; fermeture canal)</p>
<b>structure</b>	5 sous-unités avec 4 domaines transmembranaires	5 sous-unités (ρ) avec 4 domaines transmembranaires	hétérodimère R1 + R2, chacun formé de 7 segments transmembranaires

**Tableau 4 : Caractéristiques des différents récepteurs GABAergiques**

### 5.1.4 Implication du GABA dans l'embryogenèse du SNC

Le GABA joue un rôle primordial dans l'embryogenèse lors du développement du système nerveux. Il participe, entre autre, à la mise en place de plusieurs zones du SNC hiérarchisées en différentes couches cellulaires tel que le cortex ou la rétine.

Le développement du SNC repose sur l'enchaînement précis et hiérarchisé de plusieurs événements agissant aux niveaux temporel et spatial. On observe ainsi une étape de prolifération neuronale suivie d'une étape de migration, elle-même suivie d'une étape de différenciation et pour finir une étape de formation des synapses et d'affinement des circuits neuronaux. Chacune de ces étapes dans le développement du SNC implique l'expression et la fonction de divers neurotransmetteurs et de leurs récepteurs spécifiques (Lujan, Shigemoto et al. 2005). Ces différentes étapes séquentielles permettent ainsi la mise en place des différentes couches de neurones au sein du SNC et la fonctionnalité du réseau neuronal.

Il a été précédemment décrit que l'activation du récepteur GABA<sub>A</sub> chez les précurseurs neuronaux dans la zone proliférative néocorticale influençait positivement la synthèse d'ADN. Le GABA est en effet capable de réguler la prolifération cellulaire en provoquant un signal retro-contrôle qui stimule la division cellulaire (LoTurco, Owens et al. 1995; Haydar, Wang et al. 2000; Ben-Yaakov and Golan 2003). Cette action paracrine permet l'activation des récepteurs au GABA, et ce, même si les synapses ne sont pas encore fonctionnelles (Demarque, Represa et al. 2002).

Après leur division, la plupart des neurones corticaux migrent de leur site d'origine vers leur destination finale au sein du cortex cérébral. Ce mouvement des neurones est incontournable pour l'organisation finale du cerveau et son bon fonctionnement (Hatten 1999). Au cours du développement, le GABA est exprimé à proximité des trajets des neurones migrants. Le GABA libéré par les cellules dans ces régions diffuse à travers les tissus et donne l'ordre de migrer aux neurones néo-formés de la zone ventriculaire. L'activation des récepteurs GABA<sub>C</sub> et GABA<sub>B</sub>

stimule respectivement la migration des neurones de la zone ventriculaire et sous-ventriculaire vers la zone intermédiaire et de la zone intermédiaire vers la plaque corticale. L'activation des récepteurs GABA<sub>A</sub> inhibe quant à elle la migration des neurones à l'approche de leur destination finale au niveau de la plaque corticale, zone où est généré le cortex lors du développement (*cf.* Figure 13 ; (Behar, Schaffner et al. 1998)). Le blocage des récepteurs GABA<sub>B</sub> et GABA<sub>C</sub> grâce à des inhibiteurs spécifiques modifie fortement la distribution des interneurones au sein du cortex, confirmant l'implication de ces récepteurs dans la formation de cette structure du SNC (Lopez-Bendito, Lujan et al. 2003). Tous les progéniteurs neuronaux de la plaque corticale et de la zone sous-ventriculaire des ventricules latéraux (*i.e.* neurones progressant vers les bulbes olfactifs pour s'y implanter) répondent à l'activation du récepteur GABA<sub>A</sub>. Ces progéniteurs sont en effet dépolarisés par le GABA et contiennent du GABA intra-cellulaire (Wang, Krueger et al. 2003).

Ces activations séquentielles des différents récepteurs au GABA permettent ainsi la hiérarchisation du cortex cérébral et de la rétine (*cf.* Figure 13 ; (Lujan, Shigemoto et al. 2005)).

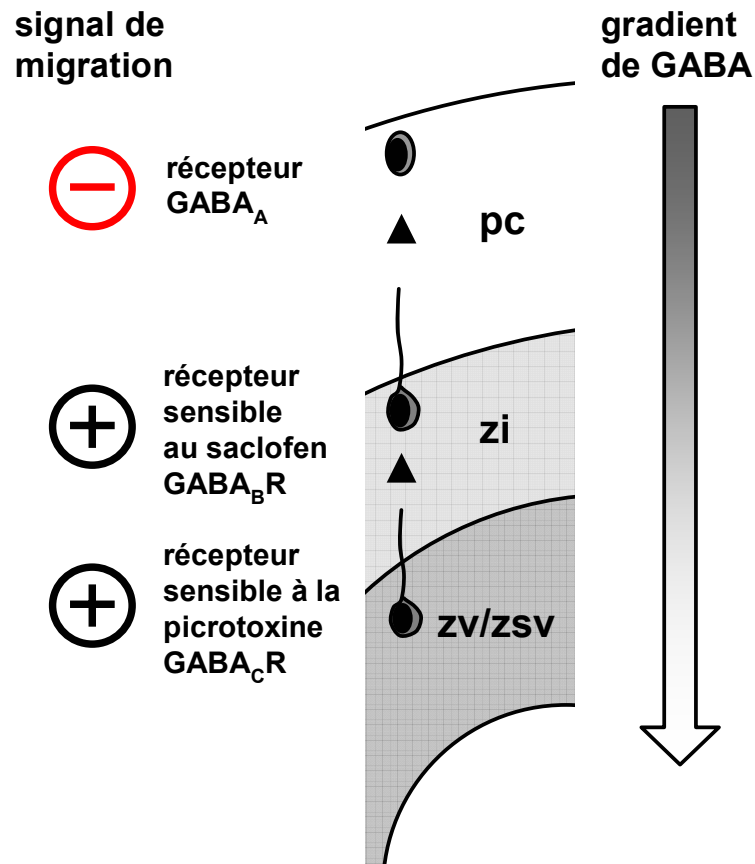
Il a également été démontré que les voies de signalisation médiées par le GABA avaient un effet direct sur le processus de différenciation neuronale. En effet, l'activation du récepteur GABA<sub>A</sub> favorise la croissance des neurites et la maturation des interneurones GABAergiques (Barbin, Pollard et al. 1993; Marty, Berninger et al. 1996). De plus, ce neurotransmetteur est capable de réguler le développement morphologique des neurones corticaux grâce à la dépolarisation membranaire et à l'augmentation de la concentration en Ca<sup>2+</sup> intra-cellulaire, deux phénomènes consécutifs à l'activation des récepteurs GABA<sub>A</sub> (Maric, Liu et al. 2001).

Enfin, le GABA joue également un rôle important dans l'établissement des connections synaptiques fonctionnelles. La mise en place d'un réseau neuronal débute par l'accroissement des axones en direction de leurs cibles post-synaptiques et par la formation de contacts synaptiques fonctionnels. L'établissement de ces contacts synaptiques se fait en deux étapes requérant une communication de proximité entre les éléments pré- et post-synaptiques, avec d'une part la formation des synapses, et

d'autre part la maturation synaptique entraînant leur différenciation fonctionnelle et morphologique (Lujan, Shigemoto et al. 2005). Il a été démontré que l'assemblage des synapses au sein du SNC était étroitement lié à une interaction cellulaire complexe *via* une signalisation impliquant le récepteur GABA<sub>A</sub> et le recrutement de protéines spécifiques (Ben-Ari 2002; Owens and Kriegstein 2002; Fritschy, Schweizer et al. 2003; Meier 2003).

Ainsi, les différentes sous-unités des récepteurs au GABA sont exprimées de manière différentielle dans des compartiments cellulaires spécifiques du SNC durant le développement et à l'âge adulte. Ces propriétés intrinsèques des récepteurs au GABA permettent ainsi l'accomplissement de différentes fonctions physiologiques au niveau de zones spécifiques du SNC.





**Figure 13 : Schéma de la migration GABA-dépendante des précurseurs neuronaux**

Les récepteurs au GABA modulent le déplacement des précurseurs neuronaux le long des trajets de migration. Pendant le développement, le GABA est exprimé à proximité des zones de passage des neurones migrants. L'activation des récepteurs GABA<sub>C</sub> entraîne la migration des neurones de la zone ventriculaire (zv) et sous-ventriculaire (zsv) vers la zone intermédiaire (zi) tandis que l'activation des récepteurs GABA<sub>B</sub> entraîne la migration des neurones de la zone intermédiaire (zi) vers la zone de la plaque corticale (pc). L'activation des récepteurs GABA<sub>A</sub> bloque la migration des neurones au niveau de la plaque corticale (d'après (Behar, Schaffner et al. 2000)).

## **5.2 Maladies neurodégénératives du système nerveux central**

Au cours du vieillissement, le système nerveux central de chaque individu est touché par une perte naturelle des cellules neuronales. Cette perte neuronale lente est caractérisée par l'apparition des premiers signes de sénescence dont les symptômes les plus courants sont les pertes de mémoire, les problèmes d'équilibre et la perte des facultés d'adaptation. Ce processus inéluctable est parfois accéléré, comme dans le cas des maladies neuro-dégénératives dont la prévalence est aujourd'hui en augmentation, liée au vieillissement de la population.

Les pathologies du système nerveux central, évolutives ou non, peuvent toucher plusieurs organes. On citera parmi les plus connues la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson touchant les neurones de l'encéphale ; la sclérose en plaques touchant le cerveau, la moelle épinière et le nerf optique ; la rétinite pigmentaire et la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) touchant la rétine. Les malades atteints de maladies neuro-dégénératives souffrent ainsi de troubles caractéristiques associés à chaque maladie : pertes de mémoire, de jugement et de raisonnement (maladie d'Alzheimer) ; troubles de la motricité et sensitifs, diminution de l'acuité visuelle (sclérose en plaque) ; tremblements au repos, troubles du tonus musculaire (maladie de Parkinson) ; perte de la vision centrale (DMLA) ; rétrécissement du champ visuel et baisse de l'acuité visuelle en cas de faible luminosité (rétinite pigmentaire). Ces symptômes entraînent ainsi une invalidité avérée, très handicapante pour les gestes du quotidien, et conduisent le plus souvent à la dépendance totale du malade.

Les données statistiques ont permis de dénombrer, à ce jour, plus de 24 millions de personnes touchées par la maladie d'Alzheimer et plus de 6 millions de malades pour la maladie de Parkinson à travers le monde. De plus, l'incidence des maladies neuro-dégénératives n'a cessé d'augmenter au cours des dix dernières années, faisant de ces maladies un problème majeur de santé publique.

### **5.2.1 Maladies neuro-dégénératives de la rétine**

La rétine qui possède la même origine embryonnaire que le cerveau peut, comme l'encéphale, être le siège de pathologies neuro-dégénératives touchant la plupart du temps soit les photorécepteurs (dégénérescence maculaire liée à l'âge et rétinite pigmentaire), soit les cellules ganglionnaires (glaucome). Les deux maladies rétinienne entraînant le plus grand nombre de cas de cécité dans le monde sont la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) et la rétinite pigmentaire.

La rétinite pigmentaire est une maladie héréditaire familiale dominante, chronique et progressive, pouvant prendre plusieurs formes, caractérisée par une dégénérescence des cellules pigmentaires de la rétine. Cette pathologie est caractérisée par un dépôt de pigments donnant à la rétine un aspect plus ou moins foncé lors de l'examen de l'œil par l'ophtalmologiste. Cette accumulation de pigments entraîne une oblitération des vaisseaux sanguins, créant ainsi un manque de vascularisation des cellules. Les premiers symptômes de cette maladie sont une baisse de l'acuité visuelle dans la pénombre et un rétrécissement du champ visuel. Les données statistiques font état d'une atteinte d'environ trois millions de personnes dans le monde, dont 40000 cas avérés en France (Lund, Kwan et al. 2001; Delyfer, Leveillard et al. 2004; Hartong, Berson et al. 2006).

La DMLA est une maladie dégénérative rétinienne chronique, évolutive et invalidante, dont les premiers symptômes apparaissent dans la majorité des cas après l'âge de 50 ans. Cette pathologie touche la macula de manière sélective, dans la zone de la rétine également appelée fovéa ou "tâche jaune" située au pôle postérieur de l'œil où l'acuité visuelle est maximale, et provoque une dégénérescence des cellules visuelles rétinienne. La DMLA, dans la majorité des cas, est caractérisée par des altérations de l'épithélium pigmentaire et par un amincissement de la macula consécutif à l'évolution de dépôts, riches en lipides et calcium, s'accumulant avec l'âge. Ces dépôts résultent des déchets du métabolisme cellulaire. L'évolution de la maladie est étroitement liée à sa forme. Dans la majorité des cas, le développement de la maladie est lent et peut s'étendre sur

plusieurs décennies. Cependant, la forme exsudative de la DMLA, plus rare (environ 20% des cas de DMLA), caractérisée par le développement de néo-vaisseaux choroïdiens sous la macula, a une évolution beaucoup plus rapide, faisant perdre la vision centrale de façon totale et irréversible en quelques mois, voire quelques semaines. La DMLA est la première cause de malvoyance après 50 ans dans les pays développés. La prévalence globale de cette maladie est de 8% après 50 ans et environ 1.000.000 de malades sont déjà recensés en France (Lund, Kwan et al. 2001; Delyfer, Leveillard et al. 2004; Hartong, Berson et al. 2006).

### **5.2.2 Traitements des maladies neuro-dégénératives rétinienne**

Il existe deux approches thérapeutiques potentielles, entrant en jeu à deux stades différents de la maladie. La première consiste à intervenir aux premiers stades de la maladie afin de prévenir les dégénérescences cellulaires, et la seconde consiste à remplacer les cellules lésées aux stades avancés de la maladie (Aramant and Seiler 2004; Delyfer, Leveillard et al. 2004).

Cette seconde approche, la thérapie cellulaire, basée sur le remplacement des cellules déficientes par des cellules saines, semble être la voie d'investigation la plus prometteuse pour un traitement efficace car elle favoriserait la restauration des fonctions, suite à des lésions irréversibles touchant le SNC. Elle postule le remplacement des cellules lésées par des cellules saines ce qui permettrait, sinon de guérir totalement la maladie, en tout cas, d'en atténuer les symptômes.

Malgré des avancées spectaculaires dans le domaine de la neurobiologie, comme la mise en évidence de cellules souches neuronales au sein du SNC (Reynolds and Weiss 1996; Galli, Gritti et al. 2003), les mécanismes spécifiques provoquant la perte des neurones dans les maladies neuro-dégénératives restent partiellement incompris, et les traitements actuels demeurent encore purement symptomatiques et non étiologiques. En effet, les traitements actuellement disponibles dans le cadre

du traitement des maladies neuro-dégénératives de la rétine ont une action limitée au ralentissement du développement de la maladie (*e.g.* apport de Vitamine A ou de divers facteurs de croissance).

Plusieurs protocoles de thérapie cellulaire adaptés aux maladies neuro-dégénératives de la rétine ont été développés ces dernières années. L'origine des cellules susceptibles d'être utilisées dans le cadre de transplantations à vocation thérapeutique est multiple (*e.g.* cellules dissociées, fragments tissulaires, cellules différenciées ou cellules souches). Deux voies de recherche sont privilégiées : la première est basée sur la protection *in situ* des cellules encore fonctionnelles grâce à un effet trophique du greffon, la deuxième vise à remplacer les cellules dégénérantes par des cellules saines (Delyfer, Leveillard et al. 2004).

Dans le cas de la rétinopathie pigmentaire, l'apoptose des bâtonnets directement liée à la maladie entraîne également une perte irréversible des cônes à long terme (Carter-Dawson, LaVail et al. 1978). Cette disparition cellulaire inattendue laissait envisager une dépendance trophique des cônes vis-à-vis des bâtonnets (Mohand-Said, Deudon-Combe et al. 1998). Ainsi, des expériences de transplantation de bâtonnets dans l'espace sous-rétinien de souris *rd10* ont permis une diminution de la disparition des cônes de l'ordre de 40% (Mohand-Said, Hicks et al. 1997; Mohand-Said, Hicks et al. 2000). Cette action de sauvegarde cellulaire serait *a priori* liée à la présence des protéines « rod-dependent cone viability factors » sécrétées par les bâtonnets, leur absence d'expression entraînant la disparition des cônes (Fintz, Audo et al. 2003; Leveillard, Mohand-Said et al. 2004). De plus, dans certaines pathologies oculaires, la dégénérescence des photorécepteurs est liée à un dysfonctionnement de l'épithélium pigmentaire rétinien.

Des expériences de transplantation de fragments de rétine fœtale dans des rétines dégénérantes ont permis de mettre en évidence la survie du greffon *in situ* (Gouras and Tanabe 2003), le développement de photorécepteurs fonctionnels (Aramant and Seiler 2004; Seiler and Aramant 2005) et une restauration effective de la fonction visuelle (Arai, Thomas et al. 2004). Ainsi, des

transplantations de fragments de rétine fœtale ont même été entreprises chez l'humain. En 2004, un morceau de rétine fœtale associée à son EPR a été transplanté dans l'espace sous-rétinien d'une patiente atteinte de rétinopathie pigmentaire. Les résultats ont mis en évidence une survie du greffon *in situ* sans rejet apparent pendant un an, ainsi qu'une amélioration de l'acuité visuelle de la patiente traitée (Radtke, Aramant et al. 2004).

La transplantation de cellules souches hématopoïétiques, issues de la moelle osseuse, a également été étudiée dans la rétine lésée. Ces expériences ont permis de mettre en évidence une optimisation de la survie des cônes (Otani, Dorrell et al. 2004) et la formation de cellules différenciées exprimant une protéine spécifique des photorécepteurs, la rhodopsine (Kicic, Shen et al. 2003).

Les cellules transplantées n'ayant pu se différencier *in situ* qu'en photorécepteurs immatures et non fonctionnels (Kicic, Shen et al. 2003), certaines équipes ont ainsi tenté des xéno-greffes de précurseurs rétiniens chez le rongeur et le porc (Chacko, Rogers et al. 2000; Chacko, Das et al. 2003; MacLaren, Pearson et al. 2006; Klassen, Kiilgaard et al. 2007). Ces progéniteurs rétiniens après injection sont capables de survivre, de s'intégrer efficacement dans la rétine et expriment de nombreux marqueurs de photorécepteurs différenciés tels que la rhodopsine, la transducine et la recoverine (Klassen, Kiilgaard et al. 2007). De plus, les cellules injectées établissent des connections synaptiques fonctionnelles avec les cellules de la rétine hôte. L'intégration des cellules dans la rétine nécessite une lésion et les cellules doivent être prélevées dans les stades précoces du développement des photorécepteurs, au moment où leur prolifération est maximale, entre le 1<sup>er</sup> et le 7<sup>ème</sup> jour post-natal (Chacko, Das *et al.*, 2003 ; McLaren, Pearson *et al.*, 2006). De nombreux points restrictifs vont à l'encontre de l'utilisation de ces précurseurs dans le cadre d'une quelconque thérapie cellulaire. Il sera indispensable, avant toute chose, de s'assurer de l'absence de développement de tumeurs ou d'autres pathologies consécutives à l'injection de cellules chez l'hôte receveur. De plus, les mécanismes d'implantation et de différenciation devront être totalement

maîtrisés afin de garantir une intervention permettant de recouvrer efficacement les fonctions visuelles du patient traité (Goureau and Sahel 2006).

### **5.2.3 Différenciation neurale *in vitro* des cellules issues du sang placentaire**

Plusieurs équipes ont déjà décrit la possibilité d'obtenir des cellules neurales *in vitro* à partir du sang de cordon ombilical humain (Sanchez-Ramos, Song et al. 2001; Bicknese, Goodwin et al. 2002; Buzanska, Machaj et al. 2002; Sanchez-Ramos 2002; McGuckin, Forraz et al. 2004; Chen, Hudson et al. 2005; Buzanska, Jurga et al. 2006; Buzanska, Jurga et al. 2006; Domanska-Janik, Habich et al. 2006; Habich, Jurga et al. 2006; McGuckin, Forraz et al. 2006; McGuckin, Jurga et al. 2008). Le nombre de cellules susceptibles de se différencier en neurones *in vitro* étant limité au sein de chaque prélèvement, il s'avère primordial de favoriser la survie de ces cellules.

Ainsi, l'utilisation *in vitro* de protéines de matrice extra-cellulaire telles que le collagène de type IV ou la fibronectine se révèle un atout essentiel pour favoriser la différenciation neurale. De plus, la culture *in vitro* doit se faire dans des conditions de densité cellulaire élevée, de 5 à 10 millions de cellules par mL de milieu (McGuckin, Jurga et al. 2008). Toutes les études traitant de la différenciation neurale des cellules placentaires abordent la nécessité d'utiliser des protocoles de culture cellulaire en plusieurs étapes. On observe, concernant les protocoles les plus aboutis, une étape de sélection, une étape de prolifération, suivie d'une étape de différenciation et de maturation (Sanchez-Ramos 2002; McGuckin, Jurga et al. 2008). La première étape de culture permet une sélection indirecte des cellules d'intérêt au sein de la population hétérogène des cellules mononucléées du sang placentaire, grâce à l'utilisation d'un milieu spécifique. Pendant cette étape apparaissent des corps embryoïdes, amas de cellules immatures, favorisant les contacts cellulaires et la sécrétion de facteurs de croissance spécifiques, jouant ainsi un rôle clé dans la survie des cellules *in vitro*. A ce stade, certaines cellules expriment des marqueurs caractéristiques des cellules souches

pluripotentes embryonnaires tels que SSEA-3/4, Oct4 et Sox2 (McGuckin, Jurga et al. 2008). La deuxième étape d'expansion nécessite, quant à elle, l'ajout de cytokines telles que l'Epidermal Growth Factor (EGF) et le basal Fibroblast Growth Factor (bFGF). Certaines équipes ajoutent également du Stem Cell Factor (SCF) aux deux cytokines précédemment citées afin d'obtenir une prolifération optimale des précurseurs neuraux (Sanchez-Ramos 2002; Chen, Hudson et al. 2005; McGuckin, Jurga et al. 2008). Cette seconde étape permet l'amplification du nombre de cellules, le nombre de précurseurs susceptibles de se différencier en neurones *in vitro* étant très limité (McGuckin, Jurga et al. 2008). Lors de cette étape de prolifération, certaines cellules vont adhérer au support de culture et commencer à se différencier spontanément. A ce stade, les cellules n'expriment plus les marqueurs embryonnaires (SSEA-3/4, Oct4 et Sox2) et expriment désormais des marqueurs de cellules souches neurales prolifératives tels que la nestine, la protéine gliale fibrillaire acide (GFAP) et Ki67. Les cellules n'expriment cependant pas encore de marqueurs neuraux matures. La troisième étape de différenciation et de maturation se fait grâce à l'ajout d'acide rétinolique supplémenté et de Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) ou de  $\beta$ -Nerve Growth Factor ( $\beta$ NGF) (Sanchez-Ramos 2002; Chen, Hudson et al. 2005; McGuckin, Jurga et al. 2008). Cette étape permet d'observer un changement morphologique des cellules ovoïdes en cellules bipolaires puis en cellules multipolaires. Même si certaines cellules expriment toujours des marqueurs retrouvés chez les cellules immatures tels que la nestine (non spécifique des cellules neurales immatures), cette expression se raréfie. A ce stade, la majorité des cellules émettant des prolongements expriment exclusivement des protéines de neurones matures telles que la protéine neurofilament NF200, la protéine associée aux microtubules MAP-2 et la protéine  $\beta$ -Tubuline de type III (Sanchez-Ramos 2002; Chen, Hudson et al. 2005; Domanska-Janik, Habich et al. 2006; McGuckin, Jurga et al. 2008). De plus, plusieurs équipes ont également démontré, grâce à des techniques d'électrophysiologie, que ces cellules neuronales obtenues à partir du sang de cordon



ombilical étaient douées d'une véritable fonctionnalité (Sun, Buzanska et al. 2005; Buzanska, Jurga et al. 2006).

#### **5.2.4 Sang placentaire et thérapie cellulaire**

De nombreuses études *in vivo* de thérapie cellulaire ont été mises en place dans le cadre du traitement des paralysies d'origine médullaire ou d'autres maladies touchant le SNC. Ainsi l'injection de cellules souches issues du sang placentaire dans des modèles animaux souffrant de lésion à la moelle épinière a permis de montrer, à plusieurs reprises, une diminution de la taille de la lésion, une croissance des tissus neuraux supérieure à celle observée chez les animaux témoins et une amélioration des fonctions motrices associées (Kuh, Cho et al. 2005; Nishio, Koda et al. 2006; Dasari, Spomar et al. 2008; Kao, Chen et al. 2008). En 2005, Kang *et al.* ont publié des résultats cliniques obtenus chez une femme de 37 ans souffrant d'une lésion à la moelle épinière et ayant reçu une injection de cellules souches d'origine placentaire directement au niveau de la zone lésée. Cette étude a permis de montrer, dans les 41 jours qui ont suivi le traitement, une régénération de la moelle épinière, au niveau exact du site de lésion, accompagnée d'une amélioration de la perception sensorielle et d'une possibilité de mouvements au niveau de la hanche, en particulier grâce à la contraction des muscles fessiers (Kang, Kim et al. 2005).

Quelques travaux ayant recours aux cellules du sang placentaire sont plus particulièrement dédiés au développement de thérapies pour le traitement des maladies neuro-dégénératives de la rétine.

La rétine, ayant la même origine embryonnaire que le cerveau, fait partie intégrante du SNC. Sa localisation excentrée et sa manipulation aisée lors des transplantations en font un bon modèle d'étude du SNC lésé. Certaines équipes étudient ainsi la potentialité des cellules du sang de cordon humain à se différencier en cellules rétiniennes et en particulier en cellules nerveuses tels que les photorécepteurs. Koike-Kiryama *et al.* ont démontré la possibilité d'obtenir des cellules rétiniennes

nerveuses *in vitro* à partir de cellules de sang de cordon non triées (Koike-Kiriyama, Adachi *et al.* 2007). Lund *et al.* ont également décrit les cellules du sang placentaire comme étant capables de limiter la dégénérescence des photorécepteurs après injection dans l'espace sous-rétinien de rats souffrant de dégénérescence des photorécepteurs (Lund, Wang *et al.* 2007). De plus, des cellules n'exprimant aucun marqueur de différenciation (Lin-), injectées dans l'espace sous-rétinien de souris, expriment différents marqueurs humains que l'on trouve dans les cellules nerveuses rétiniennes tels que la nestine, MAP2, la  $\beta$ -III-tubuline, la NSE (neuron specific enolase) et la rhodopsine après 15 jours, laissant entrevoir une possible utilisation de ces cellules dans le cadre du traitement des maladies neuro-dégénératives et des dystrophies de la rétine (Koike-Kiriyama, Adachi *et al.* 2007).

### **5.2.5 Modèles murins de pathologies neurodégénératives**

Plusieurs modèles de souris souffrant de pathologies rétiniennes sont couramment utilisés en laboratoire. Nous nous intéresserons ici uniquement aux animaux souffrant de perte de leurs photorécepteurs rétiniens ou souffrant de désorganisation de la rétine.

Les souris *rd10* présentent une mutation spontanée du gène de l'enzyme phosphodiesterase contenue dans les bâtonnets. Cette mutation génétique entraîne la dégénérescence totale des photorécepteurs rétiniens entre le 20<sup>ème</sup> et le 25<sup>ème</sup> jour post-natal (Chang *et al.*, 2002 ; Gargini *et al.*, 2007). Ce type de souris est le modèle animal le plus adapté concernant l'étude de la rétinite pigmentaire humaine et possède l'avantage d'être utilisable dans le cadre d'essais de neuroprotection, destinés à limiter la perte des photorécepteurs par divers facteurs trophiques.

D'autres modèles animaux souffrant de la perte de leurs photorécepteurs rétiniens sont également utilisés en laboratoire. Par exemple, les souris *Balb/c* exposées à une lumière continue de 2000 lux pendant 8 jours. Cette surexposition lumineuse puissante entraîne la perte de nombreux photorécepteurs par photo-lésion. L'avantage de ce modèle réside dans la perte locale des

photorécepteurs rétiniens, uniquement au niveau des zones de la rétine exposées à la lumière. Ce modèle permet ainsi d'étudier le comportement *in situ* des cellules injectées ou des cellules survivantes constitutives de la rétine au sein d'un contexte lésionnel partiel, en fonction de la présence ou non des photorécepteurs (Sheedlo, Gaur et al. 1991).

Les rats *RCS* présentent une mutation héréditaire autosomique récessive du gène *C-mer* (Bok and Hall 1971; LaVail and Battelle 1975). Ce gène *C-mer* codant un récepteur à activité tyrosine kinase est exprimé dans de très nombreux tissus et en particulier dans les cellules de l'EPR et les cellules macrophagiques (D'Cruz, Yasumura et al. 2000; Nandrot, Dufour et al. 2000). On observe chez les rats *RCS* une abolition du phénomène de phagocytose des segments externes des photorécepteurs par l'EPR (Mullen and LaVail 1976). Il en résulte une accumulation de débris cellulaires entre ces deux couches ainsi qu'une accumulation de lipofuschine dans les cellules photoréceptrices entraînant la mort des photorécepteurs (Katz, Eldred et al. 1987). Aux stades les plus avancés de la dégénérescence des photorécepteurs, on observe également une néovascularisation pathologique de la rétine. Les premiers signes de dégénérescence rétinienne sont détectés au 18<sup>ème</sup> jour après la naissance, cette dégénérescence étant complète après trois mois et se traduisant par une dégénérescence de toutes les couches de photorécepteurs. Les rats *RCS* étant un modèle animal de dégénérescence rétinienne par atteinte primitive de l'EPR, ils constituent un des modèles animaux les plus étudiés pour les dégénérescences rétiniennes (Sheedlo, Gaur et al. 1991; Lund, Wang et al. 2006; Lund, Wang et al. 2007).

Les souris *C57bl6/J*, modèle sauvage non muté des souris *rd10*, sont également utilisées dans l'étude de certaines pathologies rétiniennes. Ces souris sont utilisées, en particulier, pour des expériences de photo-coagulation de la rétine au laser. Cette lésion ciblée entraîne un phénomène de néo-vascularisation invasive localisé au point d'impact du laser résultant en une désorganisation de la rétine (Behar-Cohen, Benezra et al. 2006). Ces symptômes sont similaires à ceux développés lors de la DMLA exsudative chez l'humain.

## 6. OBJECTIFS

Dans ce travail de doctorat, nous nous sommes intéressés tout particulièrement au potentiel neurogénique des cellules du sang de cordon ombilical humain. Ces travaux font partie d'une étude à visée thérapeutique pour le traitement des maladies neuro-dégénératives, en particulier dans l'établissement d'un modèle d'étude de régénération de la rétine lésée. La mise en place d'une telle méthode de thérapie cellulaire nécessite, en amont, de caractériser parfaitement les cellules susceptibles d'être implantées, mais aussi d'acquérir la maîtrise totale des mécanismes d'implantation et de différenciation des cellules souches exogènes. En effet, il est nécessaire que les cellules souches injectées se placent au sein du tissu lésionnel et s'y différencient, *in situ*, dans le type cellulaire à remplacer.

La base de ce travail reposait sur les résultats préalablement publiés par d'autres équipes, ayant mis en évidence la possibilité d'obtenir des cellules neuronales *in vitro* à partir des cellules du sang placentaire (Ha, Choi et al. 2001; Sanchez-Ramos 2002). La première étape consistait ainsi à reproduire les résultats pré-existants. A l'exception de quelques équipes ayant décrit la possibilité d'obtenir des neurones à partir de la fraction non hématopoïétique, en particulier la fraction CD34- (Buzanska, Jurga et al. 2006; McGuckin, Jurga et al. 2008), le type cellulaire à l'origine des neurones obtenus *in vitro* à partir du sang placentaire n'a jamais été précisément défini dans la littérature. Il était donc nécessaire de préciser le phénotype de ces cellules. Nos expérimentations se sont essentiellement portées sur les sous-populations souches du sang placentaire, caractérisées par les marqueurs de membrane CD133 et CD34. Ces deux types de cellules souches, immatures, douées d'un pouvoir de prolifération et de différenciation optimal étant les plus à même de donner naissance à différentes lignées cellulaires, autres qu'hématopoïétiques (*i.e.* multi-potentialité). D'autre part, notre étude consistait également à optimiser les protocoles de culture *in vitro* afin d'obtenir un maximum de cellules neuronales différenciées et fonctionnelles après culture.

Plusieurs équipes ayant préalablement décrit la présence de différents récepteurs aux neurotransmetteurs dont le GABA sur des cellules non neuronales, telles que les cellules souches hématopoïétiques du sang périphérique (Steidl, Bork et al. 2004; Seidel, Niggemann et al. 2007), nous avons ainsi cherché à mettre en évidence la présence de cellules GABAergiques ainsi qu'à préciser la fonctionnalité de ce neurotransmetteur dans les cellules du sang de cordon ombilical humain. Nous avons ainsi cherché à évaluer les potentialités migratoires des cellules souches d'origine placentaire afin de valider leur potentielle utilisation dans le cadre de transplantations au sein du système nerveux.

Afin de compléter ces travaux *in vitro*, des expériences préliminaires de xéno greffes de cellules issues du sang de cordon ombilical humain ont été réalisées dans des modèles de souris souffrant de pathologies rétinienne neuro-dégénératives. Cette étude avait pour but de tester la capacité d'intégration et de différenciation des cellules souches CD133+ *in vivo* dans une structure du SNC accessible (annexe 1 et 2).

# **MATERIEL ET METHODES**

# 1. Culture cellulaire

## 1.1 Cultures primaires et lignées cellulaires

Plusieurs types de cellules émanant de différentes sources ont été utilisés dans cette étude :

Les prélèvements de sang placentaire, tous issus de donneurs sains, ont été cédés gracieusement par l'Etablissement Français du Sang Bourgogne Franche-Comté (Besançon).

Cellules mononucléées : les cellules mononucléées étaient isolées par gradient de Ficoll<sup>TM</sup> à partir de prélèvements de sang placentaire entiers dont le volume restreint ne concordait pas avec une utilisation thérapeutique.

Cellules souches CD133+ et CD34+ : les cellules souches CD133+ et CD34+ ont été isolées à partir des fractions mononucléées du sang de cordon ombilical grâce aux kits de sélection CD133+ ou CD34+ selon les protocoles du fabricant (*Miltenyi Biotec*, Bergisch Gladbach, Allemagne). Les cellules souches CD133+ / CD34- sont isolées grâce à un processus de double sélection : une première sélection CD34, puis une seconde sélection CD133 sur la fraction négative résultant du tri CD34 (*i.e.* cellules CD34- ; *cf.* Figure 14).



**Figure 14 : Sélection des progéniteurs CD133+ / CD34- à partir de cellules mononucléées**

Deux sélections différentes sont nécessaires pour isoler les précurseurs CD133+ / CD34- à partir des cellules mononucléées du sang de cordon ombilical. La première sélection CD34 permet de séparer les deux fractions cellulaires CD34+ et CD34-. Une deuxième sélection CD133 sur cette dernière fraction permet ensuite d'isoler les précurseurs CD133+ / CD34-.

La lignée SK-N-BE(2) : lignée neuronale provenaient de cellules malignes, issues de métastases de moelle osseuse, dérivant d'un neuroblastome encéphalique. Ces cellules (référence :CRL-2271) ont été obtenues auprès de l'American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). Cette lignée a été utilisée en tant que contrôle positif de lignée neuronale différenciée.

La lignée ARPE-19 : cellules dérivées de RPE humain (épithélium pigmentaire rétinien). Ces cellules (référence : CRL-2302) ont également été obtenues auprès de l'ATCC. Cette lignée a été utilisée en tant que stroma nourricier pour les expériences de co-cultures.

Les lignée SK-N-BE(2) et ARPE-19 nous ont été gracieusement fournies respectivement par le Pr M. Jouvenot et le Dr P. Adami (EA 3922, Université de Franche-Comté, Besançon, France) et par le Pr F. Behar-Cohen (INSERM U782 – Equipe 17, Institut Biomédical des Cordeliers, Paris, France).

Les cellules SK-N-BE(2) ont été amplifiées en conservant un état indifférencié dans du milieu DMEM/F12 (*Gibco Invitrogen*, Cergy Pontoise, France) avec 10% de sérum de veau foetal (SVF ;



*StemCell Technologies*, Vancouver, Canada). Afin d'induire leur différenciation neuronale, d'après des protocoles précédemment publiés, les cellules ont ensuite été cultivées dans du milieu sans sérum pendant au moins cinq jours (Biedler and Spengler 1976; Biedler, Roffler-Tarlov et al. 1978). Les cellules ARPE-19 ont été cultivées dans du milieu DMEM/F12 medium avec 10% de SVF.

## **1.2 Protocoles de culture cellulaire**

Notre protocole de différenciation neuronale à partir des cellules de sang placentaire humain dérive de plusieurs protocoles précédemment décrits pour ce type de cellules (Sanchez-Ramos 2002; Ha, Lee et al. 2003; Chen, Hudson et al. 2005). Ce protocole se décompose en trois étapes : une première étape de sélection, une deuxième étape de prolifération et une troisième étape de différenciation neuronale.

Les différentes populations cellulaires étaient ainsi cultivées dans un milieu de sélection contenant du milieu DMEM, L-glutamine 2 mM, Glucose 1000 mg/L (*Gibco Invitrogen*) avec 10% de SVF. Après 24 heures, le milieu de sélection était remplacé par un milieu de prolifération dans des conditions sans sérum consistant en un milieu Neurobasal-A avec le "supplément N2" (*Gibco Invitrogen*), 20 ng/mL d'Epidermal Growth Factor (EGF) et de basal Fibroblast Growth Factor (bFGF) (*AbCys*, Paris, France). Après 10 jours de culture, un troisième milieu était ensuite utilisé pour la différenciation neuronale, consistant en un milieu Neurobasal-N2 contenant 0.5µM d'acide rétinoïque all-trans (RA) avec 100 ng/mL de bêta-Nerve Growth Factor (βNGF) ou 20 ng/mL de Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) (*AbCys*).

Afin de tester la prolifération cellulaire, les cellules étaient cultivées dans du milieu Neurobasal-A medium avec le "supplément B27" (*Gibco Invitrogen*) et 20 ng/mL d'EGF et de bFGF (*AbCys*, Paris, France).

Deux types de co-cultures ont également été réalisés :

- les cellules ARPE-19 étaient cultivées jusqu'à obtenir une monocouche homogène. Les cellules d'intérêt étaient ensuite déposées sur ce stroma cellulaire puis étudiées par technique d'immunochimie.
- deux fractions cellulaires différentes étaient co-cultivées dans des chambres de Boyden séparées par une membrane semi-perméable (Transwell 0.4µm, *Nunc*, Corning Incorporated, Corning, NY, USA). La membrane semi-perméable permet ainsi la diffusion des molécules d'un compartiment à l'autre. Ce type de co-culture permet de tester la nécessité d'un éventuel contact cellulaire étroit entre deux sous-populations cellulaires.

### **1.3 Marquage membranaire avant culture**

Les cellules d'intérêt peuvent être marquées avant culture (PKH labelling ; *Sigma-Aldrich*). Cette technique permet l'inclusion de molécules fluorescentes au sein de la bicouche phospholipidique membranaire. Ces molécules n'entraînant aucun changement phénotypique, après marquage, les cellules d'intérêt peuvent être cultivées avec une autre fraction cellulaire sans séparation compartimentée. On peut ainsi repérer après culture les cellules d'intérêt précédemment marquées, au sein d'une population cellulaire hétérogène. Ce type de marquage membranaire a été utilisé afin de repérer le devenir des précurseurs du sang placentaire au sein de la fraction mononucléée totale.

