

UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE BESANÇON

Année 2009-2010

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE

SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE, ASPECTS MOLECULAIRES SCIENCES ET TECHNIQUES

*Thérapie cellulaire du Système Nerveux Central :
évaluation de la greffe de cellules souches périphériques.*

THESE

présentée et soutenue publiquement

le 24 / 11 / 2010

par

Karine CHARRIÈRE

Née le 03/02/1981 à Montbéliard (25)

Commission d'Examen :

Rapporteurs	P. CHARBORD	DR INSERM UMR972
	L. LESCAUDRON	Maître de Conférences, Université de Nantes
Examineurs	C. BOTTERI	Professeur, Université de Franche-Comté
	P-Y. RISOLD	CR INSERM, Université de Franche-Comté
Directeur de thèse	D. FELLMANN	Professeur, Université de Franche-Comté

Remerciements

Maintenant que ma thèse est passée, je peux écrire ces remerciements à tête reposée. J'aurai pensé que ce passage serait le plus simple à écrire mais il s'avère que non. En effet, comment exprimer, sans que cela sonne creux, tout ce que l'on ressent quand on a passé tant de temps à travailler, rire, pleurer (parfois) dans une même équipe ? Quoiqu'il en soit, il est essentiel que ceux qui lisent ces quelques lignes sachent que tout est sincère.

Monsieur le Professeur Charbord, vous m'avez fait l'immense honneur d'accepter de juger mon travail. Les nombreuses remarques que vous avez faites sur mon manuscrit étaient d'une rare pertinence et m'ont permis de jeter sur les cellules souches un regard plus éclairé. Je regrette que ces discussions n'aient eu lieu un peu plus tôt. Je suis très reconnaissante à Monsieur Lescaudron qui, avec un regard de spécialiste, a accepté de porter un avis critique sur mon travail. Je suis aussi très sensible à l'honneur que Madame le Professeur Botteri m'a fait en présidant mon jury de thèse.

Monsieur le Professeur Dominique Fellmann, je vous remercie de m'avoir proposé, pour mon Master 2 puis pour ma thèse, un sujet aussi innovant que celui traitant des cellules souches dans un cadre de thérapie cellulaire du système nerveux central. Vous m'avez donné l'occasion de faire mes premiers pas dans le domaine de la recherche, tout en me laissant une très grande autonomie afin que j'acquière des connaissances indispensables au métier de chercheur. Soyez assuré de toute ma gratitude.

Un grand merci à l'association Franche-Comté Alzheimer qui a financée une grande partie de ces travaux.

Je tiens, également à remercier Madame le Professeur Michèle Jouvenot, directrice de l'équipe EA3922 « Estrogènes, expression génique et pathologies du système nerveux central », pour m'avoir accueillie au sein de son équipe de recherche. C'est avec respect que je la remercie de m'avoir accordé sa confiance durant toutes ces années.

J'adresse mes plus profonds remerciements à Pierre-Yves Risold. Bien qu'en dehors de mon sujet, tu m'as énormément aidé tout au long de ce doctorat, que ce soit par tes conseils ou tes suggestions, les encouragements que tu n'as cessés de me faire et le fait que tu as toujours su te rendre disponible malgré la quantité astronomique de travail que tu pouvais avoir. Je souhaitais te dire – au moins une fois et malgré ma (très) légère impertinence – tout le respect que j'ai pour toi, tant au niveau humain que scientifique. Alors pour tout ça, merci.

Passons maintenant au reste de l'équipe ! Comment vous rendre ce que vous m'avez apporté simplement par des mots ? Cela semble tellement peu. Je vais quand même me lancer dans l'exercice et advienne que pourra !

Un grand merci à Annie pour les coupes au cryostat et à Claude C qui a toujours été là quand une question me turlupinait, au niveau technique, hygiène et sécurité et aussi orthographe !!! Gabbie, tu es quelqu'un que j'apprécie beaucoup. Nous n'avons pas vraiment eu l'occasion de travailler ensemble mais tu m'as montré les arcanes de l'HIS, que tu maîtrises si bien (même si dès fois, les HIS n'en font qu'à leur tête !!). A Fafa qui m'a appris - presque - tout ce que je sais sur les extractions en tout genre, les PCR, les gels, bref, la bio mol, je ne dirai qu'une chose : trop de dNTPs tue le dNTP ! Claude J, pro du slicer et du pinceau, sans parler de la microscopie électronique ! Si je te dis simplement « Merci », tu sauras que ça vient du fond du cœur. Christophe, on a tellement cherché des astuces ensemble pour faire marcher une manip' que je crois que toi aussi tu peux dire « J'ai testé pour vous ». En plus, bien entendu, de « the bubble is ... » ! Rendons à César ce qui appartient à César et à Dieu ce qui est à Dieu : c'est toi qui es à l'origine de ce bon mot (qui a été optimisé par la suite). Alors MERKI au « professionnel de la profession » !

Aux étudiants qui ont été mes compagnons d'(in)fortune ☺, on a passé des années assez mémorables, non ? Merci à Anna, Georges, Fabrice, Carole et Kevin qui sont partis avant moi mais avec qui j'ai passé de bons moments. A Sophie, on refera des courses dans les couloirs et je m'outrerais à nouveau, promis ! Merci d'avoir été là. Je sais que tu réussiras une belle carrière scientifique : tu as tout pour. Sandrine, je te souhaite un beau parcours. Aux étudiants de la Bouloie, Steph, Nicolas, Fatima et Nicole et à Anne, mon autre moitié ATER : un gros clin d'œil scientifique.

Je ne pouvais clore ces remerciements sans un merci à ma famille. Papa, maman, vous m'avez toujours soutenu dans ce que je voulais faire. Vous avez toujours eu confiance en moi et, pour votre soutien inébranlable, je voulais juste dire que je vous aime.

Guillaume, quelques lignes ne suffiront pas et je ne sais même pas par où commencer... Merci d'être resté près de moi pendant tout ce temps, d'avoir tout assumé pendant les mois précédant la thèse. Si tu savais comme ça m'a aidé ! Merci aussi d'être mon « number one fan ! » Pour tout ça et pour tellement plus : je t'aime.

Enfin, je ne serai pas moi si je ne glissais pas un petit mot pour Manwë, Banshee, Grishka et Az, mes chats !

A tous et à ceux que j'ai oubliés : MERCI !

Dédicace

La souris bleutée

Au trente-troisième sous-sol d'un lugubre labo
Buvant du vitriol au bord du lavabo,
Une souris verte mâle promenait çà et là
Sa tête macrocéphale et son gris de gala.
Le muridé s'approche du bromure d'éthidium :
Sur l'étagère bancroche, elle sirote le sérum
Puis dans l'étuve plonge pour y faire sa toilette.
Elle en sort et s'éponge. Pour finir la coquette
Tartine museau moustaches de Baume du Canada,
Repart et s'amourache au passage d'un soda
Au bleu de méthylène doublé de glycérine
Tiré d'un fût d'erien aux cultures corallines.
Des effets des breuvages notre ami s'apprivoise
A d'autres vagabondages d'une vulgaire gerboise !
Le géniteur s'empresse de rejoindre l'internat
Vers cent mille maîtresses ardentes comme l'Etna
Et d'autant siciliennes de feu cellules souches
Qu'aucune de ces chrétiennes ne se contente d'une couche.
D'importation, la source, d'en bas de onze étages
Se trouve des ressources à milles concubinages.
A cette heure de l'Aurore il pénètre en les cages
Et dans les corridors de son droit de cuissage.
Soudain, dans le couloir du trente-troisième sous-sol,
Quelques pions du dortoir à tête de campagnols
Murmurent leurs saluts à leur ombre machinale
Seule, fort d'un institut, à lui seul matinal.
Le mâle à tête d'œdème, gigantesques oreilles,
File vite fait du harem par peur qu'on en surveille
Ses torrides venues aux allures de débauches.
Il emprunte un conduit - le premier sur la gauche –
Pour rejoindre au plus tôt des sous-sols la cave,
Milliards de souriceaux qui piaillent de onze octaves.
Ainsi, le père amant dit à chacun « Bonjour »
En bouchant ses tympan, l'enclume et le tambour.
Descendance peut-elle se souffrir de l'excès ?
Ou faut-il kyrielle de vies puis de décès.
Emprunte de GFP le mâle souris, plus tard,
Vers une autre épopée aux senteurs des nectars,
Parcourra le monde dans les soutes, en les cales
De notre mappemonde. Pourvu qu'il se régale !
Au trente-troisième sous-sol d'un lugubre labo
Une fleur de tournesol rappelle Mexico.

Ecrit par Guillaume Arnoult.

TABLES

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES.....	- 11 -
INDEX DES ILLUSTRATIONS	- 12 -
INDEX DES TABLEAUX	- 14 -
INDEX DES ANNEXES.....	- 14 -
ABREVIATIONS	- 15 -
INTRODUCTION	21
I. Introduction générale.....	23
II. Les cellules souches embryonnaires.....	28
III. La cellule souche adulte	37
IV. La cellule souche mésenchymateuse	53
V. CSM et thérapie cellulaire du Système Neveux Central	66
OBJECTIFS.....	- 83 -
MATERIEL ET METHODES	87
1ère partie : Greffe de moelle osseuse <i>in vivo</i>	89
I. Les modèles animaux	91
II. Devenir des cellules greffées.....	94
2ème partie : Modèles d'étude <i>in vitro</i>	101
I. Obtention des CMO et des CMOA murines à partir de moelle osseuse	103
II. Modèle de greffe sur tranches	107
III. Devenir des CMO/CMOA sur les tranches de tissu en culture.....	110
IV. Devenir des tranches.....	112
V. Devenir des CMO/CMOA en culture.....	122
Tampons et solutions.....	127
RESULTATS	- 133 -
1ère partie : Greffe de moelle osseuse <i>in vivo</i>	135
I. Analyses de la greffe de CMO <i>in vivo</i>	137
II. Analyses de la greffe de CMO : utilisation de souris males GFP.....	142
2ème partie : Modèles d'étude <i>in vitro</i>	149
I. Cultures organotypiques d'hippocampe de souris	151
II. Comportement des cellules greffées : survie, prolifération, migration.....	153
III. Aspects morphologiques, capacité de différenciation	166
IV. Influence des cellules issues de la moelle osseuse sur le tissu nerveux.....	176
3ème Partie : Caractérisation des fractions cellulaires	185
I. Genes potentiellement associés aux cellules souches.....	187
II. genes potentiellement impliqués dans des voies de différenciation	191
III. Autres gènes étudiés	197
DISCUSSION.....	199
1ère partie : Greffe de moelle osseuse <i>in vivo</i>	201
2ème partie : Modèles d'étude <i>in vitro</i>	209
I. Comportement des cellules greffées.....	212
II. Réaction du tissu nerveux à l'apport de cellules	218
3ème Partie : Caractérisation des fractions cellulaires	221
I. Hétérogénéité des fractions cellulaires.....	223
II. CMOAP5 : une fraction enrichie en cellules souches.....	225
III. CMOAP1 : une fraction cellulaire protectrice pour le tissu nerveux en culture	227
CONCLUSION	237
PERSPECTIVES.....	241
BIBLIOGRAPHIE.....	245
ANNEXES	275

INDEX DES ILLUSTRATIONS

FIGURE 1 : CASCADES DE SIGNALISATION IMPLIQUEES DANS L'AUTORENOUVELLEMENT DES CELLULES ES MURINES.	34
FIGURE 2 : REGULATION EXTRINSEQUE ET INTRINSEQUE DES CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES CHEZ LA SOURIS ET CHEZ L'HOMME.	36
FIGURE 3 : AUTO-RENOUVELLEMENT SYMETRIQUE DES CELLULES SOUCHES.	39
FIGURE 4 : DIVISIONS SYMETRIQUES ET ENGAGEMENTS ASYMETRIQUES.	40
FIGURE 5 : DIVISIONS ASYMETRIQUES.	41
FIGURE 6 : MECANISME CELLULAIRE DE L'AUTO-RENOUVELLEMENT ASYMETRIQUE DETERMINISTE.	42
FIGURE 7 : COMBINAISON DES MODELES SYMETRIQUES ET ASYMETRIQUES D'AUTO-RENOUVELLEMENT DES CELLULES SOUCHES, AVEC SEGREGATION PREFERENTIELLE DES BRINS D'ADN.	43
FIGURE 8 : REGULATION INSTRUCTIVE OU REGULATION SELECTIVE.	45
FIGURE 9 : TRANS-DIFFERENCIATION ET TRANS-DETERMINATION.	50
FIGURE 10 : PERSISTANCE DES CELLULES SOUCHES ADULTES PLURIPOTENTES.	51
FIGURE 11 : FUSION D'UNE CELLULE SOUCHE AVEC UNE CELLULE DIFFERENCIEE, AVEC ET SANS MITOSE REDUCTIONNELLE.	52
FIGURE 12 : MODELE DE CONTRIBUTION DES CSM A LA MAINTENANCE TISSULAIRE.	56
FIGURE 13 : EFFETS DES CSM SUR LES CELLULES IMMUNITAIRES <i>IN VITRO</i>	65
FIGURE 14 : SCHEMA DE LA CO-CULTURE.	109
FIGURE 15 : COURBES D'ANALYSES POUR LES QPCR DE DEUX GENES D'INTERET, NF-M ET CNPASE.	120
FIGURE 16 : CERVEAUX ET RATES DE SOURIS BALB/C IRRADIEES ET GREFFEES PAR DES CMO DE MALES FVB.	138
FIGURE 17 : ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE 1,2% APRES AMPLIFICATION PAR PCR DE Ssty1.	141
FIGURE 18 : FROTTIS SANGUINS DE SOURIS GREFFEES PAR DES CMO EXPRIMANT LA GFP.	142
FIGURE 19 : DISTRIBUTION DES CELLULES GFP+ DANS DIVERSES REGIONS CEREBRALES.	143
FIGURE 20 : COUPES DE CERVEAU DE SOURIS GREFFEE AVEC DES CMO ISSUES DE SOURIS EXPRIMANT LA GFP MARQUEES PAR IMMUNOHISTOCHEMIE.	146
FIGURE 21 : PROLIFERATION DE CELLULES GLIALES SUR DEUX TRANCHES D'HIPPOCAMPE AVEC CORTEX.	152
FIGURE 22 : REPARTITION DES CELLULES GFP POSITIVES ISSUES DE LA FRACTION TOTALE DE MOELLE OSSEUSE SUR CULTURES ORGANOTYPIQUES.	154
FIGURE 23 : SUIVI DE DEUX TRANCHES D'HIPPOCAMPE AYANT REÇU UN DEPOT DE CMO EXPRIMANT LA GFP.	155
FIGURE 24 : REPARTITION DES CELLULES GFP POSITIVES ISSUES DE LA FRACTION TOTALE DE CMOAP5 SUR CULTURES ORGANOTYPIQUES. .	157
FIGURE 25 : PHENOMENE DE MOBILITE DES CMOAP5 EN BORDURE DE TRANCHE.	158
FIGURE 26 : REPARTITION DES CELLULES GFP POSITIVES ISSUES DE LA FRACTION TOTALE DE CMOAP1 SUR CULTURES ORGANOTYPIQUES. .	160
FIGURE 27 : HIPPOCAMPE AYANT REÇU UN DEPOT DE CMOAP1.	162
FIGURE 28 : REPARTITION DES CELLULES GFP POSITIVES CMOAP5 ASSOCIEES A DES CMO.	165
FIGURE 29 : MORPHOLOGIE DES CMO EXPRIMANT LA GFP DEPOSEES SUR LES TRANCHES D'HIPPOCAMPE EN CULTURE.	167
FIGURE 30 : IMMUNODETECTION DE NeuN SUR TRANCHE D'HIPPOCAMPE 7 JOURS APRES DEPOT DE CMO.	167
FIGURE 31: TRANCHES D'HIPPOCAMPE 3, 7, ET 10 JOURS APRES DEPOT DE CMOAP1 OU CMOAP5.	170

FIGURE 32 : CERVEAU DE SOURIS NFH-GF AGEE DE 1 JOUR.	173
FIGURE 33 : GENOTYPAGE D'UNE PORTEE DE SOURIS NFH-GFP PAR PCR AVEC AMORCES GFP.	173
FIGURE 34 : CERVEAU DE SOURIS NFH-GFP AGEES DE 1 JOUR.	174
FIGURE 35 : IMMUNODETECTION DE NF OU NEUN (G-L) SUR DES TRANCHES D'HIPPOCAMPE 3 (A, D, G ET J) ET 10 JOURS APRES AVOIR ETE TRAITEES	178
FIGURE 36 : QUANTIFICATION DU MARQUAGE OBTENU APRES IMMUNOHISTOCHIMIE SUR TRANCHES D'HIPPOCAMPE APRES ADJONCTION, OU NON, DE CMOAP1.	179
FIGURE 37 : EXPRESSION RELATIVE DE B III TUBULINE, CNPASE, GFAP ET NF APRES CO-CULTURE AVEC DES CMOAP1 OU DES CMOAP5.	181
FIGURE 38 : QUANTIFICATION DE LA MORT CELLULAIRE PAR L'IODURE DE PROPIDIUM SUR TRANCHES D'HIPPOCAMPE AVEC OU SANS CMOAP1.	183

INDEX DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : NOMBRE D'ARTICLES CONCERNANT LES CELLULES SOUCHES, SUR UNE PERIODE DE 5 ANS.	25
TABLEAU 2 : EXEMPLE DE MARQUEURS DE SURFACE UTILISES DANS LA LITTERATURE POUR ISOLER ET/OU CARACTERISER DES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES.	60
TABLEAU 3 : SERIES EXPERIMENTALES SOURIS RECEVEUSES BALB/C FEMELLES.	92
TABLEAU 4 : LISTE DES ANTICORPS UTILISES.	96
TABLEAU 5 : RESUME DES PROTOCOLES DE DEPOT SUR TRANCHES.	108
TABLEAU 6 : LES DIFFERENTS ANTICORPS UTILISES, SPECIFICITES ET DILUTIONS.	111
TABLEAU 7 : SEQUENCES DES AMORCES UTILISEES ET LEURS CONDITIONS D'UTILISATION POUR LA PCR SEMI-QUANTITATIVE.	116
TABLEAU 8 : SEQUENCES DES AMORCES UTILISEES ET LEURS CONDITIONS D'UTILISATION EN QPCR.	121
TABLEAU 9 : CLASSIFICATION FONCTIONNELLE DES GENES ETUDIES EN PCR ARRAY	123
TABLEAU 10 : GENES ETUDIES : SYMBOLES, POSITION, UNIGENE ET REFSEQ.	126
TABLEAU 11 : PROPORTIONS DE CELLULES DOUBLEMENT MARQUEES SUR LE TOTAL DE CELLULES GFP PAR CERVEAU SELON LES ANIMAUX. ..	144
TABLEAU 12 : VARIATION D'EXPRESSION DES NIVEAUX D'ARNM POTENTIELLEMENT ASSOCIES AUX CELLULES SOUCHES.	189
TABLEAU 13 : VARIATION D'EXPRESSION DES NIVEAUX D'ARNM POTENTIELLEMENT IMPLIQUEE DANS LA VOIE DE DIFFERENCIATION DES OSTEOCYTES.	192
TABLEAU 14 : VARIATION D'EXPRESSION DES NIVEAUX D'ARNM POTENTIELLEMENT IMPLIQUE DANS LA VOIE DE LA DIFFERENCIATION DES CHONDROCYTES.	192
TABLEAU 15 : VARIATION D'EXPRESSION DES NIVEAUX D'ARNM POTENTIELLEMENT IMPLIQUE DANS LA VOIE DE LA DIFFERENCIATION DES ADIPOCYTES.	194
TABLEAU 16 : VARIATION D'EXPRESSION DES NIVEAUX D'ARNM POTENTIELLEMENT IMPLIQUE DANS LA VOIE DE LA DIFFERENCIATION DES CELLULES ENDOTHELIALES.	195
TABLEAU 17 : VARIATION D'EXPRESSION DES NIVEAUX D'ARNM POTENTIELLEMENT IMPLIQUE DANS LA VOIE DE LA DIFFERENCIATION DES CELLULES VASCULAIRES MUSCULAIRES LISSES.	196
TABLEAU 18 : VARIATION DES TAUX D'EXPRESSION DES AUTRES ARNM ETUDIES.	198

INDEX DES ANNEXES

ANNEXE 1 : VARIATION D'EXPRESSION DES NIVEAUX D'ARNM ETUDIES PAR PCR ARRAY.	- 276 -
ANNEXE 2 : COMMUNICATIONS ORALES ET AFFICHEES	- 299 -
ANNEXE 3 : PUBLICATION.	- 300 -

ABREVIATIONS

ABREVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique	DMEM : <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire	dNTP : appellation courante du mélange des quatre désoxyribonucléotides : dATP (désoxy adénine tri-phosphate), dCTP (désoxy cytosine tri-phosphate), dGTP (désoxy guanine tri-phosphate), dTTP (désoxy thymine tri-phosphate)
APP : <i>amyloid precursor protein</i>	ECM : matrice extracellulaire
ARN : acide ribonucléique / ARNm : ARN messenger	EDTA : éthylènediaminotétraacétate disodique
BDNF : <i>brain derived neurotrophic factor</i>	EGF : <i>epidermal growth factor</i>
BET : bromure d'éthidium	ERas : <i>ES cell-expressed Ras</i>
bFGF : <i>basic fibroblast growth factor</i>	ERK(s) : <i>extracellular-signal-regulated kinase(s)</i>
BME : milieu basal de Eagle	FGF8 : <i>fibroblast growth factor 8</i>
BMP(s) : <i>bone morphogenic protein(s)</i>	FISH : hybridation <i>in situ</i> fluorescente
BMPR : récepteurs aux BMPs	FoxD3 : <i>forkhead box D3</i>
BrdU : bromodéoxyuridine	FSK : forskoline
CD : <i>cluster of differentiation</i>	GAB1 : <i>growth factor receptor bound protein 2-associated protein 1</i>
Cellules EC : cellules souches cancéreuses	GABA : <i>γ-aminobutyric acid</i>
Cellules EC : <i>embryonal carcinoma</i> ; cellules indifférenciées issues des tératocarcinomes	GalC : <i>galactosylceramidase</i>
Cellules ES : cellules souches embryonnaires	GAP43 : <i>growth-associated protein 43</i>
Cellules ES : cellules souches embryonnaires	GAPDH : <i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
CFU-f : <i>colony-forming unit-fibroblastic</i>	GCTM : <i>germ cell tumour marker</i>
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité	GDNF : <i>glial cell-derived neurotrophic factor</i>
CMO : cellules issues de la moelle osseuse	GFAP : <i>glial fibrillary acidic protein</i>
CMOAP1 : cellules souches mésenchymateuses au premier passage en culture	GFP : <i>green fluorescent protein</i>
CMOAP5 : cellules souches mésenchymateuses au cinquième passage en culture	GFP-Ub : cellules transformées pour exprimer la GFP sous contrôle d'un promoteur ubiquitaire
CNPase : 2',3'-Cyclic Nucleotide 3'-Phosphodiesterase	GSK3 : glycogen synthase kinase 3
CNTF : <i>ciliary neurotrophic factor</i>	GvHD : <i>graft versus hoste disease</i> ; syndrome du greffon contre l'hôte
CSC : cellules souches cancéreuses	HBSS : solution saline équilibrée de Hanks
CSH : cellules souches hématopoïétiques	ICM : <i>inner cell mass</i> ; masse cellulaire interne du blastocyte
CSM : cellules souches mésenchymateuses (progéniteurs adultes capables de former les tissus mésenchymateux)	IFR133 : institut fédératif de recherche 133 (ingénierie et biologie cellulaire et tissulaire)
CSN : cellules souches neurales	IGF-1 : <i>Insulin-like growth factor 1</i>
CSP : cellules souches périphériques ou cellules souches adultes	IL-1, IL-6, IL-X : interleukine 1, interleukine 6, etc.
CT : <i>threshold cycle</i> ; cycle-seuil	iNOS : <i>inducible nitric oxide synthase</i>
CXCR4 : <i>chemokine (C-X-C motif) receptor 4</i>	
CYC : cyclophiline	
DAT : <i>dopamine active transporter</i>	

ABREVIATIONS

ISCT : *international Society for Cellular Therapy* ;

Société Internationale pour la Thérapie Cellulaire

JAK : *janus associated kinase proteins kinases*

LIF : *leukemia inhibitory factor*

LIFR : récepteur au LIF

LTP : *long terme potentiation* ; potentiation à long-terme

MAP2 : *microtubule-associated protein 2*

MAPK : *mitogen activated protein kinase*

MCP-1 : *chemokine monocyte chemoattractant protein-1*

MEF : *murine embryonic fibroblast* ; couche de fibroblastes embryonnaires murins inactivés

MIAMI : *marrow isolated adult multilineage inducible* ; cellules de la moelle osseuse inductibles en plusieurs lignées

M-MLV RT : *moloney murine leukemia virus reverse transcriptase*

MO : moelle osseuse

MPTP : 1-méthyle 4-phényl 1, 2, 3, 6- tétrahydro pyridine

NeuN : *neuronal nuclei*

NF : neurofilament

NF-H / NF200: neurofilament haut poids moléculaire (200-220 kDa)

NF-L : neurofilament faible poids moléculaire ; 68-70 kDa

NF-M : neurofilament poids moléculaire moyen ; 145-160 kDa

NF- κ B : *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

NGF : *nerve growth factor*

NSE : *neuron specific enolase*

NT-3 : *neurotrophin-3*

Oct3/4 : *Pou5f1 (POU domain, class 5, transcription factor 1)*

Pax6 : *paired box gene 6*

PBS : tampon phosphate salin

PCR : polymérisation en chaîne

PFA : paraformaldéhyde

PI3-K : phosphatidylinositol-3-kinases

PIGF : *placental growth factor*

protéine Id : inhibitrice de différenciation

PS1 : *presenilin 1*

RT : *reverse transcription* ; transcription inverse

SDF-1 : *stromal cell-derived-factor-1 α*

SEM : erreur standard à la moyenne

SH2 : *src homology 2 domain*

SHH : *sonic hedgehog*

SNAP25 : *synaptosomal-associated protein 25*

SNC : système nerveux central

Sox2 : *SRY-box containing gene 2*

SRY : *sex determining region of chromosome Y*

SSEA : *stage specific embryonic antigen*

Ssty1 : *spermiogenesis specific transcript on the Y 1*

STAT : *signal transducer and activator of transcription*

SVF : sérum de veau fœtal

TAE : Tris, Acétate, EDTA

Tf : température de fusion

TGF β : *transforming growth factor, beta*

TH : tyrosine hydroxylase

TNF α : *tumor necrosis factor α*

TRA : *tumour rejection antigen*

VEGF : *vascular endothelial growth factor*

WNT : contraction des noms de gènes homologues Wg (Wingless) et Int.