## **2. Analyses immunocytochimiques**

Le protocole d'analyse immunocytochimique est similaire pour les cellules en culture et pour les tissus coupés. Pour les marquages membranaires, les cellules peuvent être directement marquées tandis que pour les marquages intra-cellulaire, les cellules doivent être préalablement fixées avec du paraformaldéhyde 3,7% (*Sigma-Aldrich*) à +4°C pendant 20 minutes, puis perméabilisées avec du triton X100 0,1% à température ambiante pendant 10 minutes. Pour les marquages membranaires

(cf. Tableau 5), les cellules sont incubées 30 minutes à +4°C en présence des anticorps correspondants dilués dans du PBS / 0,5% SVF. Pour les marquages intracellulaires, après plusieurs lavages au PBS, les anticorps primaires (cf. Tableau 5), dilués dans du PBS / 0,5% SVF, sont incubés pendant 2 heures à +4°C. Après lavage, les anticorps secondaires correspondants (cf. Tableau 6), dilués dans du PBS / 0,5% SVF, sont incubés 1 heure à +4°C. L'analyse immunocytochimique peut également être complétée par un marquage des noyaux au DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride ; *Sigma-Aldrich*). Dans ce cas, les cellules sont incubées dans la solution de DAPI pendant 5 minutes +4°C puis lavées deux fois consécutivement au PBS 1X. Des contrôles négatifs étaient systématiquement réalisés à chaque marquage, afin d'évaluer le bruit de fond d'auto-fluorescence, avec des anticorps IgG contrôles ne détectant aucun épitope sur les cellules étudiées.

anticorps	hôte	dilution	fabricant	spécificité
<b>CD133/2-PE</b>	souris	1/200	Miltenyi Biotec	cellules souches progéniteurs
<b>CD133-FITC</b>	souris	1/200	R&D Systems	cellules souches progéniteurs
<b>CD34-PE</b>	souris	1/200	Miltenyi Biotec	cellules souches progéniteurs
<b>CD34-FITC</b>	souris	1/200	Miltenyi Biotec	cellules souches progéniteurs
<b>CD45-FITC</b>	souris	1/200	Diaclone Research	cellules hématopoïétiques
<b>Nestine</b>	souris	1/200	R&D Systems	progéniteurs neuraux et endothéliaux
<b>Vimentine</b>	souris	1/200	Chemicon	progéniteurs neuraux et endothéliaux
<b>GFAP</b>	souris	1/1000	Sigma-Aldrich	cellules gliales
<b>NeuN</b>	souris	1/200	Chemicon	neurones
<b>NF200</b>	lapin	1/200	Sigma-Aldrich	neurones
<b>β-III-Tubuline</b>	souris	1/200	Chemicon	neurones matures
<b>Récept. GABA<sub>A</sub> (chaîne β)</b>	souris	1/200	Chemicon	système nerveux
<b>Récept. GABA<sub>B</sub> (R1a et R1b)</b>	cochon d'inde	1/200	Chemicon	système nerveux
<b>GABA</b>	lapin	1/200	Sigma-Aldrich	système nerveux
<b>Taline</b>	souris	1/200	Santa Cruz	cytosquelette
<b>Vav</b>	souris	1/200	Santa Cruz	cytosquelette
<b>IgG1-PE</b>	souris	1/200	Diaclone Research	contrôle isotype
<b>IgG1-FITC</b>	souris	1/200	Diaclone Research	contrôle isotype

**Tableau 5. Liste des différents anticorps primaires utilisés pour l'analyse immunocytochimique**

anticorps	dilution	fabricant
anti-mouse-FITC	1/200	Jackson Immunoresearch
anti-mouse-PE	1/200	Jackson Immunoresearch
anti-mouse-TRITC	1/200	Beckman Coulter
anti-rabbit-FITC	1/200	Beckman Coulter
anti- rabbit -PE	1/200	Jackson Immunoresearch
anti- rabbit -TRITC	1/200	Beckman Coulter
Anti-guinea pig-Cy3	1/200	Jackson Immunoresearch

**Tableau 6. Liste des différents anticorps secondaires utilisés pour l'analyse immunocytochimique**

### 3. Western blotting

Les protéines ont été extraites de différentes fractions cellulaires grâce à un tampon de lyse Tris 10 mM, pH 7,4, SDS 1%, sodium orthovanadate 1 mM (*Sigma-Aldrich*). Plusieurs aliquots correspondant à 25 ng de protéines pour chaque échantillon ont été séparés par SDS-PAGE (10%) et transférés sur des membranes de nitrocellulose. Les membranes étaient ensuite séchées puis réhydratées et lavées dans du tampon PBS / 5% Tween 20 (PBST ; *Sigma-Aldrich*). Les liaisons non spécifiques étaient bloquées par incubation des membranes dans du PBST / lait écrémé 5% pendant au moins 3 heures à +4°C. Les anticorps primaires étaient ensuite incubés pendant une nuit à +4°C (MAB377, anti-NeuN clone A60, *Chemicon International*) dans du tampon PBST / 5% lait écrémé. Les membranes étaient lavées dans du tampon PBST et PBST / 20% diméthylsulfoxyde (*B Braun Medical*, Boulogne, France), puis incubées avec l'anticorps secondaire anti-souris-HRP (*BioRad*) pendant une heure à température ambiante. Les membranes ont ensuite été lavées et un

test de détection colorimétrique Opti-4CN a été utilisé pour optimiser la réaction (*BioRad*). La révélation était ensuite stoppée par agitation des membranes dans l'eau ultra-pure stérile.

#### **4. RT-PCR**

Les ARN totaux des cellules SK-N-BE(2), de la fraction mononucléée et des cellules CD133+ du sang placentaire ont été isolés grâce à la solution RNA Now (*Ozyme*, St Quentin, France) selon les protocoles du fabricant. Les ADNc (ADN complémentaires) ont ensuite été synthétisés selon le protocole du fabricant (*Sigma-Proligo*). Le mix de PCR utilisé contenait 0,7 mL (30 pmol/mL) d'amorces, 0,5 mL (5 U/mL) de Taq DNA polymérase, 5 mL de 4XdNTP (20 mM), 5 mL de tampon 10X, 10 mL de MgCl<sub>2</sub> (10 mM), 5 mL d'ADNc et 23,1 mL d'eau ultra-pure stérile. Les conditions d'amplification des fragments d'ADN utilisées étaient : une étape de dénaturation à +94°C pendant 5 minutes, une étape d'hybridation des amorces pendant 30 secondes (température dépendante du type d'amorce utilisé ; cf. Tableau 7), et une étape d'extension à +72°C pendant 30 secondes, pendant 30 cycles. Les échantillons étaient finalement chauffés à +72°C pendant 7 minutes. Les différents produits issus de la PCR étaient dissociés sur un gel d'agarose à 2% avec du bromure d'éthidium (*Sigma-Aldrich*). Les gels ainsi obtenus ont été observés et photographiés sous BIO-PRINT (*Photosynthesis Systems*, Paris, France).

gène amplifié	amorces (sens, antisens)	longueur amplifié (paires de base)
gapdh	5' TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGG 3' 5' CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC 3'	915
nestine	5' AGGATGTGGAGGTAGTGAGA 3' 5' TGGAGATCTCAGTGGCTCTT 3'	270
nf-m	5' GAGCGCAAAGACTACCTGAAGA 3' 5' CGACTCTAGCTCGATGCTCTTG 3'	
map2c	5' TCAGAGGCAATGACCTTACC 3' 5' GTGGTAGGCTCTTGGTCTTT 3'	
gfap	5' GTGGGCAGGTGGGAGCTTGATCT 3' 5' CTGGGGCGGCCTGGTATGACA 3'	388
récepteur GABA-A, sous-unité alpha1	5' GGACAAACAGTAGACTCTGG 3' 5' ATTAGGGGTGTAGCTGGTTGCTGT 3'	470
récepteur GABA-A, sous-unité alpha2	5' CTGGGCCAATCAATCGGAAAGGAGA 3' 5' GATTCGGGGCATAATTGGCAACAGC 3'	471
récepteur GABA-A, sous-unité alpha3	5' TTTTGGGCCATGTTGTTGGGACAGAGAT 3' 5' TGGTCCCCACGATGTTGAAGGTAGTGCT 3'	470
récepteur GABA-A, sous-unité alpha4	5' TTGCCCAAAGTGTCCCTATGC 3' 5' AGCCCCTATGGTATTAAGTGTGGT 3'	554
récepteur GABA-A, sous-unité alpha5	5' GCTTTTCACAGATGCCAACCAGTTCAG 3' 5' CCATCTTCCGCCACCACCACCGACTTG 3'	570
récepteur GABA-A, sous-unité alpha6	5' GGACAAACAGTATCTAGTGAGAC 3' 5' GATGGTGTCTAAGAAGGTGGAG 3'	471
récepteur GABA-A, sous-unité beta1	5' GATGGTGTCTAAGAAGGTGGAG 3' 5' TCATAGGAGTACATGGTGGCCTTG 3'	542
récepteur GABA-A, sous-unité beta2	5' TACTGGCGTGGCGATGATAATG 3' 5' GGCCCCCTCCCAAAGAAGA 3'	433
récepteur GABA-A, sous-unité beta3	5' AGATAAAAGGCTCGCCTATTCTGG 3' 5' CTTTCGCTCTTTGAACGGTCATTC 3'	794
récepteur GABA-A, sous-unité gamma1	5' CTCAACTGAAATCATTACACACG 3' 5' ATCTTCTTGCGGCACAGAAAT 3'	465
récepteur GABA-A, sous-unité gamma2	5' GTGAAGACAACCTCCGG 3' 5' CCAAGCTCCTGTTTCGACAATCTTC 3'	558
récepteur GABA-A, sous-unité gamma3	5' CAGAAAGGTGGAAGAGGATGAA 3' 5' AAATGACACCCAGGATAAAACCAC 3'	769
récepteur GABA-A, sous-unité epsilon (ε)	5' CGCGGAAATGTTGTCCAAAGTTCT 3' 5' CGGCGATCTCAACAGTGACC 3'	314
récepteur GABA-B, sous-unité B1	5' TCAGGTTGGGCTGTGAGTTC 3' 5' AACATGACATCCCAGGAATTTG 3'	542
récepteur GABA-B, sous-unité B2	5' CCGGGCCCAGGCCTCC 3' 5' ACCATCATCCTGGAGCAGC 3'	554
récepteur GABA-C, sous-unité rho (ρ)	5' CGAGGTCGGCAGAAGTGACAAG 3' 5' TCCTGCTGCGATCTGGTACTAA 3'	591

**Tableau 7. Liste des amorces utilisées pour la RT-PCR**

## 5. Test de fonctionnalité neuronale au calcium

Le changement de concentration intra-cellulaire en ions calcium ( $[Ca^{2+}]_i$ ) peut être utilisé pour mettre en évidence l'activité neuronale. Afin de tester la fonctionnalité des neurones obtenus *in vitro* à partir des cellules du sang placentaire, nous avons effectué des mesures fluorométriques par microscopie confocale de la  $[Ca^{2+}]_i$  en utilisant le marqueur de calcium Fluo4. Le marqueur Fluo4-AM (*Molecular Probes, Invitrogen, Cergy Pontoise, France*) était dilué à une concentration finale de 3  $\mu$ M avec 20% d'acide pluronique dans une « solution de charge » (NaCl 135 mM, KCl 5 mM, glucose 10 mM, HEPES 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, pH=7.4). Les cellules étaient ensuite incubées avec la « solution de charge » (Fluo4-AM 3  $\mu$ M) pendant une heure à +37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Les cellules étaient ensuite lavées et incubées 30 minutes supplémentaires dans un tampon ne contenant pas de Fluo4-AM. Ensuite des acquisitions en temps réel ont été effectuées par microscopie confocale (FV-1000, *Olympus*). Les images ainsi que les mesures fluorométriques liées à la liaison du calcium au Fluo4 (émission à 520 nm) étaient enregistrées en direct grâce à la microscopie confocale. Les cellules étaient stimulées par perfusion d'une « solution de stimulation » (NaCl 90 mM, KCl 50 mM, glucose 10 mM, HEPES 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, pH=7.4). Les contrôles négatifs étaient réalisés en stimulant les cellules avec un « tampon de stimulation » sans calcium ou avec un « tampon de stimulation » contenant 100  $\mu$ M de cadmium (CdCl<sub>2</sub>), molécule inhibitrice des canaux calciques.

## 6. Test de migration en chambres de Boyden

Les chambres de Boyden étaient pré-incubées dans du SVF pendant 2 heures. 200.000 cellules mononucléées ou 50000 cellules CD133+ étaient suspendues dans 100  $\mu$ L de milieu DMEM / 10%SVF dans le compartiment supérieur des chambres tandis que le compartiment inférieur contient différentes concentrations de GABA (1.10<sup>-6</sup> M – 5 M ; *Sigma-Aldrich*) dilué dans du milieu DMEM / 10% SVF également. L'effet des antagonistes spécifiques aux récepteurs au GABA a été



testé en ajoutant 200  $\mu$ M de bicuculline methioïde (antagoniste du récepteur GABA<sub>A</sub> ; *Sigma-Aldrich*) ou 200  $\mu$ M de saclofen (antagoniste du récepteur GABA<sub>B</sub> ; *Sigma-Aldrich*) au GABA dans le compartiment inférieur des chambres de Boyden. Le contrôle positif était constitué de milieu DMEM / 10% SVF contenant 100ng/mL de Stromal cell Derived Factor-1 (SDF-1). Deux contrôles négatifs ont également été réalisés en ajoutant la même concentration de GABA dans les 2 compartiments des chambres de Boyden ou en utilisant un milieu DMEM / 10% SVF sans GABA dans la chambre inférieure. Après incubation, les chambres supérieures étaient retirées et le nombre de cellules migrantes vivantes était estimé par microscopie optique (3 comptages / chambre).

## **7. Injection de cellules souches dans la rétine de souris**

Diverses injections d'environ 10000 cellules souches CD133+ d'origine placentaire étaient réalisées dans le vitré de l'œil droit des souris. L'œil gauche étant utilisé comme contrôle contro-latéral, aucune cellule n'était injectée. Les contrôles négatifs étaient soumis à une injection du milieu de culture sans cellule.

Deux souches différentes de souris ont été utilisées : les souris *rd10*, souffrant d'une dégénération des photorécepteurs d'origine génétique dans les semaines suivant la naissance ; et les souris *balb/c* après photolésion, suite à une exposition des animaux à une lumière de 2000 lux continue pendant 8 jours.

Les animaux étaient ensuite sacrifiés à différents temps après transplantation (*i.e.* 1 semaine, 2 semaines, 1 mois et 2 mois). Après fixation des tissus, la rétine était coupée en fines tranches sur toute son épaisseur. Chaque coupe de rétine était ensuite analysée par la technique d'immunocytochimie afin d'étudier la localisation des cellules injectées dans la rétine, ainsi que leur état de différenciation.

# RESULTATS

# RESULTATS

## **1 Cord blood-derived neurons are originated from CD133+/CD34-stem/progenitor cells in a cell to cell contact dependent manner**

**Vincent Zangiacomi**, Norbert Balon, Stéphane Maddens, Valérie Lapierre, Pierre Tiberghien, Remy Schlichter, Claudine Versaux-Botteri, Frédéric Deschaseaux

*Stem Cells Dev. 2008 Oct;17(5):1005-16.*

## INTRODUCTION

Le sang de cordon ombilical est particulièrement riche en cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques. Ces caractéristiques en font une alternative de plus en plus utilisée en clinique pour les transplantations allogéniques dans le cadre du traitement de certaines hémopathies, en particulier en cas de non-compatibilité tissulaire des donneurs dans la famille proche (Rodriguez 2007). De nombreux travaux ont précédemment décrit la possibilité d'obtenir des cellules neuronales fonctionnelles à partir des cellules totales du sang de cordon ombilical humain. Cependant, le phénotype originel exact de ces cellules n'a pas encore clairement défini. Les seules pistes résidaient dans la possibilité de différencier *in vitro* les cellules CD34<sup>+</sup> du sang placentaire en neurones (Chen, Hudson et al. 2005; Buzanska, Jurga et al. 2006). Les cellules souches étant les plus à même de donner lieu à des cellules autres qu'hématopoïétiques, nous nous sommes donc intéressés aux compartiments souches caractérisés par l'expression du CD133 et du CD34 et à leur possible différenciation neuronale *in vitro*.

# Cord Blood-Derived Neurons Are Originated from CD133+/CD34 Stem/Progenitor Cells in a Cell-to-Cell Contact Dependent Manner

Vincent Zangiacomi,<sup>1,4</sup> Norbert Balon,<sup>1,4</sup> Stéphane Maddens,<sup>2–4</sup> Valérie Lapierre,<sup>2–4</sup> Pierre Tiberghien,<sup>2,4</sup> Remy Schlichter,<sup>5</sup> Claudine Versaux-Botteri,<sup>1,4,6</sup> and Frédéric Deschaseaux<sup>2,4</sup>

Previous studies described that neurons could be generated *in vitro* from human umbilical cord blood cells. However, there are few data concerning their origin. Notably, cells generating neurons are not well characterized. The present study deals with the origin of cord blood cells generating neurons and mechanisms allowing the neuronal differentiation. We studied neuronal markers of both total fractions of cord blood and stem/progenitor cord blood cells before and after selections and cultures. We also compared neuronal commitment of cord blood cells to that observed for the neuronal cell line SK-N-BE(2). Before cultures, neuronal markers are found within the total fraction of cord blood cells. In CD133+ stem/progenitor cell fraction only immature neuronal markers are detected. However, CD133+ cells are unable to give rise to neurons in cultures, whereas this is achieved when total fraction of cord blood cells is used. In fact, mature functional neurons can be generated from CD133+ cells only in cell-to-cell close contact with either CD133– fraction or a neurogenic epithelium. Furthermore, since CD133+ fraction is heterogenous, we used several selections to precisely identify the phenotype of cord blood-derived neuronal stem/progenitor cells. Results reveal that only CD34– cells from CD133+ fraction possess neuronal potential. These data show the phenotype of cord blood neuronal stem/progenitor cells and the crucial role of direct cell-to-cell contact to achieve their commitment. Identifying the neuron supporting factors may be beneficial to the use of cord blood neuronal stem/progenitor cells for regenerative medicine.

## Introduction

**H**UMAN UMBILICAL CORD BLOOD (HUCB) is an interesting source of hematopoietic stem/progenitor cells [1,2] already used for the treatment of several blood-related diseases [3,4]. Recently, it was observed that HUCB contains other types of stem progenitor cells with the ability to differentiate into nonhematopoietic cells, such as mesenchymal stem cells, which can give rise to bone, cartilage, and muscle [5,6]. Indeed, using a multiple-step protocol for cultures, adherent cells expressing neuronal class III  $\beta$ -tubulin and MAP2 proteins [7,8] as well as glial-specific proteins such as glial fibrillary acid protein (GFAP) [7–9], have been identified. Thus, transplantation of cord blood cells would offer

an attractive route for repairing injuries of the central nervous system. In order to evaluate these properties *in vivo*, HUCB cells were used in xenografts models. When injected without an immuno-suppression protocol into the anterior part of the subventricular zone in developing rat brains, cultured HUCB survived 1 month after transplantation. Some cells were positive for GFAP or expressed  $\beta$ -tubulin III [10]. Fresh HUCB also displays a regenerative potential, or a protective role for neurodegenerative diseases such as amyotrophic lateral sclerosis (ALS) [11] or retinitis pigmentosa [12]. In addition, HUCB cells were efficient in the regeneration of neurons *in situ* when infused after cerebral stroke diseases in mice [13,14] despite experiments showing that host immune

<sup>1</sup>Neurogenèse et Processus Intégratifs dans l'Olfaction, Laboratoire de Neurosciences, Université de Franche-Comté, Besançon, France.

<sup>2</sup>INSERM, Université de Franche-Comté, Etablissement Français du Sang Bourgogne Franche-Comté, Besançon, France.

<sup>3</sup>Unité de Thérapie Cellulaire et Génique, Etablissement Français du Sang Bourgogne Franche-Comté, Besançon, France.

<sup>4</sup>Ingénierie et Biologie Cellulaire et Tissulaire, Université de Franche-Comté, Besançon, France.

<sup>5</sup>Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Dept. Nociception et Douleur, INSERM, CNRS-Université Louis Pasteur, Strasbourg, France.

<sup>6</sup>Centre des Cordeliers, INSERM, Paris, France.

cells are able to reject injected cells. Indeed, Kosłowska et al. [15] observed that the number of donor-derived neurons decreased after 1 month of transplantation whereas adverse host reaction developed an acute rejection of grafted cells. Nevertheless, the origin of such cells with the ability to differentiate into neural cells and the conditions permitting their differentiation, have not yet been clearly defined.

The membrane marker CD133 molecule (Prominin-1) is specifically expressed on neuroblastoma, hematopoietic and neural stem/progenitor cells [16–19]. Stem cells isolated directly from fresh human fetal brain were shown to express the CD133 molecule but were CD34 and CD45 negative [20]. These CD133<sup>+</sup> neural stem cells generated neurospheres in cultures, then differentiated into both neurons and glial cells.

The aim of this study was to evaluate the capacity and conditions for stem/progenitor cells from HUCB to give rise to neural cells *in vitro*.

## Materials and Methods

### Source of cells

All cord blood samples ( $n = 89$ ) were provided by the Unité de Thérapie Cellulaire et Génique, Etablissement Français du Sang/Bourgogne Franche-Comté in compliance with ethical guidelines. Mononuclear HUCB cells were isolated using a Ficoll density gradient protocol (Ficoll Paque Plus™ 1.077 g/ml, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA).

The ARPE-19 human retinal pigment epithelial cell line and the SK-N-BE(2) neuroblastoma cell line were both obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). ARPE-19 cells were cultured in DMEM/F12 medium (Gibco Invitrogen, Cergy Pontoise, France) with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (StemCell Technologies, Vancouver, Canada). SK-N-BE(2) cells were expanded in an undifferentiated state in DMEM / F12 with 10% FBS. To induce neuronal differentiation, cells were cultured in serum-free conditions for at least 5 days according to previously published protocols [21,22].

### CD133<sup>+</sup> and CD34<sup>+</sup> cell selection

Whole mononuclear HUCB cell fractions were enumerated and then fractionated using an immunomagnetic labeling technique. According to the manufacturer's procedures, CD133<sup>+</sup> progenitor cells were isolated using the direct CD133<sup>+</sup> selection kit protocol (Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Germany) and CD34<sup>+</sup> progenitor cells using the indirect CD34<sup>+</sup> selection kit protocol (Miltenyi Biotec). CD133<sup>+</sup>/CD34<sup>−</sup> progenitor cells were also isolated by using first the CD34<sup>+</sup> selection kit, then the nonretained CD34<sup>−</sup> fraction underwent secondary selection with the CD133<sup>+</sup> selection kit. Negative fractions (CD133<sup>−</sup>, CD34<sup>+</sup> or CD34<sup>−</sup> cells) were also conserved for the investigations.

### Neuronal differentiation inducing media

We used protocols derived from previous studies [23–25]. In brief, the different populations of HUCB cells were plated first on culture flasks (Becton Dickinson, Franklin

Lakes, NJ, USA) or into eight-chamber-slides-Labtek® (Nunc, Naperville, IL, USA) in a selection medium containing DMEM, L-glutamine 2 mM, Glucose 1,000 mg/L (Gibco Invitrogen) supplemented with 10% FBS. After 24 h, the selection medium was removed and replaced by a proliferation serum-free condition medium that consisted of Neurobasal-A medium supplemented with "N2 supplement" (Gibco Invitrogen) plus 20 ng/ml epidermal growth factor (EGF) and 20 ng/ml basal fibroblast growth factor (bFGF) (AbCys, Paris, France). After 10 days of culture, a third medium was used for neuronal differentiation, consisting of Neurobasal-N2 containing 0.5 μM all-trans-retinoic acid (RA) plus 100 ng/ml β-nerve growth factor (β-NGF) or 20 ng/ml brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (AbCys). HUCB cells were also cultured in Neurobasal-A medium supplemented with "B27 supplement" (Gibco Invitrogen) plus EGF 20 ng/ml and bFGF 20 ng/ml (AbCys, Paris, France). Single floating neurospheres were picked up on five occasions using micropipette under microscopic visualization. The cells were then either replated into chamber slides (Labtek) or cultured on ARPE-19 cells using neuronal differentiation medium. The colonies were also subjected to immunofluorescence staining procedures.

### Cell-tracking protocol

After the stem/progenitor cells selection, the retained (CD133<sup>+</sup> or CD34<sup>+</sup> cells) and nonretained (CD133<sup>−</sup> or CD34<sup>−</sup> cells) cell fractions were labeled. For the first part of the experiment, CD133<sup>+</sup> cells were labeled with PKH26 red fluorescent membrane tracer (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and CD133<sup>−</sup> cells were labeled with PKH67 green fluorescent membrane tracer (Sigma-Aldrich). To study neural protein expression, CD133<sup>+</sup> cells were labeled by green PKH67 and cocultured with unstained CD133<sup>−</sup> cells. For the second part of the experiment, labeling was performed on CD34<sup>+</sup> progenitors using red PKH26 membrane tracer whereas CD34<sup>−</sup> cells were labeled with green PKH67 membrane tracer. For the third part of the experiment, CD133<sup>+</sup>/CD34<sup>−</sup> progenitors were labeled with green PKH67 membrane tracer. Labeled CD133<sup>+</sup> and CD34<sup>+</sup> cells were cultured alone or cocultured with their respective negative fraction (CD133<sup>−</sup> or CD34<sup>−</sup> cells) in the ratio 0.7–3% as previously evaluated in whole mononuclear cells fraction prior to their selection.

### Cultures and cocultures assays

ARPE-19 cell line was expanded until cells formed a stromal monolayer in chamber slides. Then PKH26 (red) prelabeled CD133<sup>+</sup> cells or PKH67 (green) floating neurosphere-like colonies were seeded on the ARPE-19 stroma in Neurobasal-N2 medium containing 0.5 μM all-trans-RA plus 20 ng/ml BDNF for 3 weeks and cells were further analyzed by immunochemistry.

CD133<sup>+</sup> purified cells were cocultured with either CD133<sup>−</sup>, whole mononuclear HUCB cell fractions, or ARPE-19 cells but also cocultured separately by a semi-permeable membrane (Transwell 0.4 μm, Nunc, Corning Incorporated, Corning, NY, USA). Cells were assessed using

our standard culture protocol for 28 days and then analyzed by immunochemistry.

### Immunofluorescent staining

For neural staining (intracellular proteins), cells cultured in LabTek were washed twice in phosphate buffered saline (PBS; Sigma-Aldrich) and fixed in PBS/3.7% formaldehyde (FA) (Sigma-Aldrich) for 20 min at 4°C and permeabilized with PBS/0.1% triton X100 (Sigma-Aldrich) for 10 min at room temperature. Cells were then washed and incubated for 2 h at 4°C with mouse monoclonal primary antibodies anti-*nestin* (MAB1259, 5 µg/ml; R&D Systems, Lille, France), *vimentin* (MAB3400, 5 µg/ml; Chemicon international, Chandlers Ford, UK), *GFAP* (MAB3402, 1/1,000; Chemicon International) and  $\beta$ -*tubulin III* (MAB1637, 1/200; Chemicon International) or with rabbit monoclonal primary antibody *NF200* (N-4142, 1/200; Sigma-Aldrich). After several washes, cells were incubated 1 h with the appropriate secondary antibody: anti-mouse antibody (Ab) conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC) (115-096-062, 1/200; Jackson Immunoresearch Laboratories, Suffolk, UK), anti-mouse Ab conjugated to phycoerythrin (PE) (115-116-068, 1/200; Jackson Immunoresearch Laboratories), anti-mouse Ab conjugated to thiorhodamine isothiocyanate (TRITC) (115-026-003, 1/200; Jackson Immunoresearch Laboratories), anti-rabbit Ab conjugated to FITC (111-096-003, 1/200; Jackson Immunoresearch Laboratories), anti-rabbit Ab conjugated to PE (111-116-144, 1/200; Jackson Immunoresearch Laboratories) or anti-rabbit Ab conjugated to TRITC (111-026-003, 1/200; Jackson Immunoresearch Laboratories). For membrane staining, cells were incubated 1 h at 4°C with monoclonal anti-CD34-PE (130-081-002, 1/200; Miltenyi Biotec), CD34-FITC (130-081-001, 1/200; Miltenyi Biotec), CD133-PE (130-090-853, 1/200; Miltenyi Biotec), CD45-FITC (854.301.010, 1/200; Diaclone Research, Besançon, France). For nuclear DNA staining, cells were incubated with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) for 5 min (D8417, 1/5,000; Sigma-Aldrich). Cells were then washed and viewed under fluorescent microscope (Olympus, Fluoview™ FV1000). Floating colonies or single floating cells after staining were spun down on glass slides (800 rpm, 5 min) and then analyzed. Positive controls for neuronal protein expression were performed using differentiated neuroblastoma SK-N-BE(2) cells. Negative controls with anti-human IgG1 antibodies were used to discard false positive cells within immunofluorescent staining (857.071.010 or 857.072.010, 1/200; Diaclone research).

### Flow-cytometry analysis

To assess the sorting, selected cells were stained by both relevant monoclonal antibodies PE-conjugated AC133/2-PE antibody (130-090-853, 1/200; Miltenyi Biotec) and FITC-conjugated CD34-FITC (AC136) (130-081-001, 1/200; Miltenyi Biotec) or similarly conjugated isotype-matched Ab (857.071.010 or 857.072.010, 1/200; Diaclone Research) (30 min, 4°C). Cells were analyzed on a FACSort flow cytometer with CellQuest software (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France). Cytometry analyses revealed that 95 ±

5% ( $n = 21$ ) of the selected cells were CD133+ within the selected fraction. Inversely, no CD133+ cells were detected within the CD133- rejected fraction. Furthermore, within the isolated CD133+ cell fraction, >95% cells ( $95.6 \pm 1.2\%$ ;  $n = 4$ ) also expressed the CD34 membrane marker.

### Calcium imaging assays

[Ca<sup>2+</sup>] imaging is used to monitor activity of neurons [26,27]. In order to test the functionality of neuronal cells obtained in vitro, fluorometric measurements of the intracellular [Ca<sup>2+</sup>] were processed with confocal imaging experiments using the Fluo4 calcium indicator. Cord blood cells and SK-N-BE(2) cells were cultured in chamber-slides-Labtek® (Nunc) specially designed for in vivo microscopic observations. Fluo4-AM (stock solution in DMSO 1 mM) (Molecular Probes, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) was diluted to a final concentration of 3 µM with 20% (w/v) pluronic acid in a "loading buffer solution" (NaCl 135 mM, KCl 5 mM, glucose 10 mM, HEPES 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, pH = 7.4). Differentiated cord blood cells and SK-N-BE(2) cells were then loaded with the Fluo4-AM (3 µM) containing solution for 1 h at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. "Loading buffer solution" was removed and cells were washed several times and incubated in the buffer free of Fluo4-AM for a further 30 min. Then, confocal microscope acquisitions were realized (FV-1000, Olympus). Live images and fluorometric measurement data related to the intracellular [Ca<sup>2+</sup>] were recorded (emission at 520 nm). Cells were stimulated with a perfusion of "stimulation buffer" solution (NaCl 90 mM, KCl 50 mM, glucose 10 mM, HEPES 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, pH = 7.4). Negative controls were realized by stimulating cells with a buffer lacking calcium (PBS calcium and magnesium free) or by stimulating cells with a "stimulation buffer" solution containing cadmium 100 µM (CdCl<sub>2</sub>, voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel inhibitor).

### Reverse-transcript polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNAs were isolated from SK-N-BE(2) cell line (as a positive control), whole mononuclear and CD133+ cells fractions using RNA Now solution (Ozyme, St Quentin, France). Primers were synthesized by Proligo (Sigma-Proligo, Paris, France). The specific oligonucleotide primers for the *GAPDH* gene were: TGA AGG TCG GAG TCA ACG GAT TTG G (sense) and CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC CAC (antisense), for the *nestin* gene: AGG ATG TGG AGG TAG TGA GA (sense) and TGG AGA TCT CAG TGG CTC TT (antisense), for the *Nf-m* (270 kDa) gene: GAG CGC AAA GAC TAC CTG AAG A (sense) and CGA CTC TAG CTC GAT GCT CTT G (antisense), for the *MAP2c* gene: TCA GAG GCA ATG ACC TTA CC (sense) and GTG GTA GGC TCT TGG TCT TT (antisense) and for the *GFAP* gene: GTG GGC AGG TGG GAG CTT GAT CT (sense) and CTG GGG CGG CCT GGT ATG ACA (antisense). cDNAs were synthesized according to the manufacturer's standard procedures. The PCR reaction mixture contained 0.7 ml (30 pmol/ml) of the above specific primers, 0.5 ml (5 U/ml) Taq DNA polymerase, 5 ml 4XdNTP (20 mM), 5 ml 10× buffer, 10 ml MgCl<sub>2</sub> (10 mM), 5 ml cDNA



and 23.1 ml ddH<sub>2</sub>O. The conditions used were: denaturation at 94°C for 5 min; annealing at 60°C (for *GAPDH*, *NF-M* and *nestin*) and 65°C (for *GFAP* and *MAP2*) for 30 s; extension at 72°C for 30 s, 30 cycles, and finally heating at 72°C for 7 min. The PCR products were resolved on a 2% agarose gel with ethidium bromide (Sigma-Aldrich). Results were observed and photographed by BIO-PRINT (Photosynthesis Systems, Paris, France).

### Western blotting

Proteins were extracted from whole mononuclear cells fraction or SK-N-BE(2) cells (used as a positive control for neural proteins expression) by using a lysis buffer containing 10 mM Tris, pH 7.4, 1% SDS, 1.0 mM sodium orthovanadate (Sigma-Aldrich). Several aliquots were prepared for the total protein content estimation using Bio-Rad assay® protocol (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Aliquots corresponding to 25 ng of proteins for each sample were separated by SDS-PAGE (10%) under reducing conditions and transferred electrophoretically to nitrocellulose filters. Membranes were dried and then hydrated and washed twice in PBS/5% Tween 20 (PBST; Sigma-Aldrich). Nonspecific binding of antibody was blocked with incubation in 5% nonfat dry milk for at least 3 h at 4°C. Membranes were then incubated overnight with the antibody (MAB377, anti-NeuN clone A60, Chemicon International) in the appropriate amount in PBST/5% nonfat dry milk. Membranes were washed twice in PBST, then three times in PBST/20% dimethylsulfoxide (B Braun Medical, Boulogne, France), and were incubated with a Goat-Anti-mouse-HRP antibody (BioRad) for 1 h at ambient temperature. Membranes were then washed twice in PBST. Colorimetric detection was performed using the Opti-4CN substrate (BioRad). Development was stopped by gentle washing in water. The monoclonal antibody AC15 (AbCys) recognizes  $\beta$ -actin protein as internal standard control.

## Results

### *HUCB cells express neuronal proteins before culture*

Although it was previously shown that neural cells were produced in vitro from HUCB, we investigated the possibility of such cells being present prior to culture. Thus, we looked for the presence of neuronal proteins within the whole fraction of mononuclear HUCB. As markers for immature neurons, we examined nestin [28] (a reliable marker for central nervous system progenitor cells) and *map2c* [29] (a *map2* isoform that is found preferentially in immature neurons). As markers for mature neurons, we used NF-M and NF-200 [30] (found in mature neurons), NeuN [31] (a postmitotic neuron-specific nuclei molecule) and  $\beta$ -tubulin III (a component of neuronal microtubules exclusively expressed in mature neurons). Finally, the glial marker GFAP (expressed in immature neural cells and mature glial cells) was also tested. As shown in Figure 1, we detected both immature (*nestin*, *map2c*) and mature (*nf-m*) neuronal-specific markers using RT-PCR (Fig. 1A), as well as the 66 kDa isoform of NeuN by using Western blotting (Fig. 1B). The glial GFAP marker was

barely detected in both RT-PCR (data not shown) and immunofluorescence experiments ( $1.0\% \pm 0.3$ ;  $n = 8$ ).

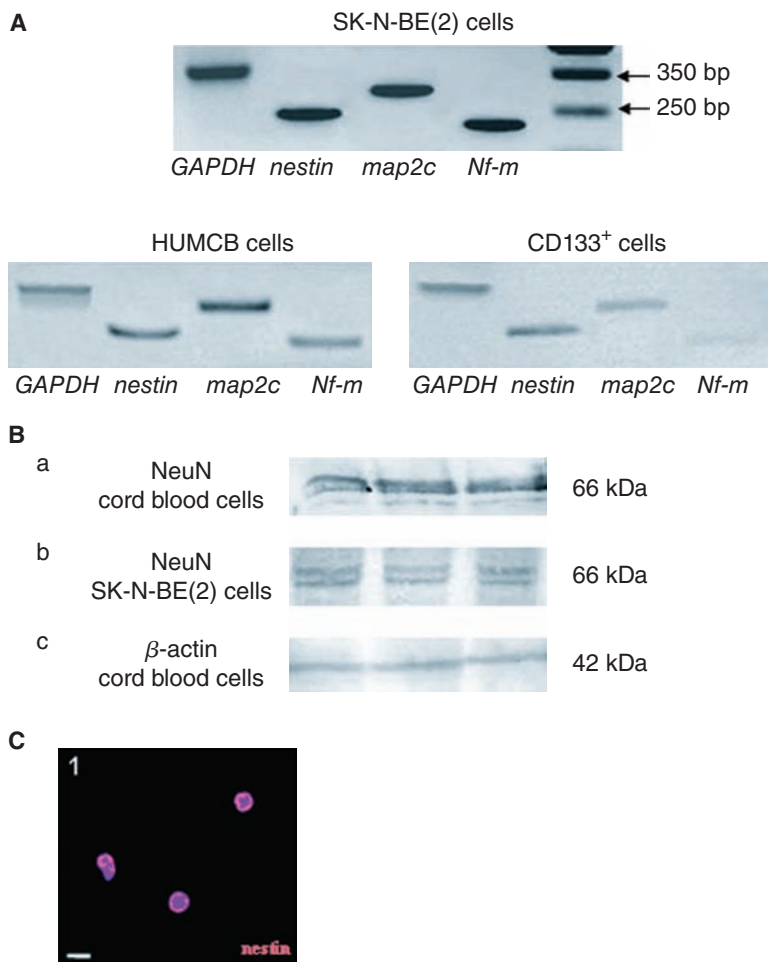
We selected cells positive for the cell surface protein CD133. CD133 is specifically expressed on the membrane of neuroblastoma, hematopoietic and neural stem/progenitor cells [16,17,19,32]. After isolation, we obtained highly purified CD133+ fractions ( $>95\%$ ,  $n = 29$ ). We then checked expression of the same neuronal markers in HUCB stem/progenitor cells as used above. RT-PCR analysis showed bands corresponding to *nestin* and *map2c* mRNAs, whereas *nf-m* mRNA was barely detected (Fig. 1A). Therefore, only immature neuronal markers were expressed by CD133+ cells. Since the CD133+ cell fraction represented a rare population among mononuclear HUCB cells ( $0.9\% \pm 0.2$ ;  $n = 29$ ), we used immunofluorescence rather than western blotting for the detection of neuronal proteins. Whilst it was possible to detect nestin within CD133+ cells ( $85.3\% \pm 5.7$ ;  $n = 10$ ), we were unable to detect NF200 or  $\beta$ -tubulin III (Fig. 1C). Of note, a scarce population of GFAP immunoreactive cells was observed ( $5.2\% \pm 4.8$ ;  $n = 10$ ). In conclusion, prior to culture, both immature and mature neuronal markers were detected in the whole fraction of mononuclear HUCB cells, whereas only immature neuronal markers were found in the CD133+ stem/progenitor cell fraction.