ABREVIATIONS

☞ Symboles et noms des gènes étudiés en PCR array :

Symboles	Noms	Synonymes
Abcb1a	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1A	Abcb4, Evi32, Mdr1a, Mdr3, P-gp, Pgp, Pgy-3, Pgy3, mdr-3
Alcam	Activated leukocyte cell adhesion molecule	AI853494, BEN, CD166, DM-GRASP, MGC27910, MuSC, SC1
Anpep	Alanyl (membrane) aminopeptidase	Apn, Cd13, Lap-1, Lap1, P150
Anxa5	Annexin A5	Anx5, R74653
Bdnf	Brain derived neurotrophic factor	-
Bglap1	Bone gamma carboxyglutamate protein 1	Bglap, OC, OG1, mOC-A
Bmp2	Bone morphogenetic protein 2	AI467020, Bmp2a
Bmp4	Bone morphogenetic protein 4	Bmp-4, Bmp2b, Bmp2b-1, Bmp2b1
Bmp6	Bone morphogenetic protein 6	D13Wsu115e, Vgr-1, Vgr1
Bmp7	Bone morphogenetic protein 7	OP1
Casp3	Caspase 3	A830040C14Rik, Apopain, CC3, CPP32, Caspase-3, Lice, Yama
CD44	CD44 antigen	AU023126, AW121933, AW146109, HERMES, Ly-24, Pgp-1
Col1a1	Collagen, type I, alpha 1	Col1a-1, Cola-1, Cola1, Mov-13, Mov13
Csf2	Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)	Csfgm, Gm-CSf, MGC151255, MGC151257, MGI-IGM
Csf3	Colony stimulating factor 3 (granulocyte)	Csfg, G-CSF, MGI-IG
Ctnnb1	Catenin (cadherin associated protein), beta 1	Catnb, Mesc
Egf	Epidermal growth factor	AI790464
Eng	Endoglin	AI528660, AI662476, CD105, S-endoglin
ErbB2	V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)	ErbB-2, HER-2, HER2, Neu, c-erbB2, c-neu, mKIAA3023
Fgf10	Fibroblast growth factor 10	BB213776, Fgf-10
Fgf2	Fibroblast growth factor 2	Fgf-2, Fgfb, bFGF
Fut1	Fucosyltransferase 1	H, MGC129302, MGC129303
Fut4	Fucosyltransferase 4	AI451562, FAL, FucT-IV, LeX
Fzd9	Frizzled homolog 9 (Drosophila)	mfz9
Gdf15	Growth differentiation factor 15	MIC-1, NAG-1, SBF
Gdf5	Growth differentiation factor 5	Cdmp-1, bp, brp
Gdf6	Growth differentiation factor 6	BMP13, GDF16
Gdf7	Growth differentiation factor 7	BMP12
Gtf3a	General transcription factor III A	2010015D03Rik, 2610111I01Rik, 5330403M05Rik
Hat1	Histone aminotransferase 1	2410071B14Rik, AA536933, Hat-1, KAT1
Hdac1	Histone deacetylase 1	HD1, Hdac1-ps, MGC102534, MGC118085, MommeD5, RPD3
Hgf	Hepatocyte growth factor	C230052L06Rik, HGF, SF, NK1, NK2, SF, HGF
Hnf1a	HNF1 homeobox A	AI323641, HNF1, HNF1-alpha, HNF1[a], Hnf-1, Hnf1alpha, LFB1, Tcf-1, Tcf1
Icam1	Intercellular adhesion molecule 1	CD54, Icam-1, Ly-47, MALA-2, MGC6195
Igng	Interferon gamma	IFN-g, IFN-gamma, Ifg
Igf1	Insulin-like growth factor 1	C730016P09Rik, Igf-1, Igf-I
Il10	Interleukin 10	CSIF, Il-10

ABREVIATIONS

Il1b	Interleukin 1 beta	IL-1beta, Il-1b
Il6	Interleukin 6	Il-6
Ins2	Insulin II	AA986540, Ins-2, InsII, Mody, Mody4, proinsulin
Itga6	Integrin alpha 6	5033401O05Rik, AI115430, Cd49f
Itgav	Integrin alpha V	1110004F14Rik, 2610028E01Rik, CD51, D430040G12Rik
Itgax	Integrin alpha X	AI449405, Cd11c, Cr4, N418
Itgb1	Integrin beta 1 (fibronectin receptor beta)	4633401G24Rik, AA409975, AA960159, CD29, Fnrb, gpIIa
Jag1	Jagged 1	Headturner, Htu, Ozz, Ser-1, Serrate-1, slalom
Kdr	Kinase insert domain protein receptor	6130401C07, Flk-1, Flk1, Krd-1, Ly73, VEGFR-2, VEGFR2
Kitl	Kit ligand	Clo, Con, Gb, Kitlg, Mgf, SCF, SF, SLF, SI, Steel, contrasted
Lif	Leukemia inhibitory factor	-
Mcam	Melanoma cell adhesion molecule	1-gicerin, AV025631, CD146, CD149, Muc18, s-endo, s-gicerin
Mitf	Microphthalmia-associated transcription factor	MGC124309, MGC124310, bHLHe32, bw, mi, vit, vitiligo, wh
Mmp2	Matrix metalloproteinase 2	Clg4a, GelA, MMP-2
Nes	Nestine	AA166324, C78523, ESTM46
Ngfr	Nerve growth factor receptor (TNFR superfamily, member 16)	LNGFR, Tnfrsf16, p75, p75NGFR, p75NTR
Notch1	Notch gene homolog 1 (Drosophila)	9930111A19Rik, Mis6, Tan1, lin-12
Nt5e	5' nucleotidase, ecto	2210401F01Rik, AI447961, CD73, NT, Nt5, eNT
Nudt6	Nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 6	Asfgf2b, MGC27904
Kat2b	K(lysine) acetyltransferase 2B	A930006P13Rik, AI461839, AW536563, Pcaf
Pdgfrb	Platelet derived growth factor receptor, beta polypeptide	AI528809, CD140b, Pdgfr
Pigs	Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class S	BC058979, Gm393, Gm689
Pou5f1	POU domain, class 5, transcription factor 1	Oct-3, Oct-3, 4, Oct-4, Oct3, Oct3, 4, Oct4, Otf-3, Otf-4, Otf3, Otf3-rs7, Otf3g, Otf4
Pparg	Peroxisome proliferator activated receptor gamma	Nr1c3, PPAR-gamma, PPAR-gamma2, PPARgamma, PPARgamma2
Prom1	Prominin 1	4932416E19Rik, AC133, CD133, Prom, Prom-1, Prom1
Ptk2	PTK2 protein tyrosine kinase 2	FAK, FRNK, Fadk, KIAA4203, mKIAA4203
Ptprc	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	B220, CD45R, Cd45, Ly-5, Lyt-4, T200, loc
Rhoa	Ras homolog gene family, member A	Arha, Arha1, Arha2
Runx2	Runt related transcription factor 2	AML3, Cbf, Cbfa-1, Cbfa1, LS3, Osf2, PEBP2aA, Pebp2a1, Pebpa2a
Slc17a5	Solute carrier family 17 (anion/sugar transporter), member 5	4631416G20Rik, 4732491M05, AST, ISSD, NSD, SD, SIALIN, SIASD, SLD
Smad4	MAD homolog 4 (Drosophila)	AW743858, D18Wsu70e, DPC4, Madh4
Smurf1	SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 1	4930431E10Rik, mKIAA1625
Smurf2	SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2	2810411E22Rik, AI558114, AI649275
Sox2	SRY-box containing gene 2	Sox-2, lcc, ysb
Sox9	SRY-box containing gene 9	2010306G03Rik, AV220920, KIAA4243, mKIAA4243
Tbx5	T-box 5	-
Tert	Telomerase reverse transcriptase	EST2, MGC150124, TCS1, TP2, TR, TRT
Tgfb1	Transforming growth factor, beta 1	TGF-beta1, Tgfbeta1, Tgfβ, Tgfβ-1

ABREVIATIONS

Tgfβ3	Transforming growth factor, beta 3	MGC118722, Tgfβ-3
Thy1	Thymus cell antigen 1, theta	CD90, T25, Thy-1, Thy-1.2, Thy1.1, Thy1.2
Tnf	Tumor necrosis factor	DIF, MGC151434, TNF-alpha, TNFSF2, TNFalpha, Tnfa, Trnfsf1a
Vcam1	Vascular cell adhesion molecule 1	CD106, Vcam-1
Vegfa	Vascular endothelial growth factor A	Vegf, Vegf-a, Vegf120, Vegf164, Vegf188, Vpf
Vim	Vimentin	MGC102095
Vwf	Von Willebrand factor homolog	6820430P06Rik, AI551257, B130011O06Rik, C630030D09, F8VWF, VWD
Wnt3a	Wingless-related MMTV integration site 3A	Wnt-3a, vt
Zfp42	Zinc finger protein 42	MGC107378, Rex-1, Rex1, Zfp-42
Gusb	Glucuronidase, beta	AI747421, Gur, Gus, Gus-r, Gus-s, Gus-t, Gus-u, Gut, asd, g
Hprt1	Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1	C81579, HPGRT, Hprt, MGC103149
Hsp90ab1	Heat shock protein 90 alpha (cytosolic), class B member 1	90kDa, AL022974, C81438, Hsp84, Hsp84-1, Hsp90, Hspcb, MGC115780
Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Gapd, MGC102544, MGC102546, MGC103190, MGC103191, MGC105239
Actb	Actin, beta	Actx, E430023M04Rik, beta-actin
MGDC	Mouse Genomic DNA Contamination	MIGX1B
RTC	Reverse Transcription Control	RTC
PPC	Positive PCR Control	PPC

INTRODUCTION

I. INTRODUCTION GENERALE

I.1 Historique

En 1855 Leydig ébaucha les bases du concept cellulaire en niant la génération spontanée de la vie pour supposer une vie préexistante (*omne vivum ex vivo*). Mais c'est Virchow qui écrivit la même année « *omnis cellula e cellula* », toutes les cellules proviennent des cellules. Le concept primordial de la cellule souche est né.

Il faudra attendre 1953 pour que Stevens découvre que des tumeurs associées aux gonades - les tératomes- contiennent divers types cellulaires (Stevens *et al.* 1954) et 1956 pour que Leblond parvienne à démontrer que certaines cellules de même que leurs composants se renouvellent constamment et rapidement (Leblond *et al.* 1956) et ne sont pas stables durant toute leur vie. Ainsi les recherches concernant les cellules souches ont réellement commencé dans les années 50 avec les travaux sur les tératocarcinomes - tumeurs malignes des cellules germinales qui comportent des cellules indifférenciées appelées cellules EC (pour *Embryonal carcinoma*). Les lignées cellulaires dérivées de ces tumeurs conservent leur pluripotence sous certaines conditions de culture. De plus, quand les cellules EC sont transplantées dans l'hôte approprié, elle forment à nouveau un tératocarcinome (Yu *et al.* 2008). Le point culminant des études concernant les cellules EC -en plus de leur caractérisation et de la mise en évidence de leur correspondance avec les cellules embryonnaires « normales »- fut l'isolement d'une lignée de cellules pluripotentes dérivées d'embryons de souris précoces dans les années 1980 (Evans *et al.* 1981; Martin 1981; Axelrod 1984) et, plus récemment, l'isolement d'une lignée dérivée de cellules embryonnaires humaines (Thomson *et al.* 1998; Andrews 2002). Dix sept ans se sont écoulés entre la première culture de cellules ES murines et la première culture de cellules ES humaines car celle-ci nécessite la présence de facteurs différents.

Les recherches concernant les cellules souches ne cessent de progresser et suscitent de très nombreuses études. Pour exemple, le Tableau 1 précise le nombre d'articles les concernant sur une période récente de 5 ans (2004-2009).

Au sein du laboratoire, la thématique des cellules souches a débuté avec mon sujet de Master 2 puis s'est poursuivie avec mon sujet de thèse ; les investigations sur les potentialités de régénération des cellules souches adultes débutaient et les possibilités d'études étaient encore vastes et sujettes à polémiques.

Années	Cellules souches	Cellules souches adultes	Cellules souches mésenchymateuses	Cellules souches embryonnaires
2005	6837 (1616)	223 (102)	699 (97)	948 (203)
2006	7785 (1689)	270 (126)	910 (102)	1231 (220)
2007	8773 (1949)	286 (124)	1203 (129)	1255 (246)
2008	10777 (2365)	1579 (450)	1771 (247)	2161 (451)
2009	10947 (1934)	340 (123)	1871 (179)	1586 (218)

Tableau 1 : Nombre d'articles concernant les cellules souches, sur une période de 5 ans.

La base de données PubMed a été utilisée avec les termes suivants : « stem cell » OR « stem cells » pour les cellules souches ; « adult stem cell » OR « adult stem cells » pour les cellules souches adultes ; « mesenchymal stem cell » OR « mesenchymal stem cells » pour les cellules souches mésenchymateuses et « embryonic stem cell » OR « embryonic stem cells » pour les cellules souches embryonnaires. La recherche a été limitée, en plus de l'année, aux champs Titre/résumé. Les nombres entre parenthèses correspondent aux revues sur le total d'articles.

I.2 Considérations générales

Les cellules souches peuvent être définies selon 3 critères principaux. Le premier est leur capacité d'auto-renouvellement, qui est un pré-requis pour conserver une réserve de cellules souches ; le deuxième est qu'elles doivent pouvoir générer, au niveau clonal, des cellules progénitrices différenciées de plusieurs lignées et le troisième est qu'elles doivent être capable de régénérer un tissu donné *in vivo* (Verfaillie 2002; Roobrouck *et al.* 2008; Verfaillie 2009).

Les cellules souches sont classiquement réparties en deux grandes catégories : les **cellules souches embryonnaires** (appelées cellules ES) et les **cellules souches adultes** (parmi lesquelles les cellules souches fœtales). Les cellules souches embryonnaires ont la faculté de reconstituer tous les types cellulaires de l'organisme et peuvent former des corps embryoïdes contenant de multiples types de cellules spécialisées *in vitro*, tandis que les cellules souches adultes constituent principalement une source locale de cellules de remplacement possédant des potentialités de différenciation restreintes.

La toute première cellule souche naît de la fusion de gamètes mâle et femelle lors de la fécondation en formant l'œuf qui est en quelque sorte la cellule souche primordiale. Lorsqu'elle commence à se diviser elle forme la morula, composée de cellules souches **totipotentes** capables d'engendrer non seulement tous les types cellulaires nécessaires à la constitution d'un organisme adulte sain et fonctionnel, mais aussi le placenta et les membranes qui entourent l'embryon. Le premier événement de différenciation a lieu quand les cellules de la couche externe de la morula se différencient en trophoblaste, formant l'embryon à l'étape du blastocyte. A l'intérieur de celui-ci, dans ce que l'on appelle la masse cellulaire interne du blastocyte (ICM pour *inner cell mass*), siègent les cellules souches **pluripotentes** qui se distinguent des cellules souches totipotentes en ce qu'elles ne peuvent produire les cellules des tissus extra embryonnaires à l'origine du placenta. Les cellules souches **multipotentes** peuvent générer les lignées cellulaires de leur tissu d'origine. Par

exemple, les cellules des différents feuilletts embryonnaires ou des crêtes neurales sont des cellules souches multipotentes de même que, chez l'adulte, les cellules souches hématopoïétiques ou mésenchymateuses. Les cellules souches possédant le plus petit potentiel de différenciation sont les cellules souches **unipotentes**. Comme leur nom l'indique, elles ne peuvent engendrer qu'un seul type cellulaire (Stewart 2004). Bien qu'au fil de leur évolution, les cellules souches perdent leur capacité à engendrer tout type de tissu, certaines persistent chez l'adulte afin d'assurer le renouvellement cellulaire et le maintien de l'homéostasie tissulaire nécessaire au bon fonctionnement de l'organisme. Ces cellules souches sont appelées cellules souches adultes et peuvent être extraites de la plupart des tissus, comme le cœur ou le cerveau (Coulombel 2003) et peuvent être à renouvellement rapide, quiescente ou à renouvellement lent. Les gamètes, issus des cellules germinales, tiennent une place à part puisqu'ils résultent d'une division cellulaire particulière - la méiose - permettant l'obtention de cellules contenant la moitié des chromosomes du génome diploïde. La reconstitution génétique a lieu lorsque le spermatozoïde fertilise l'ovocyte pour donner naissance au zygote. Notons qu'il ne faut pas confondre cellules souches et cellules progénitrices - ou précurseurs - ces dernières ne conservant pas de capacité d'auto-renouvellement et représentant les intermédiaires aboutissant aux cellules matures (Friel *et al.* 2005).

II. LES CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES

II.1 Caractère phénotypique

Une cellule souche est une cellule **indifférenciée**, c'est-à-dire une cellule immature ne présentant pas de caractéristique morphologique ou fonctionnelle des tissus adultes. Les cellules souches embryonnaires ont un rapport nucléo-cytoplasmique élevé et des nucléoles bien visibles mais sont difficilement reconnaissables, sauf peut-être pour un « œil entraîné », comme le précise Friel (Baharvand *et al.* 2003; Friel *et al.* 2005). En l'absence de signature moléculaire spécifique, pour identifier les cellules souches embryonnaires humaines ou murines, différents marqueurs de surface sont généralement utilisés, tout en conservant à l'esprit que ceux-ci ne sont pas forcément communs aux deux espèces. Pour exemple, les cellules ES humaines peuvent être caractérisées par la présence des antigènes SSEA-3 et 4 (*stage specific embryonic antigen*) et par l'absence de SSEA-1 à l'inverse de la souris. C'est le cas également pour les antigènes TRA-1-60, -1-81, -2-49 et TRA -2-54 (*Tumour rejection antigen*) et pour GCTM-2 (*germ cell tumour marker*). De plus, CD90, CD133 et CD117 sont exprimés dans les cellules ES humaines. Un trait commun aux deux espèces est une expression et une activité élevée de phosphatase alcaline et la présence de télomérase (Stewart *et al.* 2006). La population SP (*side population*) est également caractérisée par sa capacité d'exclusion des colorants vitaux (Hoechst 33342) grâce à la présence de transporteurs de la famille ABC (pour *ATP binding cassette*). Cette propriété ne peut cependant à elle seule constituer un marqueur de cellule souches (Goodell *et al.* 1996; Challen *et al.* 2006; Hadnagy *et al.* 2006).

II.1.1 Les facteurs de pluripotence des cellules ES murines

∞ Les facteurs extrinsèques

Les cellules ES murines ont initialement été cultivées en présence de sérum foetal sur une couche de fibroblastes embryonnaires murins inactivés, constituant une couche de cellules nourricières (appelée MEF *murine embryonic fibroblast*). L'utilisation de milieux conditionnés par co-culture avec différents types cellulaires ont permis leur culture sans MEF et le fractionnement de ceux-ci ont conduit à l'identification de facteurs extrinsèques indispensables au maintien des cellules ES en culture. Un des facteurs essentiels est le LIF (*Leukemia inhibitory factor*). Ce membre de la famille des cytokines IL-6 est capable d'induire l'auto-renouvellement des cellules ES de souris *in vitro*, et donc d'inhiber la différenciation (Yu *et al.* 2008). Le récepteur au LIF est constitué de deux domaines protéiques transmembranaires, LIFR β (ou LIFR) et gp130. La liaison du LIF sur gp130 induit la dimérisation des deux sous-unités du récepteur entraînant l'activation de protéines kinases (JAK pour *Janus associated kinase*) qui vont phosphoryler ces deux sous-unités. Les dimères activés recrutent alors les transducteurs de signaux et activateurs de transcription STAT par leur domaine SH2. Une fois recrutées, les protéines STAT1 et STAT3 sont activées par les protéines JAK et forment des homo- ou des hétéro-dimères qui sont transloqués dans le noyau, aboutissant à la transcription de gènes d'auto-renouvellement, *Oct3/4*, *Nanog* et *Sox2* (Stewart *et al.* 2006; Yamanaka 2008). Une autre cible transcriptionnelle de STAT3 serait c-myc (Kiuchi *et al.* 1999), qui ne peut cependant pas être considéré comme appartenant au corps des gènes d'auto-renouvellement. Un niveau protéique élevé de MYC semble indispensable et suffisant pour maintenir la prolifération des cellules ES. Qui plus est, la suppression de LIF fait chuter rapidement et de façon importante le niveau d'expression de MYC par deux processus de régulation (Cartwright *et al.* 2005) : premièrement, l'absence de

STAT3 diminue la transcription de c-Myc dans les cellules ES ; deuxièmement, LIF induit une autre cascade de signalisation (voie des Phosphatidylinositol-3-Kinases dépendante de Ras) aboutissant à la phosphorylation - par GSK3- d'un résidu thréonine sur MYC, marquant la protéine comme devant être dégradée par le protéasome (Sears *et al.* 2000). En l'absence de MYC, la proportion de cellules capables d'auto-renouvellement décroît et des phénomènes de différenciation surviennent. Le facteur extrinsèque LIF déclenche de nombreuses cascades intracellulaires, certaines contradictoires avec l'action de STAT3. Pour exemple, il peut être un facteur de différenciation cellulaire par l'activation de la voie de signalisation MAPK/ERK (*Mitogen activated protein kinase/ extracellular-signal-regulated kinase*). Quand la protéine SHP-2 est recrutée par gp130, elle s'associe à la protéine GAB1 et induit l'activation de RAS qui initie une cascade de transphosphorylations impliquant les protéines RAF et MAPK kinases (ou MEK) aboutissant *in fine* à l'activation des protéines ERKs. Ce processus conduit à des phénomènes de différenciation cellulaire. Chez la souris, l'activation de la voie de signalisation MAPK/ERK est associée avec le trophoctoderme - couche externe du blastocyte, qui fournit des nutriments à l'embryon - et avec l'endoderme primitif, qui sont deux lignées cellulaires non pluripotentes. La suppression de SHP-2 et ainsi l'inhibition de cette voie de signalisation, augmente les capacités de prolifération des cellules ES (Burdon *et al.* 1999) faisant des protéines ERKs un frein à l'auto-renouvellement cellulaire. Cette voie MAPK/ERK est par ailleurs inhibée par PI3-K. L'efficacité de l'auto-renouvellement des cellules ES est donc due à une balance de régulation très fine entre des signaux opposés découlant de la liaison d'une même protéine - LIF - sur son récepteur (Friel *et al.* 2005).

Bien qu'un milieu contenant du LIF soit nécessaire pour que les cellules ES murines prolifèrent, ce facteur seul est insuffisant. La présence d'autres facteurs sériques est indispensable à la croissance *in vitro* des cellules ES. Pour exemple, Ying *et al.* ont démontré qu'en présence de LIF et de protéines appelées BMP (*Bone morphogenic proteins*) - dont

BMP4 - les cellules ES pouvaient être cultivées et amplifiées *in vitro* sans sérum ni couche de cellules nourricières (Ying *et al.* 2003). Les BMP appartiennent à la super famille des TGF β et ont été choisies pour leur capacité à bloquer la différenciation neuronale. Le signal BMP agit par interaction avec son récepteur (hétérodimère BMPR I α /BMPR II), ce qui induit la phosphorylation de SMAD1/5/8. Cette phosphorylation permet la formation d'un hétérodimère SMAD1/5/8 - SMAD4 qui se transloque dans le noyau où il induit l'expression de la protéine Id (inhibitrice de différenciation) (Ying *et al.* 2003). Il a par ailleurs été démontré qu'une quantité suffisante d'Id en présence de LIF pouvait promouvoir la prolifération des cellules ES en l'absence de BMP. Les travaux de Qi *et al.* rapportent, quant à eux, que les BMP aideraient à maintenir l'état indifférencié des cellules ES en inhibant la voie intracellulaire des MAPK (Qi *et al.* 2004). LIF seul bloque la différenciation des cellules ES en mésoderme et endoderme, mais pas totalement en neuroectoderme, c'est pourquoi il est nécessaire que le signal BMPs soit activé afin d'inhiber la neurogenèse (Figure 1).

Le signal extracellulaire WNT serait aussi impliqué dans le maintien de la pluripotence des cellules ES. Quand WNT se lie sur son récepteur transmembranaire « Frizzled », GSK3 - une sérine/thréonine kinase - est inactivée, empêchant le marquage de la β -caténine pour une dégradation par le protéasome. Cette dernière n'étant plus dégradée s'accumule dans le cytoplasme puis se transloque dans le noyau, aboutissant à l'activation de gènes cibles qui régulent la pluripotence des cellules ES (Kato 2007; Kochegarov 2009).

La matrice extracellulaire (ECM) influence grandement le comportement des cellules ES et sa composition est un facteur clef de la niche des cellules souches. Ainsi la fibronectine induit l'expression des gènes Id et pour coopérer avec LIF (Ying *et al.* 2003). Il semblerait aussi que l'activation de récepteurs de molécules de l'ECM puisse inhiber PI3-K or l'activation de PI3-kinase peut être effectuée par LIF, BMP et un membre de la famille Ras, appelé ERas (Figure 1).

☞ Les facteurs intrinsèques

En plus des facteurs extrinsèques, il existe des facteurs intrinsèques clefs dans la régulation du comportement des cellules ES. *Nanog*, *Sox2* et *Oct3/4* en sont les principaux acteurs.

Nanog fait référence au pays Celte mythique *Tír na nÓg* - terre de la jeunesse éternelle - et est un facteur de transcription à homéoboîte qui possède une action principalement répressive. La diminution de son expression entraîne une augmentation de l'expression de *Gata4* et *Gata6* conduisant à la différenciation primitive de l'endoderme, et à celle de *Cdx2* aboutissant à la différenciation du trophoctoderme.

Nanog est régulé par *Oct3/4* et *Sox2* qui sont des gènes clefs dans la régulation de la pluripotence puisque de légères variations dans leur expression influent sur le statut de la cellule souche. Une augmentation de l'expression d'*Oct3/4* mène à la formation du mésoderme et de l'endoderme, tandis qu'une diminution résulte en la formation du trophoctoderme. La perte de *Sox2* contribue également au développement de l'endoderme extra embryonnaire.

La plupart des gènes liés par OCT3/4 et SOX2 le sont aussi par NANOG et les éléments régulés peuvent être soit des gènes hautement exprimés par les cellules souches embryonnaires, soit des gènes dont l'expression est réprimée. Il existe pour ces systèmes des rétrocontrôles négatifs. Pour exemple *FoxD3* est un facteur de transcription pouvant contrer l'action du complexe OCT3/4/SOX2/NANOG par interaction avec *Oct3/4* et *Nanog*. Ensemble, ces protéines forment le corps fonctionnel d'un complexe régulateur qui active des gènes de pluripotence tout en inhibant ceux impliqués dans la différenciation cellulaire.

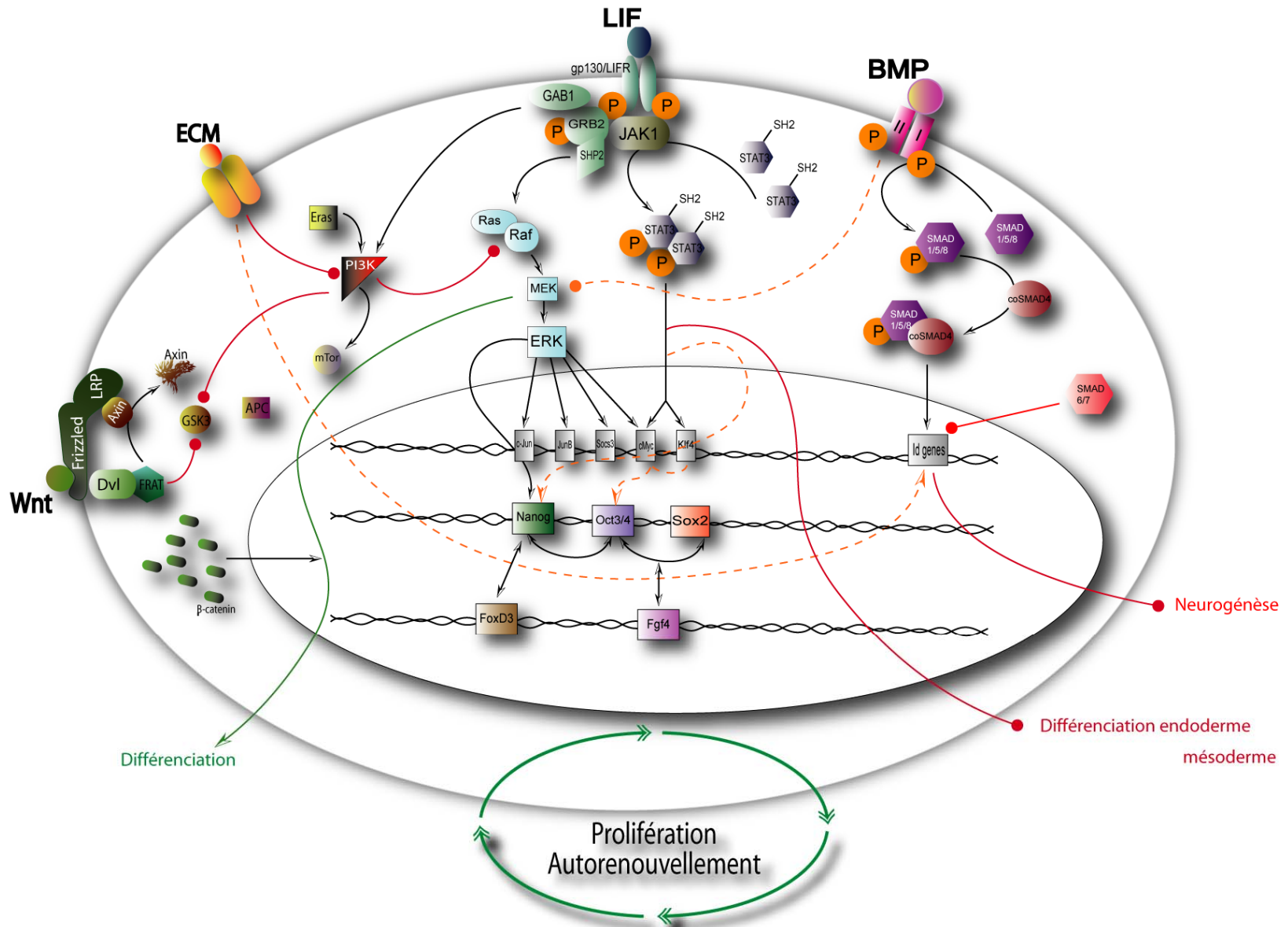
Tous ces exemples, qu'ils proviennent de facteurs extrinsèques ou intrinsèques, illustrent l'importance capitale des balances de régulation pour le maintien de la pluripotence des cellules souches (Ying *et al.* 2003; Friel *et al.* 2005; Stewart *et al.* 2006; Yu *et al.* 2008) et montre l'existence de coopérations étroites entre voies de signalisation (Figure 1).

☞ Et chez l'homme ?

Précédemment, nous avons vu qu'il existait des différences phénotypiques entre les cellules souches humaines et murines. Ces différences se retrouvent également dans les facteurs de pluripotence. En effet, les facteurs indispensables à la culture de cellules embryonnaires murines échouent quand il s'agit de cellules ES humaines. Le facteur LIF, d'une importance capitale pour l'auto-renouvellement des cellules ES murines, ne permet pas le maintien des cellules ES humaines en culture qui doivent être cultivées soit sur une couche de cellules nourricières avec adjonction de bFGF (Thomson *et al.* 1998), soit sur un support de type « matrigel » avec un milieu conditionné par des fibroblastes embryonnaires murins (Friel *et al.* 2005; Yu *et al.* 2008). De même, la voie de signalisation des BMP ne contribue pas au maintien de l'auto-renouvellement des cellules ES humaine mais, au contraire, conduit à la répression rapide de Nanog et Oct3/4. Il semblerait cependant que les facteurs extrinsèques, quoique différents, ils conduisent au même corps de gènes régulateurs de la « souchitude » : Oct4, Sox2 et nanog (Figure 2) (Zhang *et al.* 2008a).

Figure 1 : Cascades de signalisation impliquées dans l'autorenouvellement des cellules ES murines.

La liaison de LIF sur son récepteur entraîne le recrutement des kinases JAK activant par phosphorylation la voie de signalisation STAT3 et aboutissant à la transcription des gènes d'auto-renouvellement. Le complexe formé par LIF et son récepteur initie également la voie de signalisation ERK qui induit la différenciation. La liaison de BMPs sur l'hétérodimère BMP1 α / BMPRII entraîne l'activation de Smad 1/5/8 qui forme alors un complexe avec Smad4 avant de se transloquer dans le noyau où il initie l'expression des gènes Id. Tout comme la voie de LIF, la voie BMPs initie la voie des MAPKs.



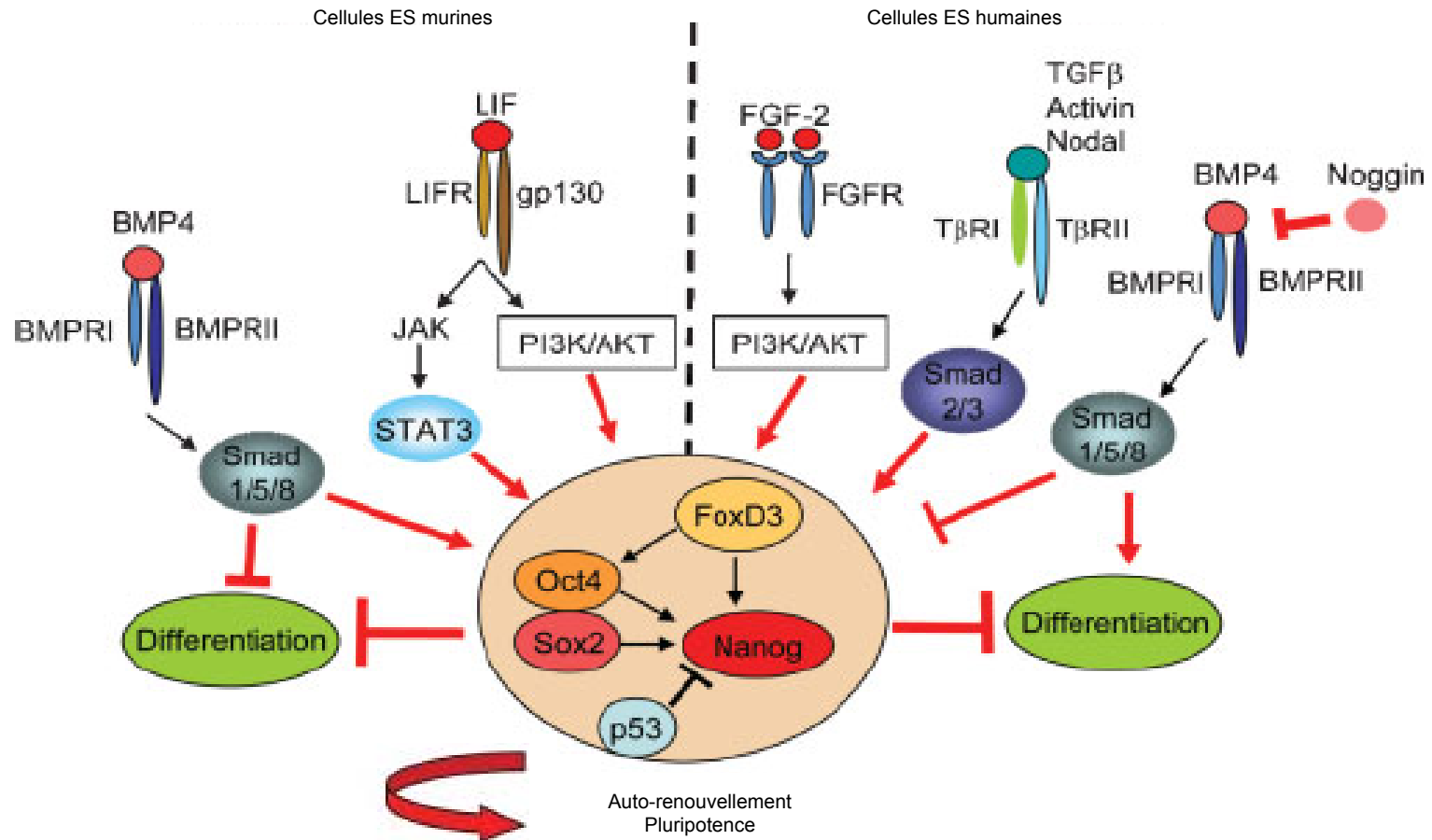


Figure 2 : Régulation extrinsèque et intrinsèque des cellules souches embryonnaires chez la souris et chez l'homme.

Tirée de (Zhang *et al.* 2008a).

III. LA CELLULE SOUCHE ADULTE

La définition des cellules souches adultes proposée par Potten et Loeffler en 1990 était que les CSA d'un tissu particulier doivent être des cellules indifférenciées, capables d'auto-renouvellement (maintien de leur population), de prolifération, pouvant produire un grand nombre de cellules différenciées fonctionnelles. Un dernier critère peu être ajouté : celui de flexibilité (Potten *et al.* 1990). En 2002, Loeffler et Roeder proposent des « amendements » à cette définition. Les cellules souches d'un tissu particulier sont une population potentiellement hétérogène de cellules indifférenciées fonctionnelles capables de rejoindre un environnement de croissance approprié (*growth environment*), capables de proliférer, de produire un grand nombre de cellules différenciées, capable de s'auto-renouveler ou de maintenir leur population, capables de régénérer un tissu après lésion. Elles doivent également posséder un potentiel de flexibilité et de réversibilité (Loeffler *et al.* 2002).

III.1 Les différentes localisations tissulaires

Parmi les cellules souches adultes, on peut distinguer celles appartenant aux tissus à renouvellement rapide, qui ont donc une activité constante tout au long de la vie, de celles appartenant aux tissus qui se renouvellent peu et qui ne sont pas actives en permanence. La connaissance de leur localisation a principalement été obtenue grâce à deux propriétés : l'exclusion du colorant Hoechst et la capacité de rétention d'intercalant de l'ADN comme le BrdU. Les cellules souches adultes sont présentes dans de nombreux tissus tels que la moelle osseuse, l'épiderme, les muscles, le cerveau, le foie, l'intestin, et le cœur (Verfaillie 2002; Coulombel 2003; Lakshmipathy *et al.* 2005). Les cellules souches adultes sont localisées dans ce que l'on appelle des niches et ne peuvent exister en dehors. Plus spécifiquement, le terme de niche doit être réservé au microenvironnement tissulaire capable d'héberger et de

maintenir une ou plusieurs cellules souches en conservant l'équilibre entre auto-renouvellement et différenciation (Mitsiadis *et al.* 2007; Morrison *et al.* 2008).

III.2 Auto-renouvellement

Les cellules souches adultes, comme les cellules souches embryonnaires, sont capables d'auto-renouvellement. Cet auto-renouvellement permet de maintenir l'homéostasie tissulaire dans des tissus où il est nécessaire que de nombreux progéniteurs différenciés soient générés chaque jour, comme pour le système hématopoïétique, l'épithélium de la peau et de l'intestin. Dans d'autres tissus pour lesquels le turnover des progéniteurs différenciés n'est pas rapide, comme le système nerveux central, ou pour lesquels les cellules terminales différenciées sont en partie responsable du maintien de l'homéostasie tissulaire, comme dans le foie, les cellules souches spécifiques du tissu servent respectivement de réserve pour le remplacement cellulaire ou la réparation tissulaire en cas de traumatisme mineur ou de lésion majeure (Weissman 2000; Roobrouck *et al.* 2008).

Cette notion implique qu'une cellule souche doit être capable, après mitose, de générer au moins une cellule identique à elle-même et donc de conserver ses potentialités de prolifération et de différenciation. Il existe deux modalités d'auto-renouvellement : l'auto-renouvellement **symétrique** et l'auto-renouvellement **asymétrique** (Orlacchio *et al.* 2010).

III.2.1 Auto-renouvellement symétrique

Dans une division symétrique, la cellule souche mère génère deux cellules filles parfaitement identiques et équivalentes, possédant les mêmes potentialités que la cellule mère. Ces divisions symétriques existent au cours des stades précoces du développement embryonnaire ou lors de lésions tissulaires et permettent l'augmentation exponentielle du nombre de cellules souches. Quand les signaux contrôlant cet auto-renouvellement viennent à manquer ou qu'apparaissent des signaux contrôlant positivement la détermination, les cellules souches

s'engagent vers la différenciation de façon symétrique (Figure 3). Pour exemple, Conti et collaborateurs ont démontré *in vitro* que des cellules souches neurales pouvaient se diviser de façon symétrique dans des milieux de culture adaptés (Conti *et al.* 2005).

Au cours d'une division symétrique, il serait également possible que les deux cellules filles naissent avec des destins cellulaires équivalents et que les signaux environnementaux immédiats déterminent un devenir différent pour chacune des cellules filles (Figure 4).

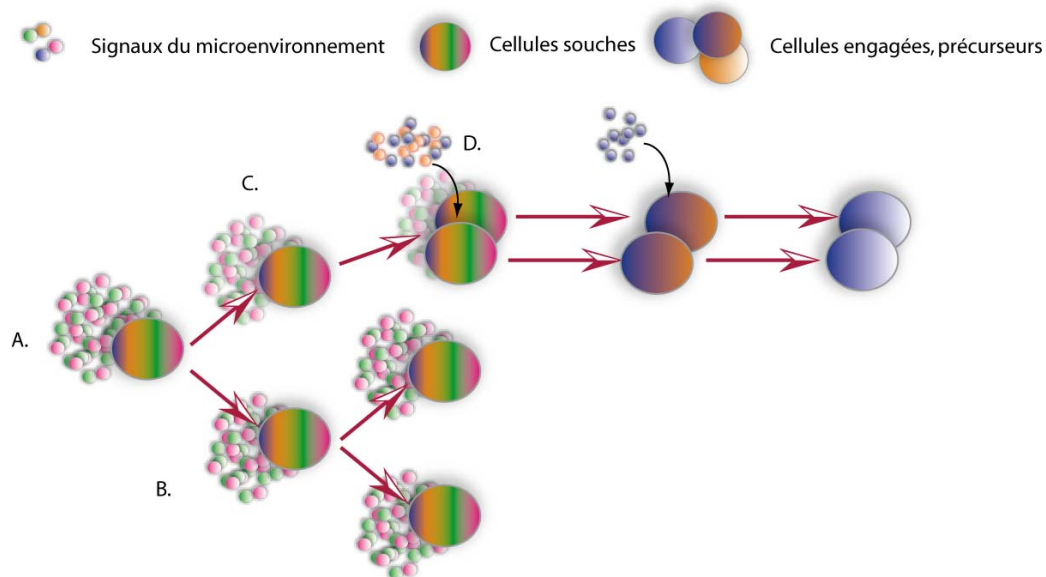


Figure 3 : Auto-renouvellement symétrique des cellules souches.

La cellule souche mère reçoit des signaux contrôlant positivement l'auto-renouvellement (A.) et prolifère (B. et C.). Quand ces signaux viennent à manquer et/ou quand apparaissent des signaux contrôlant positivement la différenciation, les cellules s'engagent de façon symétrique (D.).