### *HUCB-derived neurons develop in vitro*

The whole fraction of mononuclear HUCB cells was subjected to a three-step culture assay. As described earlier by Sanchez-Ramos [25], the culture protocols included the initial immersion of cells in selection medium for 24 h, subsequently in a proliferation-inducing medium for 9 days, and finally in a differentiation-inducing medium containing all-trans-RA and  $\beta$ -NGF or BDNF (see Materials and Methods). In all experiments, at the end of proliferation stages (i.e., day 10), it was possible to detect adherent cells with neurites ( $0.1\% \pm 3.10^{-5}$ ;  $n = 18$ ) (Fig. 2A). These neurites extended up to day 30 when cells were cultured in complete differentiation-inducing medium (Fig. 2A). At this time, to assess the neuronal phenotype, RT-PCR (Fig. 2B), western blotting (Fig. 2C) and in situ immunofluorescence assays were performed (Fig. 2D). As shown in Fig. 2B, the neuronal markers *nestin*, *map2c*, and *nf-m* mRNAs were detected by RT-PCR. Immunofluorescence microscopy showed that cells with neurites expressed nestin, vimentin, NF200, and  $\beta$ -tubulin III microtubule protein (Fig. 2D, Panel A and B). This feature was also detected in differentiated SK-N-BE(2) neuroblastoma cells used as a positive control (Fig. 2D, Panel C). A few GFAP-positive cells were found with immunofluorescence assays (Fig. 2D). Interestingly, whereas only the 66 kDa NeuN isoform was observed in mononuclear cord blood cells before culture (see above, Fig. 1B), after induction of differentiation, we detected three different NeuN isoforms of 66, 48, and 46 kDa (Fig. 2C). This shift in NeuN isoforms was also detected for the neuroblastoma SK-N-BE(2) cell line following differentiation (Fig. 2C).

Since CD133 is also a marker of hematopoietic stem/progenitor cells, we looked for resting hematopoietic cells within cultures by expression of CD45. As shown on Fig. 2D (Panel B), CD45 was expressed only by round cells that were





**FIG. 1.** Neural protein expression by whole mononuclear HUCB cell fractions and CD133<sup>+</sup> cells on Day 0 before culture. **(A)** RT-PCR analyses were performed on mRNAs extracted from both whole mononuclear cell fractions and purified CD133<sup>+</sup> cells just after collection ( $n = 10$ ). The SK-N-BE(2) human neuroblastoma cell line was used as a positive control. *nestin* (250 bp), *map2c* (320 bp), and *Nf-m* (231 bp) mRNAs were expressed in mononuclear cell fractions, whereas CD133<sup>+</sup> cells expressed only *nestin* and *map2c*. *Nf-m* mRNA was almost absent in CD133<sup>+</sup>. **(B)** Proteins from mononuclear cells were extracted, separated by SDS-PAGE, and transferred electrophoretically ( $n = 10$ ). On Day 0, mononuclear cells expressed the 66 kDa isoform of the NeuN protein as found for SK-N-BE(2) cells used as a positive control. The  $\beta$ -actin protein was used as a loading control. **(C)** A representative experiment out of 10 of immunofluorescence characterization of CD133<sup>+</sup> cells showing expression of neural antigens before culture. The nucleus of whole cells was labeled by DAPI (blue). (1–2): CD133<sup>+</sup> cells expressed nestin protein on Day 0 before culture. Scale bar = (1) 10  $\mu$ m.

negative for NF200 and  $\beta$ -tubulin III. By contrast, cells positive for neuronal proteins were immunonegative for CD45 (Fig. 2D; Panel B). Therefore, cord blood-derived neurons were present in cultures following differentiation and did not retain any classic residual hematopoietic markers.

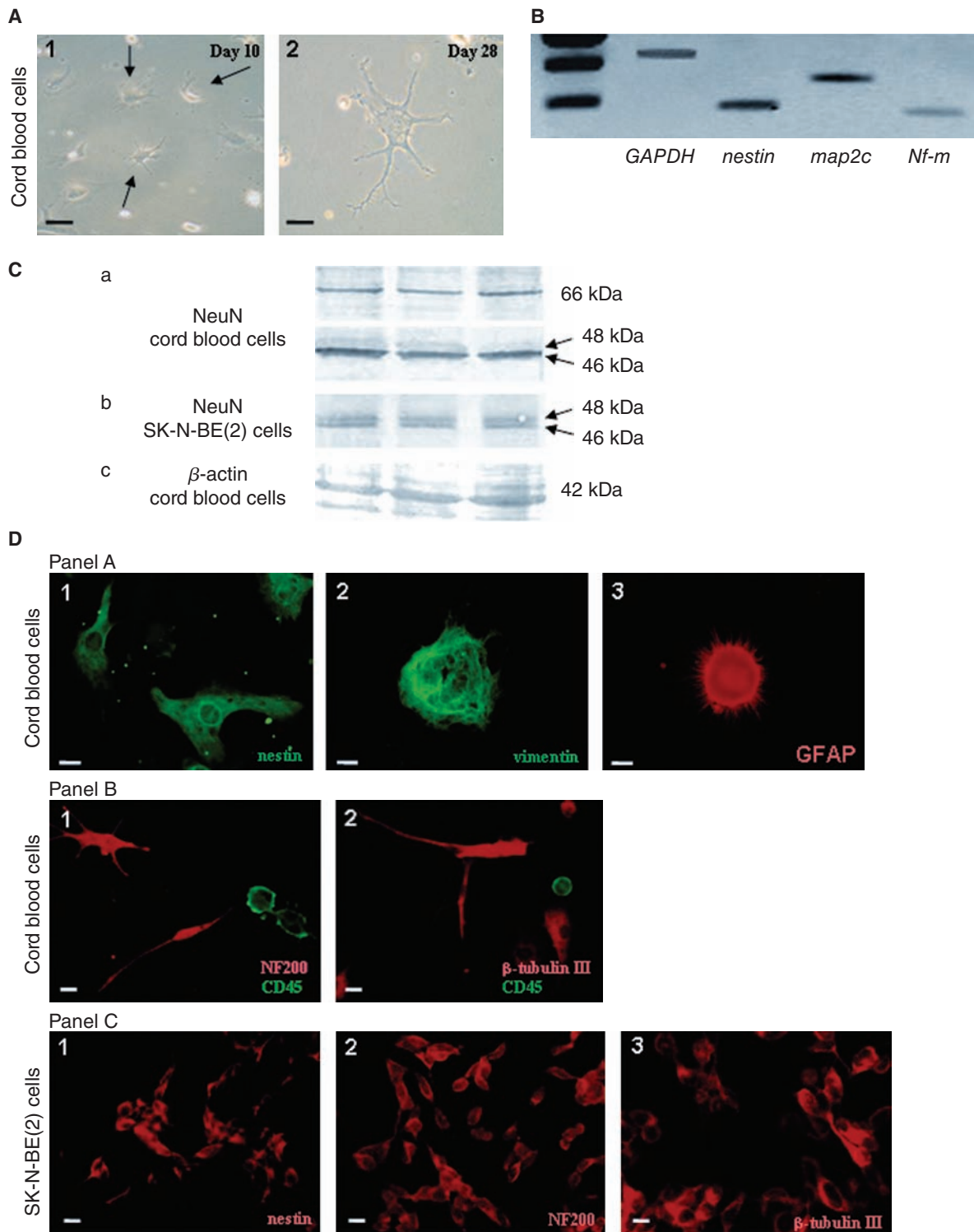
#### CD133<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> cells as the cellular origin of cord blood-derived neurons

We next sought to find the cellular source of cord blood-derived neurons. CD133<sup>+</sup> and CD133<sup>-</sup> fractions were isolated from HUCB cells and then cultured under neuronal-inducing conditions ( $n = 15$ ). In contrast to whole mononuclear HUCB cell fractions, neither CD133<sup>+</sup> nor CD133<sup>-</sup> isolated fractions generated adherent cells with neuronal feature in culture. We hypothesized that separation of CD133<sup>+</sup> and CD133<sup>-</sup> fractions before culture had a negative impact on neuronal commitment by depleting specific cells crucial for inducing proliferation and differentiation. Therefore, we decided to recombine the isolated CD133<sup>+</sup> and CD133<sup>-</sup> fractions and to follow their development in culture. After separation, CD133<sup>+</sup> cells were stained with a red fluorescent dye (PKH26), whereas CD133<sup>-</sup> cells were stained with a green fluorescent dye (PKH67). These

two labeled fractions were then reassembled prior to their culture into neuronal-inducing conditions ( $n = 10$ ). After 28 days of culture, the neuronal differentiation potential was restored since adherent cells with neurites and expression of neuronal markers were observed. It was noteworthy that only red fluorescent CD133<sup>+</sup> derived cells exhibited neurites (Fig. 3A). These data suggested that only the CD133<sup>+</sup> fraction contained cells with neuronal potential.

To assess further the neuronal differentiation properties of CD133<sup>+</sup> cells, isolated CD133<sup>+</sup> cells were labeled with PKH67 and cocultured with unlabeled CD133<sup>-</sup> cells. Detection of neuronal proteins was performed using secondary antibodies conjugated to red fluorophores. After 28 days of culture, cells were fixed and incubated with antineuronal antibodies. As shown in Fig. 3B, cells positive for nestin, NF200 and  $\beta$ -tubulin III were also stained by PKH67, signifying that they derived from the CD133<sup>+</sup> fraction. We were not able to detect CD133 on these differentiated cells (data not shown) suggesting that they downregulate CD133 expression during differentiation. Thus, differentiated neuronal cells were generated in vitro from CD133<sup>+</sup> progenitor cells only when these progenitors were cocultured with the CD133<sup>-</sup> cell fraction.

Data from an earlier report [33] showed that cord blood-derived neurons were generated from the CD34<sup>-</sup> fraction.



**FIG. 2.** Neuronal proteins expression by cord blood cells in cultures at Day 28. (A) Cord blood cells were expanded and differentiated in neuronal-inducing conditions. From Day 10 (1) to Day 28 (2), neurites (arrows) emerged and extended from cord blood cells. Scale bar = (Day 10) 40  $\mu$ m, (Day 28) 20  $\mu$ m. (B) RT-PCRs were performed on cord blood cells after 28 days of culture. *Nestin*, *map-2c*, and *Nf-m* mRNAs were expressed in cultured cord blood cells. The figure depicts a representative experiment out of 10. (C) Western blot analyses were processed on differentiated cord blood cell protein extracts on Day 28. Cultured cord blood cells (a) expressed three different isoforms (66, 48, and 46 kDa) of the specific neuronal nuclear protein NeuN, as found for differentiated SK-N-BE(2) cells (b).  $\beta$ -actin was used as a loading control (c). The figure depicts a representative experiment out of 10. (D) Cultured cord blood cells on Day 28 and differentiated SK-N-BE(2) cells were assessed for

(Continued)

In our study, the majority (95%) of CD133+ cells were also CD34+. Therefore, we sought to refine the source of cord blood-derived neurons based on CD34 expression. CD34+ and CD34- cells were isolated and either separately or collectively subjected to the three-step culture protocol. As observed for CD133+ cells, we were unable to observe neuronal cells in dishes containing only CD34+ cells. However, cells exhibiting neurites and expressing neuronal proteins were observed for CD34- fraction-derived cultures with no significant difference in cloning efficiency ( $0.1 \pm 1.10^{-5}$ ;  $n = 8$ ) compared to whole mononuclear HUCB cell cultures (Fig. 3B). Furthermore, when CD34+ and CD34- cells were labeled by the different PKH fluorescent dyes prior to their reassembling in cocultures, we observed that neuronal cells were only generated from CD34- cells (Fig. 3C). Therefore, CD34+ cells were not necessary for commitment of neuronal differentiation and cord blood-derived neurons originated from CD34- cells.

Since we found that neurons were derived from the CD133+ fraction, we directly isolated CD133+/CD34- progenitors. Selected cells were then labeled with PKH67 and subjected to the neuronal-inducing culture protocols either with or without unlabeled CD133- cells. After 28 days of culture, all PKH67-positive cells expressed neuronal molecules such as NF200 and  $\beta$ -tubulin III (Fig. 3D). On the other hand, CD133+/CD34- cells cultured alone did not give rise to neurons.

Taken together, these results not only demonstrate that neuronal cells are generated from CD133+/CD34- progenitors in vitro, but also that they require coculture with CD133- cells to undergo neuronal differentiation.

#### *Cord blood-derived neuronal differentiation requires intimate cell-to-cell contact*

Since cord blood-derived stem/progenitor cells needed to be cocultured with the CD133- fraction to generate neurons, we questioned whether the CD133- fraction could be substituted by a neurogenic epithelium. Prelabeled CD133+ purified cells were cultured directly on a human retinal pigment epithelium cell line (ARPE-19) ( $n = 5$ ). Within the cocultures, CD133+ cells survived for at least 3 weeks and expressed neuronal proteins such as NF200 and  $\beta$ -tubulin III (Fig. 4). In parallel, isolated CD133+ cells were cultured in conditioned media derived from cultured whole mononuclear HUCB cells, CD133- isolated cells or ARPE-19 ( $n = 5$ ). We also used a semipermeable membrane system (Transwell) to separately coculture CD133+ and neurogenesis-supporting cells ( $n = 5$ ). In no case were we able to

observe neuronal differentiation as seen in positive controls (close contact conditions), suggesting that stem/progenitor cells were able to generate neurons only in close contact with neurogenesis-supporting cells.

#### *Cord blood cells are able to generate neurospheres*

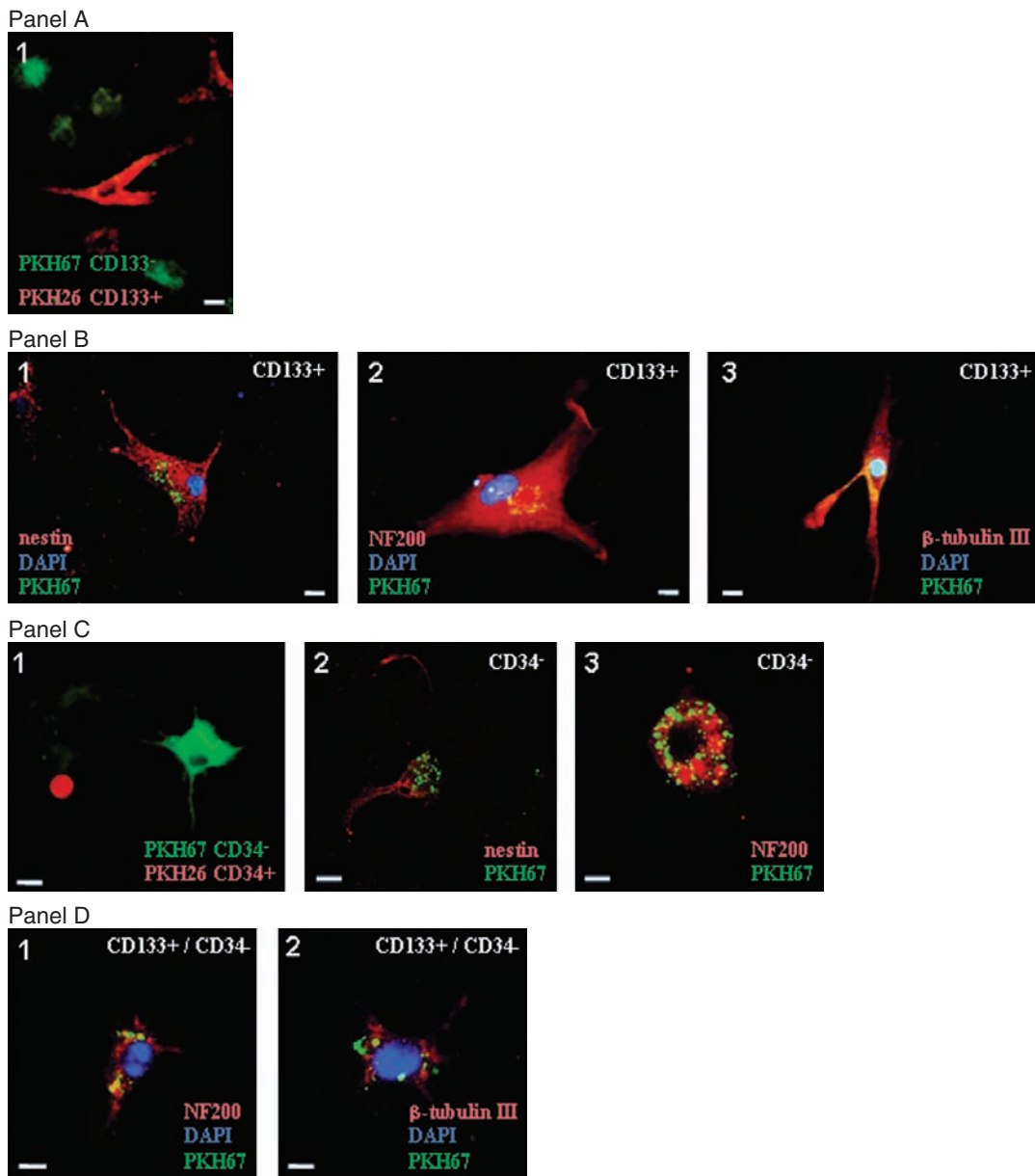
Since neuronal progenitors give rise to floating colonies called neurospheres, we evaluated this potential in cord blood cells. Floating neurosphere-like colonies were observed, but were significantly larger in B27-supplemented medium than in N2-supplemented medium (Fig. 5A). Interestingly, after their recovery and fixation, all these colonies expressed nestin and many cells within colonies still expressed CD133 after 6 days in vitro (Fig. 5A). We then picked up colonies using micropipette under microscopic visualization and cultured them in neuronal-differentiation inducing medium. After differentiation, neurosphere-derived cells expressed neuronal-specific proteins such as NF200 and  $\beta$ -tubulin III (data not shown). In addition, prelabeled floating neurospheres were cocultured on the ARPE-19 cell line, and after 21 days in culture, many cells emitted neurites and expressed neuronal proteins (Fig. 5B). Therefore, cord blood cells were able to generate neurospheres containing CD133+ progenitors with neuronal potential.

#### *Cord blood-derived neurons are functional*

By using a nonimmortalized cord blood-derived cell line, Sun et al. [34] obtained neurons in vitro expressing voltage- and ligand-gated channels. In addition, calcium-activated potassium currents were seen only within fully mature cord blood-derived neurons as found in other neuronal systems. We then evaluated these capacities by scrutinizing intracellular  $[Ca^{2+}]$  flux in both cord blood-derived neurons and differentiated SK-N-BE(2) cells (as positive control) using scanning confocal microscopy ( $n = 5$ ). In both types, neurons loaded with Fluo4-AM exhibited increased fluorescence following 100 mM KCl treatment, which activates voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channels (Fig. 6). This increased fluorescence was directly related to  $Ca^{2+}$  channel permeability due to KCl stimulation. Control experiments included both incubating cells with 100  $\mu$ M cadmium ( $CdCl_2$ ), a voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channel inhibitor, and omission of  $Ca^{2+}$  in the medium. Under these conditions, variations in  $Ca^{2+}$  permeability were not observed. Therefore, cord blood-derived neurons were able to respond to KCl voltage-dependent channel activation as observed for neurons.

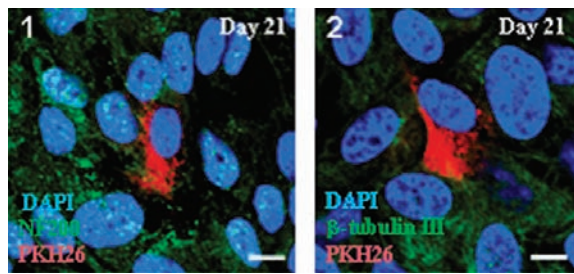
---

the expression of neuronal-specific proteins by using in situ immunofluorescence. One representative experiment out of 15 is shown. Panel A: Some cord blood cells were immunopositive for the intermediate filament proteins nestin, vimentin, or GFAP. Scale bar = (1) 5  $\mu$ m, (2) 3  $\mu$ m and (3) 5  $\mu$ m. Panel B: Staining of either NF200 or  $\beta$ -tubulin III (red) and hematopoietic CD45 (green) proteins were performed. Cells with neuron-like morphology were CD45 negative but positive for both NF200 and  $\beta$ -tubulin III, whereas round cells were only positive for CD45. Scale bar = 10  $\mu$ m. Panel C: Immunofluorescence characterization of differentiated SK-N-BE(2) cells used as a positive control for neuronal protein expression. SK-N-BE(2) cells were positive for the intermediate filament protein nestin as well as NF200 and  $\beta$ -tubulin III. Scale bar = (1-2) 10  $\mu$ m and (3) 5  $\mu$ m.



**FIG. 3.** Cellular origin of cord blood-derived neurons. Cord blood cells were analyzed after 28 days in culture. Representative experiments out of 10 are shown. Panel A: CD133+ cells were labeled by red fluorescent dye (PKH26) and then cocultured with green fluorescent CD133- cells (PKH67). After induction of differentiation, neuritis was observed for CD133+ derived cells (PKH26) whereas those deriving from the CD133- fraction remained round (PKH67). Scale bar = 8  $\mu$ m. Panel B: In order to study neuronal protein expression, CD133+ cells were labeled with green fluorescent dye (PKH67), and neural antibody staining was visualized with red fluorophore-conjugates. The CD133+/PKH67+ cells were then cocultured with unlabeled CD133- cells. The nucleus of whole cells was labeled by DAPI (blue). PKH67+ cells derived from CD133+ cells were positive for nestin (1), NF200 (2), and  $\beta$ -tubulin III (3). Colocalisation of red and green labeling in panels 2 and 3 appears yellow. Scale bar = (1 and 3) 5  $\mu$ m, (2) 3  $\mu$ m. Panel C (1): CD34+ cells were labeled with red fluorescent dye (PKH26) and then cocultured with CD34- PKH67+ cells (green). PKH67-labeled cells with neuritis were obtained exclusively from CD34+ derived cells. Small round feature of PKH26+ cells (red) from the CD34+ fraction suggested a hematopoietic origin. (2 and 3): As described above, CD34- cells were labeled by green fluorescent dye (PKH67), permitting their characterization by red tagged antibodies after the differentiation processes. PKH67+ cells derived from CD34- fraction expressed nestin (2) and NF200 (3) proteins. Scale bar = (1) 10  $\mu$ m, (2) 5  $\mu$ m, and (3) 3  $\mu$ m. Panel D (1 and 2): Directly selected CD133+/CD34- progenitor cells were tagged by PKH67 molecules that permitted characterization by red tagged antibodies after culture ( $n = 7$ ). Cells were then cocultured with the remaining nonlabeled CD133- fraction. CD133+/CD34- PKH67+ cells with neurites (green) expressed the neuronal NF200 (1) and  $\beta$ -tubulin III (2) markers (red) ( $n = 3$ ). Scale bar = 5  $\mu$ m.



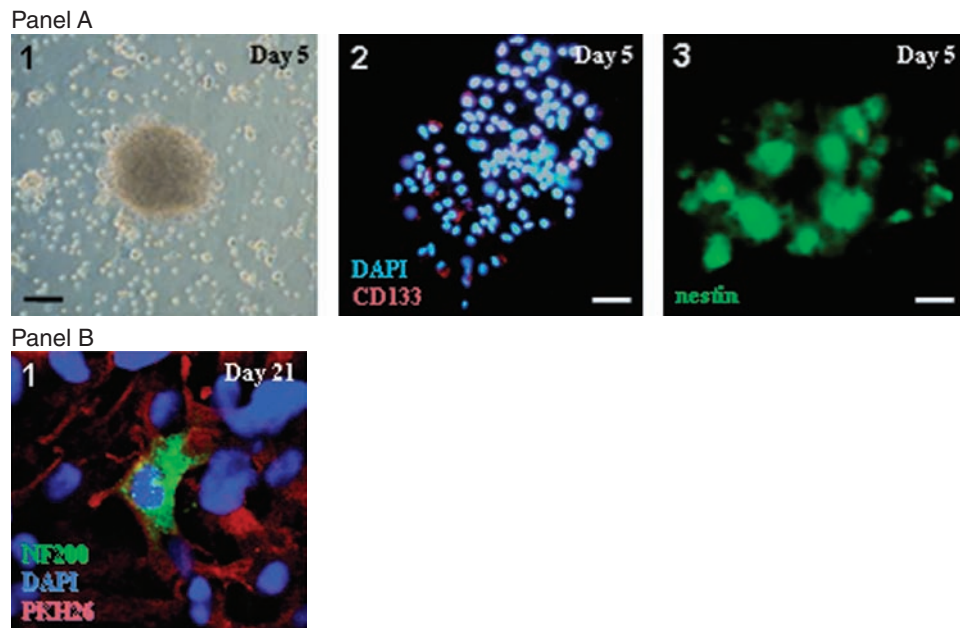


**FIG. 4.** Cord blood cells require close cell-to-cell contact to permit neuronal differentiation. Cord blood cells were cocultured on the human retinal pigment epithelium cell line ARPE-19 appearing as cuboidal cells by immunofluorescence microscopy. PKH26 prelabeled purified CD133+ cells (red) were cocultured on ARPE-19 cells and assessed for neuronal differentiation ( $n = 5$ ). After 21 days of culture, CD133+ cells survived and expressed NF200 (1) and  $\beta$ -tubulin III (2) (green). Within these neuronal-inducing conditions, RPE cells (green) were found to be NF200 and  $\beta$ -tubulin III immuno-positive as well. Scale bar = (1) 5  $\mu$ m and (2) 3  $\mu$ m.

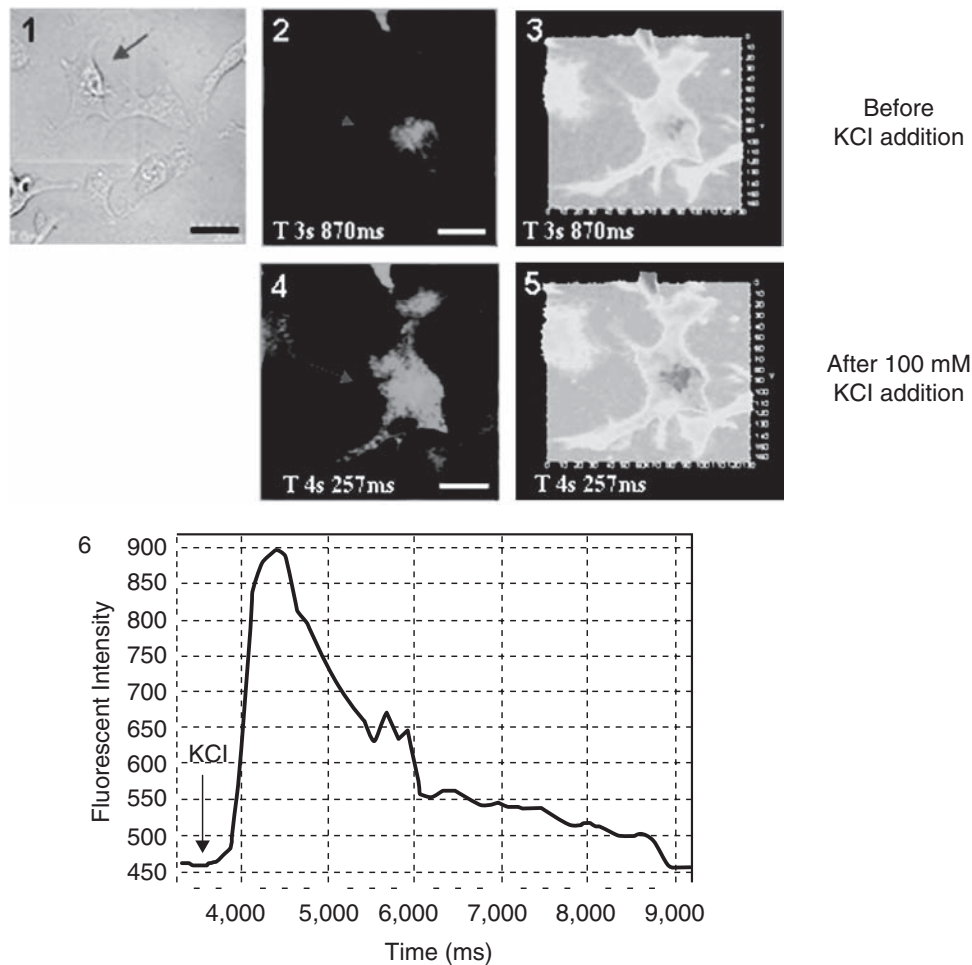
## Discussion

In the present study, we examined the cellular origin of HUCB-derived neurons and the conditions necessary for their generation. We demonstrated that cells expressing markers of immature neurons were present within

the CD133+ fraction. These stem/progenitor cells required coculture under close cell-cell interactions with either the CD133- fraction or neurogenic epithelium cells to give rise to neurons. The characteristics of cord blood neuronal stem/progenitor cells are in accordance with central nervous system stem/progenitor (CNSSP) cells in several ways. First, we assumed that like CNSSP cells, such cord blood stem/progenitor cells also express the prominin molecule CD133. CD133 was shown initially to be specific for primitive hematopoietic stem/progenitor cells and retinoblastoma-derived cells. This molecule has since been detected on neural stem cells and developing epithelium. Indeed, Uchida et al. [20] demonstrated that single-cell suspensions from human fetal brain tissue expressing CD133 were able to form neurospheres and to differentiate into either neurons or astrocytes. On the other hand, sorted CD133- cells remained as a single-cell suspension, failed to initiate neurospheres, and eventually died. Furthermore, it is well known that CD133 is highly specific to the stem cell phenotype and that committed cells do not express it [35,36]. Since we found neuronal potential in the CD133+ cells, and such cells lost CD133 expression when committed, there is phenotypic similarity between neuronal stem/progenitor cells of cord blood and neuronal stem cells from CNS. We also characterized the phenotype of such progenitor cells since they were found exclusively within the CD133+/CD34- cell fraction. This is in accordance with previous data showing that neuronal potentials were restricted to cord blood CD34- fraction [37]. Another feature of neuronal stem/progenitor cells is their ability to



**FIG. 5.** Cord blood cells were assessed for their capacities to produce neurospheres. Panel A: At Day 5, cord blood cells formed neurosphere-like floating colonies in Neurobasal-A medium supplemented with B27-supplement (1). These neurospheres contained highly immature cells since we detected cells positive for CD133 (2). All cells within neurospheres were positive for nestin (3). Scale bar = (1) 160  $\mu$ m, (2) 50  $\mu$ m, and (3) 30  $\mu$ m. One representative experiment out of five is shown. Panel B: Cord blood cells from neurospheres were labeled by PKH67 (green) and screened for neuronal differentiation when cocultured on ARPE-19 stromal cells ( $n = 5$ ). Neurosphere-derived cells were found to be immunopositive for NF200 (red) after 21 days of culture. Within these neuronal-inducing conditions, RPE cells (red) were NF200 immuno-positive too. Scale bar = 5  $\mu$ m.



**FIG. 6.** Functional evaluation of cord blood-derived neurons. Cells were loaded with Fluo4-AM and intracellular  $[Ca^{2+}]$  increase, monitored by transient changes in fluorescence intensity, was recorded just after addition of 100 mM KCl in the vicinity of cells ( $n = 5$ ) (5). (1–5): The image shows a representative experiment ( $n = 5$ ). Red arrows in phase contrast image indicates cell used for the fluorescent intensity measurements depicted on fluorescence scanning images before (2–3) and after KCl addition (4–5). (6): Fluorescence intensity measured within the cytoplasm of the cell. The profile of this trace shows increasing fluorescence related to transient calcium permeability (2 s). Black arrow indicates when KCl was added in the vicinity of cells ( $t = 3.5$  s). Scale bar = (1) 20  $\mu$ m and (2 and 4) 10  $\mu$ m.

form neurospheres in vitro, even though neurospheres do not necessarily indicate that cells are derived from a pure stem/progenitor cell population [38]. We observed that neurospheres containing nestin+ and CD133+ cells were able to differentiate into neurons. This is in accordance with previous reports describing the potential of cord blood stem/progenitor cells to generate neurospheres containing uncommitted cells [23,37]. Nevertheless, contrary to multipotential NSC from CNS, we were unable to convincingly generate mature GFAP+ astrocytes from HUCB CD133+ cells defining them as unipotential stem/progenitor cells. On the other hand, the difficulties in obtaining astrocytic cells in culture from stem/progenitor cells have been described earlier in literature. By using NSC-enriched fractions such as the multipotential cell line HUCB-NSC [39], neuronal fate was promoted compared to astrocytic lineage. HUCB-NSC cells were cocultured with neonatal rat cortex and a decrease in

members of GFAP+ cells was observed, whereas neurons were easily obtained. In addition, no astrocytic cells were detected within hippocampal organotypic cocultures containing HUCB-NSC cell line. Finally, to induce astrocytic cell fate, HUCB-NSC cells need to be cultured with Platelet Derived Growth Factor-BB (PDGF-BB) [40]. Therefore, it would be interesting to assess whether CD133+ cells under astrocytic conditions (e.g., with PDGF-BB) can differentiate into mature GFAP+ astrocytes.

Our experiments using transwells showed that cord blood neuronal stem/progenitor cells needed to be in close contact with stromal cells or CD133- cells to differentiate into neurons. This phenomenon has been observed earlier: Chen et al. [23] showed that CD133+ cord blood cells when cultured alone failed to generate colonies with neural potential. In order to define effective in vitro protocols to induce neuroglial differentiation of bone marrow stem cells, Bossolasco

et al. [41] cultured mesenchymal stem cells and CD90+ cells under several conditions. They observed that bone marrow cells required cell–cell contact in coculture systems to be effective in inducing a neuro-glial phenotype. Notably, they underlined the crucial role of astroglial cells in this mechanism. This is in agreement with reports showing that adult GFAP+ astroglial cells are capable of regulating neurogenesis by instructing stem cells to adopt a neuronal fate in vitro and in vivo [42]. Therefore, we hypothesized that failure of HUCB to give rise to neurons was because of the lack of GFAP+ cells in both CD133+ and CD133+/CD34– fractions. On the other hand, we detected GFAP+ cells within the CD133– fraction. This may explain why CD133– cells were able to drive CD133+/CD34– HUCB progenitors toward a neuronal lineage. Stem cell maintenance and self-renewal are thought to be dependent on Notch and mitogen signaling [43]. Buzanska et al. [33] demonstrated that expression of Notch in HUCB-NSC cells emphasized their stemness. Notch is a cell surface protein interacting with its cognate ligands Delta or Jagged present on adjacent cells. In a neural stem cells niche, the signal-sending cells positive for Notch ligands are GFAP+ astrocytes [44]. Therefore, under appropriate conditions, HUCB NSC can generate CD133–/GFAP+ astrocytic cells that in turn allow neuronal commitment of NSC through Notch/Jagged pathway. In addition, our results suggest that the nonneuronal ARPE-19 cell line can also be used as neuron-supporting cells. It would be interesting to assess expression of Notch, Delta and Jagged in ARPE-19 cell line, CD133+ and CD133– cord blood cells. Finally, we observed a differential display of NeuN isoforms according to the neuronal differentiation state. NeuN is a postmitotic marker of neuronal cells in which 48 and 46 kDa isoforms are related to terminally differentiated neurons lacking the potential for mitosis [45,46]. In agreement, our results showed that only committed neuronal cells express these isoforms, irrespective of their origin: cord blood or SK-N-BE(2) cell line. In addition to 48 and 46 kDa isoforms, we observed a 66 kDa isoform in immunoblots of uncommitted and differentiated neuronal cells. The 66 kDa isoform has previously been used to characterize neurons [31]. Although its role has not yet been defined, NeuN is detected in the developing nervous system but regulation of its expression is poorly understood. Several data suggest a relationship between a down-regulation of NeuN in spinal cord-derived neurons and aging [47]. Therefore, NeuN could be used as a novel differentiated neuronal marker for HUCB-derived neurons, and the isoform expression profile can indicate stages of neuronal commitment.

In conclusion, we defined the conditions necessary to generate neurons in vitro from cord blood stem/progenitor cells. These data and other previously published findings support the possibility of HUCB use in cell therapy applied to neurodegenerative disease. Further investigations are needed to better define cellular and molecular mechanisms, in particular their role in cell-to-cell contact for maintaining neurogenic potential of cord blood cells.

### Acknowledgments

We would like to thank Pr Michelle Jouvenot and Dr Pascale Adami (EA3922 Estrogènes, Expression Génique

et Pathologies du Système Nerveux Central; Université de Franche-Comté; IFR133; Besançon) for providing us the neuroblastoma SK-N-BE(2) cell line. We would like to acknowledge Pr Francine Behar-Cohen and Pr Jean-Claude Jeanny (U598 Mécanismes moléculaires et cellulaires du vieillissement de la rétine; Université Paris V; IFR58 ; Paris) for providing us the ARPE-19 cell line and Pr David Hicks for critically reading the manuscript.