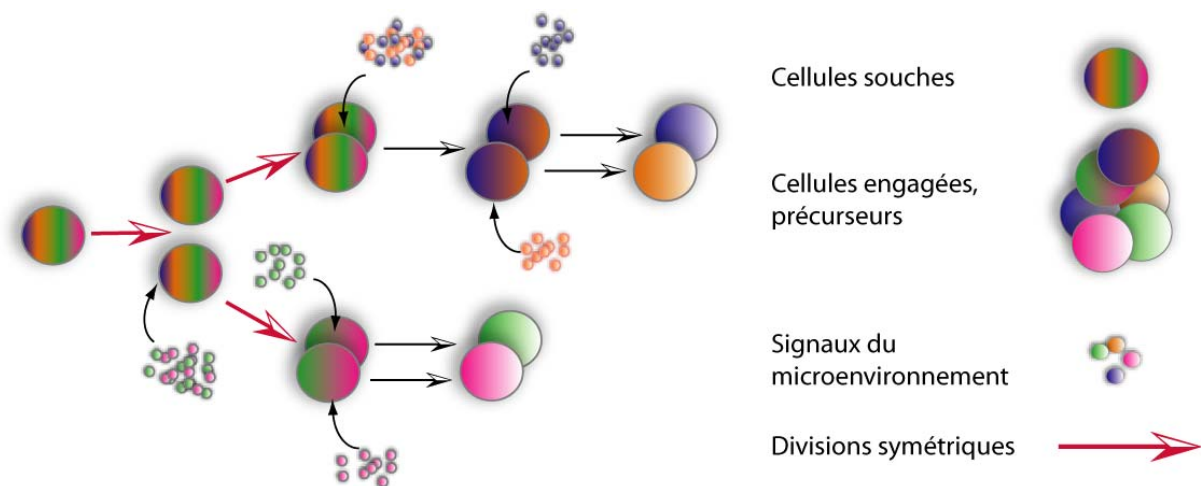


Figure 4 : Divisions symétriques et engagements asymétriques.

III.2.2 Auto-renouvellement asymétrique

Les cellules filles résultant de la division asymétrique de la cellule mère ne sont ni identiques ni équivalentes entre elles. Une des deux cellules filles sera identique à la cellule mère et conservera toutes les potentialités « souche » de cette dernière, tandis que l'autre entamera le processus de différenciation cellulaire (Figure 5). Ce phénomène permet de conserver une réserve de cellules souches tout en assurant le renouvellement physiologique des tissus adultes.

Un modèle de division asymétrique serait lié au concept du « brin d'ADN (acide désoxyribonucléique) immortel » a été étudié chez les animaux invertébrés, notamment *Caenorhabditis elegans* et *Drosophila melanogaster*. Il semblerait que ce processus a été conservé au cours de l'évolution et pourrait être décrit en quatre étapes : la cellule mère se polarise ; les composants cellulaires sont ségrégués de manière non aléatoire et l'alignement particulier du fuseau mitotique détermine le plan de clivage qui précède la division cellulaire (Figure 6) (Gonczy 2008). Karpowicz et al. ont montré - en utilisant un protocole de rétention de BrdU (Bromodeoxyuridine) ainsi que la vidéomicroscopie dans des cellules souches neuronales- que les brins d'ADN marqués par cet analogue de la thymidine se répartiraient

sélectivement dans une cellule fille durant la mitose (Karpowicz *et al.* 2005). La distribution non aléatoire des chromatides aurait également été mise en évidence pour des cellules satellites (cellules souches du muscle squelettique) grâce à des études de double marquage nucléotidique. Les auteurs mettent en évidence la haute fréquence de ségrégation des brins d'ADN nouvellement synthétisés dans les cellules filles devant acquérir un phénotype plus différencié que la cellule fille retenant le caractère souche (Conboy *et al.* 2007). Bien que ces phénomènes aient également été rapportés pour les cellules de la crypte intestinale, les cellules épithéliales de mammifères, les fibroblastes, les bactéries, les plantes (voir (Tajbakhsh 2008) et (Gonczy 2008) pour revues) et très récemment pour les cellules germinales de *Drosophila melanogaster* (Karpowicz *et al.* 2009), ils font encore débat (Lansdorp 2007; Rando 2007).

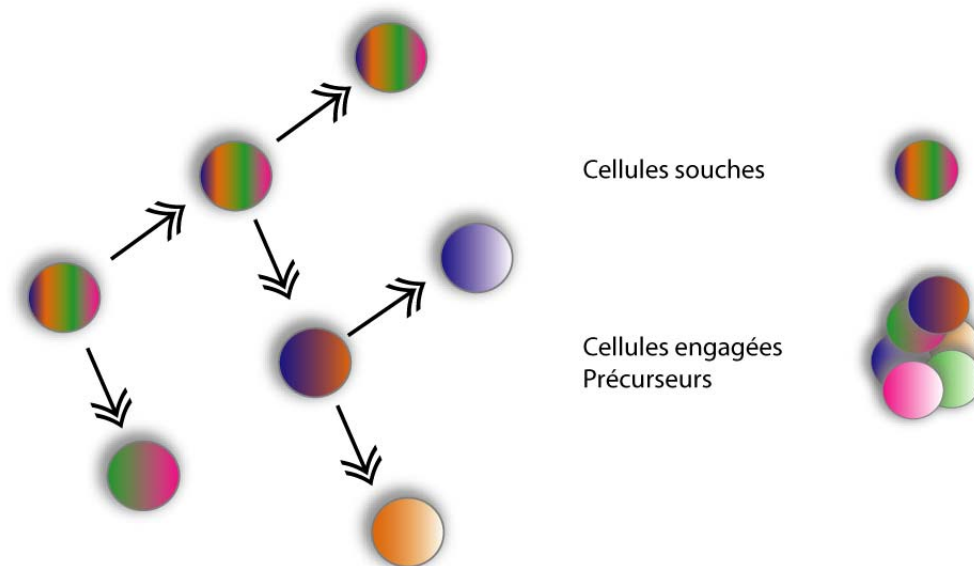


Figure 5 : Divisions asymétriques.

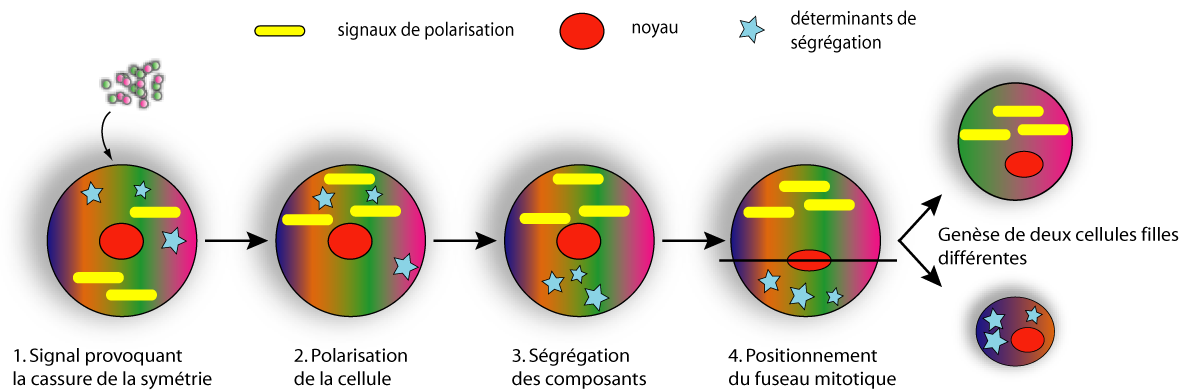


Figure 6 : Mécanisme cellulaire de l'auto-renouvellement asymétrique déterministe.

Adapté de (Gonczy 2008).

III.2.3 En conclusion

Les cellules souches ont une capacité d'auto-renouvellement symétrique et asymétrique permettant leur progression jusqu'à la différenciation terminale tout en conservant une réserve de cellules immatures (Figure 7). Les deux types d'auto-renouvellement interviendraient au cours de la genèse d'un individu. Par exemple, les divisions symétriques pourraient prévaloir au cours de la neurogenèse précoce, augmentant la taille du pool de cellules souches tandis que les divisions asymétriques pourraient devenir plus fréquentes au cours des stades plus tardifs, autorisant une plus grande production de cellules différenciées. Elles pourraient aussi coexister au sein d'un même tissu : dans le cortex cérébral en développement, les cellules souches neurales de la zone sous ventriculaire peuvent se diviser symétriquement, générant deux progéniteurs, ou asymétriquement, générant une cellule souche et une cellule différenciée (Chenn *et al.* 1995; Gonczy 2008). L'existence de ces deux mécanismes pour un même organe semble avoir été démontrée dès 1995 par Chenn et al. En suivant, par vidéo microscopie, les divisions cellulaires dans la zone ventriculaire d'explants de cortex en développement, ils ont mis en évidence le rôle crucial de la position du fuseau mitotique. Si ce dernier est aligné perpendiculairement ou obliquement par rapport au plan du neuroépithélium, ce sont deux cellules neuroépithéliales qui sont générées ; au contraire, si le

fuseau mitotique est parallèle au plan du neuroépithélium, la cellule fille basale sera un neuroblaste post mitotique tandis que la cellule fille apicale restera une cellule neuroépithéliale (Chenn et al. 1995).

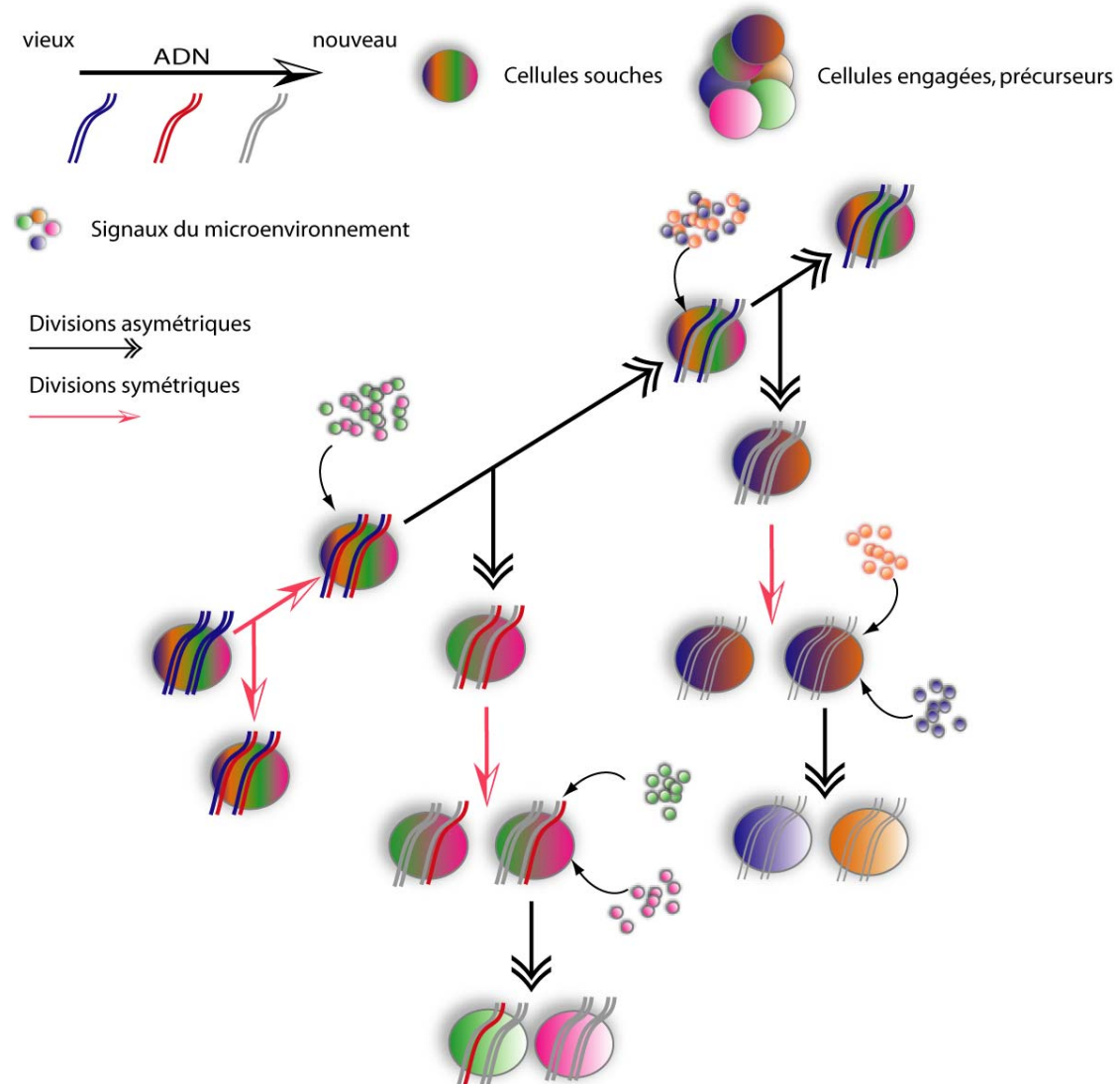


Figure 7 : Combinaison des modèles symétriques et asymétriques d'auto-renouvellement des cellules souches, avec ségrégation préférentielle des brins d'ADN.

Durant la division asymétrique déterministe des cellules souches, les chromosomes sont répartis de façon non aléatoire, de sorte que la cellule conservant un caractère souche possède les brins d'ADN primordiaux. La division symétrique quant à elle, correspond à une ségrégation aléatoire des chromosomes. Ainsi à travers le temps, les cellules souches contiennent proportionnellement plus de brins matrices que les autres populations cellulaires, ces dernières contenant principalement les ADN néosynthétisés. C'est le concept du brin d'ADN immortel.

III.3 Différenciation

Une cellule souche doit pouvoir se différencier en plusieurs types de cellules pour acquérir des fonctions caractéristiques de la cellule mature. Cette progression dans le lignage dépend des qualités intrinsèques de la cellule et de son environnement immédiat.

III.3.1 Deux modèles de régulation

Une cellule souche peut rester dans un « état souche » ou amorcer le processus de différenciation. Celui-ci dépendrait pour une part d'une évolution de la cellule au sein de gradients de concentration de molécules morphogènes (Ashe *et al.* 2006), selon un mode de **régulation instructive** dans lequel un facteur de croissance se lie à un récepteur à haute affinité pour activer une cascade moléculaire induisant le comportement cellulaire adaptée (Figure 8, A). D'autre part, les cellules répondraient également à des signaux comme les contraintes physiques. Le modèle de **régulation sélective** semblerait alors plus approprié : la cellule pourrait « basculer » dans un état ou un autre selon un répertoire prédéfini (Huang *et al.* 2004)(Figure 8, B). Quel que soit le mode de régulation, la condition *sine qua non* pour que les signaux environnementaux soient correctement perçus et interprétés est que la cellule possède toute la machinerie moléculaire nécessaire à la réception et au traitement de ces signaux, c'est-à-dire qu'elle doit être **compétente**.

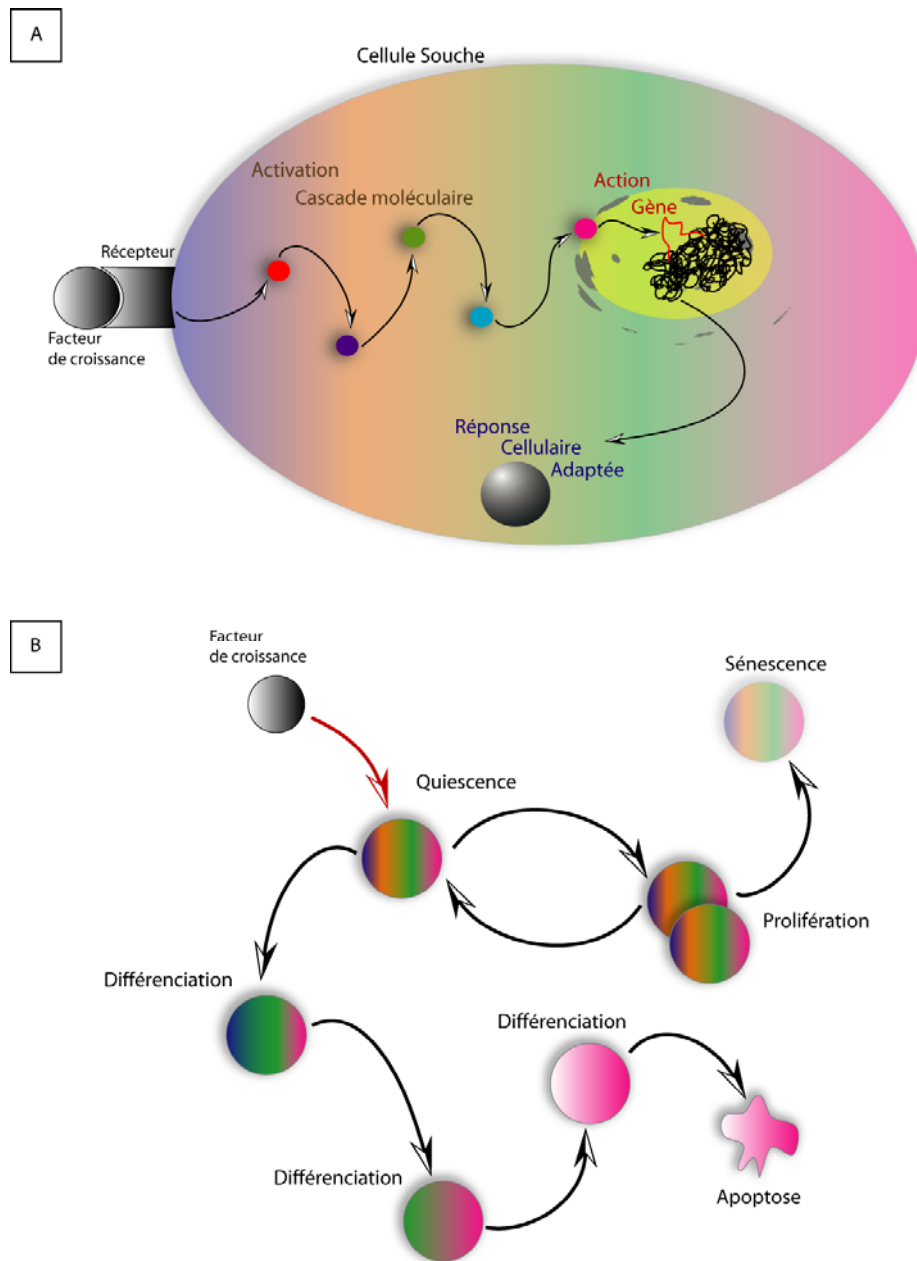


Figure 8 : Régulation instructive ou régulation sélective.

A. La régulation instructive établit un lien de type linéaire entre un signal spécifique extracellulaire porté par un facteur de croissance et la réponse cellulaire correspondante : une cause induit un effet ; B. La régulation sélective établit l'existence de 5 destins cellulaires distincts, exclusifs et séparés par des transitions de type tout ou rien (quiescence, prolifération, différenciation, sénescence, apoptose). Différents traitements peuvent entraîner la cellule dans un état ou un autre.

III.3.2 Induction cellulaire et restriction

Une fois le « choix » cellulaire effectué, l'induction de la cellule a lieu. On distingue l'**induction permissive** qui consiste en l'activation ou la stimulation d'un activateur (ou en l'inactivation / inhibition d'un répresseur) présent initialement dans la cellule, de l'**induction instructive** qui nécessite l'expression *de novo* ou la surexpression d'un activateur (ou l'extinction / sous-expression d'un répresseur). Selon certains auteurs, la progression dans le lignage entraînerait systématiquement une diminution du potentiel de différenciation, que ce soit pour les progéniteurs ou pour les cellules souches à proprement parler (Roobrouck *et al.* 2008).

La **restriction de lignage** serait l'aboutissement de la progression de la cellule souche au sein de sa lignée, la **restriction de potentiel** serait indépendante et découlerait de l'âge du donneur ou du nombre de divisions *in vitro*. Il est d'ailleurs connu que les cellules humaines ne peuvent subir que 50 à 60 divisions *in vitro* avant de devenir sénescences. Cette limite est la limite de Hayflick (Hayflick 1965) et est probablement déterminée par la réduction des télomères à laquelle les cellules souches embryonnaires ne sont quasiment pas soumises car elles expriment un fort taux de télomérase (Zeng 2007). Comme exemple de la restriction de lignage, Muraglia *et al.* ont montré que des clones de cellules souches mésenchymateuses perdent progressivement leur potentiel de différenciation au cours des divisions mitotiques et que la cinétique de croissance ralentit au cours des passages, pour stopper complètement après environ 22 doublements cellulaires. Ainsi pour 4 clones étudiés capables de se différencier en adipocytes, chondrocytes et ostéoblastes, le potentiel adipogénique serait le premier à être réprimé. Sur quatre clones possédant les potentialité d'engendrer à la fois des chondrocytes et des ostéoblastes, 3 ont perdu leur potentiel chondrogénique aux alentours de la 20^{ème} division cellulaire (Muraglia *et al.* 2000). L'étude de Banfi *et al.* illustre des phénomènes de restriction de potentiel des mêmes cellules. Pour les populations de cellules mésenchymateuses adultes,

les capacités de prolifération, de différenciation en lignée mésenchymateuses multiples et de génération efficace de tissu osseux mature seraient grandement diminuées après expansion *in vitro* (Banfi *et al.* 2000). Quelques années plus tard, et bien que leurs résultats soient aujourd'hui très discutés, l'étude de Guillot *et al.* montre que des CSM humaines indifférenciées issues d'un fœtus au premier trimestre expriment des marqueurs de pluripotence au niveau protéique, contrairement à leurs homologues prélevées chez l'adulte. Les CSM fœtales semblent également pousser plus rapidement en culture, avec un nombre de doublement de population plus important, avoir des télomères plus long et une activité télomérase supérieures par rapport aux CSM adultes (Guillot *et al.* 2007).

III.4 Rôle dans l'homéostasie tissulaire

Les cellules souches adultes ont pour rôle d'assurer la réparation physiologique d'un organe ou d'un tissu. Trois processus cellulaires principaux sont à l'origine de cette homéostasie tissulaire, qui permet d'assurer le bon fonctionnement des organes tout au long de la vie de l'individu (Muschler *et al.* 2004; Young *et al.* 2004) : la **prolifération** cellulaire (Stewart *et al.* 2006; Roobrouck *et al.* 2008) conduisant à l'augmentation de la réserve de cellules, la **migration** qui achemine les cellules à l'endroit voulu (Laird *et al.* 2008) et la **différenciation** qui permet l'obtention d'une cellule spécialisée fonctionnelle.

III.5 L'évolution des destins cellulaires

Les cellules souches adultes génèrent préférentiellement les lignées cellulaires du tissu dans lequel elles résident mais de nombreuses études mettent en avant la capacité d'évolution de ces cellules vers un destin différent. Ainsi des cellules souches issues de la moelle osseuse seraient capables de donner naissance à des cellules des lignées neuronales et des cellules souches neurales à des cellules hématopoïétiques (Bjornson *et al.* 1999; Shih *et al.* 2001) ; des cellules souches hématopoïétiques pourraient donner naissance à des cellules du foie (Petersen *et al.* 1999) ; des cellules souches musculaires pourraient engendrer des cellules hématopoïétiques (Jackson *et al.* 1999; Toma *et al.* 2001) ; des cellules isolées du derme de souris donner des cellules à caractère glial et neuronal (Toma *et al.* 2001).

Bien que les mécanismes moléculaires sous tendant cette capacité d'évolution encore controversée ne soient pas totalement élucidés, plusieurs modèles permettraient de l'expliquer (Tsai *et al.* 2002; Verfaillie 2002; Hombach-Klonisch *et al.* 2008) : la trans-différenciation, la trans-détermination et la fusion cellulaire. On ne peut enfin pas exclure la présence ectopique de cellules souches d'un tissu donné dans un autre tissu.

III.5.1 La plasticité

Cette notion illustre le fait que des cellules différenciées différentes de celles attendues initialement puissent être générées. En cela il diffère des termes pluripotence et multipotence qui sont employés pour décrire la capacité qu'ont les cellules souches de générer plusieurs types cellulaires et ce, dans un schéma classique de progression dans leur lignée.

Certaines équipes soutiennent que des cellules dérivées de la moelle osseuse, programmées pour aboutir à des cellules de types mésenchymateux ou hématopoïétiques, peuvent donner naissance à des cellules de types neurones et à des cellules de type glial (Eglitis *et al.* 1997; Brazelton *et al.* 2000; Mezey *et al.* 2000; Woodbury *et al.* 2000). Ces cellules adultes déjà

engagées dans une voie de différenciation pourraient être « reprogrammées » afin d'acquérir des capacités de cellules souches pluripotentes selon un processus de reprogrammation d'un précurseur/progéniteur, voire d'une cellule différenciée, déjà déterminé pour aboutir à un destin X en un autre précurseur/progéniteur, ou cellule adulte, à destin Y. Plusieurs voies possibles peuvent être envisagées pour l'expliquer : soit la cellule initiale se dédifférencie pour générer une cellule à potentialité plus grande (**dé-différenciation puis re-différenciation = trans-différenciation**), soit la cellule subit une reprogrammation nucléaire quand on la sort de sa niche habituelle pour la placer dans un autre environnement (**trans-détermination**) (Figure 9). Ce phénomène, décrit chez la drosophile et chez la salamandre (Tanaka 2003) n'a pas encore d'équivalent démontré avec certitude chez l'homme, cependant des études suggèrent que la dédifférenciation est possible chez les mammifères (Odelberg 2005). Pour exemples, l'étude de Odelberg *et al.* met en évidence la capacité de dé-différenciation de myotubes de souris et leur nouvelle plasticité sous certaines conditions de culture (Odelberg *et al.* 2000) et celle de Yang *et al.* révèle que des astrocytes seraient capables de se dé-différencier et de former des neurosphères suite à une blessure *in vitro* (Yang *et al.* 2009).

Pour Young *et al.* la plasticité sous-entend que des cellules pluripotentes persisteraient dans l'organisme après les premiers stades du développement embryonnaire et seraient des cellules de réserves quiescentes qui pourraient être recrutées lors d'atteinte du tissu ou simplement pour maintenir l'homéostasie tissulaire. Cette réserve de cellules consisterait en un mélange cellulaire avec des potentialités variables, allant de l'unipotence à la pluripotence. Cette plasticité des cellules souches adultes serait la même que celle observée au cours du développement et se traduirait par la formation de cellules à potentialité plus ou moins restreintes selon l'origine de la cellule mère (Figure 10). Dans ce cas de figure, l'évolution phénotypique observée serait due à l'existence de cellules issues des stades précoces du

développement et persistantes jusqu'à ce que l'organisme - ou l'expérimentateur - ne les recrute (Young *et al.* 2004).

Enfin il semble important de préciser que pour certains auteurs ces mécanismes de trans-différenciation pourraient ne pas exister réellement mais proviendraient d'artéfacts d'analyse histologique ou de phénomènes de fusion (Coulombel 2007).

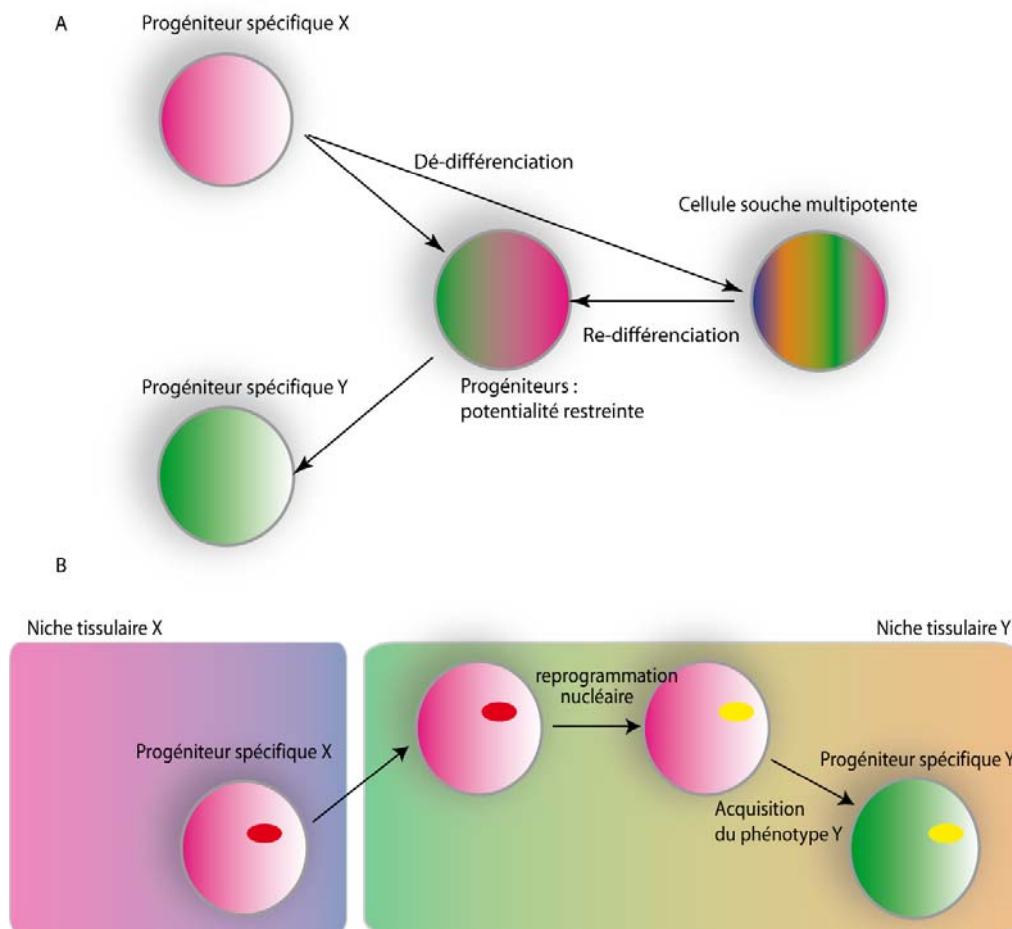


Figure 9 : Trans-différenciation et trans-détermination.

A. Dé-différenciation puis re-différenciation et B. trans-détermination des progéniteurs adultes.

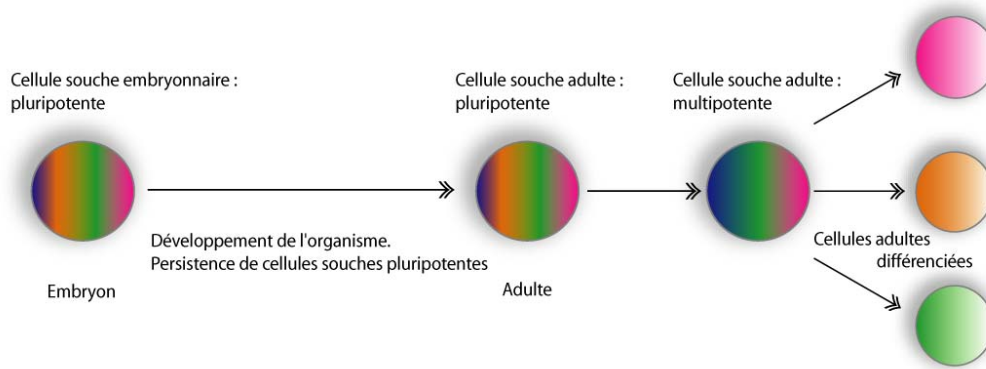


Figure 10 : Persistance des cellules souches adultes pluripotentes.

III.5.2 La fusion cellulaire

Des études ont suggérées que des cellules souches adultes seraient capables de fusionner avec des cellules somatiques (Lluis *et al.* 2010), induisant une évolution du phénotype chimique de la cellule résultante. *In vitro*, il a été démontré que les cellules souches ont la capacité de fusionner entre elles ou avec des cellules plus différenciées (Terada *et al.* 2002; Ying *et al.* 2002) et il a été récemment mis en évidence la fusion de cellules souches neurales entre elles (Jessberger *et al.* 2007). *In vivo* des cellules souches dérivées de la moelle osseuse ont fusionné avec des cellules cardiaques (Alvarez-Dolado *et al.* 2003; Nygren *et al.* 2004), des hépatocytes et des cellules de Purkinje (Alvarez-Dolado *et al.* 2003) (Figure 11).

Les phénomènes de fusion pourraient être plus répandus qu'il n'y paraît puisqu'il existe des cas de mitoses réductionnelles consécutifs à la fusion qui masqueraient la tétraploïdie des cellules résultantes (Figure 11).

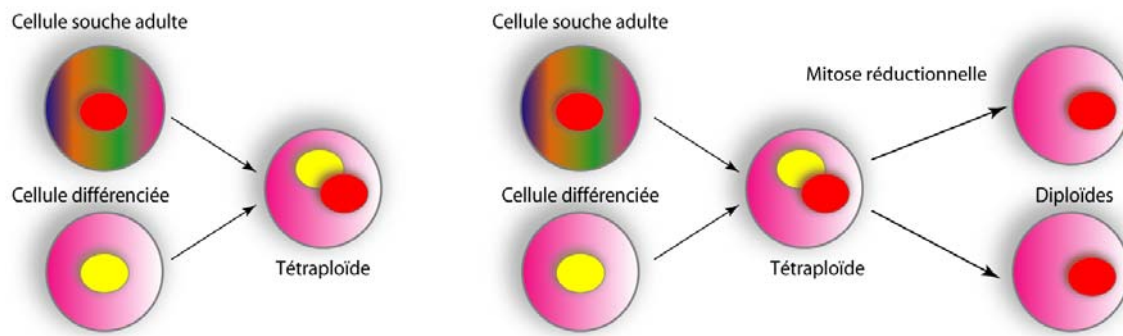


Figure 11 : Fusion d'une cellule souche avec une cellule différenciée, avec et sans mitose réductionnelle.

III.5.3 En conclusion

Bien que les mécanismes à l'origine des changements de destinée de cellules souches adultes déjà engagées restent pour une grande partie mystérieux et controversés, les travaux les concernant sont justifiés puisque suscitant de grands espoirs thérapeutiques. En effet, de nombreux organes ne sont pas capables de remplacer des cellules perdues. C'est le cas, entre autres, du cerveau lors de traumatismes, d'accidents vasculaires ou bien suite à une maladie neurodégénérative. La thérapie cellulaire utilisant des cellules souches adultes semble dès lors être une alternative idéale aux thérapeutiques existantes.

IV. LA CELLULE SOUCHE MESENCHYMATEUSE

La moelle osseuse héberge non seulement les lignées hématopoïétiques et leurs cellules souches d'origine, mais aussi des cellules de soutien issues de cellules souches mésenchymateuses (CSM) locales. Dans la littérature on peut retrouver ces cellules sous différentes appellations, telles que progéniteurs mésenchymateux, cellules stromales de la moelle, fibroblastes stromaux de la moelle ou encore CFU-f pour *colony-forming unit-fibroblastic* (Minguell *et al.* 2001). Ces différentes dénominations sont liées à l'histoire de cette population et à la précaution que prennent certains auteurs avec l'appellation « cellule souche ». Dans ce chapitre, nous appellerons CSM les progéniteurs adultes capables de former les tissus mésenchymateux.

IV.1 Premières mise en évidence

La première découverte de cellules pouvant réparer un tissu, provenant du système sanguin et par extension de la moelle osseuse, a été effectuée il y a plus de 130 ans par le pathologiste allemand Cohnheim ; cité par (Prockop 1997). La mise en évidence des cellules capables de se différencier en fibroblastes et autres tissus mésenchymateux a été réalisée par les travaux de Friedenstein. Celui-ci a placé des échantillons de moelle osseuse totale dans des boîtes de culture en plastique et, après 4 heures, a éliminé les cellules non adhérentes. Il rapporte ainsi que le petit nombre de cellules restant est hétérogène en apparence mais que les plus adhérentes sont fusiformes et forment des colonies de 2 ou 4 cellules qui restent « dormantes » 2 à 4 jours avant de se multiplier rapidement. Après plusieurs passages en culture, ces cellules deviennent plus uniformes en apparence et ont la capacité de se différencier en colonies qui ressemblent à des petits dépôts d'os ou de cartilage. La cellule d'origine a été appelée CFU-f (pour *colony-forming unit-fibroblasts*). Chaque colonie implantées sous la capsule rénale de souris est capable d'engendrer quelques semaines après

la greffe du tissu fibreux, de l'os et de l'os contenant de la moelle osseuse (Friedenstein *et al.* 1970; Friedenstein *et al.* 1976) cités par (Prockop 1997; Charbord 2010).

Ces études complétées dans les années 80, ont permis d'établir que les cellules isolées par Friedenstein en 1976 pouvaient engendrer des ostéoblastes, des chondroblastes et des adipocytes (Grigoriadis *et al.* 1988). Ces cellules multipotentes adultes seront appelées cellules souches mésenchymateuses pour la première fois par Caplan en 1991 en raison de leur potentialité de différenciation en cellules de type mésenchymateux (Caplan 1991).

IV.2 Origine tissulaire et cellulaire des CSM

Les CSM ont pu être isolées à partir de nombreuses espèces et de nombreux tissus, comme le tissu adipeux (Prunet-Marcassus *et al.* 2006), la moelle osseuse, le foie et le thymus (Krampera *et al.* 2007), le muscle, la veine cave, l'aorte, le poumon, le cerveau, le rein (da Silva Meirelles *et al.* 2006) et certains semblent mettre en évidence la présence de cette population cellulaire dans le sang de cordon ombilical (Lu *et al.* 2005), permettant une extrapolation à la présence de CSM circulantes dans le sang. Il semblerait néanmoins que cela ne soit pas le cas en dehors de pathologies nécessitant un recrutement actif de ces cellules (da Silva Meirelles *et al.* 2006). Les CSM pourraient donc être présentes dans de nombreux tissus de l'organisme (da Silva Meirelles *et al.* 2008).

Certains auteurs supposent l'existence de cellules moins différenciées qui seraient les précurseurs communs aux CSM et aux CSH (cellules souches hématopoïétiques). C'est le cas pour les MAPCs (pour *multipotent adult progenitor cells*) qui pourrait se différencier en cellules à caractère mésodermique, neuroectodermique et endodermique *in vitro* (Jiang *et al.* 2002a; Jiang *et al.* 2003). Une étude plus récente de la même équipe suggère que les MAPCs pouvaient être greffées chez des souris immunodéficientes et donner naissance à plusieurs lignées hématopoïétiques (Serafini *et al.* 2007). Les cellules appelées MIAMI (pour *marrow-isolated adult multilineage inducible*) pourraient également être dirigées vers une

différenciation en type cellulaire des trois feuillets embryonnaires (D'Ippolito *et al.* 2004; D'Ippolito *et al.* 2006).

La similarité phénotypique et comportementale de CSM provenant de différents tissus en culture laisse supposer une relation étroite entre ces différentes populations cellulaires. En 2006, da Silva Meirelles *et al.* ont proposé un modèle sur l'origine et l'action des CSM. Des CSM, localisées dans les vaisseaux sanguins, agiraient comme un réservoir de cellules indifférenciées pouvant pourvoir aux besoins des tissus dans lesquels elles résident et ce, en acquérant des caractéristiques phénotypiques locales. Ces cellules pourraient répondre aux signaux du microenvironnement en donnant naissance à des progéniteurs engagés s'intégrant progressivement au tissu, des lésions tissulaires pouvant engendrer des processus alternatifs comme une prolifération massive des cellules souches quiescentes (Figure 12) (da Silva Meirelles *et al.* 2006).

Certaines études rapportent l'existence de similitudes entre CSM et péricytes (Corselli *et al.* 2010). Les péricytes sont pléiomorphiques, allongés et possèdent de nombreuses ramifications autour des capillaires (Shepro *et al.* 1993). Leurs propriétés contractiles leur permettraient de réguler les échanges entre le compartiment sanguin et le secteur interstitiel et de jouer un rôle dans la stabilisation des vaisseaux, notamment en ce qui concerne les marqueurs de surface. Ils expriment CD44, CD90, CD105, CD106, CD140b, CD146, CD271 (p75), l'actine des muscles lisses (α -SMA), Sca-1, Stro-1 et vimentine, mais n'expriment pas CD34, CD31 et CD45, comme les CSM (da Silva Meirelles *et al.* 2008). Enfin les péricytes seraient capables de générer, *in vitro*, les cellules des lignées mésenchymateuses (adipocytes, chondrocytes et ostéoblastes) (Hirschi *et al.* 1996) et les CSM des cellules endothéliales (Jiang *et al.* 2002b; Wang *et al.* 2006). Cependant les péricytes restent un type cellulaire éluéif reconnu plutôt par leur anatomie et leur position que par un phénotype précis et défini (Bianco *et al.* 2008).

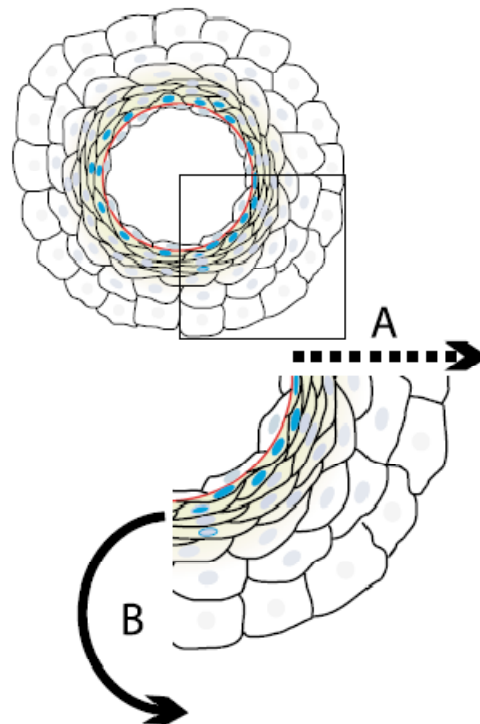


Figure 12 : Modèle de contribution des CSM à la maintenance tissulaire.

Dans cette représentation d'un vaisseau sanguin, les CSM résident dans la membrane basale (ligne rouge). Les signaux microenvironnementaux coordonnent une transition graduelle (gradient de couleur bleue) des cellules indifférenciées aux progéniteurs puis aux cellules avec un phénotype mature. Ce processus peut avoir lieu de façon naturelle (A) ou alors les CSM peuvent être recrutées dans le tissu sans transition (B). (da Silva Meirelles *et al.* 2006).

Le manque de marqueur spécifique ne permet pas de connaître la contre partie *in vivo* des CSM cependant l'étude de Sacchetti *et al.*, a montré que les CSM issues de la moelle osseuse présentent le même phénotype que des cellules réticulées de l'adventice localisées dans les sinusoides, près de la couche endothéliale (CD146+, CD105+, alkaline phosphatase+ mais CD34-, CD31-, CD45-). Les auteurs ont également démontré qu'après greffe de cellules stromales CD146+, une petite partie conservait l'expression de CD146 et était associée au développement des sinusoides. Huit semaines après la transplantation, les auteurs ont prélevé le transplant et ont réussi à obtenir de nouvelles colonies de CSM CD146+ (Sacchetti *et al.* 2007). Les études résultant du projet Genostem semblent démontrer que les CSM natives de la moelle osseuse constituent un sous ensemble tissu-spécifique spécialisé de cellules murales subendothéliales capables d'auto-renouvellement et essentielles à l'établissement du micro-environnement hématopoïétique (Sacchetti *et al.* 2007; Bianco *et al.* 2008; Charbord *et al.* 2010).

Des études assez récentes suggèrent que certaines CSM pourraient provenir des crêtes neurales. Takashima *et al.* montrent que des cellules des crêtes neurales Sox1+ du tronc pouvaient donner naissance à des CSM, mais que celles-ci semblent être une population transitoire, éventuellement remplacées par d'autres issues de voies non déterminées. Il semblerait aussi que des CSM dérivées des crêtes neurales soient présentes dans des préparations cellulaires issues de tibia et de fémurs de souris postnatales, mais la proportion de ces cellules décroît progressivement au cours du développement (Takashima *et al.* 2007). Une autre étude tend à démontrer l'existence de CSM dérivées du neuroépithélium dans la moelle osseuse des membres postérieurs de souris adultes. Leurs résultats suggèrent que les cellules dérivées des crêtes neurales migrent de la partie dorsale du tube neural jusqu'à la région aorta-gonad-mésonephros depuis laquelle elles rejoignent la moelle osseuse par le flux sanguin. Enfin leurs études prospectives ont permis d'identifier des CSM capables de générer

des ostéoblastes, des chondrocytes et des adipocytes. Ces résultats pourraient suggérer que certaines populations de CSM seraient originaires de cellules souches neurales multipotentes (Nagoshi *et al.* 2008). En 2009, une étude a isolée des CSM PDGFR α +Sca1+CD45-TER119- et a montré qu'elles pouvaient générer des cellules de la lignée mésenchymateuse. Ces cellules sont positives pour différents marqueurs des crêtes neurales et, quand elles sont cultivées sous des conditions de cultures utilisées pour générer des neurosphères, un nombre faible mais qui semble significatif de cellules positives pour des marqueurs neuronaux a été observé (Morikawa *et al.* 2009).

IV.3 Phénotype

Les caractères phénotypiques des CSM semblent dépendre du tissu et de l'espèce d'origine. Il n'est pas inutile de préciser que les différences d'expression de certains marqueurs de surface peuvent être influencées par des facteurs sécrétés par des cellules accessoires encore présentes lors des premiers passages en culture. Il est donc probable que l'expression *in vitro* de certains marqueurs de CSM ne correspondent pas forcément à leur schéma d'expression *in vivo*, ce qui pourrait expliquer la discordance des résultats concernant l'expression ou non de certains marqueurs comme CD45 : pour Phinney et Prockop les CSM ne l'expriment pas alors que pour Reyes elles l'expriment peu (Reyes *et al.* 2001; Phinney *et al.* 2007). Il en va de même pour CD106 que Jones *et al.* décrivent comme très variable selon le donneur, mais négatif pour Pittenger *et al.* ou pour Da Silva Meirelles *et al.* (Pittenger *et al.* 2004; Jones *et al.* 2006; da Silva Meirelles *et al.* 2008). De nombreux marqueurs de surface ont été utilisés pour caractériser ou isoler les CSM *in vitro*. Le Tableau 2 expose certains de ces marqueurs, de même que certaines références bibliographiques s'y rattachant.

Récemment, Delorme *et al.* ont conduit une étude sur le phénotype de protéines membranaires de CSM humaines natives et amplifiées en culture. Cette étude démontre que la population de CSM cultivées issue de la moelle osseuse est homogène et qu'elle se distingue de cellules squelettiques mésenchymateuses également cultivées mais d'origine différente. Dix sept CD spécifiques (non exprimés par les CSH) ont pu être étudiés au niveau protéiques (CD49b, CD90, CD73, CD105, CD130, CD140a, CD140b, CD146, CD151, CD200, CD202b, CD266, CD295, CD325, CD332, integrin alphaV(CD51)/beta5(ITGB5)), parmi lesquels 5 discriminent les CSM des cellules périostéales et des fibroblastes synoviaux (CD146, CD200, CD295, CD325, CD332) (Delorme *et al.* 2008).