### References

1. Fibbe WE, WA Noort, F Schipper and R Willemze. (2001). Ex vivo expansion and engraftment potential of cord blood-derived CD34+ cells in NOD/SCID mice. *Ann NY Acad Sci* 938:9–17.
2. Hao QL, AJ Shah, FT Thiemann, EM Smogorzewska and GM Crooks. (1995). A functional comparison of CD34+ CD38– cells in cord blood and bone marrow. *Blood* 95:3745–3753.
3. Cohen Y and A Nagler. (2004). Umbilical cord blood transplantation—how, when and for whom? *Blood Rev* 18:167–179.
4. Sanz MA and GF Sanz. (2002). Unrelated donor umbilical cord blood transplantation in adults. *Leukemia* 16:1984–1991.
5. Lee OK, TK Kuo, WM Chen, KD Lee, SL Hsieh and TH Chen. (2004). Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 103:1669–1675.
6. Moise KJ Jr. (2005). Umbilical cord stem cells. *Obstet Gynecol* 106:1393–1407.
7. Bicknese AR, HS Goodwin, CO Quinn, VC Henderson, SN Chien and DA Wall. (2002). Human umbilical cord blood cells can be induced to express markers for neurons and glia. *Cell Transplant* 11:261–264.
8. Buzanska L, EK Machaj, B Zablocka, Z Pojda and K Domanska-Janik. (2002). Human cord blood-derived cells attain neuronal and glial features in vitro. *J Cell Sci* 115:2131–2138.
9. Sanchez-Ramos JR, S Song, SG Kamath, T Zigova, A Willing, F Cardozo-Pelaez, T Stedeford, M Chopp and PR Sanberg. (2001). Expression of neural markers in human umbilical cord blood. *Exp Neurol* 171:109–115.
10. Zigova T, S Song, AE Willing, JE Hudson, MB Newman, S Saporta, J Sanchez-Ramos and PR Sanberg. (2002). Human umbilical cord blood cells express neural antigens after transplantation into the developing rat brain. *Cell Transplant* 11:265–274.
11. Garbuzova-Davis S, AE Willing, T Zigova, S Saporta, EB Justen, JC Lane, JE Hudson, N Chen, CD Davis and PR Sanberg. (2003). Intravenous administration of human umbilical cord blood cells in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: distribution, migration, and differentiation. *J Hematother Stem Cell Res* 12:255–270.
12. Lund RD, S Wang, B Lu, S Girman, T Holmes, Y Sauvé, DJ Messina, IR Harris, AJ Kihm, AM Harmon, FY Chin, A Gosiewska and SK Mistry. (2007). Cells isolated from umbilical cord tissue rescue photoreceptors and visual functions in a rodent model of retinal disease. *Stem Cells* 25:602–611.
13. Peterson DA. (2004). Umbilical cord blood cells and brain stroke injury: bringing in fresh blood to address an old problem. *J Clin Invest* 114:312–314.
14. Sanberg PR, AE Willing, S Garbuzova-Davis, S Saporta, G Liu, CD Sanberg, PC Bickford, SK Klasko and NS El-Badri. (2005). Umbilical cord blood-derived stem cells and brain repair. *Ann NY Acad Sci* 1049:67–83.
15. Kozłowska H, J Jabłonka, M Janowski, M Jurga, M Kossut and K Domańska-Janik. (2007). Transplantation of a novel human cord blood-derived neural-like stem cell line in a rat model of cortical infarct. *Stem Cells Dev* 16:481–488.
16. Bonanno G, A Perillo, S Rutella, DG De Ritis, A Mariotti, M Marone, F Meoni, G Scambia, G Leone, S Mancuso and



- L Pierelli. (2004). Clinical isolation and functional characterization of cord blood CD133+ hematopoietic progenitor cells. *Transfusion* 44:1087–1097.
17. Delfini C, F Centis, F Falzetti and A Tabilio. (2002). Expression of CD133 on a human cell line lacking CD34. *Leukemia* 16:2174–2175.
  18. Shmelkov SV, R St Clair, D Lyden and S Rafii. (2005) AC133/CD133/Prominin-1. *Int J Biochem Cell Biol* 37:715–719.
  19. Yin AH, S Miraglia, ED Zanjani, G Almeida-Porada, M Ogawa, AG Leary, J Olweus, J Kearney and DW Buck. (1997). AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 90:5002–5012.
  20. Uchida N, DW Buck, D He, MJ Reitsma, M Masek, TV Phan, AS Tsukamoto, FH Gage and IL Weissman. (2000). Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:14720–14725.
  21. Biedler JL and BA Spengler. (1976). A novel chromosome abnormality in human neuroblastoma and antifolate-resistant Chinese hamster cell lines in culture. *J Natl Cancer Inst* 57:683–695.
  22. Biedler JL, S Roffler-Tarlov, M Schachner and LS Freedman. (1978). Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res* 38:3751–3757.
  23. Chen N, JE Hudson, P Walczak, I Misiuta, S Garbuzova-Davis, L Jiang, J Sanchez-Ramos, PR Sanberg, T Zigova and AE Willing. (2005). Human umbilical cord blood progenitors: the potential of these hematopoietic cells to become neural. *Stem Cells* 23:1560–1570.
  24. Ha Y, JE Lee, KN Kim, YE Cho and DH Yoon. (2003). Intermediate filament nestin expressions in human cord blood monocytes (HCMNCs). *Acta Neurochir (Wien)* 145:483–487.
  25. Sanchez-Ramos JR. (2002). Neural cells derived from adult bone marrow and umbilical cord blood. *J Neurosci Res* 69:880–893.
  26. Maravall M, ZF Mainen, BL Sabatini and K Svoboda. (2000). Estimating intracellular calcium concentrations and buffering without wavelength ratioing. *Biophys J* 78:2655–2667.
  27. Svoboda K, Denk W, Kleinfeld D, Tank DW. (1997). In vivo dendritic calcium dynamics in neocortical pyramidal neurons. *Nature* 385:161–165.
  28. Lendahl U, LB Zimmerman and RD McKay. (1990). CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60:585–595.
  29. Garner CC and A Mathus. (1988). Different forms of microtubule-associated protein 2 are encoded by separate mRNA transcripts. *J Cell Biol* 106:779–783.
  30. Tojima T, Y Yamane, M Takahashi and E Ito. (2000). Acquisition of neuronal proteins during differentiation of NG108–15 cells. *Neurosci Res* 37:153–161.
  31. Lind D, S Franken, J Kappler, J Jankowski and K Schilling. (2005). Characterization of the neuronal marker NeuN as a multiply phosphorylated antigen with discrete subcellular localization. *J Neurosci Res* 79:295–302.
  32. Shmelkov SV, L Jun, R St Clair, D McGarrigle, CA Derderian, JK Usenko, C Costa, F Zhang, Z Guo and S Rafii. (2004). Alternative promoters regulate transcription of the gene that encodes stem cell surface protein AC133. *Blood* 103:2055–2061.
  33. Buzanska L, M Jurga, EK Stachowiak, MK Stachowiak and K Domanska-Janik. (2006). Neural stem-like cell line derived from a non-hematopoietic population of human umbilical cord blood. *Stem Cells Dev* 15:391–406.
  34. Sun W, L Buzanska, K Domanska-Janik, RJ Salvi and MK Stachowiak. (2005). Voltage-sensitive and ligand-gated channels in differentiating neural stem-like cells derived from the nonhematopoietic fraction of human umbilical cord blood. *Stem Cells* 23:931–945.
  35. Florek M, M Haase, AM Marzesco, D Freund, G Ehninger, WB Huttner and D Corbeil. (2005). Prominin-1/CD133, a neural and hematopoietic stem cell marker, is expressed in adult human differentiated cells and certain types of kidney cancer. *Cell Tissue Res* 319:15–26.
  36. Yu Y, A Flint, EL Dvorin and J Bischoff. (2002). AC133-2, a novel isoform of human AC133 stem cell antigen. *J Biol Chem* 277:20711–20716.
  37. Habich A, M Jurga, I Markiewicz, B Lukomska, U Bany-Laszewicz and K Domanska-Janik. (2006). Early appearance of stem/progenitor cells with neural-like characteristics in human cord blood mononuclear fraction cultured in vitro. *Exp Hematol* 34:914–925.
  38. Cai J, TL Limke, I Ginis and MS Rao. (2003). Identifying and tracking neural stem cells. *Blood Cells Mol Dis* 31:18–27.
  39. Domanska-Janik K, A Habich, A Sarnowska and M Janowski. (2006). Neural commitment of cord blood stem cells (HUCB-NSC/NP): therapeutic perspectives. *Acta Neurobiol Exp* 66:279–291.
  40. Buzanska L, M Jurga and K Domanska-Janik. (2006). Neuronal differentiation of human umbilical cord blood neural stem-like cell line. *Neurodegenerative Dis* 3:19–26.
  41. Bossolasco P, L Cova, C Calzarossa, SG Rimoldi, C Borsotti, GL Deliliers, V Silani, D Soligo and E Polli. (2005). Neuro-glial differentiation of human bone marrow stem cells in vitro. *Exp Neurol* 193:312–325.
  42. Song H, CF Stevens and FH Gage. (2002). Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* 417:39–44.
  43. Ma DK, GL Ming and H Song. (2005). Glial influences on neural stem cell development: cellular niches for adult neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 15:514–520.
  44. John GR, SL Shankar, B Shafiq-Zagardo, A Massimi, SC Lee, CS Raine and CF Brosnan. (2002). Multiple sclerosis: re-expression of a developmental pathway that restricts oligodendrocyte maturation. *Nat Med* 8:1115–1121.
  45. Weyer A and K Schilling. (2003). Developmental and cell type-specific expression of the neuronal marker NeuN in the murine cerebellum. *J Neurosci Res* 73:400–409.
  46. MullenRJ, CR Buck and AM Smith. (1992). NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 116:201–211.
  47. Portiansky EL, CG Barbeito, EJ Gimeno, GO Zuccolilli and RG Goya. (2006). Loss of NeuN immunoreactivity in rat spinal cord neurons during aging. *Exp Neurol* 202:519–521.

Address reprint requests to:  
 Dr. Frederic Deschaseaux  
 E.F.S. Centre  
 Atlantique  
 1 Bd Tomelle  
 Tours, France

E-mail: frederic.deschaseaux@efs.sante.fr

Received for publication November 20, 2007; accepted after revision January 31, 2008.



# RESULTATS

## **2 Human cord blood-derived hematopoietic and neural-like stem/progenitor cells are attracted by the neurotransmitter GABA**

Vincent Zangiacomi, Norbert Balon, Stéphane Maddens, Pierre Tiberghien,  
Claudine Versaux-Botteri, Frédéric Deschaseaux

***sous presse***

***Stem Cells and Development, accepté le 13/01/09***

## INTRODUCTION

La capacité des cellules souches à migrer est cruciale dans les processus d'homéostasie cellulaire ou de régénération tissulaire après lésion (Wu, Wang et al. 2007). Durant les stades précoces du développement embryonnaire, le GABA joue plusieurs rôles distincts, en particulier sur les précurseurs neuronaux. L'activation séquentielle des récepteurs au GABA permet ainsi la migration des précurseurs neuronaux au sein des différentes couches du cortex cérébral. Plusieurs équipes ayant démontré l'existence de récepteurs au GABA chez des cellules non neuronales, en particulier chez les cellules souches du sang périphérique (Steidl, Bork et al. 2004; Seidel, Niggemann et al. 2007), nous avons recherché, au laboratoire, la présence de tels marqueurs sur les cellules du sang placentaire. Nos résultats ont permis de mettre en évidence : 1) la présence de différentes sous-unités des récepteurs au GABA ; 2) une différence d'expression des récepteurs au GABA en fonction de l'état de maturité des cellules. En effet, les cellules souches CD133+ expriment le récepteur GABA<sub>B</sub> tandis que les cellules non souches expriment également des sous-unités du récepteur GABA<sub>A</sub>. Nous avons également mis en évidence la capacité des cellules du sang placentaire à migrer activement en réponse à un gradient de GABA. Ce phénomène de migration permet d'enrichir la fraction cellulaire en précurseurs neuronaux et hématopoïétiques.

# **Human cord blood-derived hematopoietic and neural-like stem/progenitor cells are attracted by the neurotransmitter GABA**

Vincent Zangiacomi<sup>1,4</sup>, Norbert Balon<sup>4</sup>, Stéphane Maddens<sup>2,3,4</sup>, Pierre Tiberghien<sup>2,4</sup>, Claudine Versaux-Botteri<sup>1,4</sup>, Frédéric Deschaseaux<sup>2,5,†</sup>

1 : INSERM U872, Equipe 17, Centre des Cordeliers, 75006 – Paris, France.

2 : INSERM UMR 645, Université de Franche-Comté, Etablissement Français du Sang Bourgogne Franche-Comté, 25000 – Besançon, France.

3 : AICT, Etablissement Français du Sang Bourgogne Franche-Comté, 25000 – Besançon, France

4 : IFR133 Ingénierie et Biologie Cellulaire et Tissulaire, Université de Franche-Comté, 25000 – Besançon, France.

5 : EFS Centre-Atlantique, EA3855, 37000 – Tours, France.

†Author for correspondence: (email: frederic.deschaseaux@efs.sante.fr )

Correspondance:

Dr Frederic Deschaseaux

EFS Centre-Atlantique, 2 Bd Tonnellé, 37000 Tours

Phone number : 33 2 47 36 01 01

Fax number : 33 2 47 36 01 60

E-mail : frederic.deschaseaux@efs.sante.fr

Running title: GABA can attract immature cord blood cells

Key words: umbilical cord blood, human stem/progenitor cells, GABA, chemotaxis, neuronal differentiation.

## Abstract

Migration of stem/progenitor cells is a crucial event for homing toward tissue where cells need to be renewed. The neurotransmitter gamma-aminobutyric acid (GABA) has been shown to have a crucial role in migration of neuronal stem/progenitor cells. Since human umbilical cord blood (HUCB) contains stem/progenitor cells able to generate either neuronal or hematopoietic cells, we evaluated the effect of GABA on this type of cells. While whole fraction of mononuclear cells expressed GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptor subunits (GABA-R), only GABA<sub>B</sub>-R subunits were found to be expressed on immature CD133<sup>+</sup> cells. Functional experiments revealed that both cell fractions of HUCB were attracted by a gradient of GABA concentration and furthermore were blocked by specific antagonists of GABA<sub>A</sub>R and GABA<sub>B</sub>R bicuculline and saclofen respectively. Moreover, through GABA<sub>B</sub>R activation the migrating fraction was highly enriched by both hematopoietic progenitors and cells able to generate neurons in culture. Therefore, GABA is a potent chemo-attractant of HUCB stem/progenitor cells specifically through GABA<sub>B</sub>R activation.

## Introduction

The ability of stem/progenitor cells to be attracted and to home toward injured sites is crucial for tissue regeneration. This potentiality is a prerequisite to define regenerative stem/progenitor cells [1]. Our team and others have recently highlighted several cord blood cells sub-populations with neuronal differentiation capacities [2-6]. Therefore, cord blood appears to be an interesting cell source for neuronal disorders treatment through regenerative medicine protocols. Nevertheless, very few data dealing with migration potential of cord blood-derived neuronal cells are already available. Previous works described the expression of neurotransmitter proteins notably the gamma amino-butyric acid (GABA) on G-CSF mobilized peripheral blood cells [7, 8] and human cord blood cells [9]. Therefore, these neurotrophic molecules as GABA can also be involved in migration process of both neuronal and non-neuronal cells. GABA intracellular action is mediated throughout three different types of GABA receptors (GABA-Rs) : GABA<sub>A</sub>R, GABA<sub>B</sub>R and GABA<sub>C</sub>R [10-14]. During embryogenesis, GABA-Rs activation can govern neural stem cells migration and lead to central nervous system (CNS) setting up. This neuron motion due to sequential GABA-R activations is essential for functional CNS organization [15-17]. However, GABA role has not yet been clearly defined for non-neuronal cells. Indeed, GABA can inhibit both lymphocytes and SDF-1-induced CD133+ peripheral blood cells migration [8]. On the other hand, neutrophils chemotaxis was shown to be specifically stimulated by GABA through GABA<sub>B</sub> receptor activation to invade ischemic lesion [18]. Therefore, these data prompted us to investigate GABA-related migration activities on human umbilical cord blood (HUCB) stem/progenitor cells.

## **Materials and Methods**

### ***Cord blood cells***

All cord blood samples (n = 62) were provided by the Activité d'Ingénierie Cellulaire et Tissulaire (AICT) department, Etablissement Français du Sang / Bourgogne Franche-Comté according to ethical guidelines. Mononuclear HUCB cells were isolated using a Ficoll density gradient protocol (Ficoll Paque Plus<sup>TM</sup> 1.077 g/mL, *Amersham Biosciences*, Piscataway, NJ USA).

ARPE-19 human retinal pigment epithelial cell line was obtained from the American Type Culture Collection (*ATCC*, Manassas, VA, USA) and cultured in DMEM/F12 medium (*Gibco Invitrogen*, Cergy Pontoise, France) with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (*StemCell Technologies*, Vancouver, Canada).

In order to obtain pure CD133+ cells, whole mononuclear Human Umbilical Cord Blood (HUCB) cell fractions were numerated and then fractionated using an immunomagnetic labelling technique. According to the manufacturer's procedures, CD133+ progenitor cells were isolated using the CD133+ selection kit protocol (*Miltenyi Biotec*, Bergish Gladbach, Germany).

### ***Migration assays***

Migrations assays (n = 26) were conducted in transwell plates with 5- m pore filters (*Nunc*, Corning Incorporated, Corning, NY, USA) previously incubated in FBS in order to explore chemotaxis specifically.  $2 \times 10^5$  mononuclear cells or  $5 \times 10^4$  purified-CD133+ cells were suspended in DMEM / 10% FBS into the upper chamber. To induce a gradient, different concentrations of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA;  $1.10^{-6}$  M – 5 M) diluted in DMEM / 10% FBS were added into the lower compartment of the chamber. Then, in order to improve GABA activity, GABA receptors antagonist effect was assessed by adding 200 M bicuculline methiodide (competitive antagonist for the GABA<sub>A</sub> receptor; B6889, *Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, USA) or

saclofen (competitive antagonist for the GABA<sub>B</sub> receptor; S-166, *Sigma-Aldrich*) to GABA in the lower chamber. According to previous studies, positive controls for migration were processed by adding 100ng/mL Stromal cell Derived Factor-1 (SDF-1) in the lower chamber [19]. Two different negative controls were processed for each sample, by adding the same GABA concentration in both the upper and the lower compartments of the chamber (to cancel GABA gradient) or by omitting GABA within medium in the lower chamber. Our kinetic study determined 12 hours long incubation (+ 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) as the most efficient condition for chemotaxis assays. After incubation, upper chambers were discarded and the number of migrating cells in the bottom of lower compartment (mononuclear or CD133+ cells) was estimated by microscopy on a hemocytometer. All experiments were performed at least in triplicate for each cord blood sample. Migrating and non-migrating mononuclear HUCB cells were subjected to immunophenotypic analysis, co-culture experiments and CFC assays.

### ***Neuronal differentiating medium***

We used protocols previously described [2]. Cells were plated (*Becton Dickinson*, Franklin Lakes, NJ, USA) into 8-chamber-slides-Labtek® (*Nunc*, Naperville, IL, USA) in a selection medium containing DMEM, L-glutamine 2mM, Glucose 1000 mg/L (*Gibco Invitrogen*) supplemented with 10% FBS. After 24 hours, the selection medium was removed and replaced by a proliferation serum-free condition medium which consisted of Neurobasal-A medium supplemented with “N2 supplement” (*Gibco Invitrogen*) plus 20ng/mL Epidermal Growth Factor (EGF) and 20 ng/mL basal Fibroblast Growth Factor (bFGF) (*AbCys*, Paris, France). After 10 days of culture, a third medium was used for neuronal differentiation, consisting of Neurobasal-N2 containing 0.5µM all-trans-retinoic acid (RA) plus 100 ng/mL β-Nerve Growth Factor (β-NGF) or 20 ng/mL Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) (*AbCys*).

### **Cell-tracking protocol and co-cultures assays**

For further immunofluorescent stainings within co-cultures, migrating cells were labelled with PKH67 (green) or PKH26 (red) fluorescent membrane tracer (*Sigma-Aldrich*). ARPE-19 cell line was expanded until cells formed a stromal monolayer in chamber slides. Then, PKH (green or red) pre-labelled migrating or non-migrating cells were seeded on unlabelled ARPE-19 cells. Co-cultures were assessed using our standard culture protocol for 28 days and then cells were analysed by immunochemistry technique.

### **Colony-forming cell assays**

Culture of colony-forming units (CFU) myeloid lineage (CFU-GEMM), CFU granulocyte-macrophage (CFU-GM) and burst-forming units erythroid (BFU-E) was performed using a semi-solid culture medium (Methocult GF H4534; *Stemcell Technologies*), supplemented with EPO (4.5U/mL). Cultures were incubated for 14 days (37°C; 5% CO<sub>2</sub>) then colonies were scored. CFC term included all three types of colony, i.e., CFU-GEMM, CFU-GM and BFU-E.

### **In situ immunofluorescence**

For intracellular proteins staining, cells cultured in LabTek® were washed twice in Phosphate Buffered Saline (PBS ; *Sigma-Aldrich*) and fixed in PBS/3.7% formaldehyde (FA) (*Sigma-Aldrich*) for 20 minutes at +4°C and permeabilized with PBS/0.1% triton X100 (*Sigma-Aldrich*) for 10 minutes at room temperature. Cells were then washed and incubated for 2 hours at +4°C with mouse monoclonal primary antibodies (Ab) anti-nestin (MAB1259, 5 µg/mL; *R&D Systems*, Lille, France), β-tubulin III (MAB1637, 1/200; *Chemicon International*), GABA<sub>A</sub> receptor β-chain (MAB341, 1/500; *Chemicon International*), Talin (sc-59882, 1/200; *Santa Cruz Biotechnology*, Santa Cruz, CA, USA), Vav (sc-17831, 1/200; *Santa Cruz Biotechnology*), with guinea pig monoclonal primary Ab anti-GABA<sub>B</sub> receptor R1a-R1b (AB1531, 1/200; *Chemicon International*)



or with rabbit polyclonal primary Ab anti-GABA (A2052, 1/200; *Sigma-Aldrich*) or NF200 (N-4142, 1/200; *Sigma-Aldrich*). After several washes, cells were incubated 1 hour with the appropriate secondary Ab: anti-mouse Ab conjugated to thiorhodamine isothiocyanate (TRITC) (115-026-003, 1/200; *Jackson ImmunoResearch Laboratories*, Suffolk, UK), anti-mouse Ab conjugated to fluoresceine isothiocyanate (FITC) (IM1621, 1/200; *Beckman Coulter*, Marseille, France), anti-rabbit Ab conjugated to FITC (IM0833, 1/200; *Beckman Coulter*), anti-rabbit Ab conjugated to TRITC (IM0834, 1/200; *Beckman Coulter*) or anti-guinea pig Ab conjugated to Cyanine-5 (Cy5) (111-026-003, 1/200; *Jackson ImmunoResearch Laboratories*). For membrane staining, cells were incubated 1 hour at +4°C with monoclonal anti- CD133-PE (130-090-853, 1/200; *Miltenyi Biotec*), CD45-FITC (854.301.010, 1/200; *Diaclone Research*, Besançon, France), CD133 pure (#130-090-851, 1/200; *Miltenyi Biotec*). For CD133 pure staining, cells were further incubated 30 minutes with the anti-mouse Ab conjugated to FITC. For nuclear DNA staining, cells were incubated with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) for 5 minutes (D8417, 1/5000 ; *Sigma-Aldrich*). Cells were then washed and viewed under fluorescent microscope (*Olympus*, Fluoview™ FV1000). Negative controls with anti-human IgG1 antibodies were used to discard false positive cells within immunofluorescent staining (857.071.010 or 857.072.010, 1/200; *Diaclone research*).

### **Flow-cytometry analysis**

Mononuclear cells were analysed by flow cytometry for membrane protein expression using monoclonal Ab: anti-human CD34-PE (AC136) (130-081-001, 1/200; *Miltenyi Biotec*), AC133/2-PE (130-090-853, 1/200; *Miltenyi Biotec*), GABA<sub>A</sub> receptor  $\beta$ -chain-FITC and GABA<sub>B</sub> receptor R1a-R1b-TRITC. To assess the sorting, selected cells were stained by both relevant monoclonal Ab PE-conjugated AC133/2-PE or similarly conjugated isotype-matched Ab (857.071.010 or 857.072.010, 1/200; *Diaclone Research*) (30 minutes, +4°C). Cells were analysed on a FACSort flow cytometer with CellQuest software (*Becton Dickinson*, Le Pont de Claix, France).

### ***RT-PCR (Reverse-Transcript Polymerase Chain Reaction)***

Total RNAs were isolated from whole mononuclear and CD133+ cells fractions using RNA Now solution (*Ozyme*, St Quentin, France). Primers were synthesized by Proligo (*Sigma-Proligo*, Paris, France). Refer to Table 1 for neurotransmitter receptor genes specific primers used. cDNAs were synthesized according to the manufacturer's standard procedures. The PCR reaction mixture contained 0.7 mL (30 pmol/mL) of the above specific primers, 0.5 mL (5 U/mL) Taq DNA polymerase, 5 mL 4XdNTP (20 mM), 5 mL 10Xbuffer, 10 mL MgCl<sub>2</sub> (10 mM), 5 mL cDNA and 23.1 mL ddH<sub>2</sub>O. The conditions used were: denaturation at +94°C for 5 minutes; annealing at +65°C for 30 seconds; extension at +72°C for 30 seconds, 30 cycles, and finally heating at +72°C for 7 minutes. The PCR products were resolved on a 2% agarose gel with ethidium bromide (*Sigma-Aldrich*). Results were observed and photographed by BIO-PRINT (*Photosynthesis Systems*, Paris, France).

### ***Statistics***

All values were expressed as means ± SD and Anova tests were used to determine the significance of differences among the groups. A value of  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

## Results

### ***HUCB cells expressed different GABA receptors according to cell maturation***

GABAergic markers were analysed in different HUCB mononuclear cells fractions including CD133+ stem/progenitor cells. We first sought to show the presence of different GABA-Receptor isoforms and intracellular GABA within the whole fraction of mononuclear HUCB. We investigated GABA<sub>A</sub>R expression comprising  $\alpha_1$ - $\alpha_6$ ,  $\beta_1$ - $\beta_3$ ,  $\gamma_1$ - $\gamma_3$  and  $\epsilon$  subunits, R<sub>1</sub> (R<sub>1a</sub> and R<sub>1b</sub> isoforms) and R<sub>2</sub> subunits expression for GABA<sub>B</sub>R, and  $\rho$  subunit expression for GABA<sub>C</sub>R. As shown on Fig.1A, using RT-PCR (n=4), we only detected GABA<sub>A</sub>R  $\beta_2$  and  $\gamma_3$  subunits mRNAs and GABA<sub>B</sub>R R<sub>1</sub> subunit mRNA within whole mononuclear HUCB cells. No GABA<sub>C</sub>R  $\rho$  subunit mRNA was observed. We then checked expression of these markers in sorted stem/progenitor CD133+ cells. RT-PCR analysis (n=4) showed only a weak but consistent band corresponding to GABA<sub>B</sub>R R<sub>1</sub> subunit mRNAs (Fig.1A). No other isoform of GABA<sub>A</sub>R, GABA<sub>B</sub>R and GABA<sub>C</sub>R were detected.

By using immunofluorescence technique on whole fraction of mononuclear cells (n=8), we were able to detect some mononuclear cells expressing GABA<sub>A</sub>R subunit, GABA<sub>B</sub>R subunit or both markers, furthermore, cells expressing GABA-R also contained intracellular GABA (Fig.1B: 1-2). Moreover, among cells expressing either GABA<sub>A</sub>R or GABA<sub>B</sub>R or containing intracellular GABA, the majority (75±6%; n=4) retained the classical hematopoietic marker CD45 (Fig.1B: 3-5). To quantify these data, we further used flow cytometry analyses (n=4) which revealed that 1.4±0.3% mononuclear cells expressed GABA<sub>A</sub>R ( $\beta_2$  isoform) and 16.6±2.3% were GABA<sub>B</sub>R positive (R<sub>1a</sub>-b isoforms) (Fig.1C). In addition, almost all mononuclear GABA<sub>B</sub>R positive cells did not co-express GABA<sub>A</sub>R since only 3.8% cells were positive for both GABA<sub>A</sub>R and GABA<sub>B</sub>R (Fig.1C). Co-staining of CD133 (as a stem/progenitor cells marker) and GABA-Rs was also performed (n=5) on HUCB mononuclear cells. Interestingly, as found in RT-PCR experiments, cells expressing

CD133 molecules were shown to only express GABA<sub>B</sub>R proteins (Fig.1D: 1-2). Moreover, some of these CD133<sup>+</sup> cells also contained intracellular GABA (Fig.1D: 3). When sorted, CD133<sup>+</sup> cells were performed for GABA-R proteins expression. Immunofluorescence analyses confirmed that CD133<sup>+</sup> cells expressed GABA<sub>B</sub>R but lacked GABA<sub>A</sub>R (Fig.1D: 4-6). In conclusion, whereas both GABA<sub>A</sub>R and GABA<sub>B</sub>R were found in whole mononuclear HUCB fraction, CD133<sup>+</sup> cord blood stem/progenitor fraction was shown to only express GABA<sub>B</sub>R. In addition, for almost all GABA-R<sup>+</sup> cells, there was an exclusion for the expression of GABA<sub>A</sub>R and GABA<sub>B</sub>R.

### ***HUCB cells were specifically attracted by a gradient of GABA***

We then sought to evaluate the GABA migration inducing effect on both stem/progenitor and whole mononuclear cell fractions. We thus measured chemotaxis of cells toward different GABA gradients. SDF-1 was used as an internal positive control. As shown on figure 2, data revealed a GABA-related chemotaxis effect on whole mononuclear HUCB cells fraction. Two different GABA concentrations were shown to have a major chemotaxis effect. We first observed a slightly but significant chemotaxis effect for 100 $\mu$ M GABA concentration (1.7-fold,  $P < 0.05$ ; Fig. 2A) whereas the stronger chemotaxis effect was observed for 50-100mM GABA concentration (2.7-fold,  $P < 0.05$ ,  $n = 18$ ; Fig.2A). Moreover, no chemotaxis effect was observed when GABA was equally added in both the upper and the lower Boyden chambers or when GABA was omitted (Fig.2A). For further investigations, migration assays using antagonists of GABA-Rs were performed. Both antagonists of GABA<sub>A</sub>R (bicuculline) and GABA<sub>B</sub>R (saclofen) blocked the migration of whole mononuclear HUCB cells fraction (respectively 4.8- and 3.4-fold; Fig.2B). In situ immunofluorescence assays ( $n = 3$ ) revealed that all attracted cells, recovered in the lower chamber after migration assays, expressed either GABA<sub>A</sub>R or GABA<sub>B</sub>R while no GABA receptor subunit was found on non-migrating cells (Fig.2C: 1-2). We then evaluated expression of intracellular molecules involved in cell migration process such as talin and vav [20]. As shown on

Fig.2D, attracted cells expressed significantly more talin and vav than non-attracted cells. Indeed, before migration we detected  $10\pm 2.1\%$  talin-positive and  $5\pm 1.2\%$  vav-positive cells whereas all attracted cells expressed talin and the majority was also vav-positive ( $p<0.01$ ,  $n=4$ ). This underlined an active migration effect of GABA.

Since the type of GABA-R expression depends on the type of HUCB fraction, we next sought to evaluate their respective role in GABA-induced migration mechanisms. After recovering attracted cells, flow cytometry analyses revealed an enrichment in CD133+ stem/progenitor cells within this fraction (0.09% vs. 11.7%,  $n=4$ ; Fig.2E). We then compared the chemotaxis potential of both sorted-CD133+ cells and whole mononuclear HUCB cells (both fractions derived from the same sample) in identical conditions (i.e. 50mM GABA;  $n=4$ ). Data revealed that CD133+ attracted cells rate was 2.8 fold higher than observed for whole mononuclear HUCB cells fraction (Fig.2F). Moreover, GABA<sub>B</sub>R antagonist saclofen partially inhibited (2.4 fold) the migration of CD133+ cells while GABA<sub>A</sub>R antagonist bicuculline did not (Fig.2F). Therefore, these results confirmed that GABA-Rs expressed by HUCB cells were functional and that CD133+ stem/progenitors showed a specific and higher migration capacities in response to in vitro GABA gradient than found for the more mature CD133-negative cells.

### ***Hematopoietic and neural-like origin of migrating cells***

Since CD133+ fractions of HUCB contain cells able to generate either hematopoietic or neural-like cells [2, 21], we assessed GABA attraction on both type of cells. After chemotaxis assays with whole fraction of mononuclear cells, both migrating and non-migrating cells were recovered and then co-cultured in neurogenic conditions with either whole mononuclear HUCB cells or stromal ARPE-19 cells according to in vitro protocols previously described [2]. After 28 days of co-culture the majority of cells seeded died as found in our previous works. In situ immunofluorescence investigations were performed on the resting adherent cells in order to evaluate the expression of

neuronal proteins. Our results revealed that nearly all migrating cells ( $98.2 \pm 0.7\%$ ,  $n=6$ ) and 60% of non-migrating cells ( $59.7 \pm 0.5\%$ ,  $n=6$ ) were positive for neuronal markers such as nestin, NF200 or  $\beta$ -III-tubulin (Fig.3A, 1-6). Therefore, cell fraction responding to GABA-induced chemotaxis was enriched with neural-like cells.

Additionally, hematopoietic progenitor potential of whole mononuclear HUCB cells was also investigated by using a semi-solid culture medium containing hematopoietic cytokines and growth factors. Three different populations of cells were thus evaluated: mononuclear cells before migration, non-migrating and migrating mononuclear cells after migration assays (Fig.4A). Results revealed that migrating cells fraction was enriched with the most immature hematopoietic progenitors (i.e. CFU-GEMM) compared to non-migrating (1.8 fold) cells fraction (i.e. respectively 0.11‰ vs 0.06‰ ; cf. Table2). Therefore, migration process toward a GABA gradient specifically enriched the hematopoietic fraction with the most immature multipotent progenitors (i.e. CFU-GEMM). In conclusion, GABA-related chemotaxis effect specifically targeted the CD133+ stem/progenitor cells fraction of HUCB with either neural-like or hematopoietic potentials.

## Discussion

In the present study, we investigated the expression of GABA receptors on HUCB cells and the role of GABA neurotransmitter on cell migration activity. RT-PCR and immunofluorescence assays showed that mononuclear HUCB cells express both GABA<sub>A</sub>R and GABA<sub>B</sub>R subunits. Our results show expression of the GABA<sub>B</sub>R R1 subunits in both purified-CD133+ and whole mononuclear cells fractions whereas GABA<sub>A</sub>R  $\beta$ 2 and  $\gamma$ 3 subunits were only expressed in whole mononuclear cells fraction. The differential GABA receptors subunits expression according to cell maturation observed in our results is in accordance with previous data. Such results have already been demonstrated for peripheral blood stem/progenitor cells fraction. Indeed, Steidl et al. (2004) and Seidel et al. (2007) previously showed that peripheral blood stem/progenitor CD133+ and CD34+ cells expressed GABA<sub>B</sub>R mRNAs and proteins but lack the GABA<sub>A</sub>R [7, 8]. In addition, Laurie et al (1992) and Ma and Barker (1995) described that GABA<sub>B</sub>R R1 subunits are preferentially localized to presynaptic and postsynaptic membranes in immature neurons from human developing CNS while GABA<sub>A</sub>R  $\beta$ 2 and  $\gamma$ 3 subunits are predominantly expressed in young post-natal neurons [22, 23]. Therefore, exclusive GABA<sub>B</sub>R subunits associated to immature markers such as CD133 could thus be considered as markers of stem/progenitor cells whatever their origin, i.e. cord blood, peripheral blood or from CNS.

Our migration assays showed that mononuclear cord blood cells respond to GABA stimulation for two different GABA concentrations. Whole mononuclear cells were shown to be attracted by a low 100 $\mu$ M GABA concentration but also at higher GABA concentrations (50-100mM) which were determined as the most efficient. This migrating process involving stem cells GABA-Rs activation has been previously described during CNS development [24-28]. Moreover, our results are in accordance with previous studies describing 100 $\mu$ M GABA concentration as a physiological value

[8, 29, 30]. Almost all studies describing in vitro migration assays using GABA were performed using dissociated immature neurons on brain slices [16, 24-28]. Within these studies, Behar et al. described two GABA concentrations (femtomolar and micromolar) as physiological concentrations involved in immature neurons migration. The high GABA concentration effect (millimolar) observed with HUCB cells in our conditions could be due to the origin of cells (i.e. cord blood) comparing to cells from CNS. Further experiments should be driven in these directions to elude those questions.

The migration process observed in our study was clearly specific to GABA neurotransmitter as migrating cells expressed GABA-Rs and furthermore this migration was also inhibited by both inhibitors of the GABA<sub>A</sub>R and GABA<sub>B</sub>R, respectively bicuculline and saclofen. Moreover, this process involves molecules recruitment such as vav and talin. Our results are in accordance with Behar et al. who previously described that GABA<sub>A</sub>R activation had an effect on both chemotaxis and chemokinesis of immature neurons [31]. In our study, GABA<sub>A</sub>R receptor antagonist bicuculline had a stronger inhibitory effect on cell migration than observed in control where GABA was omitted. Thus, bicuculline could perhaps antagonise both chemotaxis and chemokinesis.

Migration process requires complex cytoskeleton reorganization linked to cell movement [20] where vav and talin have a crucial role. We thus decided to observe these proteins within cord blood cells during migration process in our in vitro conditions. We observed that all migrated cells were also strongly positive for both vav and talin reinforcing the fact that GABA-induced migration is a strongly active mechanism. Moreover, our results are also in accordance with previous reports describing that vav expression in hematopoietic cells leads to adherens junction-associated molecules expression such as talin.

Since many cord blood cells expressing GABA-Rs exhibit hematopoietic markers, we sought to evaluate the effect of GABA-related migration on hematopoietic progenitors. Our experiments revealed that CFU-GEMM formation within migrating cells fraction was 1.8-fold higher compared



to the resulting non-migrating fraction. This fits well with our results showing that CD133+ cells, consisting mainly in stem/progenitor cells, were more attracted by GABA than the CD133- cells fraction containing more mature cells. This could also explain the enrichment in cells with neuronal differentiation abilities after migration since we previously demonstrated that cord blood cells with neural-like capacities were also originated from the stem/progenitor CD133+ / CD34- fraction [2]. Moreover, different reports described GABA neurotransmitter as molecules endowed with several functions in immature neuronal cells including proliferation and differentiation inducer [32, 33]. Thus, the role of GABA and its receptors in non-migrating cord blood cells population is certainly related to others functions which should be precised in the future.

Our overall results demonstrate that migration of cord blood cells in response to GABA gradient is an active process involving GABA receptors and cytoskeleton reorganization that can be modulated by GABA concentration, cell maturity or the environmental stimuli. Notably, GABA<sub>B</sub>-R were described on mature hematopoietic cells such as neutrophile inducing their migration toward ischemic lesions [18]. Inversely, during hematopoiesis GABA<sub>B</sub>-R were shown to be preferentially expressed by immature progenitors CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>dim</sup> than in more mature CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>brith</sup> cells. Therefore, regenerative stem/progenitor cells may use different mechanisms according the microenvironment context.

## **Acknowledgements**

We would like to thank Pr Francine Behar-Cohen, Pr Jean-Claude Jeanny and Frédéric Mascarelli (U872 Mécanismes moléculaires et cellulaires du vieillissement de la rétine; Université Paris V; IFR58 ; Paris) for providing us the ARPE-19 cell line.

## References

1. Wu, Y., J. Wang, et al. (2007). "Bone marrow-derived stem cells in wound healing: a review." *Wound Repair Regen* 15 Suppl 1: S18-26.
2. Zangiacomi V, N Balon, S Maddens, V Lapierre, P Tiberghien, R Schlichter, C Versaux-Botteri and F Deschaseaux. (2008). Cord blood-derived neurons are originated from CD133+/CD34-stem/progenitor cells in a cell to cell contact dependent manner. *Stem Cells Dev.* 17:1005-1016.
3. Lee OK, TK Kuo, WM Chen, KD Lee, SL Hsieh and TH Chen. (2004). Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 103:1669-1675.
4. Moise KJ Jr. (2005). Umbilical cord stem cells. *Obstet Gynecol* 106:1393-1407.
5. Domanska-Janik K, A Habich, A Sarnowska, and M Janowski. (2006). Neural commitment of cord blood stem cells (HUCB-NSC/NP): therapeutic perspectives. *Acta Neurobiol Exp.* 66:279-291.
6. McGuckin CP and N Forraz. (2008). Potential for access to embryonic-like cells from human umbilical cord blood. *Cell Prolif Suppl* 1:31-40.
7. Steidl U, S Bork, S Schaub, O Selbach, J Seres, M Aivado, T Schroeder, UP Rohr, R Fenk, S Kliszewski, C Maercker, P Neubert, SR Bornstein, HL Haas, G Kobbe, DG Tenen, R Haas and R Kronenwett. (2004). Primary human CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells express functionally active receptors of neuromediators. *Blood* 104:81-88.
8. Seidel J, B Niggemann, M Punzel, J Fischer, KS Zänker and T Dittmar. (2007). The neurotransmitter GABA is a potent inhibitor of the stromal cell-derived factor-1alpha induced migration of adult CD133+ hematopoietic stem and progenitor cells. *Stem Cells Dev* 16:827-836.
9. Sun W, L Buzanska, K Domanska-Janik, RJ Salvi and MK Stachowiak. (2005). Voltage-sensitive and ligand-gated channels in differentiating neural stem-like cells derived from the nonhematopoietic fraction of human umbilical cord blood. *Stem Cells.*23:931-945.