Exprimement	CD332, CD325, CD295, CD271, CD266, CD202b, CD200, CD166, CD151, CD146, CD140a, CD140b, CD130, CD127, CD126, CD124, CD123, CD120b, CD120a, CDw119, CD106*, CD105, CD102, CD90, CD73, CD71, CD54, CD51, CD49a-f, CD44*, CD29, CD13, TGFβ1R, TGFβ1IR, STRO-1, SSEA-4, SSEA-3, HLA-A-C, GD2, integrin alphaV(CD51)/beta5(ITGB5) (Reyes <i>et al.</i> 2001; Deschaseaux <i>et al.</i> 2003; Pittenger <i>et al.</i> 2004; Jones <i>et al.</i> 2006; Gindraux <i>et al.</i> 2007; Martinez <i>et al.</i> 2007; Phinney <i>et al.</i> 2007; Delorme <i>et al.</i> 2008)
Exprimement peu	CD45*, CD44*, b2-microglobulin, CDw90, KDR, Flt1 (Reyes <i>et al.</i> 2001; Jones <i>et al.</i> 2006)
N'exprimement pas	CD133, CD117, CD106*, CD95, CD62E, L, S, CD50, CD49d, CD45*, CD38, CD36, CD34, CD31, CD25, CD21, CD19, CD18, CD15, CD14, CD11b, CD11a, CD10, CD9, CD6, CD4, CD3, GlyA, fibroblast surface antigen (1B10), HLADR, H1P12, class I HLA, Tie, Tek, (Reyes <i>et al.</i> 2001; Deschaseaux <i>et al.</i> 2003; Pittenger <i>et al.</i> 2004; Gindraux <i>et al.</i> 2007; Martinez <i>et al.</i> 2007; Phinney <i>et al.</i> 2007)

Tableau 2 : Exemple de marqueurs de surface utilisés dans la littérature pour isoler et/ou caractériser des cellules souches mésenchymateuses.

* : illustre les divergences d'opinion entre les différentes équipes.

IV.4 Définition de la Société Internationale pour la Thérapie Cellulaire

La Société Internationale pour la Thérapie Cellulaire (ISCT pour *International Society for Cellular Therapy*) a statué sur des critères minimaux permettant de définir ces cellules comme étant effectivement des CSM, afin de permettre une uniformisation des études concernant cette population cellulaire (Dominici *et al.* 2006). Notons que ces critères n'ont été définis que pour les CSM humaines et dans un cadre de recherche. Ils sont au nombre de trois :

- ✓ Les cellules doivent adhérer au plastique dans des conditions standard de culture.
- ✓ Plus de 95% d'entre elles doivent exprimer les marqueurs CD105 (endoglin ou Mab SH2), CD73 (ecto 5' nucléotidase ou Mab SH3 et SH4) et CD90 (Thy1). Les marqueurs CD45 (pan-leucocyte marker), CD34 (marqueurs des progéniteurs des cellules endothéliales et hématopoïétiques), CD14 ou CD11b (respectivement marqueurs de monocytes et de macrophages) et CD79 α ou CD19 (marqueurs des cellules B qui peuvent elles aussi être adhérentes et rester en vie dans la culture grâce à des interactions stromales) doivent être exprimés par moins de 2% de la population cellulaire en culture.
- ✓ Les cellules doivent pouvoir être différenciées en ostéoblastes, en adipocytes et en chondrocytes.

IV.5 Rôle biologique et utilisation thérapeutique des CSM

L'existence *in vivo* des CSM ne peut encore être affirmée sans équivoque puisqu'elles se définissent avant tout sur un plan fonctionnel (multipotence, auto-renouvellement, plasticité, capacité de régénérer le microenvironnement hématopoïétique). Il en va de même pour leurs rôles biologiques et leurs fonctionnalités cependant elles sont, depuis de nombreuses années, utilisées pour leur capacité de soutien de l'hématopoïèse (Devine *et al.* 2000; Dazzi *et al.* 2006). *In vivo*, la co-transplantation de CSM avec des CSH permet d'augmenter le chimérisme hématopoïétique. *In vitro* il a été démontré que les cellules stromales influencent la survie, la prolifération et la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques par la sécrétion de cytokines et de facteurs extracellulaires (Bennaceur-Griscelli *et al.* 2001; Majumdar *et al.* 2003).

Le fait que les CSM adultes puissent être sélectionnées, amplifiées et différenciées *in vitro* pour former différents types cellulaires font d'elles des candidates attractives pour l'ingénierie tissulaire et des stratégies de thérapies géniques depuis plusieurs années (Forbes *et al.* 2002). Ces cellules peuvent se différencier en divers types cellulaires *in vitro* (Pittenger *et al.* 1999). La capacité de différenciation des CSM en ostéoblastes, adipocytes et chondrocytes dans des milieux de culture appropriés est d'ailleurs une manière indirecte de les identifier. D'autres types de différenciations cellulaires ont été obtenus *in vitro*, certains ont été reproduits par de nombreuses équipes et d'autres, plus récents, restent à confirmer. Ainsi des différenciations en cellules neurales (Cho *et al.* 2005), cardiomyocytes, pneumocytes, ont été décrites *in vitro* et sont donc sujettes à des critiques méthodologiques (Minguell *et al.* 2001; Coulombel 2003). Ces dernières années, de nombreuses équipes se sont intéressées à l'utilisation des CSM comme source de thérapies dans diverses pathologies : maladies auto-immunes, infarctus du myocarde (Perl *et al.* 2010), atteintes hépatiques (Almeida-Porada *et al.* 2010), osseuses

(Cancedda *et al.* 2003) ou encore neurales (Kim *et al.* 2009; Delcroix *et al.* 2010; Greco *et al.* 2010; Naegele *et al.* 2010; Park *et al.* 2010).

IV.5.1 Propriétés immunologiques des CSM

Les CSM humaines expriment les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de type I (CMH-I) mais très peu les molécules du CMH-II et pas du tout les molécules co-stimulantes CD40, CD80 et CD86 (Klyushnenkova *et al.* 2005). Dans un modèle de co-cultures en présence de lymphocytes T allogéniques, les mêmes auteurs démontrent que les CSM suppriment la prolifération des cellules T de façon dose-dépendante, que les CSM soient, ou non, traitées par l'interféron gamma (INF). L'inhibition des cellules T peut être obtenue sans contact direct. Les monocytes sanguins CD14⁺ induisent l'activation des CSM par l'intermédiaire de l'interleukine-1 β . Les CSM activées sécrètent en retour des facteurs solubles comme le TGF β mais pas l'IL-10, conduisant à l'inactivation des lymphocytes T alloréactifs (Groh *et al.* 2005).

Les propriétés immunosuppressives des CSM s'exercent également sur les lymphocytes B, par un arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1 et non par induction de l'apoptose. De même que pour les lymphocytes T, cette action découle de la sécrétion de facteurs solubles. En plus d'un arrêt de la prolifération, les CSM provoquent une chute de la production des immunoglobulines M, G et A, en inhibant la différenciation en plasmocytes. Les propriétés chimotactiques des lymphocytes B sont également altérées (Corcione *et al.* 2006).

Les CSM semblent également diminuer l'expression de CD40 et CD86 par les cellules dendritiques matures et l'interleukine-6 sécrétée par les CSM a été décrite comme inhibant la différenciation des progéniteurs en cellules dendritiques matures ; elles augmentent aussi la prolifération des cellules T régulatrices (Uccelli *et al.* 2007; Patel *et al.* 2008; Wang *et al.* 2009a). On pourrait supposer que les CSM, une fois différenciées, expriment les molécules du CMH-II et soient rejetées par les cellules T. Cependant Le Blanc *et al.* ont démontré qu'après

une différenciation en os, cartilage ou en tissu adipeux, l'expression des molécules du CMH-I est augmentée mais les molécules du CMH-II ne sont pas détectées à la surface cellulaire. La différenciation des CSM n'augmente donc pas leur antigénicité (Le Blanc *et al.* 2003).

Ainsi, Les CSM possèdent des propriétés à la fois immunosuppressives et immuno-modulatrices qui peuvent être mises à profit à des fins thérapeutiques puisqu'elles induisent une tolérance immunologique et permettent de diminuer la fréquence et l'impact des réactions du greffon contre l'hôte (*Graft versus Host Disease* ou GvHD) grâce à des propriétés immunosuppressives. La Figure 13 résume les effets régulateurs (*in vitro*) des CSM sur les cellules immunitaires. Pour exemple, dans un modèle de greffe de peau chez le babouin, Bartholomew *et al.* ont démontré que l'administration *in vivo* de CSM prolonge la durée de survie du greffon, par rapport aux animaux contrôles (Bartholomew *et al.* 2002). De plus, les capacités antiprolifératives et anti-inflammatoires *in vivo* et *in vitro* des CSM font d'elles de bonnes candidates à la régulation des processus auto-immuns (Perl *et al.* 2010). En 2008, Le Blanc *et al.* ont mené une étude de phase II avec des patients présentant des GvHD sévères et résistants aux traitements stéroïdes. Suite à l'injection de CSM, près de la moitié des patients présentaient une réponse complète au traitement et un peu plus de la moitié de ceux-ci étaient encore en vie 2 ans après (Le Blanc *et al.* 2008).

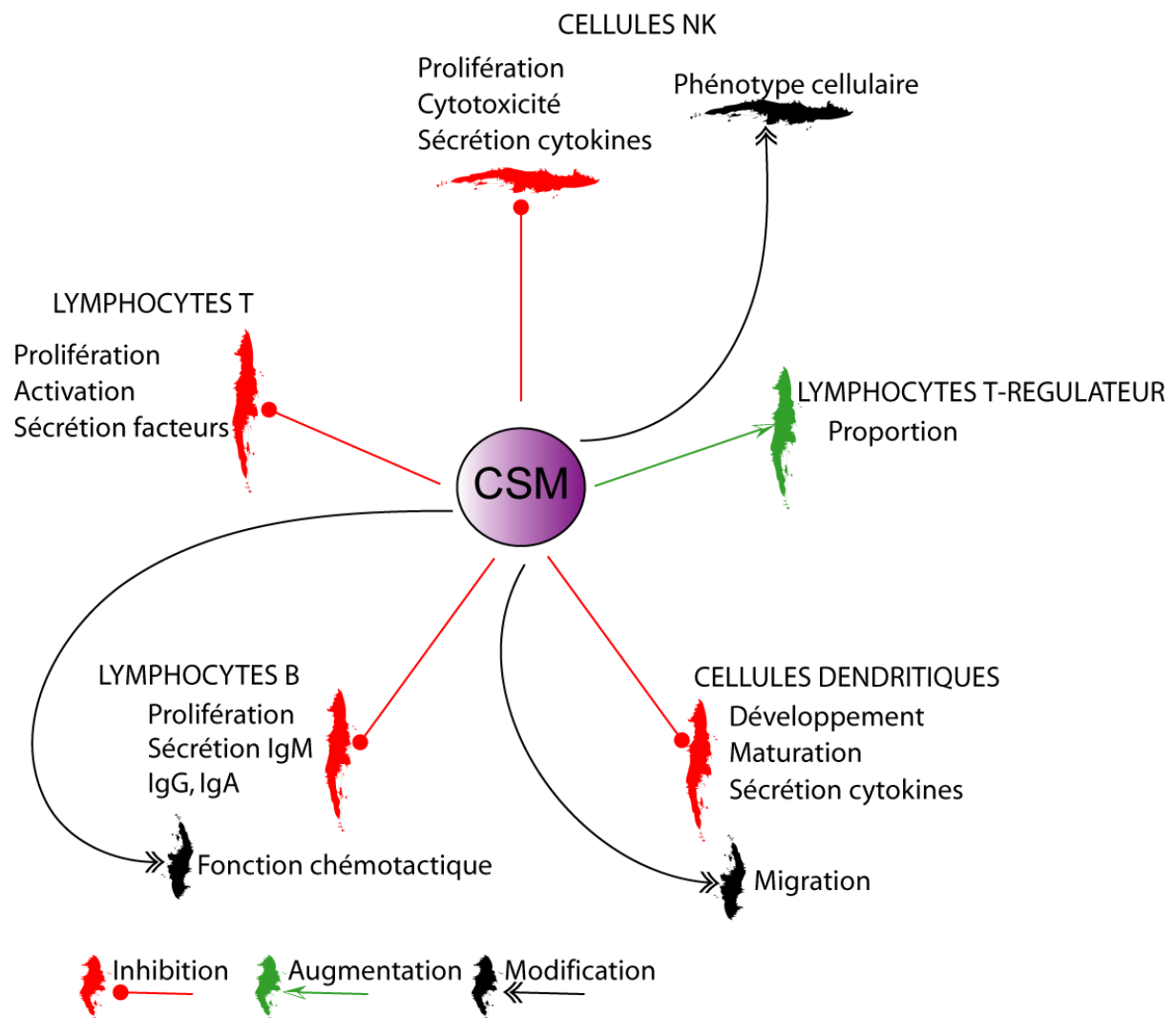


Figure 13 : Effets des CSM sur les cellules immunitaires *in vitro*.

Adapté de (Wang *et al.* 2009a).

V. CSM ET THERAPIE CELLULAIRE DU SYSTEME NEVEUX CENTRAL

Les CSM sont des cellules souches tissu spécifique peuvent se différencier en cellules matures (cellules stromales, adipeuses et squelettiques). De nombreuses équipes se sont penchées sur les capacités de trans-différenciation des CSM, certaines plus particulièrement sur leur capacité à former des cellules neurales à la fois *in vitro* et *in vivo* notamment dans des modèles animaux avec des lésions cérébrales, traumatiques ou consécutives à des pathologies neurodégénératives.

V.1 Différenciations des CSM *in vitro*

En 2000, deux groupes ont conduits des travaux sur la différenciation des CSM en cellules de type neuronal. Sanchez-Ramos et al. ont utilisé un protocole d'induction par EGF (*epidermal growth factor*) et BDNF (*brain derived neurotrophic factor*) et ont obtenu un phénotype neural, contrôlé par immunohistochimie et Western blot. En co-cultivant les CSM avec des cellules fœtales de cerveau de rat, toujours en présence de BDNF et d'acide rétinoïque, ils ont obtenus un marquage positif pour des marqueurs neuraux mais dans des proportions très faibles (0,5 à 1 %) (Sanchez-Ramos et al. 2000). Woodbury et al. ont également caractérisé les cellules trans-différenciées par marquages immunocytochimiques mais leur induction incluait l'utilisation de β -mercaptoéthanol, de diméthyle sulfoxyde et d'hydroxyanisole butylé (Woodbury *et al.* 2000). Un traitement par bFGF sans β -mercaptoéthanol a conduit à l'obtention de 78% de cellules positives pour la protéine *neuron specific enolase* et de 79% positives pour neurofilament (NF). Quoique ne prouvant pas la réelle capacité de différenciation des CSM en neurones, ces deux études « pionnières » ont suscité un grand intérêt dans la communauté scientifique et d'autres travaux ont exploré plus avant les capacités plastiques des CSM, certains concluant d'ailleurs à une trans-différenciation

artefactuelle, du à la cytotoxicité des agents chimiques employés (Lu et al. 2004; Neuhuber et al. 2004).

Les études se sont néanmoins poursuivies et la plupart des chercheurs ont utilisé un protocole d'induction similaire à celui de Sanchez-Ramos en vérifiant les capacité de trans-différenciation sur la base de changements morphologiques et/ou de l'expression de marqueurs neuronaux, que ce soit à un niveau transcriptionnel ou traductionnel (Kohyama *et al.* 2001; Kabos *et al.* 2002; Jin *et al.* 2003; Levy *et al.* 2003; Bossolasco *et al.* 2005; Tondreau *et al.* 2008; Yang *et al.* 2008). Toujours sur la base de ces observations morphophénotypiques, Wislet-Gendebien *et al.* ont induit la formation de neurosphères à partir de CSM de rat cultivées dans du DMEM/F12 enrichi ou en co-culture avec des cellules souches neurales de souris. Deux conditions semblent indispensables pour parvenir à ce résultat : i) l'absence de sérum dans le milieu et ii) l'expression préalable de nestine par les CSM. Cette observation suggère que la trans-différenciation ne peut s'effectuer que par une succession de stimuli ordonnés (Wislet-Gendebien *et al.* 2003). La même équipe a réussi quelques années plus tard à obtenir des cellules de type neural en co-cultivant les CSM nestine positives avec des neurones cérébelleux de souris. Il est intéressant de noter que ces cellules expriment des canaux ioniques potassiques fonctionnels et des canaux sodiques pouvant faire naître des potentiels d'actions (Wislet-Gendebien *et al.* 2005). En 2004 les travaux de Hermann *et al.* confirment l'hypothèse de Wislet-Gendebien sur la nécessité d'une succession de stimuli (Hermann *et al.* 2004) pour obtenir des neurones « fonctionnels » et, en 2006, leur étude comparative démontre que l'induction en une seule étape est inefficace et qu'il est nécessaire de « dédifférencier » les CSM en cellules souches neurales immatures avant de pouvoir les diriger vers une voie neuronale ou gliale, suivant l'ordre « expansion, conversion, différenciation » (Hermann *et al.* 2006). Quelques articles portent sur l'investigation des capacités de différenciations des CSM dans un environnement intermédiaire entre *in vitro* et

in vivo grâce à la technique de culture organotypique. Pour exemple, Abouelfetouh *et al.* ont déposé 10000 CSM murines par tranche d'hippocampe et ont trouvé une « différenciation » en cellules semblant être des neurones, mais seules 9,6 % d'entre elles expriment NeuN, aucun autre marquage n'a été mis en évidence. Ces changements morphologiques n'ont pu être observés sur les CSM à côté des tranches de tissu nerveux, suggérant la nécessité d'un contact direct (Abouelfetouh *et al.* 2004) alors que Rivera *et al.* ont mis en évidence un changement morphologique et l'expression de NF en conditionnant les CSM par du milieu de culture obtenu par du broyat filtré d'hippocampe, de cervelet ou de cortex (40 %, 11 % et 17 % de marquage obtenu, respectivement) (Rivera *et al.* 2006). En 2006, Mizobe *et al.* n'ont pu mettre en évidence la présence de cellules positives pour neurofilament ni pour la *neuron specific enolase* issues de la moelle osseuse dans leur protocole de co-cultures hippocampe / CSM mais ont obtenu des résultats positifs pour les mêmes marqueurs avec un modèle de co-culture CSM / cellules fœtales de striatum de rat (Mizobe *et al.* 2006). Wehner *et al.* en utilisant sensiblement le même paradigme expérimental qu'Abouelfetouh *et al.* mais avec des CSM exprimant la GFP (*green fluorescent protein*) sous contrôle d'un promoteur ubiquitaire ou GFAP (*glial fibrillary astrocytic protein*) n'ont également observé aucun marquage astrocytaire, quoique certaines CSM présentaient un double marquage GFP-Iba1 suggérant une différenciation en cellules de type microglial, normalement générées par les CSH (Wehner *et al.* 2003).

Conclure à un état différencié des cellules sur la base de l'expression de protéines neurales est cependant tendancieux : en effet certains auteurs ont mis en évidence une expression basale, *ie* par des CSM non induites, de quelques gènes neuraux comme nestine, NeuN (*neuronal nuclei*), MAP-2 (*microtubule associated protein*), tyrosine hydroxylase, Tuj-1, NF, neuroD, Pax6, GFAP et CNPase (*2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase*), bien qu'après induction les taux d'expression augmentent significativement, suggérant l'existence d'un état

« multi différencié » des CSM plutôt qu'un état indifférencié (Woodbury *et al.* 2002; Ratajczak *et al.* 2004; Tondreau *et al.* 2004b; Deng *et al.* 2006; Mareschi *et al.* 2006).

D'autres études indépendantes ont toutefois confirmé par électrophysiologie la fonctionnalité des « cellules nerveuses » obtenues après un protocole de différenciation (Jiang *et al.* 2003; Mareschi *et al.* 2006; Nagai *et al.* 2007; Koh *et al.* 2008; Tondreau *et al.* 2008) et suggèrent même l'existence de transmission synaptique (Cho *et al.* 2005). Un travail très récent utilisant des CSM humaines dérivées de tissu adipeux induites pour la lignée neurales grâce au bFGF et à de la forskoline a mis en évidence, non seulement une panoplie de marqueurs neuraux protéiques incluant des marqueurs synaptiques (GAP43 et SNAP25), mais aussi l'existence d'un courant entrant sodique dans 75 % des cellules différenciées - courant bloqué en présence de tétradotoxine (Jang *et al.* 2010).

V.2 Modèles de lésions cérébrales

Au vu des capacités plastiques des CSM, l'idée qu'elles pouvaient être employées à des fins thérapeutiques du système nerveux central a rapidement germé et le nombre d'articles sur ce sujet a subi une croissance considérable ces dernières années, dans divers modèles cellulaires ou animaux. Les mécanismes d'action des cellules souches menant à des récupérations fonctionnelles sont désormais mieux compris. Ainsi, grâce à leurs capacités de différenciation en de nombreux types cellulaires, leur facilité d'implantation dans les zones lésionnelles, leurs propriétés immunomodulatrices et leurs actions trophiques (neuroprotection, neurogenèse, angiogenèse), les CSM sont des sources de cellules souches polyvalentes pour un usage en thérapie cellulaire et/ou en thérapie génique. Leur usage ne provoque d'ailleurs aucune controverse éthique puisque provenant d'organisme adulte, voire du patient lui-même. Il a par ailleurs été montré que les potentialités de ces cellules ne sont pas diminuées lorsqu'elles sont prélevées sur des sujets atteints de maladie neurodégénérative comme la maladie de Parkinson (Zhang *et al.* 2008b). C'est pourquoi ces cellules, malgré l'avènement des cellules souches

induites (cellules iPS) reste une option non négligeable pour soigner des atteintes du SNC comme la maladie de Huntington, la sclérose latérale amyotrophique, les lésions de la moelle épinière, certaines formes d'épilepsie, la maladie de Parkinson, les accidents vasculaires cérébraux et la maladie d'Alzheimer (Trzaska *et al.* 2007b; Kim *et al.* 2009; Lee *et al.* 2009c; Trounson 2009; Greco *et al.* 2010; Lindvall *et al.* 2010; Naegele *et al.* 2010; Orlacchio *et al.* 2010).

In vitro, certains auteurs ont choisi de rechercher les effets de ces cellules sur la pousse axonale et / ou dendritique, grâce à des modèles de tranches de moelle épinière seule ou en co-culture avec des tranches corticales ; ils ont trouvé que la longueur des axones allant du cortex vers la moelle épinière est significativement supérieure après traitement par les CSM, bien que très peu de celles-ci soient immunoréactives pour MAP-2, GalC (*galactosylceramidase*) ou encore nestine (Kamei *et al.* 2007). Après avoir induit une démyélinisation, les auteurs d'une étude récente ont également démontré une survie et une pousse axonale accrues pour les cellules endogènes, comparativement aux tranches n'ayant reçues aucun apport de CSM (Cho *et al.* 2009). *In vivo*, après injections intracérébrales ou systémiques chez des animaux ayant subi des lésions cérébrales, les CSM sont capables de migrer aux sites de la lésion (Lee *et al.* 2003; Shichinohe *et al.* 2004; Simard *et al.* 2004) ou elles pourront mener à une amélioration fonctionnelle directement ou indirectement par la production de divers facteurs solubles impliqués dans la maintenance ou la réparation tissulaire (Mahmood *et al.* 2004).

V.2.1 CSM et accidents vasculaires cérébraux

Selon la synthèse du rapport sur la prévention et la prise en charge des accidents vasculaires cérébraux remis à Mme la Ministre de la Santé et des Sport (http://www.sante-sports.gouv.fr/IMG/pdf/AVC_-_synthese_rapport_final_-_vf.pdf, http://www.sante-sports.gouv.fr/IMG/pdf/pourquoi_un_plan_AVC.pdf), « l'accident vasculaire cérébral (AVC)

touche 400 000 personnes en France ; il y représente la troisième cause de mortalité chez l'homme et la deuxième chez la femme, la première cause de handicap acquis de l'adulte ; la tendance naturelle est à l'augmentation en raison du vieillissement de la population (...)).