10. Owens DF and AR Kriegstein. (2002). Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nat Rev Neurosci* 3:715-727.
11. Kaupmann K, K Huggel, J Heid, PJ Flor, S Bischoff, SJ Mickel, G McMaster, C Angst, H Bittiger, W Froestl and B Bettler. (1997). Expression cloning of GABA(B) receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. *Nature* 386:239-246.
12. Billinton A, N Upton and NG Bowery. (1999). GABA(B) receptor isoforms GBR1a and GBR1b, appear to be associated with pre- and post-synaptic elements respectively in rat and human cerebellum. *Br J Pharmacol* 126:1387-1392.
13. LeVine H 3rd. (1999). Structural features of heterotrimeric G-protein-coupled receptors and their modulatory proteins. *Mol Neurobiol* 19, 111-149, 1999
14. Bormann J and A Feigenspan. (1995). GABAC receptors. *Trends Neurosci* 18:515-519.
15. Hatten ME. (1999). Central nervous system neuronal migration. *Annu Rev Neurosci* 22:511-539.
16. Behar TN, AE Schaffner, CA Scott, C O'Connell and JL Barker. (1998). Differential response of cortical plate and ventricular zone cells to GABA as a migration stimulus. *J Neurosci* 18:6378-6387.
17. López-Bendito G, R Luján, R Shigemoto, P Ganter, O Paulsen and Z Molnár. (2003). Blockade of GABA(B) receptors alters the tangential migration of cortical neurons. *Cereb Cortex* 13:932-942.
18. Rane MJ, D Gozal, W Butt, E Gozal, WM Pierce Jr, SZ Guo, R Wu, AD Goldbart, V Thongboonkerd, KR McLeish and JB Klein. (2005). Gamma-amino butyric acid type B receptors stimulate neutrophil chemotaxis during ischemia-reperfusion. *J Immunol.* 2005 Jun 1;174(11):7242-9.
19. Broxmeyer HE. (2008). Chemokines in hematopoiesis. *Curr Opin Hematol* 15:49-58.
20. Fischer KD, YY Kong, H Nishina, K Tedford, LE Marengère, I Kozieradzki, T Sasaki, M Starr, G Chan, S Gardener, MP Nghiem, D Bouchard, M Barbacid, A Bernstein and JM Penninger.

- (1998). Vav is a regulator of cytoskeletal reorganization mediated by the T-cell receptor. *Curr Biol* 8:554-562.
21. Götze KS, M Schiemann, S Marz, VR Jacobs, G Debus, C Peschel and RA Oostendorp. (2007). CD133-enriched CD34(-) (CD33/CD38/CD71)(-) cord blood cells acquire CD34 prior to cell division and hematopoietic activity is exclusively associated with CD34 expression. *Exp Hematol* 35 :1408-1414.
22. Laurie DJ, W Wisden and PH Seeburg. (1992). The distribution of thirteen GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. III. Embryonic and postnatal development. *J Neurosci* 12:4151-4172.
23. Ma W and JL Barker. (1995). Complementary expressions of transcripts encoding GAD67 and GABAA receptor alpha 4, beta 1, and gamma 1 subunits in the proliferative zone of the embryonic rat central nervous system. *J Neurosci* 15:2547-2560.
24. Behar TN, Schaffner AE, Scott CA, Greene CL, Barker JL. (2000). GABA receptor antagonists modulate postmitotic cell migration in slice cultures of embryonic rat cortex. *Cereb Cortex* 10:899-909.
25. Behar TN, SV Smith, RT Kennedy, JM McKenzie, I Maric and JL Barker. (2001). GABA(B) receptors mediate motility signals for migrating embryonic cortical cells. *Cereb Cortex* 11:744-753.
26. Luján R, R Shigemoto and G López-Bendito. Glutamate and GABA receptor signalling in the developing brain. *Neuroscience*. 2005;130(3):567-580.
27. Represa A and Y Ben-Ari. (2005). Trophic actions of GABA on neuronal development. *Trends Neurosci* 28:278-283.
28. Fueshko SM, S Key and S Wray. (1998). GABA inhibits migration of luteinizing hormone-releasing hormone neurons in embryonic olfactory explants. *J Neurosci* 18:2560-2569.
29. Wang DD, DD Krueger and A Bordey. (2003). GABA depolarizes neuronal progenitors of the postnatal subventricular zone via GABAA receptor activation. *J Physiol* 550:785-800.

30. Azuma H, T Inamoto, T Sakamoto, S Kiyama, T Ubai, Y Shinohara, K Maemura, M Tsuji, N Segawa, H Masuda, K Takahara, Y Katsuoka and M Watanabe M. (2003). Gamma-aminobutyric acid as a promoting factor of cancer metastasis; induction of matrix metalloproteinase production is potentially its underlying mechanism. *Cancer Res* 63:8090-8096.
31. Behar TN, YX Li, HT Tran, W Ma, V Dunlap, C Scott and JL Barker. (1996). GABA stimulates chemotaxis and chemokinesis of embryonic cortical neurons via calcium-dependent mechanisms. *J Neurosci* 16:1808-1818.
32. Jelitai M, M Anderová, K Markó, K Kékesi, P Koncz, E Syková and E Madarász. (2004). Role of gamma-aminobutyric acid in early neuronal development: studies with an embryonic neuroectodermal stem cell clone. *J Neurosci Res* 76:801-811.
33. Andäng M, J Hjerling-Leffler, A Moliner, TK Lundgren, G Castelo-Branco, E Nanou, E Pozas, V Bryja, S Halliez, H Nishimaru, J Wilbertz, E Arenas, M Kolzenburg, P Charnay, A El Manira , CF Ibanez , P Ernfors. (2008). Histone H2AX-dependent GABA<sub>A</sub> receptor regulation of stem cell proliferation. *Nature* 451: 460-464.

## Figure legends

**Fig. 1.** GABA-related and hematopoietic proteins expression by whole mononuclear HUCB cells fraction and purified-CD133+ cells. **(A)** RT-PCR analyses were performed on mRNAs extracted from both mononuclear and purified-CD133+ cells just after collection (n=6).  $\beta 2$  (433 bp) and  $\gamma 3$  (769 bp) GABA-A-R and GABA-B-R1 (542 bp) subunits mRNAs were expressed in mononuclear cell fractions whereas purified-CD133+ cells expressed at low rate but consistently GABA-B-R1 (542 bp) subunit mRNA. No GABA-C-R mRNA was detected in both cell populations. **(B)** Immunophenotypic characterization of whole mononuclear cells. (1-2): After their fixation and permeabilization the whole fraction of mononuclear cells were labelled by anti-GABA and anti-GABA-Receptors conjugated to fluorochromes. GABA appeared in green and GABA-Receptors in red whereas their co-expression was stained in yellow. All mononuclear cells expressing either GABA-A-R ( $\beta$  chain isoforms) or GABA-B-R (R1a and R1b isoforms) proteins also expressed GABA molecule. (3-5): The co-expression of CD45 and GABA-Receptors was assessed. Some cells expressing GABA-A-R ( $\beta$  chain), GABA-B-R (R1a and R1b) or intra-cellular GABA co-expressed the classical hematopoietic CD45 marker. Scale bar = (1,5) 3  $\mu\text{m}$ , (2) 2  $\mu\text{m}$  and (3,4) 7  $\mu\text{m}$ . **(C)** Flow cytometric analysis of GABA-Receptor on mononuclear HUCB cells. Data show a representative experiment out of 6, as percentage of cells expressing GABA receptors. (1): Values inscribed within the different gates represent mean of positive cells of all experiments. **(D)** Immunophenotypic comparison between whole mononuclear and purified-CD133+ cord blood cells for their expression of GABA receptors, GABA molecule and CD45. (1): CD133 and GABA-A-R markers were never found to be co-expressed on mononuclear cells. (2-3): Double-positive cells for CD133 and GABA-B-R (R1a and R1b isoforms) or CD133 and intra-cellular GABA were found within mononuclear cells. (4-6): No CD133+ cell was found positive for GABA-A-R ( $\beta$  chain isoforms) marker. Moreover, within purified-CD133+ cells population, no cell was found positive for GABA-A-R. (5): Most of purified-CD133+ cells expressed GABA-B-R. (6): Purified-

CD133+ cells population co-expressed CD45+ and GABA-B-R. The nucleus of whole cells was labelled by DAPI (blue). Scale bar = (1,3,4) 7  $\mu\text{m}$ , (2) 5  $\mu\text{m}$ , (5,6) 9  $\mu\text{m}$  and (7) 3  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 2.** Chemotaxis assays. **(A)** Diagram represents GABA-induced chemotaxis performed within Boyden chambers. GABA gradient-dependent attraction was compared to negative control (GABA free) (n = 18). A significant chemotaxis effect was observed on mononuclear cells for 100 $\mu\text{M}$  GABA. Moreover, 50-100mM GABA had also a significant chemotaxis effect and was determined as the optimal GABA concentration to induce mononuclear cells migration. Chemotaxis was almost totally inhibited with GABA but without gradient in Boyden chambers (50mM GABA in both the upper and the lower chambers). **(B)** Diagram represents GABA-receptor antagonists effect on chemotaxis (n = 6). Both bicuculline (GABA-A-receptor antagonist) and saclofen (GABA-B-receptor antagonist) inhibited the migration of mononuclear cells compared to optimal 50mM GABA chemotaxis. **(C)** GABA-receptors immuno-characterization of (1) mononuclear non-migrating cells and (2) mononuclear migrating cells after chemotaxis assays. (1-2): Most of mononuclear migrating cells expressed GABA-B-receptor (R1a and R1b) while a scarce population of cells expressed GABA-A-receptor ( $\beta$  chain). No cell expressing GABA-A-receptor or GABA-B-receptor was found in the resulting non-migrating cell fraction after chemotaxis assays. Scale bar = (1) 5  $\mu\text{m}$  and (2) 4  $\mu\text{m}$ . **(D)** Migration-related molecules staining (talin and vav) within mononuclear cells (1-2) before and (3-4) after GABA-induced chemotaxis assays. (1-2): No mononuclear cell was found to express both talin and vav proteins before migration. (3-4): Migrating mononuclear cells were found to express talin or vav proteins. Moreover, cells positive for migrating-related molecules co-expressed the GABA-B-receptor (R1a and R1b). Scale bar = (1) 8  $\mu\text{m}$ , (2) 4  $\mu\text{m}$ , (3) 10  $\mu\text{m}$  and (4) 5  $\mu\text{m}$ . **(E)** Stem cell immunophenotypic characterization of mononuclear cells after GABA chemotaxis assays. A sub-population of migrating cells expressed the CD133 molecule (n=4,  $11.7 \pm 0.4\%$ ). **(F)** Comparison of GABA chemotaxis efficiency between

purified-CD133+ and whole mononuclear cells (n = 4). All assays were processed with CD133+ and mononuclear cells derived from the same sample. Purified-CD133+ cells chemotaxis potential was 2.7-fold higher than observed for mononuclear cells. Moreover, as observed for whole mononuclear HUCB cells fraction, saclofen (GABA-B-receptor antagonist) inhibited the migration of purified-CD133+ cells (2.4 fold) whereas bicuculine did not.

**Fig. 3.** Neuronal differentiation assays of mononuclear cells after GABA chemotaxis assays. (1-3): After chemotaxis assays, migrating cells were labelled with PKH67 (green) and then co-cultivated with non-labelled mononuclear HUCB cells. After 28 days of culture, PKH67-positive (green) cells expressed neural proteins (red) such as (1) nestin, (2) NF200 and (3)  $\beta$ -III-tubulin. (4-6): After chemotaxis assays, migrating cells were also co-cultured with non-labelled ARPE-19 cells after their labelling with PKH26 (red). After 28 days of cultures, PKH26-positive (red) cells expressed neural proteins (green) such as (4) nestin, (5) NF200 and (6)  $\beta$ -III-tubulin. ARPE-19 cells were also immuno-positive for these three neural markers (green labelling). The nucleus of whole cells was labelled by DAPI (blue). Scale bar = (1-3) 7  $\mu$ m, (4) 5  $\mu$ m, (5) 3  $\mu$ m and (6) 4  $\mu$ m.

**Fig.4.** Hematopoietic colony-forming cell (CFC) frequencies assays on mononuclear cells. (A) CFC frequencies obtained from mononuclear cells before and after GABA chemotaxis assays. (1): Colony-forming multi-lineage (CFU-GEMM), CFU granulocyte-macrophage (CFU-GM) and burst-forming units erythroid (BFU-E) frequencies were analysed for total mononuclear cells before migration (control) and after migration (on non-migrating and migrating mononuclear cells) (n = 6). CFU-GEMM frequencies were significantly increased for migrating cells compared to non-migrating cells: 16.3 versus 9.3 (p<0.05).



**Table 1.** RT-PCR primers listing

<b>neurotransmitter receptor genes</b>	<b>primers (sense, antisense)</b>	<b>amplicon length (bp)</b>
<i>GABA-A receptor, alpha1</i>	5' GGACAAACAGTAGACTCTGG 3' 5' ATTAGGGGTGTAGCTGGTTGCTGT 3'	470
<i>GABA-A receptor, alpha2</i>	5' CTGGGCCAATCAATCGGAAAGGAGA 3' 5' GATTCGGGGCATAATTGGCAACAGC 3'	471
<i>GABA-A receptor, alpha3</i>	5' TTTTGGGCCATGTTGTTGGGACAGAGAT 3' 5' TGGTCCCCACGATGTTGAAGGTAGTGCT 3'	470
<i>GABA-A receptor, alpha4</i>	5' TTGCCCAAAGTGTCCTATGC 3' 5' AGCCCCTATGGTATTAAGTGTGGT 3'	554
<i>GABA-A receptor, alpha5</i>	5' GCTTTTCACAGATGCCAACCAGTTCAG 3' 5' CCATCTTCCGCCACCACCACCGACTTG 3'	570
<i>GABA-A receptor, alpha6</i>	5' GGACAAACAGTATCTAGTGAGAC 3' 5' GATGGTGTCTAAGAAGGTGGAG 3'	471
<i>GABA-A receptor, beta1</i>	5' GATGGTGTCTAAGAAGGTGGAG 3' 5' TCATAGGAGTACATGGTGGCCTTG 3'	542
<i>GABA-A receptor, beta2</i>	5' TACTGGCGTGGCGATGATAATG 3' 5' GGCCCCCTCCCAAAGAAGA 3'	433
<i>GABA-A receptor, beta3</i>	5' AGATAAAAGGCTCGCCTATTCTGG 3' 5' CTTTCGCTCTTTGAACGGTCATTC 3'	794
<i>GABA-A receptor, gamma1</i>	5' CTCAACTGAAATCATTACACAG 3' 5' ATCTTCTTGCGGCACAGAAAT 3'	465
<i>GABA-A receptor, gamma2</i>	5' GTGAAGACAACCTCCGG 3' 5' CCAAGCTCCTGTTCGACAATCTTC 3'	558
<i>GABA-A receptor, gamma3</i>	5' CAGAAAGGTGGAAGAGGATGAA 3' 5' AAATGACACCCAGGATAAAACCAC 3'	769
<i>GABA-A receptor, epsilon (ε)</i>	5' CGCGGAAATGTTGTCCAAAGTTCT 3' 5' CGGCGATCTCAACAGTGACC 3'	314
<i>GABA-B receptor, B1</i>	5' TCAGGTTGGGCTGTGAGTTC 3' 5' AACATGACATCCCAGGAATTTG 3'	542
<i>GABA-B receptor, B2</i>	5' CCGGGCCCAGGCCTCC 3' 5' ACCATCATCCTGGAGCAGC 3'	554
<i>GABA-C-receptor, rho (ρ)</i>	5' CGAGGTCGGCAGAAGTGACAAG 3' 5' TCCTGCTGCGATCTGGTACTAA 3'	591

**Table 2.** hematopoietic CFC frequencies after 14 days

/ 150.000 cells incubated	<b>CFU-GEMM</b>	<b>CFU-GM</b>	<b>BFU-E</b>
<b>before migration</b>	29.3 ± 5.8	99.3 ± 9.2	44.0 ± 8.7
<b>non migrating cells</b>	9.3 ± 1.1	60.2 ± 3.1	16.0 ± 6.9
<b>migrating cells</b>	16.3 ± 1.5	37.6 ± 5.7	3.0 ± 1.7

**FIGURE 1**

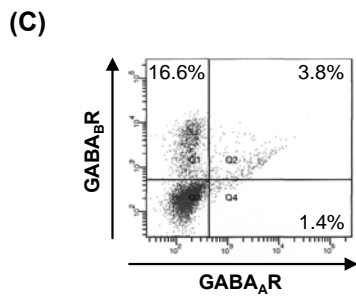
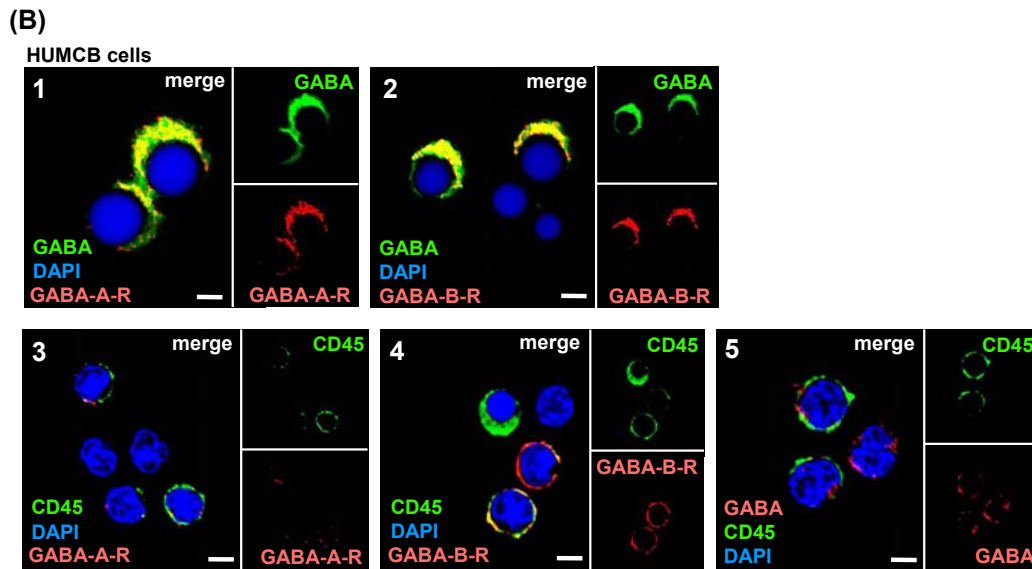
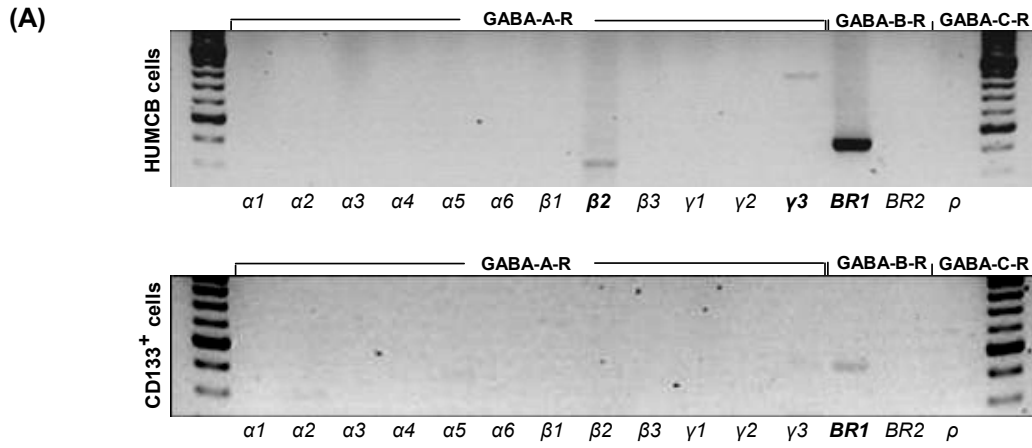
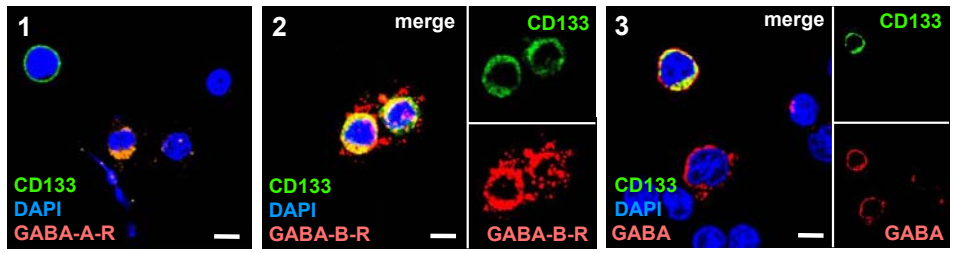


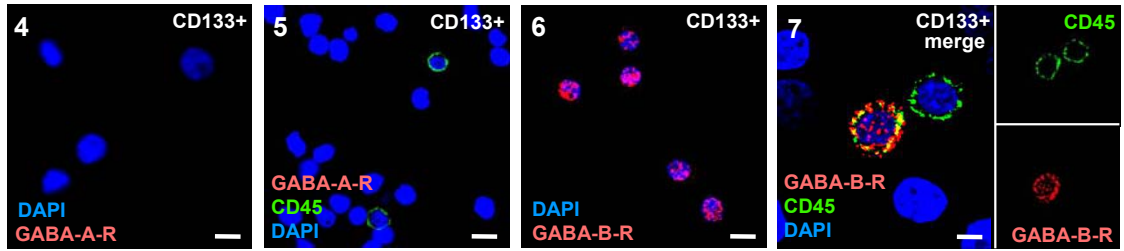
FIGURE 1

(D)

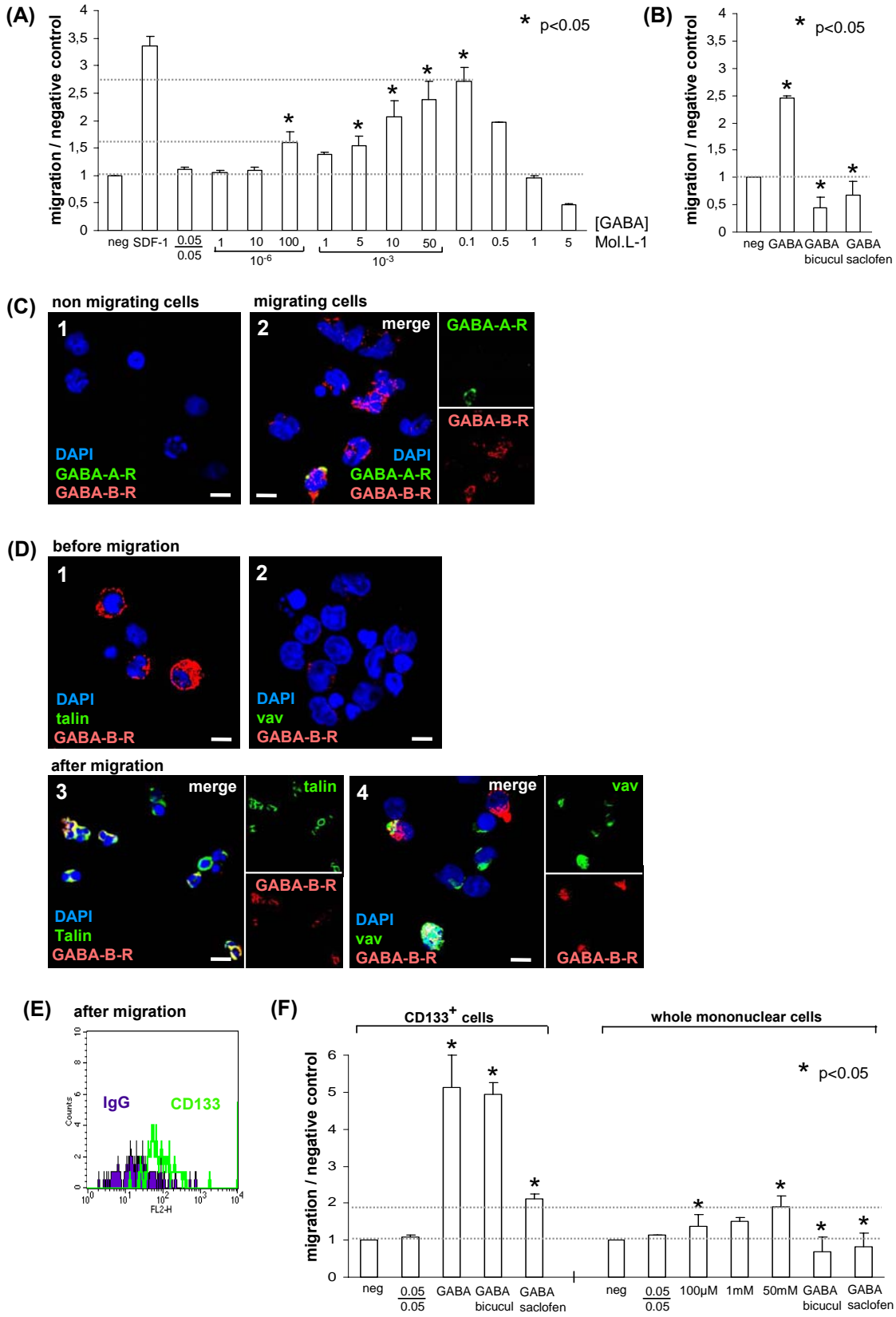
HUMCB cells



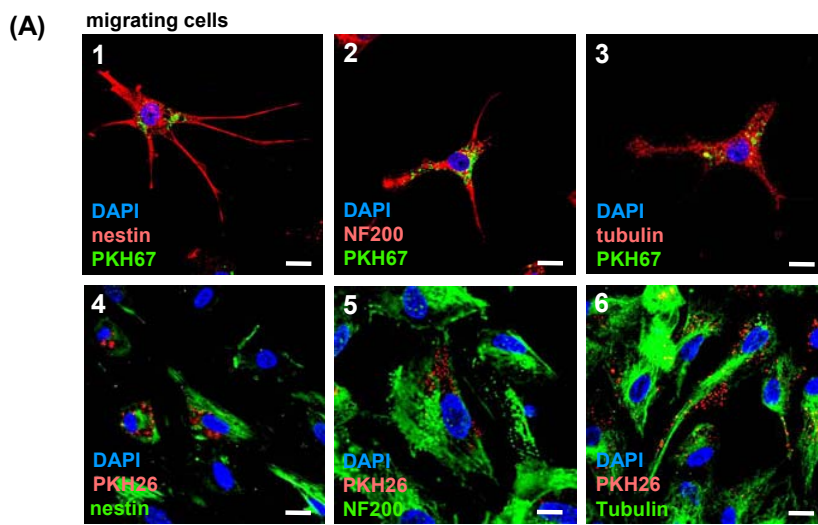
CD133<sup>+</sup> cells



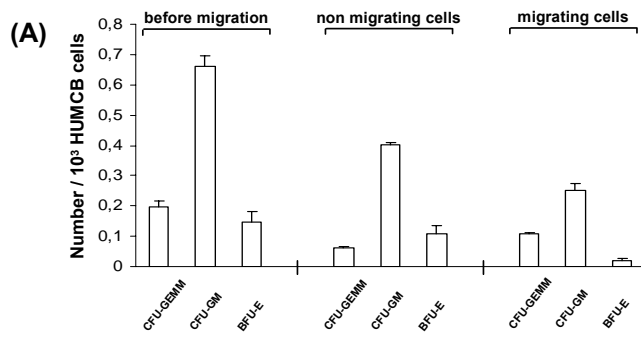
**FIGURE 2**



**FIGURE 3**



**FIGURE 4**



# RESULTATS

## **3 Caractérisation neurale des cellules du sang de cordon ombilical humain : application à la médecine régénérative.**

**Vincent Zangiacomi**

*PUFC, 978-2-84867-226-7, June 2008.*

## **INTRODUCTION**

La perte naturelle des neurones, due au vieillissement de l'organisme, peut être parfois dramatiquement accélérée dans le cas de certaines pathologies du système nerveux telles que les maladies neuro-dégénératives. Leur prévalence étant en cruciale augmentation dans les pays développés, ces maladies se sont imposées comme un problème majeur de santé publique. A ce jour, seuls quelques traitements pharmacologiques n'agissant que sur les symptômes de ces maladies ont vu le jour. Désormais, la thérapie cellulaire reste l'alternative la plus intéressante en terme de traitements. Cette technique repose sur l'utilisation de cellules souches à vouées thérapeutiques et a pour but de guérir voire de réduire les symptômes liés à ces maladies évolutives. Nous avons discuté dans cet article des aboutissements de notre recherche et d'une possible utilisation du sang de cordon ombilical humain dans le traitement des maladies neuro-dégénératives, relevant d'un autre domaine que de l'hématologie où l'utilité de greffer ces cellules souches est clairement établie.



## **Caractérisation neurale des cellules du sang de cordon ombilical humain : application à la médecine régénérative. Mise en place d'un modèle de thérapie cellulaire pour les maladies neuro-dégénératives de la rétine.**

Le système nerveux est constitué d'une part du système nerveux central et d'autre part du système nerveux périphérique. Le système nerveux central se distingue du système nerveux périphérique par l'entourage des méninges contenant le liquide céphalo-rachidien. De plus, il est isolé biochimiquement du reste de l'organisme grâce à la barrière hémato-encéphalique. Il est constitué d'une part de l'encéphale, logé dans la boîte crânienne, lui-même constitué du cerveau (telencéphale et diencephale), du tronc cérébral et du cervelet, et d'autre part de la moelle épinière.

Au cours du vieillissement, le système nerveux central de tous les individus est touché par une perte naturelle des cellules neuronales. Cette perte neuronale lente est caractérisée par l'apparition des premiers signes de sénescence dont les plus courants sont les pertes de mémoire, les problèmes d'équilibre et la perte des facultés d'adaptation. Ce processus inéluctable est parfois accéléré dramatiquement, comme dans le cas des maladies neuro-dégénératives dont la prévalence est très élevée.

Les pathologies du système nerveux central, évolutives ou non, peuvent toucher plusieurs organes. On citera parmi les plus connues la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson touchant les neurones de l'encéphale; la sclérose en plaques touchant le cerveau, la moelle épinière et le nerf optique; la rétinite pigmentaire et la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) touchant la rétine. Les malades atteints de maladies neuro-dégénératives souffrent ainsi de troubles caractéristiques associés à chaque maladie : pertes de mémoire, de jugement et de raisonnement (maladie d'Alzheimer); tremblements au repos, troubles du tonus musculaire (maladie de Parkinson); perte de la vision centrale (DMLA); rétrécissement du champ visuel et baisse de l'acuité visuelle en cas de faible luminosité (rétinite pigmentaire). Ces symptômes entraînent ainsi une invalidité avérée, très handicapante pour les gestes du quotidien, et conduisent le plus souvent à la dépendance totale du malade.

Les données statistiques ont permis de dénombrer, à ce jour, plus de 24 millions de personnes touchées par la maladie d'Alzheimer et plus de 6 millions de malades pour la maladie de Parkinson à travers le monde. De plus, l'incidence des maladies neuro-dégénératives n'a cessé d'augmenter au cours des dix dernières années, faisant de ces maladies un véritable problème de santé publique. Malgré des avancées spectaculaires dans le domaine des neurosciences, comme la mise en évidence de cellules souches neuronales au sein du système nerveux central, les mécanismes spécifiques provoquant la perte des neurones dans les maladies neuro-dégénératives restent incompris, et les traitements actuels demeurent purement symptomatiques et non

étiologiques. De nombreuses voies de recherche sont potentiellement exploitables dans ce domaine, mais la thérapie cellulaire semble être, à ce jour, la voie d'investigation la plus prometteuse.

Le laboratoire de Neurosciences de Besançon a développé ces dernières années plusieurs thématiques centrées sur l'étude des cellules souches à vocation thérapeutiques. La rétine, modèle utilisé au laboratoire, possède la même origine embryonnaire que le cerveau. Faisant partie intégrante du système nerveux central, cet organe possède l'avantage d'être facilement manipulable avec du matériel peu coûteux. Elle est constituée de plusieurs couches de cellules neuronales visuelles (les bâtonnets et les cônes) qui permettent la transformation de la lumière en influx nerveux, et de cellules de soutien (cellules gliales). Les cônes sont essentiellement présents au centre de la rétine et sont responsables de la vision des détails (acuité visuelle) et des couleurs. Les bâtonnets sont quant à eux concentrés à la périphérie de la rétine et sont principalement responsables de la détection des mouvements dans notre champ de vision et de la vision nocturne.

La rétine peut, comme l'encéphale, être atteinte de pathologies neuro-dégénératives touchant la plupart du temps soit les photorécepteurs (dégénérescence maculaire liée à l'âge et rétinite pigmentaire), soit les cellules ganglionnaires (glaucome). Deux types de maladies neuro-dégénératives de la rétine sont actuellement étudiées au laboratoire: la rétinite pigmentaire et la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA).

La rétinite pigmentaire est une maladie héréditaire familiale dominante, chronique et progressive, pouvant prendre plusieurs formes, caractérisée par une dégénérescence des cellules pigmentaires de la rétine. La rétinite pigmentaire se caractérise par un dépôt de pigments donnant à la rétine un aspect plus ou moins foncé lors de l'examen de l'œil par l'ophtalmologiste. Cette accumulation de pigments entraîne une oblitération des vaisseaux sanguins, créant ainsi un manque de vascularisation des cellules. Les premiers symptômes de cette maladie sont une baisse de l'acuité visuelle dans la pénombre et un rétrécissement du champ visuel. Les données statistiques font état d'une atteinte d'environ trois millions de personnes dans le monde, dont 40000 cas avérés en France.

La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est une maladie dégénérative rétinienne chronique, évolutive et invalidante, dont les premiers symptômes apparaissent dans la majorité des cas après l'âge de 50 ans. Cette pathologie touche la macula de manière sélective, dans la zone de la rétine également appelée "tâche jaune" située au pôle postérieur de l'œil où l'acuité visuelle est maximale, et provoque une dégénérescence des cellules visuelles rétinienne. La DMLA, dans la majorité des cas, est caractérisée par des altérations de l'épithélium pigmentaire et par un amincissement de la macula consécutif à l'évolution de dépôts, riches en lipides et calcium, qui

peuvent s'accumuler dans la rétine avec l'âge. Ces dépôts, liés au vieillissement de la rétine, résultent des déchets du métabolisme cellulaire. L'évolution de la maladie est étroitement liée à sa forme. Dans la majorité des cas, le développement de la maladie est lent et peut s'étendre sur plusieurs décennies. Cependant, la forme exsudative de la DMLA, plus rare (environ 20% des cas), caractérisée par le développement de néo-vaisseaux choroïdiens sous la macula, a une évolution beaucoup plus rapide, faisant perdre la vision centrale de façon totale et irréversible en quelques mois, voire quelques semaines. La DMLA est la première cause de malvoyance après 50 ans dans les pays développés. La prévalence globale de cette maladie est de 8% après 50 ans et environ 800.000 à 1.000.000 de malades sont déjà recensés en France.

Les médicaments actuellement disponibles dans le cadre du traitement des maladies neuro-dégénératives de la rétine ont une action limitée au ralentissement du développement de la maladie. Ainsi, la thérapie cellulaire, basée sur le remplacement des cellules déficientes par des cellules saines, semble être la voie d'investigation la plus prometteuse pour un traitement efficace permettant la restauration des fonctions visuelles déficientes, suite à des lésions rétinienne irréversibles. Cette thérapie postule sur le fait que la fonction cellulaire restaurée permettrait, sinon de guérir totalement la maladie, en tout cas, d'en atténuer les symptômes.

Plusieurs thèmes de recherche, basés sur l'utilisation des cellules souches dans le cadre du traitement des maladies neuro-dégénératives de la rétine, sont actuellement développés au sein du laboratoire. Deux d'entre eux portent d'une part sur l'étude des cellules souches de l'épithélium olfactif chez le rongeur (rat et souris) et d'autre part sur l'étude du potentiel neurogénique des cellules souches du sang de cordon ombilical humain.

Les travaux expérimentaux initiés par mes soins au laboratoire de Neurosciences de Besançon visent à la guérison partielle ou totale des lésions tissulaires du système nerveux central, en particulier dans des modèles rétinien lésés, par le remplacement des cellules déficientes à partir des cellules issues du sang de cordon ombilical humain, également appelé sang placentaire. Ces travaux de recherche sont réalisés en étroite collaboration avec l'Activité d'Ingénierie Cellulaire et Tissulaire (AICT) de l'Etablissement Français du sang Bourgogne / Franche-Comté. L'AICT de Besançon fait partie des deux seules banques de sang placentaire Françaises avec Bordeaux. Afin de répondre à la demande croissante du nombre de greffons en clinique, le développement de l'activité s'est concentré dans un premier temps sur l'extension du nombre de maternités assurant la collecte du sang de cordon ombilical dans les régions de Besançon et Bordeaux. Suite au « Plan greffe » lancé par le Ministère de la santé en 2004, un projet de création de banques de sang placentaire dans

d'autres villes a été prévu à court terme mais l'ouverture de ces centres n'a toujours pas été précisée à ce jour.

Le sang placentaire retient particulièrement l'attention des chercheurs et cliniciens depuis plusieurs années. Effectuée avec le consentement préalable des parents, après la naissance de l'enfant et avant la délivrance, la collecte n'est pas douloureuse et ne comporte aucun danger, ni pour la mère, ni pour le nouveau-né, puisqu'elle ne modifie en aucun cas les gestes médicaux classiques de l'accouchement. Le sang placentaire a l'avantage d'être particulièrement riche en cellules souches hématopoïétiques qui permettent l'établissement *in vivo* des différentes cellules du sang (leucocytes, hématies et plaquettes). Les prélèvements disponibles dans les banques sont, à ce jour, essentiellement utilisés dans le cadre des greffes de cellules hématopoïétiques, la première transplantation remontant à 1988 précisément. Le sang placentaire s'avère être une option thérapeutique novatrice et avantageuse pour certains cas de leucémies, de déficits immunitaires ou d'anémies sévères. Cette source de cellules présente de nombreux avantages, en effet l'utilisation du sang de cordon ombilical ne soulève aucun problème éthique, les cellules étant prélevées sur un tissu qui est normalement détruit et qui est issu d'un don. Par ailleurs, les dépistages systématiques révèlent qu'il contient rarement d'agents infectieux, ce qui réduit les risques pathologiques relatifs à son utilisation. Les cellules du sang de cordon sont peu immunogènes, il en résulte une compatibilité donneur-receveur accrue, favorisant les allogreffes (d'un donneur à l'autre) voire les xenogreffes (d'une espèce à l'autre). De telles greffes seraient ainsi envisageables afin de remplacer les cellules lésées du système nerveux central. De plus, certains modèles animaux d'ischémie mettent en évidence la capacité des précurseurs (CD34+) du sang de cordon ombilical humain à régénérer fonctionnellement le système nerveux central lésé via deux phénomènes couplés : l'angiogenèse et la neurogenèse.

Les cellules souches présentes dans le sang de cordon ombilical humain possèdent un fort potentiel prolifératif. De plus, de nombreuses études ont également démontré la potentialité de les différencier en de multiples lignées cellulaires sous l'influence de facteurs biologiques spécifiques (*i.e.* en cellules neurales, épidermiques ou hématopoïétiques ; définie sous le terme de multi-potentialité).

Mes travaux de recherche portent sur l'étude du potentiel neuronal des cellules du sang de cordon ombilical humain. Ces travaux font partie d'une étude à visée thérapeutique pour le traitement des maladies neuro-dégénératives, en particulier dans l'établissement d'un modèle d'étude de régénération de la rétine lésée. La mise en place d'une telle méthode de thérapie cellulaire nécessite, en amont, de caractériser parfaitement les cellules susceptibles d'être

implantées, mais aussi d'acquérir la maîtrise totale des mécanismes d'implantation et de différenciation des cellules souches exogènes. En effet, il est nécessaire que les cellules souches injectées se placent au sein du tissu lésionnel et s'y différencient, *in situ*, dans le type cellulaire à remplacer.

La base de ce travail reposait sur les résultats préalablement publiés par d'autres équipes, ayant mis en évidence la possibilité d'obtenir des cellules neuronales *in vitro* à partir des cellules du sang placentaire. La première étape consistait ainsi à reproduire les résultats préexistants et à optimiser les protocoles de culture *in vitro* afin d'obtenir un maximum de cellules neuronales différenciées et fonctionnelles après culture. Après cette étape préliminaire de culture, le type cellulaire à l'origine des neurones obtenus *in vitro* à partir du sang placentaire n'ayant jamais été précisément défini dans la littérature, il s'avérait incontournable de caractériser précisément ces cellules. En utilisant des protocoles de sélection permettant d'isoler une population spécifique de cellules, grâce aux protéines exprimées à la surface de chaque type cellulaire, plusieurs sous-populations cellulaires du sang placentaire ont pu être analysées séparément. Les expérimentations se sont essentiellement portées sur les sous-populations souches du sang placentaire, caractérisées par les marqueurs de membrane CD133 et CD34 (*cf.* Annexe 1). Ces deux types de cellules souches, immatures, douées d'un pouvoir de prolifération et de différenciation optimal étant les plus à même de donner naissance à plusieurs lignées cellulaires, autres qu'hématopoïétiques (*i.e.* multipotentialité). A l'aide de différentes molécules de traçage, permettant le repérage des cellules initialement marquées au sein d'une population cellulaire hétérogène (*i.e.* contenant plusieurs types de cellules ; *cf.* Annexe 2, Figure 2), les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence que les cellules du sang placentaire à l'origine de la différenciation neuronale *in vitro* sont les cellules les plus primitives du compartiment souche. Ces cellules souches sont caractérisées par l'expression membranaire du marqueur CD133, mais elles n'expriment cependant pas le marqueur CD34 (*i.e.* cellules CD133+ / CD34- ; *cf.* Annexe 1).

De plus, ces expériences de co-culture ont également permis de démontrer qu'un contact cellulaire étroit avec les autres cellules du sang placentaire, que l'on appellera cellules facilitatrices, est nécessaire pour la différenciation neuronale. En effet, ces cellules souches CD133+ / CD34- cultivées seules, dans les conditions optimales de culture préalablement déterminées, sont alors incapables de se différencier en cellules neuronales. Cette absence de différenciation est également observée lorsque les cellules souches sont cultivées séparées des cellules facilitatrices par une membrane semi-perméable, ne laissant passer que les molécules diffusibles et empêchant tout contact cellulaire direct entre les deux sous-populations (*cf.* Annexe 2, Figure 3). Ces résultats

permettent de faire l'hypothèse que des protéines de contact membranaires ou des molécules diffusibles agissant à très courte distance sur les cellules adjacentes (*i.e.* effet paracrine) et issues des cellules dites facilitatrices seraient vraisemblablement à l'origine de la différenciation des cellules souches du sang placentaire en neurones fonctionnels.

Après la caractérisation précise des cellules susceptibles de se différencier en neurones dans le sang placentaire et la mise en évidence de leur mode de différenciation, des expériences de xénogreffe ont été mises en place afin d'étudier le comportement de ces cellules *in vivo*, dans des modèles de pathologies neuro-dégénératives. Pour cela, nous disposons au laboratoire, en étroite collaboration avec l'équipe INSERM U598 « Physiopathologie des maladies oculaires : innovations thérapeutiques » Paris VI, de plusieurs modèles d'animaux souffrant de pathologie rétinienne neuro-dégénérative:

- les souris *rd10*, développant une maladie génétique similaire à la rétinite pigmentaire humaine, entraînant la perte totale des photorécepteurs après quelques semaines post-natales ;
- les souris *Balb/c* exposées à une lumière continue de 2000 lux pendant 8 jours. Cette surexposition lumineuse entraîne une perte locale des photorécepteurs en différentes zones de la rétine ;
- les souris *C57BL6/J* après photo-coagulation de la rétine au laser Argon. Cette lésion ciblée entraîne un phénomène de néo-vascularisation invasive localisé au point d'impact du laser résultant en une désorganisation de la rétine, similaire aux symptômes de la DMLA exsudative chez l'humain.

Après isolement et purification des cellules d'intérêt, diverses injections de cellules souches CD133+ dans le vitré de l'œil des souris ont été effectuées. Les animaux ont ensuite été sacrifiés à différents temps après l'injection de cellules (*i.e.* 1 semaine, 2 semaines, 1 mois et 2 mois). Après fixation des tissus, la rétine a été récupérée et coupée en fines tranches sur toute son épaisseur. Chaque coupe de rétine a ensuite été analysée par technique d'immuno-cytochimie afin d'étudier la localisation dans la rétine des cellules injectées, ainsi que leur état de différenciation.

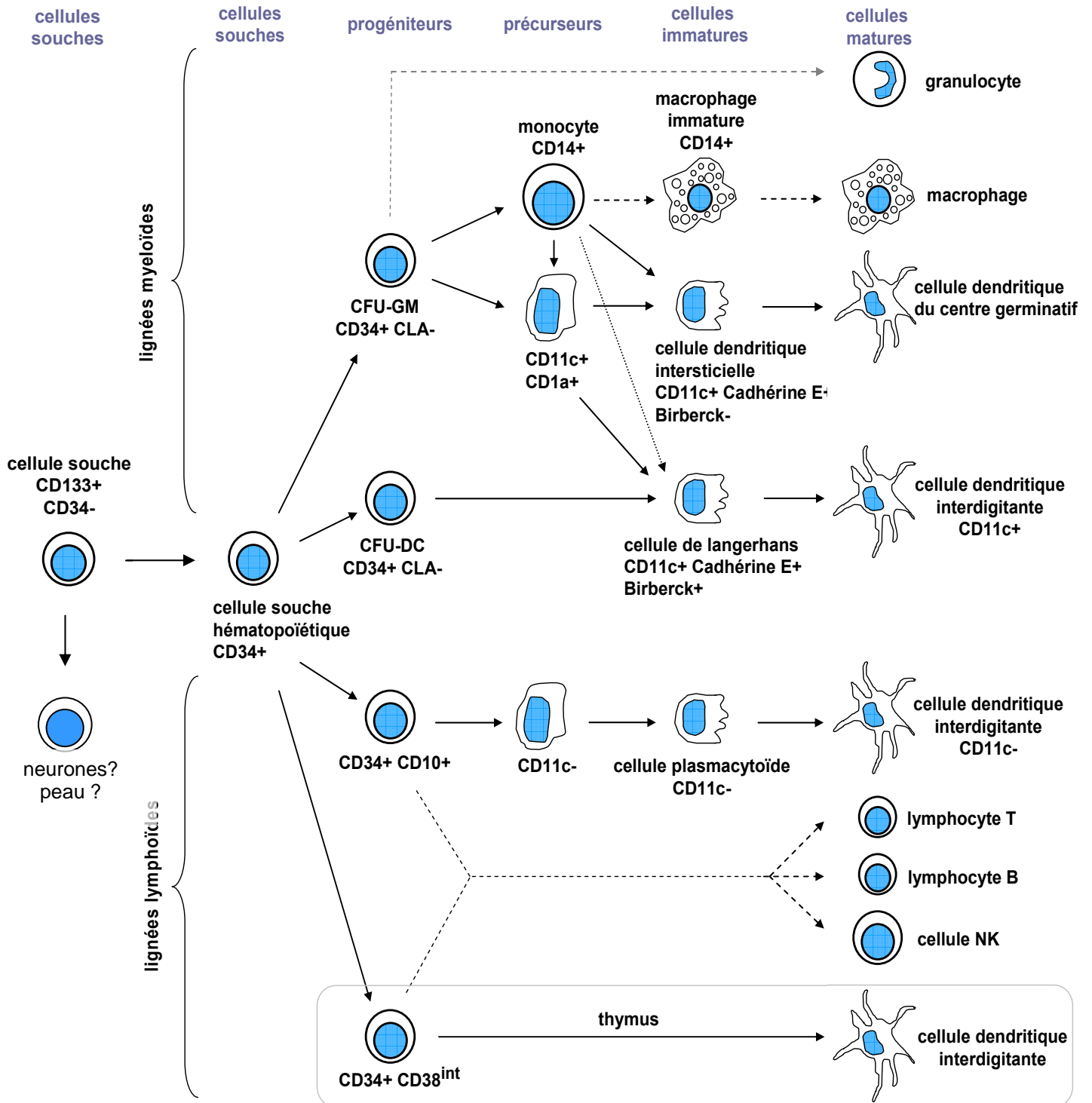
Ces résultats préliminaires font état d'une implantation des cellules souches CD133+ humaines injectées dans la rétine dans les 15 jours qui suivent l'injection. De plus, les différents modèles animaux utilisés nous ont permis de mettre en évidence que l'implantation des cellules dans la rétine lésée se fait de façon très hiérarchisée. En effet, les cellules souches CD133+, préalablement injectées, migrent progressivement dans les différentes couches de la rétine et sont

uniquement présentes dans les zones de la rétine lésée où les photorécepteurs rétiniens sont absents (2 mois après l'injection). Aucune cellule n'a été retrouvée dans les zones de la rétine possédant encore leurs photorécepteurs ou dans les animaux contrôles (*i.e.* animaux sans pathologie rétinienne avérée). La différenciation en photorécepteurs des cellules humaines injectées dans la rétine des souris n'a cependant pas pu être démontrée dans nos différents modèles. Ces résultats *in vivo* préliminaires mettent donc en évidence un phénomène de chimiotactisme vis-à-vis des cellules souches humaines au niveau des zones de lésion de la rétine. L'implantation dans la rétine d'une part, et la migration sélective des cellules souches d'autre part, sont vraisemblablement imputables aux molécules inflammatoires libérées au niveau des zones de lésion. Des études complémentaires (*e.g.* injections de cellules souches CD133+ avec des cellules facilitatrices, études de l'effet de différents facteurs neurotrophiques,...) sont en cours afin de favoriser la différenciation *in vivo* des cellules souches implantées. Cette étape fondamentale s'avère être incontournable pour utiliser ce type de cellules dans un contexte de médecine régénérative.

Tous ces résultats obtenus mettent en évidence la possibilité de différenciation *in vitro* des cellules souches du sang de cordon ombilical en cellules neuronales fonctionnelles. De plus, nos études préliminaires de xéno greffes montrent que les cellules souches CD133+ d'origine humaine sont capables de s'intégrer, de migrer au sein de la rétine lésée de souris et d'y survivre sans rejet apparent pendant au moins deux mois. Des études complémentaires seront nécessaires afin d'étudier les facteurs exogènes susceptibles de favoriser la différenciation des cellules injectées en cellules rétinienne.

Tous ces travaux permettent ainsi de progresser dans la compréhension des mécanismes moléculaires liés à la différenciation des cellules souches humaines. La maîtrise de la différenciation *in vivo* des cellules souches en cellules neuronales, en particulier en photorécepteurs, pourrait ainsi conduire à moyen terme à la mise en place d'un modèle d'étude pré-clinique des maladies cécitantes d'origine neuro-dégénérative. De plus, ces travaux encourageants permettent d'envisager l'établissement d'une thérapie cellulaire adaptée aux maladies neuro-dégénératives de la rétine et du système nerveux central à moyen terme.

## Annexe 1 :



**Figure 1 :** Les cellules souches du sang (CD133+ et CD34+) sont à l'origine de toutes les cellules de la lignée hématopoïétique (lignées myéloïdes et lymphoïdes). Les recherches les plus récentes laissent entrevoir une possible différenciation de ces cellules en plusieurs lignées autres qu'hématopoïétique (neurones, cellules épidermiques,...). La différenciation en un type cellulaire donné est directement liée aux facteurs de croissance en présence (cytokines).



## Annexe 2 :

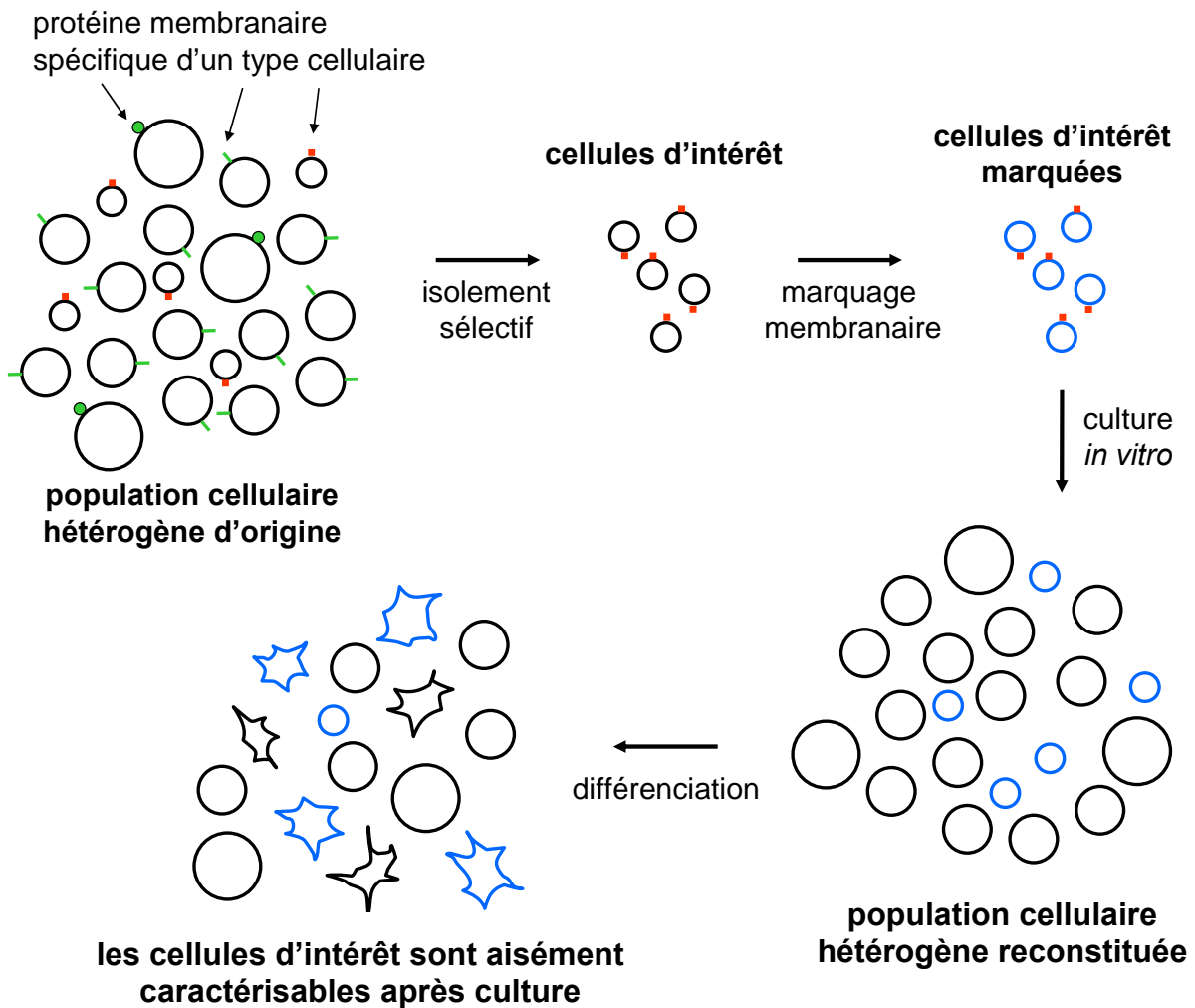


Figure 2 : Marquage membranaire permettant le traçage de cellules au sein d'une population cellulaire hétérogène après culture.

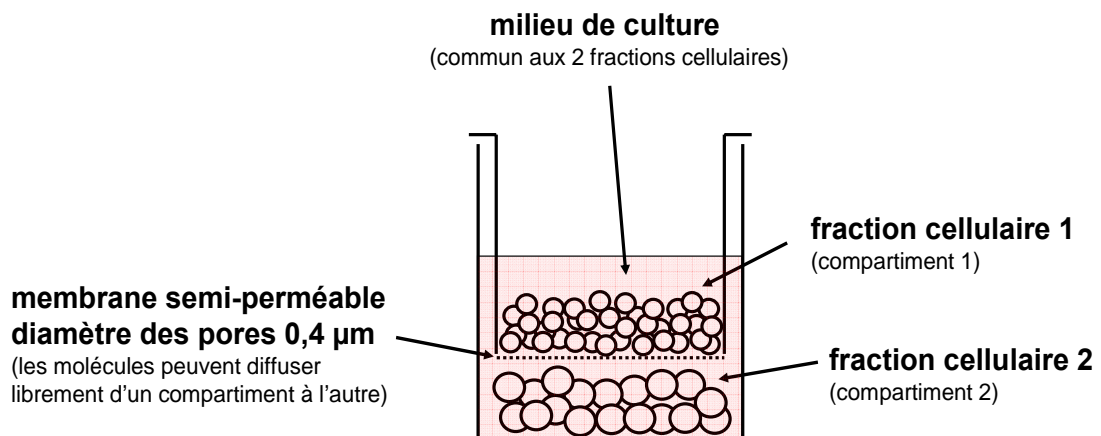


Figure 3 : Co-culture de 2 fractions cellulaires séparées par une membrane semi-perméable. Ce type de co-culture permet de cultiver 2 fractions cellulaires sans contact direct entre elles, tout en laissant passer les molécules diffusibles.

# **DISCUSSION & PERSPECTIVES**

## **DISCUSSION & PERSPECTIVES**

Ce travail préliminaire s'inscrit dans la mise en place d'un protocole de thérapie cellulaire pour le traitement des maladies neuro-dégénératives du SNC, en particulier de la rétine. Les différents résultats obtenus ouvrent la voie à de nombreuses recherches, en particulier dans l'utilisation des cellules souches issues du sang placentaire. Ces travaux devraient permettre, à terme, de guérir totalement ou tout du moins d'améliorer les fonctions déficientes associées à diverses maladies du SNC.

### **1. Etude de la différenciation neurale *in vitro* des cellules du sang de cordon ombilical humain**

Nous avons mis en évidence, dans cette étude, la présence de différentes sous-populations cellulaires exprimant des marqueurs neuraux à l'état naturel dans le sang placentaire humain. De plus, nos résultats confirment la capacité de différenciation des cellules souches CD133+ en neurones fonctionnels dans des conditions *in vitro* précises.

Nous avons ainsi démontré l'expression, avant culture, de marqueurs neuraux immatures et matures chez les cellules mononucléées. D'autre part, nous avons mis en évidence que seuls les marqueurs immatures sont exprimés dans la fraction des cellules souches CD133+. Ces résultats vont dans le sens des travaux de Ha *et al.* qui ont également montré l'expression de nestine (plus de 60%) chez les précurseurs CD133+ du sang de cordon ombilical (Ha, Lee et al. 2003). Cette expression différentielle des marqueurs neuraux en fonction de l'état d'immaturité des cellules permet de supposer qu'une certaine population cellulaire contenue dans le sang placentaire a des prédispositions à la différenciation neuronale. Le profil d'expression protéique observé dans notre étude sur le sang placentaire est très proche de celui retrouvé chez les précurseurs neuronaux du SNC. En effet, l'expression du CD133 et de la nestine sont deux caractéristiques communes aux

cellules souches du sang de cordon et aux précurseurs neuronaux du SNC (Yin, Miraglia et al. 1997; Keeney, Brown et al. 2003; Bonanno, Perillo et al. 2004; Shmelkov, St Clair et al. 2005).

Afin de confirmer ce caractère souche, il serait intéressant de tester plusieurs marqueurs de cellules embryonnaires pluripotentes tels que Oct3/4, Sox2 et Rex1 sur la fraction CD133 du sang de cordon ombilical, bien que ceux-ci soient rarement co-exprimés en même temps que les marqueurs de cellules immatures (nestine) ou proneuraux (NeuroD1) (Habich, Jurga et al. 2006).

Grâce à un protocole de culture en plusieurs étapes, nous avons confirmé la possibilité d'obtention de cellules neuronales fonctionnelles à partir des cellules du sang placentaire. Cette différenciation neuronale a également été démontrée par plusieurs équipes utilisant des protocoles de culture similaires (Sanchez-Ramos 2002; Buzanska, Jurga et al. 2006; McGuckin, Jurga et al. 2008).

Lors de l'étape de prolifération, caractérisée par l'utilisation des facteurs de croissance EGF et bFGF, les cellules forment des amas cellulaires au sein desquels toutes les cellules expriment la nestine et une majorité d'entre elles le marqueur de cellules souches CD133. Ces amas cellulaires ont également été décrits par McGuckin *et al.* (2008) et sont proches, en terme de morphologie et d'expression protéique, des neurosphères observées lors de la culture des progéniteurs neuronaux du SNC (Buzanska, Jurga et al. 2006; Habich, Jurga et al. 2006; McGuckin, Jurga et al. 2008). Cependant, nos expériences complémentaires de repiquage clonogénique après dissociation mécanique n'ont pas permis de mettre en évidence de réel auto-renouvellement comme il est possible de l'observer chez les cellules souches neuronales du SNC. Cette absence d'auto-renouvellement peut s'expliquer par l'état de différenciation des cellules contenues au sein de ces amas cellulaires. Ces cellules, après plusieurs jours de culture dans nos conditions neurogéniques *in vitro*, sont peut-être dans un stade de différenciation neurale trop avancé et pourraient ainsi avoir perdu leur potentiel d'auto-renouvellement, caractéristique des cellules très immatures. De plus, il n'est pas exclu que les amas cellulaires observés en culture soient issus de colonies hétérogènes et

n'aient pas une origine clonogénique avérée. Cette hypothèse pourrait s'expliquer par la forte densité cellulaire nécessaire à l'initiation du processus de différenciation neurale *in vitro* dans nos conditions expérimentales, et susceptible de favoriser l'aggrégation de cellules non clonogéniques (Singec, Knoth et al. 2006).

Après 10 jours de culture, certaines cellules issues des neurosphères adhèrent spontanément au plastique des flacons de culture et commencent à émettre des prolongements membranaires similaires à des prolongements neuritiques. Ces mêmes observations ont également été faites par plusieurs équipes (Habich, Jurga et al. 2006; McGuckin, Jurga et al. 2008). Après 15 jours de culture dans nos conditions *in vitro*, toutes les cellules exprimant des marqueurs neuraux co-expriment également le marqueur hématopoïétique pan-leucocytaire CD45 (common leukocyte antigen). Cette co-expression permet de faire l'hypothèse que le processus de différenciation neurale *in vitro*, dans nos conditions expérimentales, se fait à partir d'une population cellulaire d'origine strictement hématopoïétique.

Les prolongements observés sur les cellules en culture vont ensuite croître jusqu'au 30<sup>ème</sup> jour. Après 4 semaines de culture, toutes les cellules exprimant des marqueurs matures de différenciation neuronale n'expriment plus le marqueur classique hématopoïétique CD45. Des cellules ovoïdes exprimant le CD45 et négatives pour tous les marqueurs neuraux immatures et matures restent toutefois visibles en culture. Ce résultat indique que le processus de différenciation neurale *in vitro* n'est pas systématique à toutes les cellules et qu'il est limité à une fraction cellulaire spécifique. Cette absence d'expression du marqueur hématopoïétique CD45 normalement observée dans la majorité des cellules du sang de cordon avant culture, y compris dans une majorité des cellules souches CD133+, confirme la possibilité de différenciation des cellules cultivées vers des lignées autre qu'hématopoïétique (*i.e.* transdifférenciation) (Majeti, Park et al. 2007).

Afin de confirmer ce phénomène de transdifférenciation, il serait intéressant de préalablement purifier la fraction cellulaire hématopoïétique exprimant le CD45 ou la Glycophorine A (CD235a) puis d'effectuer des sélections CD133 et CD34, dans le but de ne conserver que les cellules CD133+ / CD34- co-exprimant ces marqueurs hématopoïétiques avant culture (*i.e.* cellules souches hématopoïétiques). La culture et l'étude de la différenciation en neurones fonctionnels des cellules résultant des tris successifs permettraient ainsi de conclure à une réelle transdifférenciation.

Si la possibilité de transdifférenciation *in vitro* des cellules hématopoïétiques du sang placentaire était confirmée, il conviendrait ensuite de tester leur potentiel à se différencier en différents types cellulaires issus des trois feuillets embryonnaires (mesodermique, endodermique et ectodermique). L'utilisation de ces cellules dans le cadre de l'élaboration de divers protocoles de thérapie cellulaire serait dès lors indiscutable. Par conséquent, ces « hypothétiques » cellules souches pluripotentes pourraient permettre d'une part, de pallier à l'utilisation des cellules ES, issues d'embryons, dont les problèmes éthiques et la disponibilité limitent l'usage en clinique et d'autre part, de pallier à l'utilisation des cellules iPS (« induced pluripotent stem cells ») dont l'intégration de rétrovirus au sein de leur génôme, nécessaire à l'expression des différents facteurs de transcription liés à leur pluripotentialité, compromet également leur utilisation en clinique à court terme.

On observe, après induction de la différenciation, trois isoformes de la protéine NeuN (66, 48 et 46 kDa) tandis qu'une seule isoforme de cette protéine (66 kDa) était détectable sur les cellules avant culture. Cette expression différentielle des différentes isoformes de la protéine NeuN semble être étroitement liée à l'état de maturité cellulaire, en particulier pour les isoformes de 48 et 46 kDa dont l'expression semble être restreinte au compartiment des cellules neuronales fonctionnelles.

Seule l'isoforme de 66 kDa de la protéine NeuN a déjà été décrite dans la caractérisation des neurones par immunoblot (Lind, Franken et al. 2005). Le rôle de la protéine NeuN n'a pas été

clairement défini jusqu'alors, cette protéine étant détectée au sein des neurones lors du développement du SNC.

Certaines équipes suggèrent une relation étroite entre la régulation de la protéine NeuN observée dans les neurones issus de la moelle épinière et les neurones lors du vieillissement (Portiansky, Barbeito et al. 2006). Il serait intéressant de comparer l'expression des différentes isoformes de la protéine NeuN au sein des différents compartiments du SNC, en fonction de leur état de maturité cellulaire ainsi que sur les cellules ES lors du processus de différenciation neuronale.

De plus, nos résultats montrent que les cellules neuronales obtenues à partir des cellules du sang placentaire dans nos conditions *in vitro* possèdent des canaux calciques fonctionnels dont l'activité est identique à celle observée pour des cellules neuronales fonctionnelles issues de neuroblastome (Biedler and Spengler 1976; Biedler, Roffler-Tarlov et al. 1978). Certaines équipes ont également mis en évidence, avec des expériences d'électrophysiologie, une fonctionnalité des cellules neuronales obtenues *in vitro* à partir des cellules du sang placentaire (Sun, Buzanska et al. 2005).

Il serait donc intéressant, comme il l'a été précédemment fait sur les neurones du SNC, de comparer les deux techniques d'électrophysiologie et d'imagerie au calcium sur les cellules différenciées et issues d'un même prélèvement (Svoboda, Denk et al. 1997; Maravall, Mainen et al. 2000; Sun, Buzanska et al. 2005).

Notre étude a également permis de montrer que les cellules capables de se différencier en neurones dans nos conditions spécifiques *in vitro* étaient, à l'origine, les cellules souches CD133+ / CD34-. Ces cellules souches sont reconnues comme étant les cellules les plus immatures contenues dans le sang de cordon ombilical. Ces résultats confirment ainsi que les cellules CD133+ du sang placentaire, ayant des caractéristiques proches des cellules souches neurales avant culture, sont capables de se différencier en cellules autres qu'hématopoïétiques et en particulier en cellules de

type neuronal. Bien que certaines équipes aient précédemment annoncé la différenciation neurale des cellules du sang placentaire comme étant restreinte à la fraction cellulaire CD34-, la possibilité de différenciation neurale des cellules CD133+ n'avait jamais été publiée (Habich, Jurga et al. 2006). Chen *et al.* ont même décrit l'incapacité des cellules CD133+ du sang placentaire, cultivées seules en culture, à générer des cellules neurales *in vitro* (Chen, Hudson et al. 2005). Nous avons ainsi réussi à élucider les conditions nécessaires à la différenciation des cellules souches CD133+ en neurones grâce à nos différentes études de co-cultures. Ces expériences démontrent qu'un contact cellulaire étroit avec des cellules stromales neurogéniques ou des cellules facilitatrices du sang placentaire est nécessaire pour initier la différenciation des cellules souches en neurones dans nos conditions expérimentales. Ces résultats sont confortés par les travaux de McGuckin *et al.* qui ont également démontré la nécessité d'une forte concentration cellulaire afin d'initier la différenciation neuronale à partir des cellules du sang de cordon ombilical (McGuckin, Jurga et al. 2008).

La phénotype exact des cellules facilitatrices contenues dans la fraction CD133- du sang placentaire ainsi que les facteurs libérés par le stroma neurogénique (*i.e.* cellules ARPE-19) restent à définir afin de déterminer les molécules ou le processus à l'origine de cette différenciation neuronale *in vitro*. Plusieurs hypothèses se révèlent plausibles. Ce processus de différenciation pourrait être initié soit par un contact cellulaire direct mettant en jeu un complexe ligand / récepteur fonctionnel, soit par l'activation de récepteurs présents à la surface des cellules CD133+ grâce à des molécules diffusibles paracrines issues des cellules facilitatrices et agissant à très courte distance. De plus, le rôle des cellules mononucléées « non souches » CD133- exprimant des marqueurs neuraux avant culture et ne se différenciant pas en cellules neuronales matures fonctionnelles dans nos conditions expérimentales n'étant pas encore déterminé, il n'est pas exclu que ces cellules puissent également jouer un rôle fondamental dans ce processus.



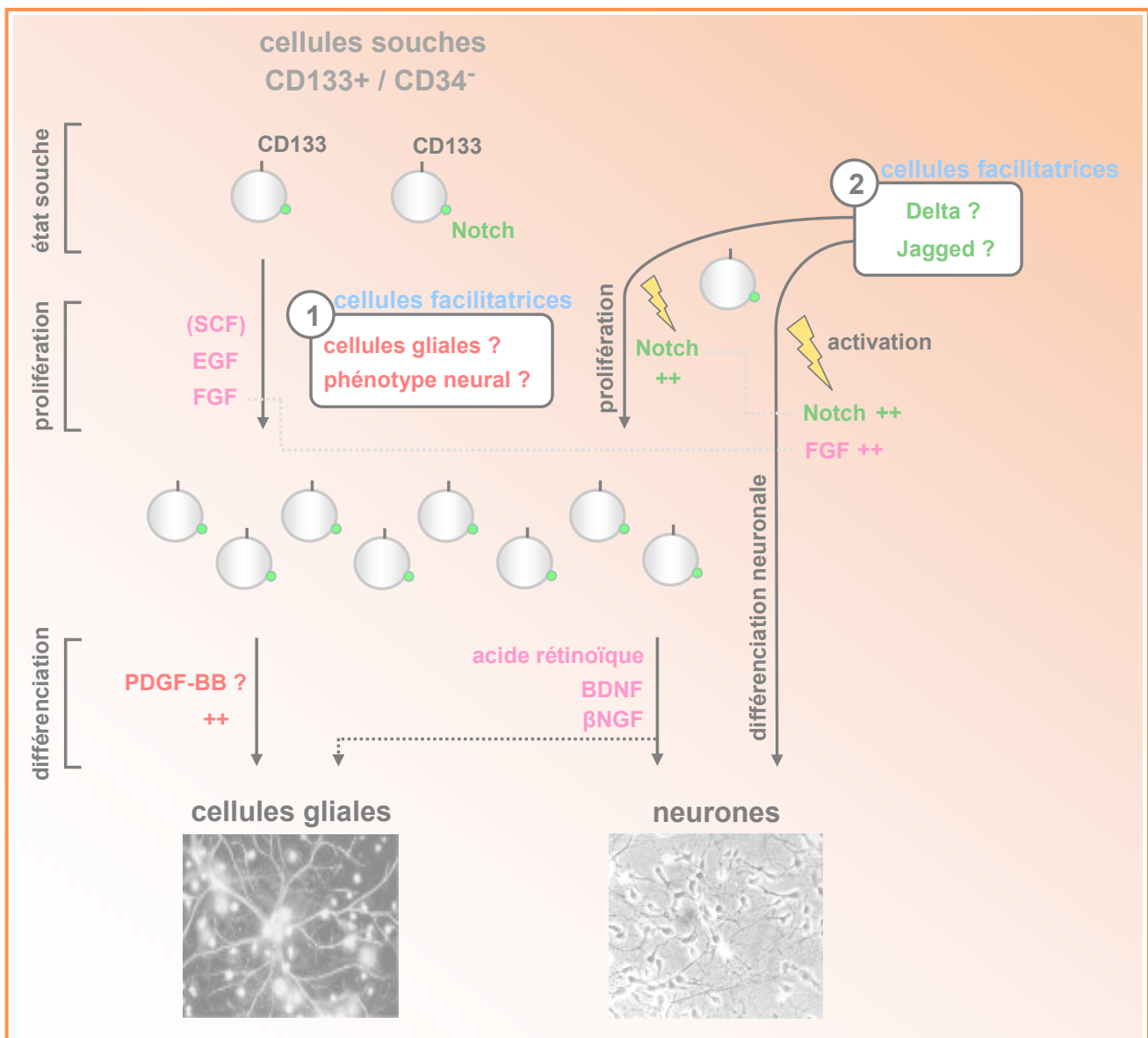
Afin de vérifier le possible rôle facilitateur de ces cellules, il serait intéressant de ne sélectionner que les cellules CD133- exprimant également des marqueurs neuraux et de les co-cultiver avec des cellules souches CD133+, puis d'étudier l'état de différenciation neuronale de ces dernières.

Contrairement aux cellules souches neurales multipotentes du SNC, la différenciation des cellules souches CD133+ / CD34- du sang placentaire en cellules gliales est très faible (inférieure à 5%) dans nos conditions de culture. Song *et al.* ont précédemment décrit les cellules astrogliales adultes comme de possibles régulateurs de la neurogenèse et capables d'induire les cellules souches à adopter un profil neuronal *in vitro* et *in vivo* (Song, Stevens et al. 2002). Ainsi, les cellules CD133- du sang placentaire exprimant la protéine gliale GFAP avant culture pourraient ainsi initier et faciliter la différenciation neuronale des cellules souches CD133+, au détriment des cellules gliales. De plus, la différenciation gliale *in vitro* étant favorisée par l'utilisation de la cytokine Platelet Derived Growth Factor-BB (PDGF-BB), il serait intéressant de cultiver les cellules CD133+ en utilisant des facteurs de croissance adaptés et d'étudier le rendement de la différenciation gliale et astrocytique dans des conditions optimales à chaque type de différenciation (Buzanska, Jurga et al. 2006).

Le maintien des cellules souches dans un état de non-différenciation et de prolifération est universellement placé sous la dépendance étroite du facteur Notch et des signaux mitogènes. Cette protéine membranaire de surface va se lier avec des ligands issus des cellules adjacentes tels que Delta et Jagged. Il a également été démontré une implication directe de la protéine Notch dans la différenciation neurale. En effet, la neurogenèse *in vivo* des progéniteurs neuronaux est directement liée à la proportion de récepteurs Notch activés sur ces cellules (Breunig, Silbereis et al. 2007). Buzanska *et al.* ont ainsi mis en évidence que l'expression de Notch chez les cellules souches du sang de cordon ombilical permettait d'augmenter leur potentiel d'auto-renouvellement (Buzanska, Jurga et al. 2006). D'autre part, Lowell *et al.* ont démontré que la surexpression de Notch chez les

cellules ES murines, en plus d'une action stimulatrice sur la prolifération cellulaire, entraînait un processus de différenciation strictement limité à la lignée neuronale.

De plus, il a été démontré que cette voie de signalisation liée à Notch et impliquée dans la différenciation neuronale nécessitait l'activation parallèle du récepteur au FGF (Lowell, Benchoua et al. 2006). Ainsi, dans nos conditions *in vitro*, l'initiation de la différenciation neuronale des cellules souches du sang de cordon ombilical observée dès l'« étape de prolifération », ne contenant pas de facteur neurogénique à proprement parlé, pourrait s'expliquer par la seule présence du FGF au sein du milieu de culture. L'activation nécessaire de Notch dans ce processus pourrait ainsi se faire *via* l'expression de Delta ou Jagged par les cellules adjacentes dites « facilitatrices » (*cf.* Figure 16). Dans ce sens, il a été démontré, au sein de la niche des cellules souches, que les cellules astrogliales étaient capables d'activer Notch. Ainsi, sous certaines conditions de culture appropriées, les cellules du sang de cordon sont capables de générer des cellules positives pour la GFAP, elle-mêmes susceptibles à leur tour d'activer et de permettre la différenciation des cellules souches en cellules neuronales, *via* la voie de signalisation Notch/Jagged (John, Shankar et al. 2002). De plus, ces données confirment une fois encore le rôle prépondérant que peuvent jouer les cellules gliales dans la différenciation neuronale (*cf.* Figure 15).



**Figure 15 : Implication des cytokines et autres facteurs dans la prolifération et la différenciation neuronale *in vitro* des cellules souches du sang placentaire.**

La prolifération *in vitro* des cellules souches du sang placentaire est possible grâce à la présence indispensable de cellules facilitatrices en forte concentration [1] et par l'utilisation d'EGF et de FGF (le SCF peut également être utilisé pour favoriser la prolifération des cellules souches). De plus, Notch a un effet positif sur la prolifération des cellules souches via son activation par Delta et Jagged (supposée par les cellules facilitatrices [2]). La différenciation neuronale et gliale, après l'étape de prolifération, est possible en ajoutant de l'acide rétinoïque, du BDNF ou du bêta-NGF dans le milieu de culture de base. Le nombre de cellules gliales obtenues *in vitro* étant restreint, l'utilisation du PDGF-BB pourrait permettre l'induction spécifique de la différenciation gliale. D'autre part, l'initiation de la différenciation neuronale observée dès l'étape de prolifération est possible grâce à l'activation simultanée du récepteur au FGF et de Notch.