In vitro, les modèles classiques d'ischémie des tranches d'hippocampe par une privation d'oxygène et de glucose ont démontré que les CSM transplantées sur - ou sans contact direct - avec les tranches diminuaient la mort neuronale induite par l'anoxie et augmentaient la surface neuritique de la tranche (Zhong *et al.* 2003; Sarnowska *et al.* 2009), probablement grâce aux facteurs solubles comme BDNF, IGF-1, NGF (*nerve growth factor*) ou bFGF, sécrétées par les cellules issues de la MO. Une protection similaire a été mise en évidence dans un modèle de co-culture de CSM et de neurones corticaux (Tate *et al.* 2010) ou de neuroblastomes humains (Hau *et al.* 2008).

In vivo, les deux grands modèles animaux pour cette pathologie sont l'occlusion de l'artère cérébrale moyenne ou l'occlusion transitoire de la carotide. Suite à ces lésions, la migration des CSM après injection intracérébrale (Koh *et al.* 2008) ou intraveineuse (Chen *et al.* 2001; Chen *et al.* 2003a) a été démontrée. Cette capacité migratoire provient probablement de l'expression de chemokines par le cerveau endommagé. Pour exemple, Wang *et al.* ont montré que MCP-1 (*chemokine monocyte chemoattractant protein-1*) n'est pas présent dans le cerveau normal mais est rapidement surexprimé après une occlusion de l'artère cérébrale moyenne chez le rat et cette protéine induit la migration des CSM jusqu'au site de la lésion (Wang *et al.* 2002). Un autre mécanisme de « domiciliation » des CSM pourrait impliquer SDF-1 (*stromal cell-derived factor-1 α*) et son récepteur CXCR4. En effet, le cerveau endommagé exprime un plus fort niveau de SDF-1 que le cerveau non atteint et les CSM hypoxiées expriment fortement CXCR4. De plus, l'utilisation d'un antagoniste inhibe fortement la migration des cellules injectées (Wang *et al.* 2008). Une fois les cellules implantées, elles survivent et améliorent les bénéfices fonctionnels avec ou sans réduction

visible de la zone infarctée (Li *et al.* 2000; Zhao *et al.* 2002; Chen *et al.* 2003a; Wakabayashi *et al.* 2010). Il semblerait néanmoins que, quoique des événements de trans-différenciation puissent avoir lieu (Hess *et al.* 2002; Nagai *et al.* 2007), l'amélioration fonctionnelle observée provienne essentiellement de facteurs induisant l'angiogenèse et améliorant le flux sanguin cérébral (Borlongan *et al.* 2004; Onda *et al.* 2008). Après transplantation intraveineuse de CSM humaines chez des rats ayant subi une occlusion de l'artère cérébrale moyenne, Chen *et al.* ont mis en évidence une augmentation du nombre de cellules endothéliales BrdU positives - provenant vraisemblablement de source endogène - ainsi qu'une augmentation du périmètre vasculaire, en plus d'une élévation de VEGF (*vascular endothelial growth factor*) et de son récepteur (Chen *et al.* 2003b). Le rétablissement des patients suite à des injections de CSM pourraient donc être du à des mécanismes de réparation neuronale et de neuroprotection par réduction de l'apoptose et la stimulation de la réponse de l'hôte pendant les épisodes ischémiques.

D'ailleurs, quand des CSM humaines sont modifiées génétiquement pour exprimer des facteurs de croissance, la neuroprotection et les améliorations fonctionnelles sont renforcées (Nomura *et al.* 2005; Horita *et al.* 2006; Liu *et al.* 2006a; Onda *et al.* 2008) : après injection intraveineuse de CSM exprimant GDNF dans un modèle de rats ischémiés, Horita *et al.* ont pu observer une diminution du volume de l'infarctus et une augmentation flagrante de la vitesse maximale atteinte lors d'un test d'effort sur tapis roulant, que ce soit contre les contrôles sans CSM ou contre les contrôles traités par des CSM non modifiées (Horita *et al.* 2006). Liu *et al.* ont observé le même type de résultats en transplantant des CSM modifiées pour exprimer le PlGF (*placental growth factor*) (Liu *et al.* 2006a).

Enfin, les propriétés immunomodulatrices des CSM ne sont probablement pas étrangères aux améliorations consécutives à leur injection. Ainsi Ohtaki *et al.* ont démontré que l'injection de CSM humaines à des souris ayant subi une occlusion transitoire de la carotide conduisait à la

modification de l'expression de cytokines dans l'hippocampe - notamment IGF-1 - ainsi qu'à l'activation de la microglie et/ou des macrophages, conduisant à une diminution des réactions inflammatoires, de la réponse immunitaire, de l'apoptose et, au final, à la préservation des cellules nerveuses (Ohtaki *et al.* 2008). Le seul essai clinique réalisé par Bang *et al.* en 2005 n'a cependant pas permis d'observer d'amélioration clinique significative (Bang *et al.* 2005).

V.2.2 CSM et maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson est une des maladies neurodégénératives les plus courantes ; elle est notamment caractérisée par des tremblements de repos, une rigidité musculaire avec difficulté d'initiation du mouvement et des troubles de l'équilibre et de la coordination. Cette pathologie résulte de la perte massive des neurones dopaminergiques de la substance noire. Le SNC n'étant pas capable de régénérer ses cellules perdues, une des stratégies thérapeutiques envisagée est le remplacement des neurones dopaminergiques par d'autres cellules capables de produire cette substance (Orlacchio *et al.* 2010). Dans ce contexte, les CSM sont de bonnes candidates puisqu'elles peuvent synthétiser et sécréter des facteurs neurotrophiques ou stimuler le tissu hôte pour leur production. Pour exemple, BDNF, GDNF et neurturin semblent avoir des effets positifs sur la survie neuronale, la stimulation de la régénération endogène. De fait, une amélioration fonctionnelle du syndrome Parkinsonien est observée après greffe de CSM (Lee *et al.* 2009c). De plus, la production des cellules de type dopaminergique à partir de CSM a été décrite dans la littérature, faisant de ces cellules des sources alternatives de sécrétion de ce neurotransmetteur (Jiang *et al.* 2003; Dezawa *et al.* 2004; Guo *et al.* 2005; Fu *et al.* 2006; Trzaska *et al.* 2007a). Dezawa *et al.*, ont obtenu 41 % de cellules tyrosine hydroxylase (TH) positives - avec sécrétion de dopamine à des niveaux détectables - en transfectant les CSM par un domaine intracellulaire de Notch puis en les exposant à différents facteurs trophiques (forskoline, bFGF, *ciliary neurotrophic factor*) suivi de l'administration de GDNF (Dezawa *et al.* 2004). Plus récemment, Trzaska *et al.* ont obtenu

67 % d'efficacité avec leur protocole d'induction en utilisant un milieu Neurobasal additionné de SHH (*sonic hedgehog*), FGF8 et de bFGF (Trzaska *et al.* 2007a). Ces deux équipes ont pu démontrer l'existence de canaux potassiques mais pas sodiques, suggérant que les cellules n'ont pas acquis les propriétés des neurones dopaminergiques totalement différenciés. Tatard *et al.*, avec un protocole d'induction en plusieurs étapes incluant SHH, FGF8, NGF, BDNF, NT-3 (*neurotrophin-3*) et de l'acide rétinoïque, ont réussi à atteindre un taux d'efficacité élevé en terme de différenciation (60 % des CSM induites expriment la TH), ainsi que des caractéristiques électrophysiologiques similaires à celles des neurones matures pour une sous population des CSM : les cellules MIAMI (*marrow isolated adult multilineage inducible*) (Tatard *et al.* 2007). Trzaska *et al.*, en complétant l'induction des CSM par du BDNF, ont mis en évidence l'augmentation de calcium intracellulaire après dépolarisation de la cellule ainsi que l'existence de courants électrophysiologiques suite à des stimulations par de l'acétylcholine ou du GABA (*γ-aminobutyric acid*), de même qu'une sécrétion de dopamine dépendant de la dépolarisation cellulaire (Trzaska *et al.* 2009). Une étude plus ancienne faisait déjà part de ce besoin de maturation des CSM induites pour obtenir des « neurones » matures (Dezawa *et al.* 2004).

Les résultats obtenus *in vitro* ont également leur pendant *in vivo*. Ainsi, dans de nombreux modèles animaux, la greffe de CSM induites ou non a abouti à une diminution des symptômes Parkinsoniens comparés aux contrôles. En injection intracrânienne dans un modèle de souris traitées au MPTP (1- méthyle 4- phényl 1,2,3,6-tétrahydro pyridine), les auteurs ont constaté une amélioration fonctionnelle au test du rotor malgré un faible pourcentage de CSM TH-positives (0,8 %). Ye *et al.* n'ont également pas retrouvé de CSM TH-positives dans leur modèle d'injection chez des rats traités par la 6-hydroxydopamine (6-OHDA), bien que certaines CSM aient subi une induction neuronale. Le nombre de rotations dues à la lésion est plus faible pour le groupe injecté avec ces cellules, bien que le groupe ayant reçu des CSM

non induites montre aussi une amélioration par rapport au groupe contrôle (Ye *et al.* 2007). L'utilisation de cellules préalablement conditionnées *in vitro* semble donc produire un bénéfice thérapeutique plus élevé que les CSM non conditionnées. Dans une autre étude, l'addition de GDNF au milieu de culture de CSM préalablement induites par transfection puis par utilisation de milieu conditionné par des facteurs trophiques, conduit à une nette amélioration fonctionnelle avec 45 % des cellules issues de la moelle osseuse TH positives et 30 % exprimant un transporteur de la dopamine (DAT) (Dezawa *et al.* 2004).

Ces capacités thérapeutiques nécessitent probablement la « domiciliation » des cellules greffées au site de lésion. En 2006 Hellmann *et al.* confirmaient la capacité de migration par le corps calleux des CSM injectées du côté controlatéral à l'administration de 6-OHDA jusqu'à la zone lésionnelle produite par la 6-OHDA. Les auteurs suggèrent que cette migration serait liée à de la sécrétion d'agents chémotactiques comme SDF-1 par la zone endommagée, (Hellmann *et al.* 2006). Comme pour les modèles d'attaques cérébrales, les propriétés anti-inflammatoires des cellules souches mésenchymateuses sont vraisemblablement impliquées dans la diminution des troubles neurologiques observés dans les différents modèles animaux utilisés. Ainsi Park *et al.* avec un modèle de perte neuronale provoquée par du MGI-132 (inhibiteur non spécifique du protéasome) ont démontré que l'injection des CSM diminuait l'immunoréactivité pour OX-6, marqueur de la microglie activée (Park *et al.* 2008). Suite à un traitement par du MPTP et Lipopolysaccharide (provoquant l'inflammation) puis une injection des cellules souches mésenchymateuses, l'activation microgliale, ainsi que les taux de TNF α et de iNOS (*inducible nitric oxide synthase*) diminuent comparés aux contrôles, ce qui suggèrent l'existence de mécanismes anti-inflammatoires, médiés par une modulation de l'activation microgliale dans les phénomènes neuroprotecteurs attribués aux CSM (Lee *et al.* 2009c).

Venkataramana *et al.* ont mené une étude clinique ouverte dans laquelle des CSM autologues ont été transplantés dans le striatum de 7 patients souffrant de la maladie de Parkinson à un stade avancé. Les auteurs ont suivi ces patients durant 12 à 36 mois et n'ont pas noté d'effets secondaires durant cette période d'observation. Les améliorations cliniques semblent marginales et pourraient être attribuées à un effet placebo (Venkataramana *et al.* 2010). Cette étude établit cependant la faisabilité des transplantations autologues de CSM tout en garantissant la sécurité des patients, au moins jusqu'à 36 mois post-greffe.

V.2.3 CSM et maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est la forme de démence la plus courante chez les humains. Elle est caractérisée par le dépôt de peptides β -amyloïdes en plaques amyloïdes ou plaques séniles dans le parenchyme du cerveau et le réseau micro vasculaire, conduisant à la perte de neurones et de synapses. Les traitements actuels, principalement les inhibiteurs d'acétylcholinestérase, sont temporaire et non curatifs.

Une des pistes thérapeutiques explorée est la diminution des niveaux de peptides β -amyloïdes. Ainsi des études ont démontré qu'après injection d'anticorps dirigés contre ces plaques séniles dans des modèles murins de la maladie d'Alzheimer, la sécrétion d'acétylcholine était restaurée et les tests d'apprentissages améliorés. Des administrations intracérébrales de vecteurs lentiviraux exprimant la neprilysine humaine ou des fibroblastes transformés pour surexprimer cette protéine ont abouti à une diminution des dépôts β -amyloïdes (pour revue : (Kim *et al.* 2009)). Simard *et al.* ont exploré les propriétés curatives des cellules microgliales issues de la moelle osseuse dans un modèle de souris transgéniques de la maladie d'Alzheimer et ont trouvé qu'elles étaient efficaces pour l'élimination des plaques séniles par phagocytose, contrairement aux cellules microgliales résidentes (Simard *et al.* 2006). Ces résultats suggèrent que la stimulation du système immunitaire peut réduire la charge en peptide β -amyloïde et être envisagée comme thérapie potentielle. Ainsi, après transplantation

intracérébrales de CSM chez des souris injectées par le peptide β -amyloïde ou transgéniques APP/PS1 (*amyloid precursor protein / presenilin 1*) la diminution du nombre de dépôts β -amyloïdes est associé à la restauration de la fonction microgliale déficiente. Une diminution de la réponse inflammatoire a également été observée de même qu'une amélioration des fonctions cognitives (Lee *et al.* 2009b; Lee *et al.* 2010b). Par la suite, la même équipe a démontré *in vitro* et *in vivo* que les CSM atténuent la mort neuronale provoquée par ces dépôts et elle suggère que les CSM diminuent la neurotoxicité et le déclin cognitif par inhibition de l'apoptose et du stress oxydatif dans l'hippocampe (Lee *et al.* 2010a).

De plus, les CSM sont de bonnes candidates pour la thérapie génique et pourraient être utilisées comme vecteur pour administrer des molécules anti-apoptotiques comme le NGF ou la seladin-1 (*selective Alzheimer's disease indicator-1*), gène anti-apoptotique, moins exprimé dans les régions cérébrales atteintes que chez des sujets sains (Benvenuti *et al.* 2006; Kim *et al.* 2009).

La situation concernant le remplacement neuronal conduisant à une restauration fonctionnelle est extrêmement complexe dans la maladie d'Alzheimer car les cellules souches utilisées devront être pré-différenciées *in vitro* en de nombreux types neuroblastiques pour une implantation dans de nombreuses aires cérébrales (Lindvall *et al.* 2010). Ainsi les recherches concernant l'utilisation des CSM comme source de thérapie cellulaire de la maladie d'Alzheimer n'en sont qu'à leur tout début et le champ d'investigation reste très vaste.

V.2.4 CSM et sclérose latérale amyotrophiques

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est un trouble neurodégénératif fatal, caractérisé par une paralysie musculaire progressive reflétant la perte de neurones moteurs dans le cortex cérébral et de neurones cholinergiques dans la corne ventrale de la moelle épinière. Aucune perte cognitive (mémoire, affecte sens) n'est associée à cette pathologie. Les causes sont encore inconnues bien qu'une mutation dans le gène codant pour l'enzyme superoxyde

dismutase 1 soit associée à des formes familiales (Hou *et al.* 2008; Wijesekera *et al.* 2009). Aucun traitement efficace n'est connu à ce jour, mais la thérapie cellulaire reste une des pistes les plus prometteuses.

Dans des modèles animaux de la SLA, Vercelli *et al.* ont démontré que des CSM humaines transplantées dans la moelle épinière diminuait l'inflammation (réduction de l'astroglie et de l'activation microgliale) et la perte des motoneurones, entraînant de meilleures performances motrices (Vercelli *et al.* 2008). Il a également été démontré que les CSM humaines survivaient dans le muscle de rats ayant une forme familiale de la SLA, si une lésion mineure est pratiquée avant injection (Suzuki *et al.* 2008). La même étude révèle que les CSM réduisent le nombre de plaques motrices dénervées et diminuent de la perte des motoneurones spinaux. Cette action est par ailleurs potentialisée par des cellules transformées pour exprimer GDNF. Il est intéressant de noter que des travaux révèlent une différence entre mâles et femelles. Ainsi Morita *et al.* ont observé que les femelles greffées par des CSM présentent une durée de vie supérieure aux témoins non greffées, alors qu'aucune différence significative n'a pu être mise en évidence chez les mâles (Morita *et al.* 2008). L'effet sur l'allongement de la vie, le déclin des performances motrices et le nombre moyen de motoneurones semble également lié à la dose de cellules injectées (Kim *et al.* 2010). Concernant les conditions d'administration des CSM, une étude rapporte un effet du nombre de passage en culture sur des cellules prélevées sur des malades (Choi *et al.* 2010). Bien qu'aucune modification des antigènes de surface n'ai été révélée, la sécrétion de facteurs trophiques diminuent au cours du temps. De plus, les CSM des passages les plus précoces auraient une capacité de différenciation supérieure à celle des CSM récoltées plus tardivement. Notons également que des différences ont été relevées entre les capacités des CSM de volontaires sains et celles issues de personnes atteintes par la SLA. Par exemple, Boucherie *et al.* ont observé que les CSM issus d'animaux modifiés pour le gène de la

superoxyde dismutase 1 ne pouvaient acquérir des propriétés neuroprotectrices (Boucherie *et al.* 2008). Ils ont aussi noté des différences morphologiques lors de protocoles de différenciation astrocytaire : les CSM issues de souches sauvages acquièrent une morphologie de type gliale avec des prolongements ramifiés, tandis que les CSM issues des souches modifiées développent de rares prolongements cytoplasmiques, conduisant à des cellules de type bipolaire. De même les CSM « sauvages » répondent par une augmentation de la sécrétion de GDNF, après traitement au riluzole (indiqué pour retarder le besoin d'assistance ventilatoire chez les patients atteints de SLA) tandis que les CSM issues des animaux modifiés ne répondent pas. Les résultats de cette étude révèlent une incapacité des CSM issues de modèles animaux pour la SLA à acquérir des propriétés neuroprotectrices.

Des études pilotes ont d'ailleurs été réalisées et les résultats obtenus par Mazzini *et al.* après des injections de CSM autologues dans un essai clinique ont révélés un ralentissement du déclin de la capacité vitale pour 4 patients sur 9 (Mazzini *et al.* 2008). Plus récemment, d'autres études ont été conduites : en 2010 Deda *et al.* ont greffé 13 patients atteints de SLA et 9 d'entre eux affirmaient « aller mieux » un an après l'injection. Cette amélioration subjective a été confirmée par électro-neuro-myographie. Un patient est resté stable, sans déclin ni amélioration de son état et 3 patients sont décédés des suites d'infection pulmonaire et d'infarctus du myocarde ((Deda *et al.* 2009) cité par (Orlacchio *et al.* 2010)). La même année Mazzini *et al.* ont publié les résultats d'une nouvelle étude clinique incluant 10 patients. Une légère diminution de la détérioration de la capacité vitale a été observée chez 2 patients sur les 10 ayant participé à l'étude. Bien que les bénéfices thérapeutiques restent actuellement faibles, ces études sont encourageantes car elles permettent d'envisager la faisabilité des greffes de CSM comme traitement de la SLA.

V.2.5 CSM et chorée de Huntington

La chorée de Huntington est une maladie neurodégénérative à caractère héréditaire. La mutation du gène IT15 (chromosome 4) codant pour la protéine huntingtine provoque une perte des neurones GABAergiques du striatum puis d'autres régions cérébrales. Elle se caractérise par des mouvements dits choréiques, des dysfonctionnements cognitifs et émotionnels graves, des troubles de l'équilibre, la léthargie puis la mort. Aucun traitement efficace n'est connu à ce jour, même si des espoirs existent grâce à la thérapie cellulaire, notamment l'implantation de cellules souches fœtales humaines. Les essais cliniques réalisés ont ainsi montré de faibles, mais significatives, améliorations chez quelques patients ayant reçus une greffe. Malheureusement des études sur le long terme ont révélées que ces transplantations neurales n'étaient pas stables et que les améliorations cliniques observées diminuaient 4 à 6 ans après la greffe (Gaura *et al.* 2004; Bachoud-Levi *et al.* 2006). La difficulté d'obtention des cellules souches fœtales humaine et les faibles améliorations consécutives aux greffes de celle-ci laissent toutefois une grande place à de nouvelles études utilisant d'autres sources cellulaires.

Ainsi, avec un modèle animal de la maladie de Huntington, Lescaudron *et al.* ont pu démontrer que la greffe bilatérale de CSM autologues dans le striatum endommagé de ces animaux conduisait à une diminution significative des déficits cognitifs. Cependant la plupart de ces cellules ont conservé un état primitif et très peu d'entre elles présentent un phénotype neural (Lescaudron *et al.* 2003). Des travaux plus récents ont révélé que, chez des souris transgéniques modèles de la maladie, les greffes de CSM survivaient peu de temps : dès le cinquième jours post-greffe une diminution des CSM étaient observé et aucune cellule intacte n'a pu être mise en évidence 15 jours après leur injection (Snyder *et al.* 2010). Les auteurs de cette études ont cependant observé que les CSM augmentaient la prolifération endogène de cellules et certaines d'entre elles exprimaient des marqueurs de différenciation neuronale

jusqu'à 30 jours post greffe (β III tubuline). Il semblerait aussi que les CSM puissent recruter des précurseurs neuronaux pré-existants et augmenter la sécrétion de facteurs neurotrophiques (FGF-2, CNTF, VEGF et NGF). La diminution du volume de la zone d'atrophie du striatum révélée par cette étude est comparable à celle rapportée dans une autre publication (Amin *et al.* 2008). Plus récemment, les CSM ont été utilisées comme vecteurs pour des facteurs trophiques (BDNF et NGF) (Dey *et al.* 2010). Les premiers résultats suggèrent que les cellules surexprimant le BDNF injectées dans le striatum y créent un environnement favorable au ralentissement de la neurodégénérescence et atténuent les déficits comportementaux.

V.3 Conclusion

Les mécanismes d'action des cellules souches menant à des récupérations fonctionnelles sont désormais mieux compris. Grâce à leurs capacités de différenciation en de nombreux types cellulaires, leur facilité d'implantation dans des zones lésées, leurs propriétés immunomodulatrices et leurs actions trophiques (neuroprotection, neurogenèse, angiogenèse), les CSM restent des sources de cellules souches polyvalentes pour un usage en thérapie cellulaire et/ou en thérapie génique. Leur usage ne provoque pas de controverse éthique puisque provenant d'organisme adulte, voire du patient lui-même. C'est pourquoi ces cellules, malgré l'avènement des cellules souches induites (cellules iPS) restent une option intéressante pour soigner des atteintes du SNC (Trzaska *et al.* 2007b; Kim *et al.* 2009; Lee *et al.* 2009c; Trounson 2009; Greco *et al.* 2010; Lindvall *et al.* 2010; Naegele *et al.* 2010; Orlacchio *et al.* 2010).

OBJECTIFS

L'un des axes de recherche développé à l'IFR133 (Ingénierie et Biologie Cellulaire et Tissulaire) a pour but d'optimiser la production, l'utilisation et le traçage de sources cellulaires utilisables en thérapeutique. Dans un contexte collaboratif, le projet d'étudier le rôle et le devenir des cellules souches dans un modèle d'ischémie cérébrale expérimental et leurs implications dans la récupération et/ou régénération neuronale a été mis sur pied. Deux sources de cellules avaient été envisagées initialement : des cellules souches mésenchymateuses médullaires à potentiel angiogénique ou neuronal, et des cellules souches neuronales de l'épithélium olfactif à potentiel régénératif. Le suivi à long terme des animaux aurait permis d'étudier le devenir des cellules greffées, l'établissement de connexions éventuelles, les différents mécanismes potentiels de régénération et d'évaluer le retentissement fonctionnel global par des tests comportementaux et d'imagerie. Enfin, l'aspect sécuritaire de la greffe devait être exploré en analysant la survenue de thromboses, de néoformations vasculaires et/ou de tumeurs. Ces approches de thérapies cellulaires constituent un axe de recherche transversal nécessitant des compétences multiples et notre équipe devait conduire les recherches concernant le devenir de l'implant par des analyses histologiques et hodologiques. Malheureusement, les soutiens financiers devant porter ce projet n'ont pu être obtenus et les collaborations envisagées alors ne se sont pas concrétisées. Cependant, malgré l'absence d'historique de notre laboratoire dans ce domaine, le projet fut poursuivi.