L'un des problèmes majeurs s'imposant quant à l'utilisation de telles cellules souches en thérapie est leur relative rareté au sein d'un prélèvement de sang placentaire. On dénombre, dans nos conditions actuelles, environ une cellule sur 10.000 capable de se différencier en cellule neuronale, soit 15.000 à 20.000 cellules utiles par prélèvement en moyenne. Sachant que ces cellules ont besoin de cellules facilitatrices en forte concentration pour leur différenciation, leur utilisation dans le cadre d'une thérapie cellulaire efficace limiterait d'autant plus le nombre de cellules souches utiles injectables.

Une alternative à cette différenciation neuronale limitée serait d'isoler puis de concentrer avant injection les cellules CD133+ / CD34- souches, optimisant ainsi le nombre de cellules qui seraient susceptibles de se différencier en neurones *in vivo*. Une seconde alternative serait de provoquer la pré-différenciation *in vitro* des cellules souches avant injection *in vivo* dans l'organe cible. Ce procédé aurait pour avantage de faciliter la différenciation des cellules souches du sang placentaire en les initiant dans un processus de différenciation neuronale irréversible. De plus, ce processus de pré-différenciation permettrait de limiter la prolifération anarchique des cellules souches au sein de l'individu receveur, en abolissant leur pouvoir d'auto-renouvellement.

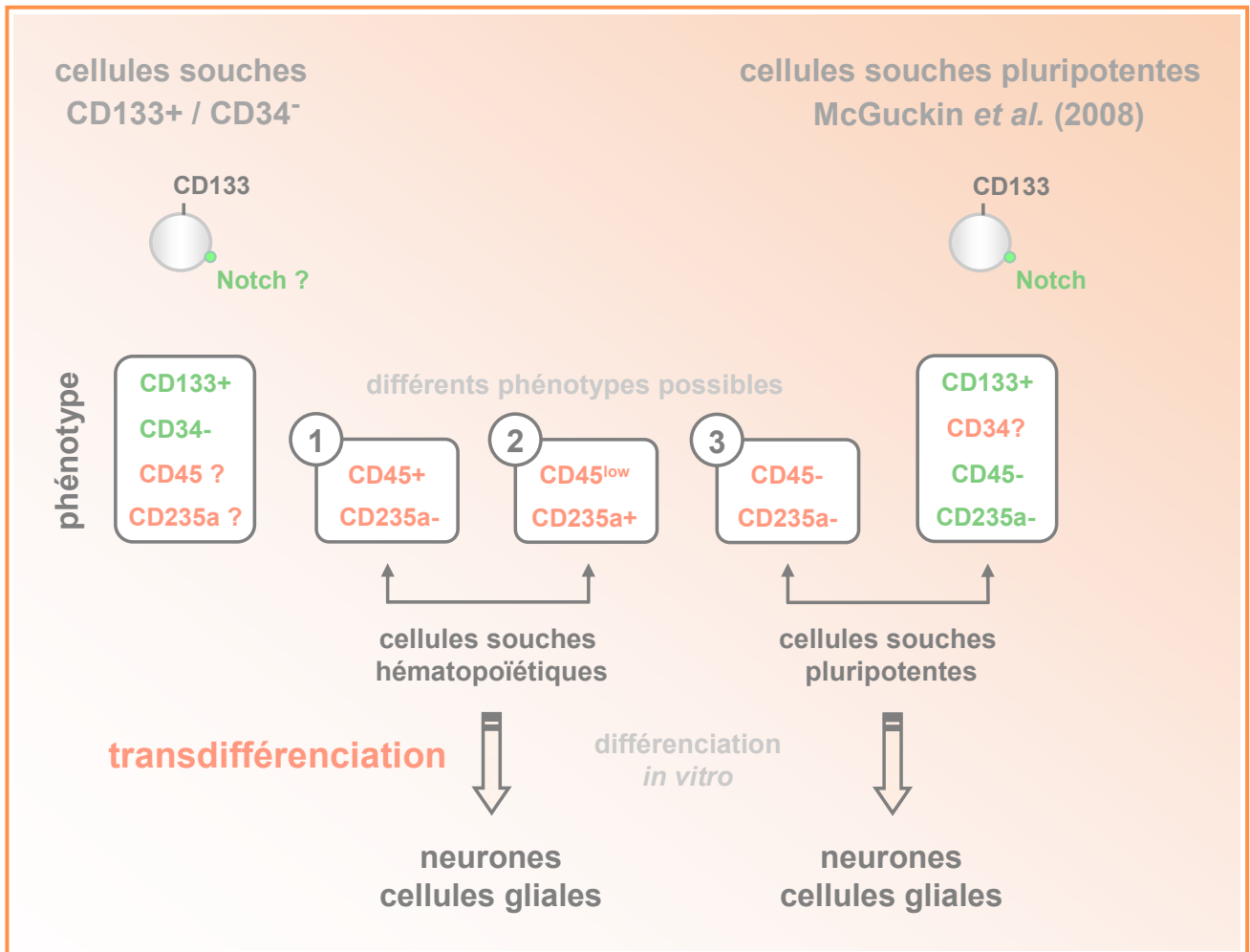
Récemment, d'autres équipes ont également mis en évidence la possible différenciation, sous certaines conditions *in vitro*, de cellules souches non hématopoïétiques pluripotentes du sang de cordon ombilical en neurones (McGuckin, Jurga et al. 2008). Ces cellules souches (CD45-, CD33-, CD7- et CD235a- [Glycophorine A]) isolées par sélection négative sont également capables de proliférer *in vitro* avant de se différencier en neurones (*cf.* Figure 16). Le protocole de culture utilisé par cette équipe démontre que l'utilisation conjointe des milieux Neurobasal-B27 et Neurobasal-N2 conjuguée à l'utilisation du SCF semble être une alternative intéressante afin de favoriser la prolifération des cellules souches du sang de cordon ombilical (McGuckin, Jurga et al. 2008). D'autre part, Ma *et al.* ont récemment décrit l'importance de la laminine, protéine de matrice extra-

cellulaire, dans la prolifération *in vitro* des progéniteurs neuraux issus de cellules embryonnaires ainsi que dans leur différenciation en cellules neuronales (Ma, Tavakoli et al. 2008). Dans cette optique, il paraît incontournable de préciser si le rendement de prolifération et de différenciation observé avec des cellules issues du sang placentaire cultivées en présence de laminine est bien supérieur à celui observé en présence de collagène, utilisé dans notre protocole. Il serait donc intéressant de tester ces différents protocoles sur la fraction CD133+ du sang placentaire afin de favoriser le nombre de cellules capables de se différencier, ce facteur limitant étant crucial dans la mise en place de protocoles à vocation thérapeutiques.

L'un des avantages de notre procédé de culture, après sélection directe des cellules souches du sang placentaire, réside dans la non-utilisation de sérum de veau fœtal. Ainsi, ce processus de culture caractérisé par l'absence d'antigènes exogènes d'origine non humaine diminuerait les risques de contamination relatifs à la greffe de cellules. Même si la prise de greffe est facilitée par l'absence d'expression des protéines du CMHII à la surface des cellules souches issues du sang placentaire, le risque de rejet dû à une incompatibilité tissulaire n'est pas totalement exclu. Il conviendra donc de vérifier la compatibilité entre le donneur et le receveur avant de tenter une quelconque transplantation de telles cellules dans le SNC lésé humain.

D'autre part, il n'est pas exclu que les cellules souches CD133+ / CD34- du sang placentaire, douées d'un potentiel neurogénique dans nos conditions de culture, soient identiques aux cellules souches (CD45-, CD33-, CD7- et CD235a- [Glycophorine A]) décrites par McGuckin *et al.* et exprimant également le CD133 (McGuckin, Jurga et al. 2008). En supposant que nos cellules CD133+ / CD34- n'expriment pas les marqueurs hématopoïétiques précédemment discutés (*i.e.* CD45, CD235a : mise en évidence de la transdifférenciation des cellules souches *in vitro*), il serait intéressant de les caractériser plus précisément (CD33-, CD7-, Oct4, Sox2) et d'étudier la

prolifération et la différenciation neuronale dans les mêmes conditions que McGuckin *et al.* Il existe peut-être un lien de parenté très étroit entre ces différents types de cellules souches décrits issus du sang de cordon ombilical humain (*cf.* Figure 16).



**Figure 16 : Comparaison du phénotype des cellules CD133+ / CD34- étudiées dans nos travaux et des cellules pluripotentes décrites par McGuckin *et al.***

Les cellules souches CD133+ / CD34- décrites dans nos travaux et susceptibles de se différencier en cellules neurales ont un phénotype proche des cellules souches pluripotentes décrites dans les travaux de McGuckin *et al.* (McGuckin, Jurga et al. 2008). Les différents phénotypes possibles des cellules CD133+ / CD34- qu'il serait intéressant de déterminer précisément à l'avenir permettront de confirmer ou d'infirmer la transdifférenciation des cellules souches hématopoïétiques en neurones.

## 2. Etude des cellules GABAergiques du sang de cordon ombilical humain

Ces travaux nous ont permis de mettre en évidence la présence de différentes sous-populations cellulaires exprimant les sous-unités des récepteurs au GABA et capables de migrer activement en réponse à un gradient de GABA. Nous avons également démontré que cette migration active permettait l'enrichissement en précurseurs neuronaux et hématopoïétiques.

Ainsi, cette étude nous a permis de démontrer, avant culture, la présence des sous-unités des récepteurs GABA<sub>A</sub> et GABA<sub>B</sub> chez les cellules mononucléées du sang placentaire, tandis que seul le récepteur GABA<sub>B</sub> a pu être détecté dans la fraction des cellules souches CD133+. Aucune sous-unité correspondant au récepteur GABA<sub>C</sub> n'a pu être mise en évidence dans les différentes populations cellulaires étudiées. Cette expression de récepteurs GABA<sub>B</sub> fonctionnels a déjà été observée sur des cellules non neuronales (Watanabe, Maemura et al. 2002) et, en particulier, chez les progéniteurs hématopoïétiques CD133+ et CD34+ mobilisés du sang périphérique (Steidl, Bork et al. 2004; Seidel, Niggemann et al. 2007). Cette expression différentielle des récepteurs au GABA sur les différentes fractions cellulaires du sang placentaire peut s'expliquer par l'état de maturité des cellules. Au sein du SNC, la sous-unité R1 du récepteur GABA<sub>B</sub> est préférentiellement localisée au niveau des membranes pré- et post-synaptiques des neurones immatures lors du développement embryonnaire (Laurie, Wisden et al. 1992). D'autre part, les sous-unités  $\beta 2$  et  $\gamma 3$  du récepteur GABA<sub>A</sub> sont exprimées chez les jeunes neurones après la naissance (Ma and Barker 1995). Les sous-unités du récepteur GABA<sub>A</sub> retrouvées chez les cellules non souches du sang placentaire sont donc exprimées, dans le SNC, chez des cellules un peu plus matures que celles exprimant le récepteur GABA<sub>B</sub>. Ainsi, les cellules du sang placentaire exprimant le récepteur GABA<sub>B</sub> mais n'exprimant pas le récepteur GABA<sub>A</sub> pourraient être caractérisées par leur immaturité, comme en atteste la co-expression du récepteur GABA<sub>B</sub> et du marqueur de cellules souches CD133 (*cf.* Figure 17).

Il serait donc intéressant de tester la présence du récepteur GABA<sub>B</sub> conjointement à d'autres marqueurs caractéristiques des cellules souches et d'immaturité cellulaire tels que Oct-3/4, Sox2 et Nanog, ainsi que certains marqueurs caractéristiques des précurseurs neuraux tels que les protéines Nestine, NeuN et GFAP (McGuckin, Jurga et al. 2008).

Nous avons également mis en évidence la capacité des cellules du sang de cordon à migrer activement en réponse au GABA via l'activation des récepteurs GABA<sub>A</sub> et GABA<sub>B</sub>. Cette migration due au GABA a déjà été démontrée *in vivo* au sein du cortex durant le développement. Ce processus migratoire lié au GABA est indispensable au bon fonctionnement du SNC chez l'humain. En effet, lors du développement embryonnaire la mise en place du SNC hiérarchisé, en particulier le cortex ou la rétine, dépend étroitement de la migration des neurones immatures grâce à l'activation séquentielle des différents récepteurs au GABA (Behar, Schaffner et al. 2000). Nous avons mis en évidence deux concentrations efficaces différentes pour la migration active des cellules du sang de cordon placentaire. Une concentration dite « faible » de l'ordre de 100µM et une concentration dite « élevée » de l'ordre de 50-100mM. Behar *et al.*, ont également mis en évidence deux concentrations physiologiques actives *in vivo* sur des cellules corticales dissociées de l'ordre du femtomolaire et du micromolaire (Behar, Li et al. 1996; Behar, Schaffner et al. 1998). Leurs résultats rapportent qu'une faible concentration de GABA (femtomolaire) favoriserait la chimiotaxie (migration des cellules orientée vers la source de production de la molécule chimioattractive) des neurones immatures tandis qu'une forte concentration de GABA (micromolaire) favoriserait la chimiokinèse (mouvement aléatoire non orienté ne nécessitant pas la formation d'un gradient chimique attractif) des neurones matures isolés à partir de la plaque corticale. Cependant, l'étude de la migration des neurones dans ces différentes publications a été réalisée sur des cultures organotypiques de cerveau. La concentration élevée de l'ordre de 50-100 mM, non physiologique d'après les données de Behar *et al.*, pourrait s'expliquer par la



configuration des chambres de Boyden, imposant une grande distance entre les cellules contenues originellement dans le compartiment supérieur et la concentration de GABA efficace au sein du gradient. Cette grande distance pourrait ainsi minimiser l'effet des concentrations en GABA. Nos concentrations micromolaires et millimolaires efficaces pourraient être respectivement assimilées aux concentrations femtomolaires et millimolaires mises en évidence par Behar *et al* (Behar, Schaffner et al. 2000). De plus, les cellules utilisées dans les autres études sont de véritables neurones immatures issus du SNC et ne répondent donc pas obligatoirement aux mêmes concentrations de GABA, ne serait-ce qu'en fonction des différents récepteurs au GABA en présence sur chaque type cellulaire. En effet, les récepteurs au GABA étant des protéines hétérogènes constituées de plusieurs sous-unités distinctes (*i.e.* plus de 250 récepteurs GABA<sub>A</sub> différents sont connus à ce jour), Smith and Olsen ont précédemment décrit l'importance de la combinaison des différentes sous-unités constitutives de chaque récepteur au GABA dans l'efficacité et le rôle respectifs associés à chaque récepteur (Smith and Olsen 1995). Il serait donc intéressant de réaliser des tests de migration en chambres de Boyden dans les mêmes conditions avec différentes populations de neurones issus du SNC, en fonction de leur état de maturité et de comparer les résultats obtenus avec les cellules issues du sang placentaire.

Nos résultats mettent également en évidence un rôle inhibiteur des antagonistes spécifiques des récepteurs GABA<sub>A</sub> (bicuculline) et GABA<sub>B</sub> (saclofen) sur la migration des cellules du sang placentaire (*cf.* Figure 17). De plus, aucune migration n'a pu être observé lorsque le gradient de GABA était absent (absence de GABA ou concentration identique en GABA dans le compartiment supérieur et inférieur des chambres de Boyden). Ce phénomène de migration est donc directement associé à l'activation des récepteurs GABA<sub>A</sub> ou GABA<sub>B</sub>, via l'établissement d'un gradient de GABA obligatoire. Ces résultats sont donc en adéquation avec les données de Behar *et al.* décrivant la migration des neurones immatures en réponse à un gradient de GABA (Behar, Schaffner et al.

2000). Une étude de la migration en réponse aux agonistes spécifiques aux différents récepteurs au GABA (*e.g.* muscimol pour le récepteur GABA<sub>A</sub> et baclofen pour le récepteur GABA<sub>B</sub>) permettrait de confirmer nos données sur l'implication de chaque récepteur dans ce processus actif.

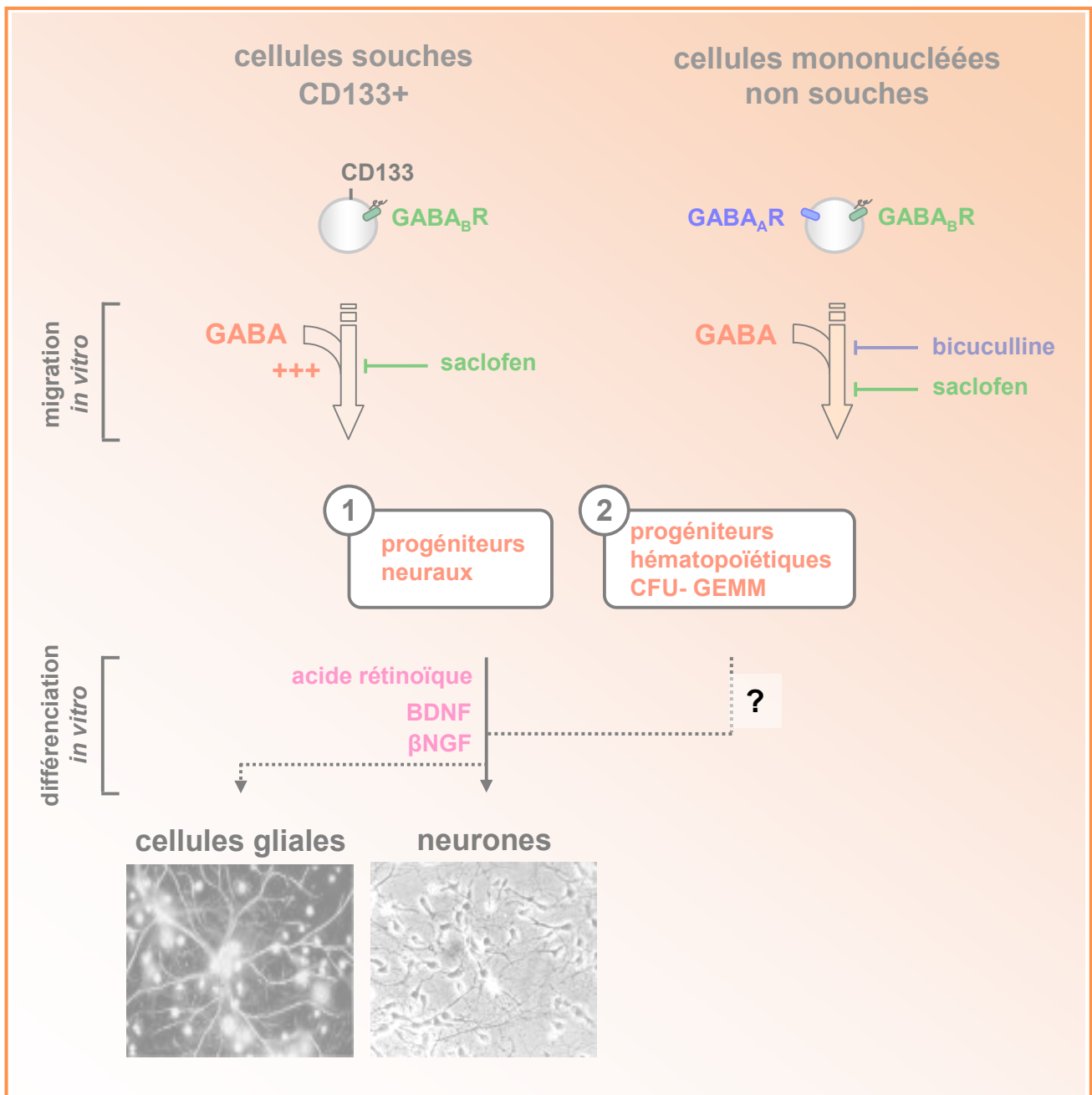
Le rôle du GABA n'a pas encore été clairement défini dans la littérature, en particulier pour les cellules non neuronales. Rane *et al.* ont précédemment démontré que le processus de chimiokinèse des neutrophiles est directement lié à l'activation des récepteurs GABA<sub>B</sub> par le GABA. Ainsi, le GABA peut également agir comme une molécule chimio-attractrice permettant l'invasion d'une lésion ischémique par les neutrophiles (Rane, Gozal *et al.* 2005). Ces données confortent nos résultats quant à la possible implication des récepteurs au GABA dans des processus migratoires, en particulier pour des cellules d'origine non neuronale. Seidel *et al.* ont également démontré que le GABA est capable d'inhiber la migration des précurseurs hématopoïétiques CD133<sup>+</sup> et des lymphocytes médiée par la molécule Stromal cell-derived factor-1 (Seidel, Niggemann *et al.* 2007). Cette étude ne rapporte cependant que l'effet de différentes cytokines sur la chimiokinèse (*i.e.* migration passive) et non la chimiotaxie (*i.e.* migration active). Nos résultats démontrant que la migration des cellules du sang placentaire en réponse à un gradient de GABA est essentiellement due à un processus actif de chimiotaxie, les données de Seidel *et al.* ne vont donc pas à l'encontre de nos travaux mais démontrent une fois encore la complexité des différents rôles associés à l'activation des récepteurs au GABA.

Nos résultats indiquent également que la fraction cellulaire impliquée dans le processus de chimiotaxie en réponse à un gradient de GABA est enrichie, d'une part, en cellules capables de se différencier en cellules de la lignée neuronale et, d'autre part, en progéniteurs hématopoïétiques (*i.e.* CFU-GEMM) (*cf.* Figure 18). Ces résultats sont donc bien en adéquation avec les études faisant état de la migration des progéniteurs neuronaux (Behar, Li *et al.* 1996; Behar, Schaffner *et al.* 2000)

mais renforcent également que le fait que le rôle de ce neuromédiateur n'est pas limité qu'aux cellules neuronales du SNC. En démontrant la différenciation *in vitro* des précurseurs CD133+ / CD34- du sang placentaire en cellules neuronales fonctionnelles et la migration active des précurseurs, nous pouvons désormais supposer l'existence d'une relation étroite entre les progéniteurs hématopoïétiques et les progéniteurs neuronaux issus du sang de cordon ombilical humain.

Afin de mettre en évidence un éventuel précurseur commun aux deux sous-populations cellulaires neuronales et hématopoïétiques répondant activement à un gradient de GABA, il serait intéressant d'étudier la possible différenciation des progéniteurs hématopoïétiques issus des CFU-GEMM en cellules neuronales *in vitro* (*cf.* Figure 17).

Steidl *et al.* ayant également mis en évidence la présence de récepteurs GABA<sub>B</sub> fonctionnels sur les précurseurs hématopoïétiques CD34+ du sang circulant, la molécule de GABA peut ainsi être considérée comme un médiateur entre les cellules neuronales et hématopoïétiques (Steidl, Bork et al. 2004). De plus, le récepteur GABA<sub>B</sub> a également été détecté sur les granulocytes neutrophiles matures du sang périphérique et permet au neurotransmetteur GABA de jouer un rôle significatif dans leur migration associée aux phénomènes inflammatoires et à la réparation de lésion locale comme dans le cas d'ischémie suite à un accident vasculaire cérébral (Rane, Gozal et al. 2005). Les fonctions migratoires associées aux récepteurs au GABA dépassent donc le contexte du développement embryonnaire et montrent une fois encore l'interrelation qui peut exister entre les compartiments neural et hématopoïétique *in vivo*.



**Figure 17 : Potentiel GABAergique des cellules du sang de cordon ombilical humain.**

Certaines cellules du sang placentaire sont capables de migrer activement en réponse à un gradient de GABA *in vitro*. La caractérisation de diverses populations cellulaires a permis de mettre en évidence l'expression de plusieurs sous-unités des récepteurs au GABA sur ces cellules. Ainsi certaines cellules mononucléées expriment des sous-unités des récepteurs GABA<sub>A</sub> et GABA<sub>B</sub> tandis que les cellules souches CD133+ n'expriment que les sous-unités du récepteur GABA<sub>B</sub>. De plus, cette migration active spécifique peut être inhibée via l'utilisation d'antagonistes aux récepteurs GABA<sub>A</sub> ou GABA<sub>B</sub> (en fonction de l'expression des récepteurs). D'autre part, cette migration en réponse à un gradient de GABA, préférentielle au compartiment souche CD133+ du sang placentaire, permet l'enrichissement en progéniteurs hématopoïétiques et neuraux, susceptibles de se différencier *in vitro*. Il pourrait donc exister un éventuel précurseur commun aux deux sous-populations cellulaires neuronales et hématopoïétiques.

### **3. Caractérisation neurale des cellules du sang de cordon ombilical humain : application à la médecine régénérative.**

Nos résultats préliminaires d'injection de cellules dans le vitrée de modèles murins souffrant de pathologies rétiniennes ont permis de confirmer le fait que l'implantation des cellules au sein de la rétine lésée est un processus très contrôlé.

En effet, les cellules souches CD133+ humaines migrent progressivement au sein des différentes couches de la rétine murine et viennent se placer uniquement dans les zones de la rétine lésée où les photorécepteurs rétiniens sont absents (*cf.* Annexe 1). Comme l'ont précédemment décrit Spaeth *et al.* concernant le recrutement des cellules souches mésenchymateuses mobilisées dans la réparation de sites lésés, ce phénomène de chimiotactisme vis-à-vis des cellules souches et restreint à la zone lésée est vraisemblablement imputable aux molécules libérées au niveau du site de lésion et aux cellules immunitaires recrutées au niveau des sites d'inflammation (Spaeth, Klopp *et al.* 2008). Il est à noter qu'aucune différence n'a pu être observée dans nos travaux entre les animaux non injectés et les animaux ayant subi une injection de milieu sans cellule. De plus, l'anticorps anti-Nestine humaine utilisé dans notre étude a été testé par nos soins sur des cellules murines et n'a montré aucun signe de réactivité croisée vis-à-vis de la Nestine murine. Ces observations confirment ainsi que les cellules observées dans la rétine après injection sont toutes d'origine exogènes et ne dérivent aucunement d'une mobilisation *in vivo* de précurseurs murins.

La différenciation en neurones des cellules souches CD133+ humaines injectées dans la rétine lésée de souris n'a pas pu être démontrée lors de nos différentes expérimentations. Même après 2 mois *in vivo*, les cellules humaines conservent un aspect de cellules rondes sans prolongement, sont uniquement immuno-réactives à la nestine et n'expriment aucun marqueur de différenciation neurale mature (*cf.* Figure 2). Soit le temps d'incubation *in vivo* de 2 mois après transplantation est

encore trop court pour observer un effet quelconque sur la différenciation neurale *in vivo*, soit les cellules souches humaines sont incapables de se différencier dans ces conditions.

Lund *et al.* ont récemment mis en évidence la capacité des cellules du sang placentaire à limiter la dégénérescence des photorécepteurs après injection dans l'espace sous-rétinien de rats *RCS* (Lund, Wang et al. 2007). De plus, ces cellules humaines injectées ne semblent pas entraîner *in vivo* la formation de tumeur ou d'autre pathologie associée. Néanmoins, ces auteurs n'ont pas été en mesure d'observer de différenciation des cellules injectées en neurones au sein de la rétine hôte, et ce, même dans les 100 jours suivant l'injection. Lund *et al.* démontrent donc ici que les effets de la transplantation de cellules d'origine placentaire semblent être limités à une action de neuroprotection au sein de la rétine dégénérée. Dès lors, nos expériences *in vitro* ayant mis en évidence un besoin de co-culture des cellules souches CD133+ avec des cellules facilitatrices pour leur différenciation en neurones, il est possible que la balance cellules souches CD133+ / cellules facilitatrices CD133- soit primordiale pour permettre une différenciation des cellules implantées. Afin de déterminer l'importance de ce facteur, il serait intéressant de tester différents ratio de concentration cellules souches CD133+ / cellules facilitatrices et d'étudier la différenciation neuronale *in vivo*. De plus, l'injection de différents facteurs de croissance neurogéniques lors de la transplantation des cellules seraient peut-être susceptibles de favoriser la différenciation des cellules *in vivo*.

Klassen *et al.* ayant démontré que les progéniteurs rétiniens sont capables de s'intégrer efficacement, de se différencier *in vivo* en photorécepteurs fonctionnels et d'émettre des connections avec les cellules rétiniennes de la rétine hôte (Klassen, Kiilgaard et al. 2007), une étape de culture des cellules souches du sang placentaire, préliminaire à l'injection, permettant la pré-différenciation et la détermination des cellules souches en cellules de la lignée neuronale pourrait peut-être permettre de pallier à ce problème de différenciation. De plus, Zigova *et al.* ont également

décrit l'intégration, la survie et la différenciation neuronale spontanée de cellules issues du sang placentaire et préalablement soumises à un traitement neurogénique. Ces cellules ont été transplantées dans le cerveau de souris en développement (Zigova, Song et al. 2002). Koike-Kiriyama *et al.* ayant précédemment décrit l'obtention de photorécepteurs à partir des cellules du sang placentaire, il serait donc intéressant d'utiliser ce protocole pour traiter les cellules avant injection (Koike-Kiriyama, Adachi et al. 2007). En effet, en plus du contrôle indirect de la prolifération anarchique des cellules souches pluripotentes observée sous certaines conditions, la différenciation *in vivo* des cellules « pré-déterminées » en neurones rétiniens fonctionnels pourrait être facilitée. Walczak *et al.* ont cependant mis en évidence la disparition de cellules issues du sang de cordon ombilical et soumises à un traitement neurogénique dans le mois suivant leur injection dans le cerveau de souris adultes (Walczak, Chen et al. 2007). Malgré une maturation des cellules injectées dans les 5 jours suivant la transplantation, les cellules disparaissent sans mobilisation des lymphocytes T et sans changement apparent de la microglie et des astrocytes environnants. Dans cette étude, l'absence d'intégration à moyen terme des cellules injectées au sein du cerveau hôte peut cependant s'expliquer par une transplantation de cellules dans un contexte non lésionnel ne favorisant pas la différenciation neuronale *in vivo* (Sun, Lai et al. 2003; Walczak, Chen et al. 2007). Cette absence de différenciation *in vivo* de cellules issues du sang placentaire a également été rapportée par Coenen *et al.* (Coenen, Kogler et al. 2005). Ces auteurs ont en effet décrit que des cellules progénitrices n'exprimant pas de marqueurs neuraux et hématopoïétiques, après injection dans le cerveau de rats lors du développement embryonnaire, sont capables de coloniser différentes zones du SNC (striatum, cortex, hippocampe, thalamus, hypothalamus, tectum, pont, et cervelet) mais elles n'expriment pas pour autant de marqueur de différenciation neurale après plusieurs mois. Ainsi, en tenant compte des données de Zigova *et al.*, de Walczak *et al.* et de Coenen *et al.*, l'intégration et la différenciation des cellules d'origine placentaire semblent être étroitement liées à l'âge des animaux utilisés et tout particulièrement à leur stade de développement. De plus, la

différenciation neuronale de ces cellules semble nécessiter un traitement neurogénique préalable à l'injection (Zigova, Song et al. 2002; Coenen, Kogler et al. 2005; Walczak, Chen et al. 2007). Il serait intéressant de tester l'implantation et la différenciation neuronale des cellules CD133+ issues du sang placentaire, avec ou sans traitement neurogénique préalable, dans des modèles murins souffrant de pathologies rétinienne neurodégénératives au cours de leur développement, en injectant ces cellules dans les premiers jours suivant la naissance.

Le sang de cordon ombilical humain et plus particulièrement les cellules souches d'origine placentaire s'avèrent être un outil d'avenir en transplantation, en thérapie cellulaire et en médecine régénérative. Leur utilisation en clinique dans le cadre du traitement des hémopathies est incontournable depuis de nombreuses années, notamment en cas de traitement d'urgence lorsqu'aucun greffon de moelle osseuse ou de sang périphérique compatible avec le patient à traiter n'est disponible. En cas de systématisation de prélèvement du sang placentaire à chaque naissance, la disponibilité en greffons serait très élevée. De plus, ces cellules souches placentaires, contrairement aux cellules ES, ne présentent pas de caractère carcinogène suite à leur transplantation. De ce fait, de nombreuses équipes se sont penchées sur de nouvelles utilisations potentielles du sang placentaire à vocation thérapeutique, en particulier dans la mise en place de traitements pour les maladies neurodégénératives. La possibilité de différenciation neuronale *in vitro* des cellules du sang de cordon ombilical humain ne fait plus aucun doute à ce jour, différentes cellules susceptibles de se différencier en neurones, en fonction des protocoles utilisés, ayant été caractérisées à ce jour. Cependant, leur mode de différenciation reste encore à être précisé, cette étape fondamentale s'avérant être incontournable pour utiliser ce type de cellules dans un contexte de médecine régénérative efficace. Si la pluripotentialité, sans transformation préalable, de certaines cellules souches du sang placentaire était avérée, elles pourraient ainsi être amenées à suppléer les cellules ES ou iPS dans de nombreux protocoles de recherche liés à la transplantation. A l'avenir,



l'utilisation des cellules souches du sang placentaire dans le cadre de protocoles cliniques autres que dans le domaine de l'hématologie va nécessiter de multiples approches *in vitro* et *in vivo* préalables afin de confirmer leur réel potentiel régénératif.

# **BIBLIOGRAPHIE**

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Altman, J. (1962). "Are new neurons formed in the brains of adult mammals?" Science **135**: 1127-8.
- Amescua, G., F. Collings, et al. (2008). "Effect of CXCL-1/KC production in high risk vascularized corneal allografts on T cell recruitment and graft rejection." Transplantation **85**(4): 615-25.
- Amit, M., M. K. Carpenter, et al. (2000). "Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture." Dev Biol **227**(2): 271-8.
- Andrews, R. G., J. W. Singer, et al. (1989). "Precursors of colony-forming cells in humans can be distinguished from colony-forming cells by expression of the CD33 and CD34 antigens and light scatter properties." J Exp Med **169**(5): 1721-31.
- Aoi, T., K. Yae, et al. (2008). "Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells." Science **321**(5889): 699-702.
- Arai, S., B. B. Thomas, et al. (2004). "Restoration of visual responses following transplantation of intact retinal sheets in rd mice." Exp Eye Res **79**(3): 331-41.
- Aramant, R. B. and M. J. Seiler (2004). "Progress in retinal sheet transplantation." Prog Retin Eye Res **23**(5): 475-94.
- Bach, S. P., A. G. Renehan, et al. (2000). "Stem cells: the intestinal stem cell as a paradigm." Carcinogenesis **21**(3): 469-76.
- Barbin, G., H. Pollard, et al. (1993). "Involvement of GABAA receptors in the outgrowth of cultured hippocampal neurons." Neurosci Lett **152**(1-2): 150-4.
- Barnard, E. A., P. Skolnick, et al. (1998). "International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function." Pharmacol Rev **50**(2): 291-313.
- Behar-Cohen, F., D. Benezra, et al. (2006). "Krypton laser photocoagulation induces retinal vascular remodeling rather than choroidal neovascularization." Exp Eye Res **83**(2): 263-75.
- Behar, T. N., Y. X. Li, et al. (1996). "GABA stimulates chemotaxis and chemokinesis of embryonic cortical neurons via calcium-dependent mechanisms." J Neurosci **16**(5): 1808-18.
- Behar, T. N., A. E. Schaffner, et al. (2000). "GABA receptor antagonists modulate postmitotic cell migration in slice cultures of embryonic rat cortex." Cereb Cortex **10**(9): 899-909.
- Behar, T. N., A. E. Schaffner, et al. (1998). "Differential response of cortical plate and ventricular zone cells to GABA as a migration stimulus." J Neurosci **18**(16): 6378-87.
- Ben-Ari, Y. (2002). "Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture." Nat Rev Neurosci **3**(9): 728-39.
- Ben-Yaakov, G. and H. Golan (2003). "Cell proliferation in response to GABA in postnatal hippocampal slice culture." Int J Dev Neurosci **21**(3): 153-7.

- Bettler, B. and J. Y. Tiao (2006). "Molecular diversity, trafficking and subcellular localization of GABAB receptors." Pharmacol Ther **110**(3): 533-43.
- Bicknese, A. R., H. S. Goodwin, et al. (2002). "Human umbilical cord blood cells can be induced to express markers for neurons and glia." Cell Transplant **11**(3): 261-4.
- Biedler, J. L., S. Roffler-Tarlov, et al. (1978). "Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones." Cancer Res **38**(11 Pt 1): 3751-7.
- Biedler, J. L. and B. A. Spengler (1976). "A novel chromosome abnormality in human neuroblastoma and antifolate-resistant Chinese hamster cell lines in culture." J Natl Cancer Inst **57**(3): 683-95.
- Biggs, C. S., L. J. Fowler, et al. (1995). "Impulse-dependent and tetrodotoxin-sensitive release of GABA in the rat's substantia nigra measured by microdialysis." Brain Res **684**(2): 172-8.
- Bok, D. and M. O. Hall (1971). "The role of the pigment epithelium in the etiology of inherited retinal dystrophy in the rat." J Cell Biol **49**(3): 664-82.
- Bonanno, G., A. Perillo, et al. (2004). "Clinical isolation and functional characterization of cord blood CD133+ hematopoietic progenitor cells." Transfusion **44**(7): 1087-97.
- Bonanno, G. and M. Raiteri (1993). "gamma-Aminobutyric acid (GABA) autoreceptors in rat cerebral cortex and spinal cord represent pharmacologically distinct subtypes of the GABAB receptor." J Pharmacol Exp Ther **265**(2): 765-70.
- Bowery, N. G. (1993). "GABAB receptor pharmacology." Annu Rev Pharmacol Toxicol **33**: 109-47.
- Bradley, M. B. and M. S. Cairo (2005). "Cord blood immunology and stem cell transplantation." Hum Immunol **66**(5): 431-46.
- Breunig, J. J., J. Silbereis, et al. (2007). "Notch regulates cell fate and dendrite morphology of newborn neurons in the postnatal dentate gyrus." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(51): 20558-63.
- Brown, J. A. and V. A. Boussiotis (2008). "Umbilical cord blood transplantation: Basic biology and clinical challenges to immune reconstitution." Clin Immunol.
- Browning, M. D., S. Endo, et al. (1993). "Phosphorylation of the GABAA receptor by cAMP-dependent protein kinase and by protein kinase C: analysis of the substrate domain." Neurochem Res **18**(1): 95-100.
- Buzanska, L., M. Jurga, et al. (2006). "Neuronal differentiation of human umbilical cord blood neural stem-like cell line." Neurodegener Dis **3**(1-2): 19-26.
- Buzanska, L., M. Jurga, et al. (2006). "Neural stem-like cell line derived from a nonhematopoietic population of human umbilical cord blood." Stem Cells Dev **15**(3): 391-406.
- Buzanska, L., E. K. Machaj, et al. (2002). "Human cord blood-derived cells attain neuronal and glial features in vitro." J Cell Sci **115**(Pt 10): 2131-8.
- Campbell, D. J., C. H. Kim, et al. (2003). "Chemokines in the systemic organization of immunity." Immunol Rev **195**: 58-71.

- Caplan, A. I. (1994). "The mesengenic process." Clin Plast Surg **21**(3): 429-35.
- Carter-Dawson, L. D., M. M. LaVail, et al. (1978). "Differential effect of the rd mutation on rods and cones in the mouse retina." Invest Ophthalmol Vis Sci **17**(6): 489-98.
- Chacko, D. M., A. V. Das, et al. (2003). "Transplantation of ocular stem cells: the role of injury in incorporation and differentiation of grafted cells in the retina." Vision Res **43**(8): 937-46.
- Chacko, D. M., J. A. Rogers, et al. (2000). "Survival and differentiation of cultured retinal progenitors transplanted in the subretinal space of the rat." Biochem Biophys Res Commun **268**(3): 842-6.
- Chen, N., J. E. Hudson, et al. (2005). "Human umbilical cord blood progenitors: the potential of these hematopoietic cells to become neural." Stem Cells **23**(10): 1560-70.
- Civin, C. I., L. C. Strauss, et al. (1984). "Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells." J Immunol **133**(1): 157-65.
- Coenen, M., G. Kogler, et al. (2005). "Transplantation of human umbilical cord blood-derived adherent progenitors into the developing rodent brain." J Neuropathol Exp Neurol **64**(8): 681-8.
- Couve, A., S. J. Moss, et al. (2000). "GABAB receptors: a new paradigm in G protein signaling." Mol Cell Neurosci **16**(4): 296-312.
- D'Cruz, P. M., D. Yasumura, et al. (2000). "Mutation of the receptor tyrosine kinase gene *Mertk* in the retinal dystrophic RCS rat." Hum Mol Genet **9**(4): 645-51.
- Dasari, V. R., D. G. Spomar, et al. (2008). "Umbilical cord blood stem cell mediated downregulation of fas improves functional recovery of rats after spinal cord injury." Neurochem Res **33**(1): 134-49.
- Delo, D. M., P. De Coppi, et al. (2006). "Amniotic fluid and placental stem cells." Methods Enzymol **419**: 426-38.
- Delyfer, M. N., T. Leveillard, et al. (2004). "Inherited retinal degenerations: therapeutic prospects." Biol Cell **96**(4): 261-9.
- Demarque, M., A. Represa, et al. (2002). "Paracrine intercellular communication by a Ca<sup>2+</sup>- and SNARE-independent release of GABA and glutamate prior to synapse formation." Neuron **36**(6): 1051-61.
- Domanska-Janik, K., A. Habich, et al. (2006). "Neural commitment of cord blood stem cells (HUCB-NSC/NP): therapeutic perspectives." Acta Neurobiol Exp (Wars) **66**(4): 279-91.
- Eldefrawi, A. T. and M. E. Eldefrawi (1987). "Receptors for gamma-aminobutyric acid and voltage-dependent chloride channels as targets for drugs and toxicants." Faseb J **1**(4): 262-71.
- Eminli, S., J. Utikal, et al. (2008). "Reprogramming of neural progenitor cells into induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2 expression." Stem Cells **26**(10): 2467-74.
- Evans, M. J. and M. H. Kaufman (1981). "Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos." Nature **292**(5819): 154-6.

- Fadilah, S. A., S. Vuckovic, et al. (2007). "Cord blood CD34+ cells cultured with FLT3L, stem cell factor, interleukin-6, and IL-3 produce CD11c+CD1a-/c- myeloid dendritic cells." Stem Cells Dev **16**(5): 849-55.
- Feldblum, S., A. Dumoulin, et al. (1995). "Comparative distribution of GAD65 and GAD67 mRNAs and proteins in the rat spinal cord supports a differential regulation of these two glutamate decarboxylases in vivo." J Neurosci Res **42**(6): 742-57.
- Fintz, A. C., I. Audo, et al. (2003). "Partial characterization of retina-derived cone neuroprotection in two culture models of photoreceptor degeneration." Invest Ophthalmol Vis Sci **44**(2): 818-25.
- Florek, M., M. Haase, et al. (2005). "Prominin-1/CD133, a neural and hematopoietic stem cell marker, is expressed in adult human differentiated cells and certain types of kidney cancer." Cell Tissue Res **319**(1): 15-26.
- Ford, A. M., C. A. Bennett, et al. (1998). "Fetal origins of the TEL-AML1 fusion gene in identical twins with leukemia." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(8): 4584-8.
- Fritschy, J. M., C. Schweizer, et al. (2003). "Pre- and post-synaptic mechanisms regulating the clustering of type A gamma-aminobutyric acid receptors (GABAA receptors)." Biochem Soc Trans **31**(Pt 4): 889-92.
- Fu, Y. S., Y. C. Cheng, et al. (2006). "Conversion of human umbilical cord mesenchymal stem cells in Wharton's jelly to dopaminergic neurons in vitro: potential therapeutic application for Parkinsonism." Stem Cells **24**(1): 115-24.
- Fukushima, N. and H. Ohkawa (1995). "Hematopoietic stem cells and microenvironment: the proliferation and differentiation of stromal cells." Crit Rev Oncol Hematol **20**(3): 255-70.
- Galli, R., A. Gritti, et al. (2003). "Neural stem cells: an overview." Circ Res **92**(6): 598-608.
- Giesert, C., G. Almeida-Porada, et al. (2001). "The monoclonal antibody W7C5 defines a novel surface antigen on hematopoietic stem cells." Ann N Y Acad Sci **938**: 175-83.
- Gluckman, E., H. A. Broxmeyer, et al. (1989). "Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling." N Engl J Med **321**(17): 1174-8.
- Gluckman, E. and V. Rocha (2005). "History of the clinical use of umbilical cord blood hematopoietic cells." Cytotherapy **7**(3): 219-27.
- Gouras, P. and T. Tanabe (2003). "Survival and integration of neural retinal transplants in rd mice." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **241**(5): 403-9.
- Goureau, O. and J. A. Sahel (2006). "[Retinal stem cells: mechanism of differentiation and therapeutic application]." Pathol Biol (Paris) **54**(2): 64-71.
- Gross, C. G. (2000). "Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma." Nat Rev Neurosci **1**(1): 67-73.

- Gussoni, E., Y. Soneoka, et al. (1999). "Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation." Nature **401**(6751): 390-4.
- Ha, Y., J. U. Choi, et al. (2001). "Neural phenotype expression of cultured human cord blood cells in vitro." Neuroreport **12**(16): 3523-7.
- Ha, Y., J. E. Lee, et al. (2003). "Intermediate filament nestin expressions in human cord blood monocytes (HCMNCs)." Acta Neurochir (Wien) **145**(6): 483-7.
- Habich, A., M. Jurga, et al. (2006). "Early appearance of stem/progenitor cells with neural-like characteristics in human cord blood mononuclear fraction cultured in vitro." Exp Hematol **34**(7): 914-25.
- Hannigan, M. O., C. K. Huang, et al. (2004). "Roles of PI3K in neutrophil function." Curr Top Microbiol Immunol **282**: 165-75.
- Hartong, D. T., E. L. Berson, et al. (2006). "Retinitis pigmentosa." Lancet **368**(9549): 1795-809.
- Haspel, R. L. and K. K. Ballen (2006). "Double cord blood transplants: filling a niche?" Stem Cell Rev **2**(2): 81-6.
- Hatten, M. E. (1999). "Central nervous system neuronal migration." Annu Rev Neurosci **22**: 511-39.
- Havens, A. M., E. Chiu, et al. (2008). "Stromal-derived factor-1alpha (CXCL12) levels increase in periodontal disease." J Periodontol **79**(5): 845-53.
- Haydar, T. F., F. Wang, et al. (2000). "Differential modulation of proliferation in the neocortical ventricular and subventricular zones." J Neurosci **20**(15): 5764-74.
- Hedlund, E. M., J. Pruszek, et al. (2008). "Embryonic Stem (ES) Cell-derived Pitx3-eGFP Midbrain Dopamine Neurons Survive Enrichment by FACS and Function in an Animal Model of Parkinson's Disease." Stem Cells.
- Hergeth, S. P., W. K. Aicher, et al. (2008). "Characterization and functional analysis of osteoblast-derived fibulins in the human hematopoietic stem cell niche." Exp Hematol **36**(8): 1022-34.
- Hidalgo, A., L. A. Weiss, et al. (2002). "Functional selectin ligands mediating human CD34(+) cell interactions with bone marrow endothelium are enhanced postnatally." J Clin Invest **110**(4): 559-69.
- Hill, D. R. and N. G. Bowery (1981). "3H-baclofen and 3H-GABA bind to bicuculline-insensitive GABA B sites in rat brain." Nature **290**(5802): 149-52.
- Hofmann, M., K. C. Wollert, et al. (2005). "Monitoring of bone marrow cell homing into the infarcted human myocardium." Circulation **111**(17): 2198-202.
- Hou, L., H. Cao, et al. (2003). "Induction of umbilical cord blood mesenchymal stem cells into neuron-like cells in vitro." Int J Hematol **78**(3): 256-61.
- Huntington, N. D. and D. M. Tarlinton (2004). "CD45: direct and indirect government of immune regulation." Immunol Lett **94**(3): 167-74.

- Ichii, M., K. Oritani, et al. (2008). "Regulation of human B lymphopoiesis by the transforming growth factor-beta superfamily in a newly established coculture system using human mesenchymal stem cells as a supportive microenvironment." Exp Hematol **36**(5): 587-97.
- Jaing, T. H., C. P. Yang, et al. (2007). "Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood utilizing double-unit grafts for five teenagers with transfusion-dependent thalassemia." Bone Marrow Transplant **40**(4): 307-11.
- John, G. R., S. L. Shankar, et al. (2002). "Multiple sclerosis: re-expression of a developmental pathway that restricts oligodendrocyte maturation." Nat Med **8**(10): 1115-21.
- Johnston, G. A. (1996). "GABAA receptor pharmacology." Pharmacol Ther **69**(3): 173-98.
- Jung, Y. J., K. H. Ryu, et al. (2008). "In vitro hepatic differentiation of human umbilical cord blood and bone marrow cells." Pediatr Hematol Oncol **25**(6): 481-91.
- Kang, K. S., S. W. Kim, et al. (2005). "A 37-year-old spinal cord-injured female patient, transplanted of multipotent stem cells from human UC blood, with improved sensory perception and mobility, both functionally and morphologically: a case study." Cytotherapy **7**(4): 368-73.
- Kao, C. H., S. H. Chen, et al. (2008). "Human umbilical cord blood-derived CD34+ cells may attenuate spinal cord injury by stimulating vascular endothelial and neurotrophic factors." Shock **29**(1): 49-55.
- Katz, M. L., G. E. Eldred, et al. (1987). "Lipofuscin autofluorescence: evidence for vitamin A involvement in the retina." Mech Ageing Dev **39**(1): 81-90.
- Keeney, M., W. Brown, et al. (2003). "Immunophenotypic characterization of CD34(pos) cells." J Biol Regul Homeost Agents **17**(3): 254-60.
- Kestendjieva, S., D. Kyurkchiev, et al. (2008). "Characterization of mesenchymal stem cells isolated from the human umbilical cord." Cell Biol Int.
- Kicic, A., W. Y. Shen, et al. (2003). "Differentiation of marrow stromal cells into photoreceptors in the rat eye." J Neurosci **23**(21): 7742-9.
- Kim, S. J., J. K. Lee, et al. (2008). "Surface modification of polydimethylsiloxane (PDMS) induced proliferation and neural-like cells differentiation of umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells." J Mater Sci Mater Med **19**(8): 2953-62.
- Klassen, H., J. F. Kiilgaard, et al. (2007). "Progenitor cells from the porcine neural retina express photoreceptor markers after transplantation to the subretinal space of allorecipients." Stem Cells **25**(5): 1222-30.
- Koike-Kiriyama, N., Y. Adachi, et al. (2007). "Human cord blood cells can differentiate into retinal nerve cells." Acta Neurobiol Exp (Wars) **67**(4): 359-65.
- Kollet, O., S. Shvitiel, et al. (2003). "HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34+ stem cell recruitment to the liver." J Clin Invest **112**(2): 160-9.



- Kopen, G. C., D. J. Prockop, et al. (1999). "Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(19): 10711-6.
- Krabbe, C., J. Zimmer, et al. (2005). "Neural transdifferentiation of mesenchymal stem cells--a critical review." Apmis **113**(11-12): 831-44.
- Krause, D. S., M. J. Fackler, et al. (1996). "CD34: structure, biology, and clinical utility." Blood **87**(1): 1-13.
- Krishek, B. J., X. Xie, et al. (1994). "Regulation of GABAA receptor function by protein kinase C phosphorylation." Neuron **12**(5): 1081-95.
- Kuh, S. U., Y. E. Cho, et al. (2005). "Functional recovery after human umbilical cord blood cells transplantation with brain-derived neurotrophic factor into the spinal cord injured rat." Acta Neurochir (Wien) **147**(9): 985-92; discussion 992.
- Kuznetsov, S. A., M. H. Mankani, et al. (2001). "Circulating skeletal stem cells." J Cell Biol **153**(5): 1133-40.
- Lakshminpathy, U. and C. Verfaillie (2005). "Stem cell plasticity." Blood Rev **19**(1): 29-38.
- Lansdorp, P. M. (1995). "Developmental changes in the function of hematopoietic stem cells." Exp Hematol **23**(3): 187-91.
- Lapidot, T., A. Dar, et al. (2005). "How do stem cells find their way home?" Blood **106**(6): 1901-10.
- Lataillade, J. J., D. Clay, et al. (2002). "Stromal cell-derived factor 1 regulates primitive hematopoiesis by suppressing apoptosis and by promoting G(0)/G(1) transition in CD34(+) cells: evidence for an autocrine/paracrine mechanism." Blood **99**(4): 1117-29.
- Laurie, D. J., W. Wisden, et al. (1992). "The distribution of thirteen GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. III. Embryonic and postnatal development." J Neurosci **12**(11): 4151-72.
- LaVail, M. M. and B. A. Battelle (1975). "Influence of eye pigmentation and light deprivation on inherited retinal dystrophy in the rat." Exp Eye Res **21**(2): 167-92.
- Lazzari, L., S. Lucchi, et al. (2001). "Evaluation of the effect of cryopreservation on ex vivo expansion of hematopoietic progenitors from cord blood." Bone Marrow Transplant **28**(7): 693-8.
- Leveillard, T., S. Mohand-Said, et al. (2004). "The search for rod-dependent cone viability factors, secreted factors promoting cone viability." Novartis Found Symp **255**: 117-27; discussion 127-30, 177-8.
- Lind, D., S. Franken, et al. (2005). "Characterization of the neuronal marker NeuN as a multiply phosphorylated antigen with discrete subcellular localization." J Neurosci Res **79**(3): 295-302.
- Lopez-Bendito, G., R. Lujan, et al. (2003). "Blockade of GABA(B) receptors alters the tangential migration of cortical neurons." Cereb Cortex **13**(9): 932-42.

- LoTurco, J. J., D. F. Owens, et al. (1995). "GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis." *Neuron* **15**(6): 1287-98.
- Lowell, S., A. Benchoua, et al. (2006). "Notch promotes neural lineage entry by pluripotent embryonic stem cells." *PLoS Biol* **4**(5): e121.
- Lowell, S., P. Jones, et al. (2000). "Stimulation of human epidermal differentiation by delta-notch signalling at the boundaries of stem-cell clusters." *Curr Biol* **10**(9): 491-500.
- Lujan, R., R. Shigemoto, et al. (2005). "Glutamate and GABA receptor signalling in the developing brain." *Neuroscience* **130**(3): 567-80.
- Lund, R. D., A. S. Kwan, et al. (2001). "Cell transplantation as a treatment for retinal disease." *Prog Retin Eye Res* **20**(4): 415-49.
- Lund, R. D., S. Wang, et al. (2006). "Human embryonic stem cell-derived cells rescue visual function in dystrophic RCS rats." *Cloning Stem Cells* **8**(3): 189-99.
- Lund, R. D., S. Wang, et al. (2007). "Cells isolated from umbilical cord tissue rescue photoreceptors and visual functions in a rodent model of retinal disease." *Stem Cells* **25**(3): 602-11.
- Ma, W. and J. L. Barker (1995). "Complementary expressions of transcripts encoding GAD67 and GABAA receptor alpha 4, beta 1, and gamma 1 subunits in the proliferative zone of the embryonic rat central nervous system." *J Neurosci* **15**(3 Pt 2): 2547-60.
- Ma, W., T. Tavakoli, et al. (2008). "Cell-Extracellular Matrix Interactions Regulate Neural Differentiation of Human Embryonic Stem Cells." *BMC Dev Biol* **8**(1): 90.
- Macdonald, R. L. and R. W. Olsen (1994). "GABAA receptor channels." *Annu Rev Neurosci* **17**: 569-602.
- MacLaren, R. E., R. A. Pearson, et al. (2006). "Retinal repair by transplantation of photoreceptor precursors." *Nature* **444**(7116): 203-7.
- Majeti, R., C. Y. Park, et al. (2007). "Identification of a hierarchy of multipotent hematopoietic progenitors in human cord blood." *Cell Stem Cell* **1**(6): 635-45.
- Maravall, M., Z. F. Mainen, et al. (2000). "Estimating intracellular calcium concentrations and buffering without wavelength ratioing." *Biophys J* **78**(5): 2655-67.
- Maric, D., Q. Y. Liu, et al. (2001). "GABA expression dominates neuronal lineage progression in the embryonic rat neocortex and facilitates neurite outgrowth via GABA(A) autoreceptor/Cl<sup>-</sup> channels." *J Neurosci* **21**(7): 2343-60.
- Marshall, F. H., K. A. Jones, et al. (1999). "GABAB receptors - the first 7TM heterodimers." *Trends Pharmacol Sci* **20**(10): 396-9.
- Marty, S., B. Berninger, et al. (1996). "GABAergic stimulation regulates the phenotype of hippocampal interneurons through the regulation of brain-derived neurotrophic factor." *Neuron* **16**(3): 565-70.

- McGuckin, C., N. Forraz, et al. (2006). "Embryonic-like stem cells from umbilical cord blood and potential for neural modeling." Acta Neurobiol Exp (Wars) **66**(4): 321-9.
- McGuckin, C., M. Jurga, et al. (2008). "Culture of embryonic-like stem cells from human umbilical cord blood and onward differentiation to neural cells in vitro." Nat Protoc **3**(6): 1046-55.
- McGuckin, C. P., N. Forraz, et al. (2004). "Umbilical cord blood stem cells can expand hematopoietic and neuroglial progenitors in vitro." Exp Cell Res **295**(2): 350-9.
- McKay, R. (1997). "Stem cells in the central nervous system." Science **276**(5309): 66-71.
- Meier, J. (2003). "The enigma of transmitter-selective receptor accumulation at developing inhibitory synapses." Cell Tissue Res **311**(3): 271-6.
- Mihic, S. J. and R. A. Harris (1997). "GABA and the GABAA receptor." Alcohol Health Res World **21**(2): 127-31.
- Miki, T. and S. C. Strom (2006). "Amnion-derived pluripotent/multipotent stem cells." Stem Cell Rev **2**(2): 133-42.
- Minguell, J. J., A. Erices, et al. (2001). "Mesenchymal stem cells." Exp Biol Med (Maywood) **226**(6): 507-20.
- Misgeld, U., M. Bijak, et al. (1995). "A physiological role for GABAB receptors and the effects of baclofen in the mammalian central nervous system." Prog Neurobiol **46**(4): 423-62.
- Mitchell, K. E., M. L. Weiss, et al. (2003). "Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia." Stem Cells **21**(1): 50-60.
- Miyasaka, M. and T. Tanaka (2004). "Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas." Nat Rev Immunol **4**(5): 360-70.
- Mizrak, D., M. Brittan, et al. (2008). "CD133: molecule of the moment." J Pathol **214**(1): 3-9.
- Mohand-Said, S., A. Deudon-Combe, et al. (1998). "Normal retina releases a diffusible factor stimulating cone survival in the retinal degeneration mouse." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(14): 8357-62.
- Mohand-Said, S., D. Hicks, et al. (2000). "Selective transplantation of rods delays cone loss in a retinitis pigmentosa model." Arch Ophthalmol **118**(6): 807-11.
- Mohand-Said, S., D. Hicks, et al. (1997). "Photoreceptor transplants increase host cone survival in the retinal degeneration (rd) mouse." Ophthalmic Res **29**(5): 290-7.
- Moon, Y. J., M. W. Lee, et al. (2008). "Hepatic differentiation of cord blood-derived multipotent progenitor cells (MPCs) in vitro." Cell Biol Int **32**(10): 1293-301.
- Mullen, R. J. and M. M. LaVail (1976). "Inherited retinal dystrophy: primary defect in pigment epithelium determined with experimental rat chimeras." Science **192**(4241): 799-801.
- Murphy, M., K. Reid, et al. (1997). "Neural stem cells." J Investig Dermatol Symp Proc **2**(1): 8-13.

- Nakagawa, M., M. Koyanagi, et al. (2008). "Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts." Nat Biotechnol **26**(1): 101-6.
- Nandrot, E., E. M. Dufour, et al. (2000). "Homozygous deletion in the coding sequence of the c-mer gene in RCS rats unravels general mechanisms of physiological cell adhesion and apoptosis." Neurobiol Dis **7**(6 Pt B): 586-99.
- Narasipura, S. D., J. C. Wojciechowski, et al. (2008). "P-Selectin coated microtube for enrichment of CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells from human bone marrow." Clin Chem **54**(1): 77-85.
- Newsholme, E. A., B. Crabtree, et al. (1985). "Glutamine metabolism in lymphocytes: its biochemical, physiological and clinical importance." Q J Exp Physiol **70**(4): 473-89.
- Nguyen, V. A., C. Furhapter, et al. (2008). "Endothelial cells from cord blood CD133(+)/CD34(+) progenitors share phenotypic, functional and gene expression profile similarities with lymphatics." J Cell Mol Med.
- Nicholls, D. G. (1989). "Release of glutamate, aspartate, and gamma-aminobutyric acid from isolated nerve terminals." J Neurochem **52**(2): 331-41.
- Nishio, Y., M. Koda, et al. (2006). "The use of hemopoietic stem cells derived from human umbilical cord blood to promote restoration of spinal cord tissue and recovery of hindlimb function in adult rats." J Neurosurg Spine **5**(5): 424-33.
- Okano, H. (2002). "Neural stem cells: progression of basic research and perspective for clinical application." Keio J Med **51**(3): 115-28.
- Okita, K., T. Ichisaka, et al. (2007). "Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells." Nature **448**(7151): 313-7.
- Osuji, N., K. Beiske, et al. (2007). "Characteristic appearances of the bone marrow in T-cell large granular lymphocyte leukaemia." Histopathology **50**(5): 547-54.
- Otani, A., M. I. Dorrell, et al. (2004). "Rescue of retinal degeneration by intravitreally injected adult bone marrow-derived lineage-negative hematopoietic stem cells." J Clin Invest **114**(6): 765-74.
- Owens, D. F. and A. R. Kriegstein (2002). "Is there more to GABA than synaptic inhibition?" Nat Rev Neurosci **3**(9): 715-27.
- Papayannopoulou, T. (2003). "Bone marrow homing: the players, the playfield, and their evolving roles." Curr Opin Hematol **10**(3): 214-9.
- Park, K. S., Y. S. Lee, et al. (2006). "In vitro neuronal and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood." J Vet Sci **7**(4): 343-8.
- Perdikogianni, C., H. Dimitriou, et al. (2008). "Could cord blood be a source of mesenchymal stromal cells for clinical use?" Cytotherapy **10**(5): 452-9.

- Petersen, B. E., W. C. Bowen, et al. (1999). "Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells." Science **284**(5417): 1168-70.
- Portiansky, E. L., C. G. Barbeito, et al. (2006). "Loss of NeuN immunoreactivity in rat spinal cord neurons during aging." Exp Neurol **202**(2): 519-21.
- Privat, A. (2005). "[Stem cells and neural repair]." Bull Acad Natl Med **189**(4): 605-13; discussion 613-4.
- Prockop, D. J. (1997). "Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues." Science **276**(5309): 71-4.
- Radtke, N. D., R. B. Aramant, et al. (2004). "Vision change after sheet transplant of fetal retina with retinal pigment epithelium to a patient with retinitis pigmentosa." Arch Ophthalmol **122**(8): 1159-65.
- Rane, M. J., D. Gozal, et al. (2005). "Gamma-amino butyric acid type B receptors stimulate neutrophil chemotaxis during ischemia-reperfusion." J Immunol **174**(11): 7242-9.
- Reinders, M. E., T. J. Rabelink, et al. (2006). "Angiogenesis and endothelial cell repair in renal disease and allograft rejection." J Am Soc Nephrol **17**(4): 932-42.
- Reynolds, B. A. and S. Weiss (1996). "Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell." Dev Biol **175**(1): 1-13.
- Riordan, N. H., K. Chan, et al. (2007). "Cord blood in regenerative medicine: do we need immune suppression?" J Transl Med **5**: 8.
- Rodriguez (2007). "Le point sur la greffe de sang de cordon." Oncologie **9**: 848–855.
- Rutella, S., G. Bonanno, et al. (2003). "Identification of a novel subpopulation of human cord blood CD34-CD133-CD7-CD45+lineage- cells capable of lymphoid/NK cell differentiation after in vitro exposure to IL-15." J Immunol **171**(6): 2977-88.
- Sanchez-Ramos, J., S. Song, et al. (2000). "Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro." Exp Neurol **164**(2): 247-56.
- Sanchez-Ramos, J. R. (2002). "Neural cells derived from adult bone marrow and umbilical cord blood." J Neurosci Res **69**(6): 880-93.
- Sanchez-Ramos, J. R., S. Song, et al. (2001). "Expression of neural markers in human umbilical cord blood." Exp Neurol **171**(1): 109-15.
- Schober, A. and A. Zerneck (2007). "Chemokines in vascular remodeling." Thromb Haemost **97**(5): 730-7.
- Sconocchia, G., K. Keyvanfar, et al. (2005). "Phenotype and function of a CD56+ peripheral blood monocyte." Leukemia **19**(1): 69-76.

- Seidel, J., B. Niggemann, et al. (2007). "The neurotransmitter GABA is a potent inhibitor of the stromal cell-derived factor-1alpha induced migration of adult CD133+ hematopoietic stem and progenitor cells." Stem Cells Dev **16**(5): 827-36.
- Seigel, G. M., A. S. Hackam, et al. (2007). "Human embryonic and neuronal stem cell markers in retinoblastoma." Mol Vis **13**: 823-32.
- Seiler, M. J. and R. B. Aramant (2005). "Transplantation of neuroblastic progenitor cells as a sheet preserves and restores retinal function." Semin Ophthalmol **20**(1): 31-42.
- Sheedlo, H. J., V. Gaur, et al. (1991). "Transplantation to the diseased and damaged retina." Trends Neurosci **14**(8): 347-50.
- Shmelkov, S. V., R. St Clair, et al. (2005). "AC133/CD133/Prominin-1." Int J Biochem Cell Biol **37**(4): 715-9.
- Sieghart, W. (1995). "Structure and pharmacology of gamma-aminobutyric acidA receptor subtypes." Pharmacol Rev **47**(2): 181-234.
- Sims, K. L., H. A. Weitsen, et al. (1972). "GABA catabolism: localization of succinic semialdehyde dehydrogenase in brain motor and sensory nuclei." Science **175**(29): 1479-80.
- Singec, I., R. Knoth, et al. (2006). "Defining the actual sensitivity and specificity of the neurosphere assay in stem cell biology." Nat Methods **3**(10): 801-6.
- Six, E. M., D. Bonhomme, et al. (2007). "A human postnatal lymphoid progenitor capable of circulating and seeding the thymus." J Exp Med **204**(13): 3085-93.
- Smith, G. B. and R. W. Olsen (1995). "Functional domains of GABAA receptors." Trends Pharmacol Sci **16**(5): 162-8.
- Song, H., C. F. Stevens, et al. (2002). "Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells." Nature **417**(6884): 39-44.
- Sordi, V., M. L. Malosio, et al. (2005). "Bone marrow mesenchymal stem cells express a restricted set of functionally active chemokine receptors capable of promoting migration to pancreatic islets." Blood **106**(2): 419-27.
- Spaeth, E., A. Klopp, et al. (2008). "Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells." Gene Ther **15**(10): 730-8.
- Stanley, E. G. and A. G. Elefanty (2008). "Building better beta cells." Cell Stem Cell **2**(4): 300-1.
- Steidl, U., S. Bork, et al. (2004). "Primary human CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells express functionally active receptors of neuromediators." Blood **104**(1): 81-8.
- Sun, W., L. Buzanska, et al. (2005). "Voltage-sensitive and ligand-gated channels in differentiating neural stem-like cells derived from the nonhematopoietic fraction of human umbilical cord blood." Stem Cells **23**(7): 931-45.

- Sun, Z. H., Y. L. Lai, et al. (2003). "Neural stem/progenitor cells survive and differentiate better in PD rats than in normal rats." Acta Neurochir Suppl **87**: 169-74.
- Svoboda, K., W. Denk, et al. (1997). "In vivo dendritic calcium dynamics in neocortical pyramidal neurons." Nature **385**(6612): 161-5.
- Takahashi, K., K. Okita, et al. (2007). "Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures." Nat Protoc **2**(12): 3081-9.
- Takahashi, K., K. Tanabe, et al. (2007). "Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors." Cell **131**(5): 861-72.
- Thomas, E. D. (1991). "Frontiers in bone marrow transplantation." Blood Cells **17**(2): 259-67.
- Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, et al. (1998). "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts." Science **282**(5391): 1145-7.
- Tuch, B. E. (2006). "Stem cells--a clinical update." Aust Fam Physician **35**(9): 719-21.
- von Philipsborn, A. and M. Bastmeyer (2007). "Mechanisms of gradient detection: a comparison of axon pathfinding with eukaryotic cell migration." Int Rev Cytol **263**: 1-62.
- Walczak, P., N. Chen, et al. (2007). "Long-term cultured human umbilical cord neural-like cells transplanted into the striatum of NOD SCID mice." Brain Res Bull **74**(1-3): 155-63.
- Wang, D. D., D. D. Krueger, et al. (2003). "GABA depolarizes neuronal progenitors of the postnatal subventricular zone via GABAA receptor activation." J Physiol **550**(Pt 3): 785-800.
- Watanabe, M., K. Maemura, et al. (2002). "GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs." Int Rev Cytol **213**: 1-47.
- Watt, S. M., E. Austin, et al. (2007). "Cryopreservation of hematopoietic stem/progenitor cells for therapeutic use." Methods Mol Biol **368**: 237-59.
- Weissman, I. L. (2000). "Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution." Cell **100**(1): 157-68.
- Wright, N. A. (2000). "Epithelial stem cell repertoire in the gut: clues to the origin of cell lineages, proliferative units and cancer." Int J Exp Pathol **81**(2): 117-43.
- Wu, Y., J. Wang, et al. (2007). "Bone marrow-derived stem cells in wound healing: a review." Wound Repair Regen **15 Suppl 1**: S18-26.
- Yin, A. H., S. Miraglia, et al. (1997). "AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells." Blood **90**(12): 5002-12.
- Young, M. J., J. Ray, et al. (2000). "Neuronal differentiation and morphological integration of hippocampal progenitor cells transplanted to the retina of immature and mature dystrophic rats." Mol Cell Neurosci **16**(3): 197-205.
- Zaehres, H. and H. R. Scholer (2007). "Induction of pluripotency: from mouse to human." Cell **131**(5): 834-5.

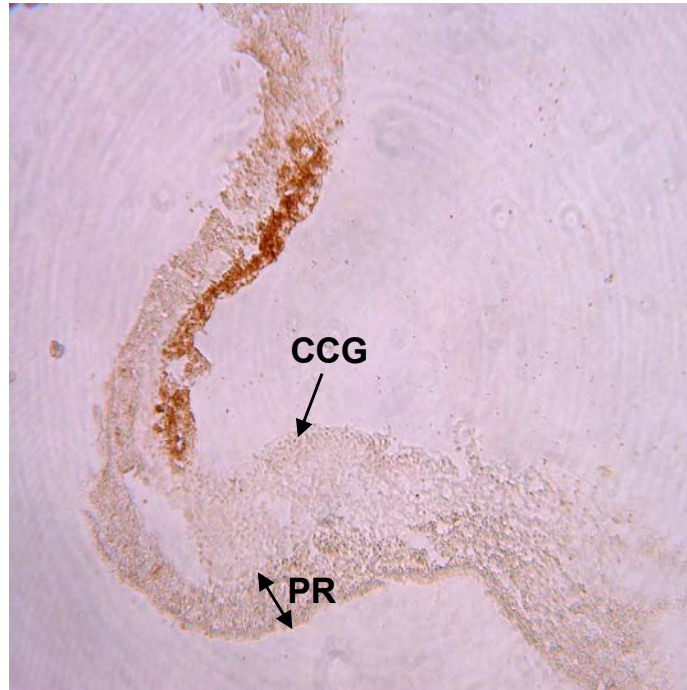
Zeppernick, F., R. Ahmadi, et al. (2008). "Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients." Clin Cancer Res **14**(1): 123-9.

Zigova, T., S. Song, et al. (2002). "Human umbilical cord blood cells express neural antigens after transplantation into the developing rat brain." Cell Transplant **11**(3): 265-74.



# **ANNEXE**

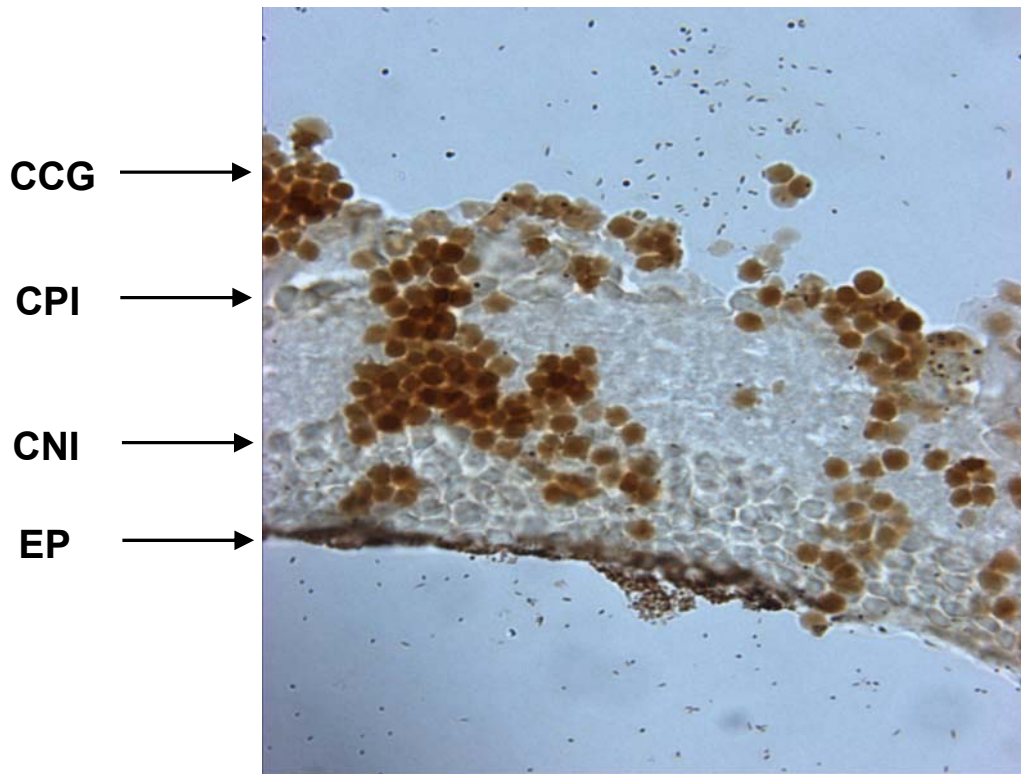
## ANNEXE 1 : Injection de cellules souches CD133+ dans le vitré de souris balb/c photolésées



Afin de créer une photolésion dans la rétine de souris Balb/c, ces souris ont été préalablement illuminées sous 2000 lux continus pendant 8 jours. Après photolésion, on observe une perte locale des photorécepteurs caractéristique de ce type de lésion. Les cellules CD133+ humaines issues du sang placentaire ont ensuite été injectées dans le vitrée.

Après 3 semaines *in vivo*, les immunomarquages avec un anticorps anti-nestine spécifique à l'humain révèlent que les cellules humaines injectées (couleur marron/rouge) se sont implantées dans la couche des cellules granulaires. De plus, ces cellules humaines ne sont présentes que dans la zone de la rétine où les photorécepteurs sont absents (*i.e.* sur la gauche de la photo, les photorécepteurs étant encore présents sur la partie basse de la photo (PR)). Abréviations : CPI, Couche Plexiforme Interne ; CNI, Couche Nucléaire Interne ; CCG, Couche des Cellules Granuleuses ; PR, Photorécepteurs.

## ANNEXE 2 : Injection de cellules souches CD133+ dans le vitré de souris *rd10*



Les souris *rd10* souffrent d'une perte caractéristique de tous les photorécepteurs au niveau rétinien (normalement présents entre l'épithélium pigmentaire (EP) et la couche nucléaire interne (CNI).

Les cellules CD133+ humaines issues du sang placentaire ont ensuite été injectées dans le vitrée.

Après 8 semaines *in vivo*, les immunomarquages avec un anticorps anti-*nestine* spécifique à l'humain révèlent que les cellules humaines injectées (couleur marron/rouge) se sont implantées dans les différentes couches des cellules granulaires après 3 semaines *in vivo*. Cependant, aucune différenciation n'a pu être observée, ces cellules n'exprimant pas de marqueur mature de différenciation neuronale. Abréviations : CPI, Couche Plexiforme Interne ; CNI, Couche Nucléaire Interne ; CCG, Couche des Cellules Granuleuses ; EP, Epithélium Pigmentaire.



## **RESUME**

### **EXPLORATION DU POTENTIEL NEURAL DES CELLULES DU SANG DE CORDON OMBILICAL HUMAIN**

Ces dernières décennies, la demande croissante en greffons de moëlle osseuse utilisés en clinique pour le traitement des hémopathies a soulevé un problème de disponibilité restreinte ne permettant pas la prise en charge systématique de tous les patients. La recherche de nouvelles sources de cellules souches a permis de mettre en exergue la capacité du sang placentaire à régénérer le compartiment hématopoïétique des malades après greffe. Des études complémentaires ont également permis de mettre en évidence la possible différenciation *in vitro* des cellules du sang de cordon ombilical en cellules autres qu'hématopoïétiques, et en particulier en cellules neuronales. Cependant, l'origine de ces cellules susceptibles de se différencier en neurones est encore floue à l'heure actuelle.

Grâce à des tris immunomagnétiques dirigés contre différents marqueurs de cellules souches, nous avons mis en évidence que le compartiment cellulaire à l'origine des cellules neuronales *in vitro* était caractérisé par le phénotype souche CD133+ / CD34-. De plus, ces cellules nécessitent un contact cellulaire étroit avec des cellules facilitatrices afin d'initier leur différenciation neuronale. Ainsi, le tri via le CD133 permet un enrichissement en cellules neurogéniques à partir du sang de cordon ombilical humain.

Dans un deuxième temps, nous avons également étudié la fonctionnalité d'un neurotransmetteur, l'acide gamma-aminobutyrique (GABA), sur les cellules du sang placentaire humain. En plus d'exprimer différentes sous-unités des récepteurs au GABA, les cellules du sang placentaire sont capables de migrer activement en réponse à un gradient de GABA. De plus, la fraction cellulaire qui a migré est enrichie en cellules neurogéniques et hématopoïétiques.

Nos résultats ont donc permis d'obtenir de nouvelles données phénotypiques et fonctionnelles sur les cellules souches du sang de cordon ombilical humain douées d'un potentiel neurogénique. Ces données suggèrent que le sang de cordon possède des cellules souches dont le potentiel régénératif dépasse le seul cadre de l'hématopoïèse. Cela augmente l'intérêt de leur utilisation dans la mise en place de protocoles de thérapie cellulaire notamment dans les dégénérescences du système nerveux central et périphérique.