Nous nous sommes intéressés à l'impact de la greffe de cellules souches périphériques (CSP) dans une optique de thérapie cellulaire du système nerveux central (SNC). Dans un premier temps, il s'est agi de vérifier la capacité des cellules de moelle osseuse à migrer dans l'encéphale de souris adultes saines, de s'y implanter et d'y générer des cellules de type neural. Nos premiers résultats positifs nous ont incité à développer une approche *in vitro* de manière à mettre en place une série de modèles permettant une analyse plus commode des interactions entre le greffon et l'hôte et de l'évolution des cellules greffées. Nous avons choisi

l'utilisation d'un modèle de cultures organotypiques de cerveau parce que présentant le double avantage des modèles *in vivo* (conservation de la structure et des connexions) et *in vitro* (contrôle des conditions de culture). Dans cette optique, la première étape fut de mettre au point plusieurs outils : cultures organotypiques d'hippocampe et « greffe » de moelle osseuse sur ces tranches. Nous avons aussi décidé d'affiner la sélection cellulaire en nous orientant vers l'utilisation de cellules souches mésenchymateuses qui sont habituellement sélectionnées indirectement par i) leur forte capacité à adhérer au plastique des flacons de culture et ii) à proliférer intensément (étape d'amplification) dans un milieu de base contenant du sérum de veau.

Une fois cette étape franchie, il s'est agi de déterminer si les cellules greffées s'implantaient dans le tissu nerveux en culture et si elles étaient susceptibles de se transdifférencier en neurones afin d'évaluer leur potentiel en terme de thérapie cellulaire grâce à l'utilisation de marqueurs immunohistochimiques. La mise en place d'outils fiables permettant d'appréhender de façon non discutable la différenciation neuronale semblait donc indispensable. C'est pourquoi nous avons entrepris d'utiliser des CSM provenant d'animaux NFH-GFP (Letournel *et al.* 2006), modifiées pour exprimer la GFP (*Green Fluorescent Protein*) uniquement dans les neurones puisque placées sous le contrôle du promoteur NFH (neurofilament haut poids moléculaire).

Les résultats obtenus, nous ont poussé à explorer plus avant le comportement des cellules greffées, leurs effets sur les tranches et les différences potentielles entre les fractions cellulaires utilisées et susceptibles d'expliquer les variations d'effets observées.

MATERIEL ET METHODES

1ère partie : Greffe de moelle osseuse *in vivo*

I. LES MODELES ANIMAUX

I.1 Souris donneuses FvB mâles, receveuses Balb/c femelles

Les souris donneuses mâles sont de type FvB. Ces souris expriment le gène H2q du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), contrairement aux femelles de types Balb/c qui expriment le gène H2d du CMH, ce qui crée un chimérisme du CMH.

Les receveuses sont réparties en 3 groupes de 2 à 5 souris (Tableau 3 : Séries expérimentales souris receveuses Balb/C femelles. Tableau 3). Le groupe 0 correspond au groupe témoin et est constitué de souris n'ayant subi aucun traitement. Dans un premier temps les effets d'une irradiation sur le tissu cérébral sont contrôlés par comparaison d'un groupe de souris irradiées (groupe 1) et du groupe de souris témoin (groupe 0). Dans un deuxième temps ces résultats sont confrontés à ceux observés chez des souris irradiées et greffées avec des cellules non purifiées de MO seules (groupe 2).

I.2 Souris donneuses GFP mâles, receveuses Balb/c femelles

Les souris mâles de type donneuses de MO ont été modifiées pour exprimer la GFP (*Green Fluorescent Protein*) sous le contrôle du promoteur ubiquitaire de β -actine - elles seront notées GFP-Ub - , permettant un repérage direct avec un microscope à fluorescence des cellules médullaires greffées et sont âgées d'un an au moment du sacrifice [C57Bl/6-TgN (β -act-EGFP)Osb strain, Okabe *et al.* 1997]. Les souris receveuses sont des Balb/c femelles âgées de 21 semaines au moment de la greffe de CMO et n'expriment pas la GFP.

Différents groupes de receveuses sont constitués (Tableau 3). Le groupe GFP-Ub 0 correspond au groupe témoin, constitué de souris ayant subi une irradiation, sans autre traitement. Le groupe GFP-Ub 1 correspond à un groupe ayant subi une irradiation et une

injection de tampon phosphate salin (PBS). Le dernier groupe GFP-Ub 2 est constitué de souris irradiées et greffées avec les cellules de MO prélevées sur les souris GFP-Ub.

Groupes	Description des injections	Nombre d'animaux
0	Souris n'ayant subi ni irradiation, ni greffe	2
1	Souris ayant subi une irradiation seule (sans greffe)	4
2	Souris ayant subi une irradiation puis une greffe de MO (10 ⁶ cellules par souris)	5
GFP-Ub 0	Souris ayant subi une irradiation.	3
GFP-Ub 1	Souris ayant subi une irradiation et une injection de PBS.	5
GFP-Ub 2	Souris ayant subi une irradiation et une greffe de CMO.	2

Tableau 3 : Séries expérimentales souris receveuses Balb/C femelles.

I.2.1 Discrimination des souris GFP-Ub

La discrimination des souris GFP-Ub est effectuée très facilement grâce à l'utilisation d'une lampe à ultra-violets. Chez les souriceaux, une couleur verte fluorescente apparaît sur l'ensemble du corps lors de l'exposition à la lampe ; chez les animaux plus âgés possédant un pelage, cette couleur est visible au niveau de la queue et des yeux.

I.3 Irradiation corporelle des souris receveuses

Elle est réalisée dans le service de radiothérapie du Centre Hospitalier Universitaire de Besançon, la veille de la greffe de moelle osseuse. Les souris receveuses sont placées par groupe de 10 dans une boîte calibrée et reçoivent une irradiation gamma de 6 Gray (Gy) sublétale, pour un temps d'irradiation de 2 minutes. Cette irradiation permet la destruction de la MO et affaiblit les défenses immunitaires, favorisant ainsi la prise de greffe.

I.4 Prélèvement des CMO

Les cellules médullaires sont issues de la moelle des os longs des souris donneuses GFP-Ub. Les os des membres inférieurs, fémurs et tibias, prélevés après euthanasie sont placés dans un milieu de culture (RPMI 1640, BioWhittaker). La moelle osseuse est prélevée stérilement à l'aide d'une seringue puis les cellules de MO sont dispersées dans le RPMI. La suspension est homogénéisée pour dissocier les amas cellulaires médullaires par passages répétés dans l'aiguille. Les cellules sont ensuite centrifugées (2 min, 1000 g) et les hématies sont lysées par 10 ml de solution de lyse 1X. Le volume est ensuite ajusté à 30 ml avec du PBS (tampon phosphate salin) et incubé 15 minutes à température ambiante. Les cellules sont ensuite lavées deux fois dans du PBS, puis les cellules viables comptées à la cellule de Malassez après coloration au bleu trypan. Les suspensions cellulaires sont conservées à 4 °C 15 000 à 20 000 cellules de moelle osseuse ont été recueillies par animal.

I.5 Greffe des cellules et contrôle de la prise de greffe

Les CMO sont injectées par voie intraveineuse dans la veine latérale de la queue des souris receveuses Balb/c femelles. Le nombre de cellules nécessaires (10^6 CMO et $5 \cdot 10^6$ cellules apoptotiques obtenues à partir des mâles FvB ; $6,9 \cdot 10^5$ CMO obtenues à partir des mâles GFP-Ub) est ajusté dans un volume final de 300 μ L de PBS. Le délai post greffe est de 6 mois pour les souris Balb/c ayant reçu une greffe de cellules provenant des donneuses FvB et de 15 jours pour les souris Balb/c qui ont reçu une greffe de cellules provenant des donneuses GFP-Ub. Afin d'effectuer des contrôles de la prise de greffe chez les Balb/c femelles ayant reçu une injection de CMO provenant des mâles GFP-Ub, un prélèvement sanguin est effectué avant la fixation des tissus par perfusion transcardiaque. Le sang est prélevé sur EDTA (éthylènediaminotétraacétate disodique) afin d'éviter la coagulation puis étalé sur lame.

II. DEVENIR DES CELLULES GREFFEES

II.1 Préparation du matériel histologique

II.1.1 Fixation

Les animaux sont d'abord anesthésiés par injection d'une solution d'hydrate de chloral 7%. La cage thoracique est ouverte, le cœur dégagé et l'oreillette droite ainsi que le ventricule gauche sont fendus. Une canule est introduite par le ventricule jusqu'à l'aorte ascendante et le réseau vasculaire de l'animal est rincé à l'aide d'une pompe par perfusion de 150-200 mL d'une solution de NaCl 0,9%. Les tissus sont ensuite fixés par le passage, avec le même système, de 250 mL de paraformaldéhyde (PFA) 4%. Enfin le cerveau est retiré de la boîte crânienne de l'animal et la rate est prélevée. Ces tissus sont postfixés dans le même fixateur pendant 2-3 heures.

La MO des souris ayant reçu une greffe de CMO provenant des souris mâles FvB est également prélevée et placée dans le même fixateur pour une postfixation comme décrit précédemment.

II.1.2 Coupes au cryostat

Les prélèvements sont plongés pendant 24 heures dans une solution cryoprotectrice de saccharose 15% dans du tampon phosphate 0,1M pH 7,2. Les cerveaux et les rates sont congelés en atmosphère d'azote à -100°C ; les MO sont congelées de la même façon après inclusion dans un milieu d'enrobage (Tissue Tek). Les tissus sont stockés à -40°C jusqu'à la coupe. Les coupes sériées de 10 µm d'épaisseur sont recueillies sur des lames gélatinées et conservées à -40°C jusqu'à leur utilisation.

II.2 Techniques histologiques

II.2.1 Coloration au bleu de toluidine (souris greffées avec des CMO issues de mâles FvB)

L'analyse des cerveaux au bleu de toluidine permet la mise en évidence des effets éventuels de l'irradiation, par exemple sur le nombre de neurones, le nombre de cellules gliales, de détecter l'existence éventuelle de zones plus sensibles et la présence de foyers inflammatoires. Les coupes au cryostat sont décongelées dans du PBS puis lavées à l'eau distillée avant d'être plongées entre 30 s et 2 min dans la solution de bleu de toluidine. La coloration est alors différenciée dans des bains d'éthanol 70% puis 95%, et les coupes sont déshydratées dans deux bains successifs d'éthanol absolu. Enfin les coupes sont plongées dans 3 bains de xylène pour être montées entre lame et lamelle de façon permanente dans une résine naturelle (baume du Canada).

II.2.2 Immunohistochimie

L'analyse immunohistochimique permet le phénotypage des cellules du greffon, leur quantification et l'analyse précise de leur localisation.

Après décongélation et rinçage dans du PBS-Triton (3x10 min), les coupes sont incubées toute la nuit dans une chambre humide à température ambiante avec l'anticorps primaire préparé à la concentration appropriée (Tableau 4). Afin de saturer les sites de liaison aspécifique, les anticorps polyclonaux sont dilués dans une solution PBS-Triton comportant des lactoprotéines. Les anticorps monoclonaux dans du PBS-Triton. Dans un deuxième temps, l'utilisation d'un anticorps secondaire dirigé contre l'anticorps primaire et couplé à la cyanine permet la visualisation des sites de synthèse ou d'accumulation de la protéine ayant fixé les anticorps. Ainsi, après incubation du ou des anticorps primaires, les coupes sont rincées trois fois dans du PBS et sont incubées 1 heure à température ambiante avec un anticorps anti-

immunoglobuline G de lapin ou de souris fluorescent (Jackson Immuno Research Laboratories Inc) et dilué de façon appropriée (tableau 3). A la fin de l'incubation, les coupes sont à nouveau rincées trois fois dans du PBS et sont montées entre lames et lamelle avec un milieu glycérolé (1 volume de glycérol, 1 volume de PBS). Les coupes sont conservées à 4°C et peuvent être observées au microscope à fluorescence (microscope à fluorescence, Olympus).

Parallèlement à cette étude des tissus cérébraux, une étude a été réalisée sur la rate qui est le tissu cible des greffes hématopoïétiques, afin d'en vérifier le chimérisme.

Anticorps	Espèce	Marquage	Dilution	Fournisseur
Anti H-2Kq FITC	Souris	Cellules de MO greffées	1 : 200	PharmLngen
Anti H-2Kd FITC	Souris	Témoin positif des antigènes de surface de l'hôte.	1 : 300	PharmLngen
Anti NeuN	Souris	Neurones	1 : 200	Chemicon
Anti CNPase	Souris	Oligodendrocytes	1 : 100	Chemicon
Anti GFAP	Lapin	Astrocytes	1 : 200	Sigma
Anti CD31	Souris	Cellules endothéliales	1 : 50	DakoCytomaton
Cyanine anti-souris	Chèvre		1 : 400	Jackson
Cyanine anti-lapin	Chèvre		1 : 400	Jackson

Tableau 4 : liste des anticorps utilisés.

II.3 Techniques de biologie moléculaire

Afin de mettre en évidence la présence de cellules greffées porteuses du chromosome Y dans les tissus des souris receveuses femelles, nous avons mis en œuvre des techniques de polymérisation en chaîne (PCR) et d'hybridation *in situ* fluorescente (FISH). Pour celle-ci nous avons testé une sonde commerciale du gène SRY humain d'une part et une sonde spécifique du gène *Ssty1* (Bishop *et al.*, 1985) de souris préparée par nos soins, d'autre part.

II.3.1 Extraction de l'ADN génomique

Pour réaliser l'extraction d'ADN génomique, un prélèvement sanguin est effectué dans la cavité rétro orbitale d'une souris FvB mâle âgée de 9 mois, avec de l'EDTA. L'ADN a été extrait avec le kit QIAMP DNA Blood mini kit (Qiagen), en suivant les instructions du fabricant, puis dosé au spectrophotomètre (Eppendorf) afin de vérifier l'absence de contamination protéique ou phénolique. La concentration de l'ADN est déterminée par la lecture de son absorbance à 260 nm (A_{260nm}) dans un spectrophotomètre. La contamination protéique est appréciée par lecture de l'absorbance à 280 nm (A_{280nm}) et la contamination phénolique par une lecture à 230 nm (A_{230nm}) ; la pureté des extraits d'ADN est satisfaisante quand le rapport A_{260nm} / A_{280nm} est compris entre 1,8 et 2 et le rapport A_{260nm} / A_{230nm} est compris entre 1,5 et 2,2. Pour certaines extractions, une deuxième purification phénol : chloroforme : isopropanol (25:24:1) a été réalisée afin d'éliminer les traces de phénol retrouvées dans la solution d'ADN extrait, la contamination phénolique pouvant conduire à une surestimation de la quantité d'ADN et freiner les réactions suivantes de PCR. Le volume de la solution d'ADN génomique à purifier est ajusté à 50 μ L au moins et 1 volume d'une solution phénol : chloroforme : isopropanol est ajouté. Après centrifugation 5 min à 4°C, 9000g, la phase aqueuse supérieure est récupérée. Un volume de chloroforme est ajouté et une nouvelle centrifugation est réalisée dans les mêmes conditions. La phase aqueuse est

récupérée ; 2 volumes d'isopropanol et ½ volume d'acétate de sodium 3M pH 7,5 sont ajoutés. Après une précipitation de l'ADN de 30 min à -40°C, une nouvelle centrifugation est réalisée (25 min, 18000g, 4°C) et le surnageant est éliminé. Le culot est alors rincé avec de l'éthanol 70% à -40°C et centrifugé à 4°C, 18000g durant 3 min. Le surnageant est éliminé et le culot est séché à l'aide d'un évaporateur sous vide. Le culot est ensuite repris dans 30 µL d'eau ultra pure puis dosé au spectrophotomètre.

Afin d'extraire l'ADN des tissus fixés (cerveaux des Balb/c femelles greffées par des CMO FvB mâles), nous appliquons la technique de purification au phénol : chloroforme : isopropanol, après une étape préliminaire de protéolyse des tissus avec une solution constituée notamment de protéinase K. Le matériel fixé est récupéré à partir de coupes sériées congelées. Deux à trois coupes "grattées" sur lames sont déposées dans chaque tube.

II.3.2 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Un fragment de 1511 pb du gène *Ssty1* est amplifié grâce à un couple d'amorces choisi à l'aide du logiciel Primer Express. La trousse FastStart *Taq* DNA polymerase (Roche) a été utilisée dans nos expériences. Les réactions de PCR ont été réalisées dans un volume final de 20 µL, dans le milieu réactionnel suivant :

- | | |
|---|-----------------------------------|
| ✓ 2 µL de tampon 10X d'enzyme | ✓ 2 µL d'ADN génomique |
| ✓ 3 µL de MgCl ₂ 25 mM | ✓ 1 µL du couple d'amorces |
| ✓ 1 µL d'un mélange des 4 dNTP
(2,5 mM chacun) | ✓ 0,2 µL d'enzyme (5U/µL) |
| | ✓ Eau distillée stérile qsp 25 µL |

Pour cette amplification, le thermocycleur (PTC-200, Polylabo) est programmé pour une étape d'activation de la *Taq* polymérase (Roche) suivie de 33 cycles d'amplification. Chaque cycle est composé d'une phase de dénaturation de 30 s à 96°C, d'une phase d'hybridation de 30 s à 65°C et d'une phase d'élongation de 2 min à 72°C. A l'issue des 35 cycles, le milieu réactionnel est laissé à 4°C pour stopper les réactions. Les produits de PCR ont été analysés par électrophorèse 20 min, 100 V en gel d'agarose 1,2% dans une cuve de type RunOne Power Supply (EmbiTec) dans du tampon TAE 0,5X additionné de BET 0,06%. L'observation est faite sur un banc UV par l'intermédiaire d'une caméra (Bio-Rad Gel Doc 2000). La séquence a été vérifiée par séquençage réalisé sur un séquenceur AB GA3130 du service de séquençage de l'IFR133.

2ème partie : Modèles d'étude *in vitro*

I. OBTENTION DES CMO ET DES CMOA MURINES A PARTIR DE MOELLE OSSEUSE

Pour ces expérimentations, nous avons utilisé plusieurs types de souris : soit les animaux donneurs sont des souris non modifiées génétiquement (souris OF1), soit génétiquement modifiés pour exprimer la GFP, permettant un repérage au microscope à fluorescence des cellules médullaires greffées, les tranches de tissus mises en culture (hippocampe) provenant d'animaux n'exprimant pas cette protéine.

Le premier modèle animal exprime la GFP de façon ubiquitaire - comme pour les expérimentations *in vivo* : GFP-Ub - et permet le repérage et le suivi des cellules médullaires greffées du début à la fin de l'expérimentation. Le second modèle animal exprime cette protéine sous contrôle du promoteur du neurofilament haut poids moléculaire (NFH) - il sera noté NFH-GFP - et permet le repérage des cellules médullaires greffées qui exprime la protéine NFH, c'est-à-dire si elles ont subi une différenciation en cellules possédant un phénotype de type neuronal.

I.1 Génotypage des souris NFH-GFP

Il est nécessaire de génotyper les jeunes souris (3 à 4 semaines) car il n'est pas possible de reconnaître à l'œil les souris hétérozygotes ou homozygotes pour le gène modifié des souris ne le possédant pas. La technique de génotypage utilisée est basée sur l'extraction d'ADN par lyse alcaline, suivie d'une amplification par PCR.

Après avoir nettoyé la partie à prélever avec du Dakin puis avec de l'alcool 95° afin d'éviter toute contamination environ 1 mm de queue est prélevé avec des instruments stériles puis placé dans un tube Eppendorf de 500 µL stérile. Si le génotypage ne peut être effectué immédiatement, alors les tissus sont conservés au congélateur à -20°C jusqu'à utilisation.

On ajoute 75 μL de solution de lyse alcaline (25 mM NaOH, 0.2 mM EDTA disodique, qsp H_2O 10 mL) pour environ 1 mm^3 de tissu. L'échantillon est chauffé 4 heures à 95 °C et refroidi 10 min à 4°C. Une solution de tris HCl 40 mM est ajoutée volume à volume pour neutraliser la solution de lyse et arrêter la réaction. Les tubes sont centrifugés afin de faire sédimenter les débris tissulaires et cellulaires. Le surnageant est prélevé et peut être utilisé comme matrice pour une PCR classique dont le protocole est détaillé dans la partie précédente (II.3.2 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)). Les amorces sont dessinées pour être spécifiques de la GFP (sens : 5'-TGGTGAGCAAGGGCGAGGAG-3' ; antisens : 5' - TTGTGGCTGTTGTAGTTGTA - 3'). L'analyse des produits de PCR se fait par électrophorèse sur gel d'agarose 2%, avec un marqueur de poids moléculaire. La bande attendue pour la détection du gène GFP est à 450 pb.

I.2 Prélèvement de la MO

Les cellules médullaires sont issues de la moelle des os longs des souris donneuses âgées de 3 à 8 semaines. Les os des membres inférieurs prélevés, fémurs et tibias, sont placés dans un milieu de culture simple (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM). La moelle osseuse est prélevée stérilement à l'aide d'une seringue et les cellules de moelle osseuse (CMO) sont dispersées dans le DMEM. La suspension est homogénéisée par passages répétés dans l'aiguille pour dissocier les amas cellulaires médullaires et est ensuite centrifugée (5 minutes à 300g) ; le culot est repris dans 10 mL de milieu de culture composé de DMEM additionné de 10% sérum de veau fœtal (SVF), 100 U/mL de pénicilline, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de streptomycine et 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ d'amphotéricine B (= milieu de culture pour CMOA). A ce stade, les cellules sont utilisées sans aucune sélection et sont appelées Cellules de Moelle Osseuse (CMO), ou sont mises en culture pour sélection par adhérence au plastique (CMOA).

I.3 Mise en culture des CSM murines

Les cellules viables sont comptées à l'hématimètre de Malassez après coloration au bleu de trypan et ensemencées sur boîtes de Pétri à une concentration de 10^6 cellules/cm². Elles sont cultivées à 37°C sous 5% de CO₂ en atmosphère humide, dans du milieu de culture pour CMOA. Trois jours après la mise en culture (J3), les CMOA sont isolées grâce à leur propriété d'adhérence au plastique, les cellules non adhérentes étant éliminées par changement du milieu (les CMOA sont alors au passage P0). Cette étape peut être réalisée plus tard (J5) si la présence de cellules adhérentes semble faible. Environ 2 à 3 semaines après l'ensemencement, les CMOA atteignent 70 à 80% de confluence. Elles sont lavées avec du Hanks et décollées par de la Trypsine 0,25%, EDTA 1mM durant 10 min à 37°C. Elles sont ensuite réensemencées après une dilution de 1/2 dans le milieu de culture pour CMOA. Les récoltes des CMOA pour les expérimentations sont réalisées à des passages différents afin d'évaluer l'influence de la culture sur nos expérimentations : CMOAP1 et CMOAP5 pour les récoltes à 1 ou 5 passages respectivement.

I.4 Vérification de la multipotence des CMOA

I.4.1 Différenciation en adipocytes

L'adipogenèse est induite selon le protocole de Pittenger *et al.* (Pittenger *et al.* 1999). Les CMOA à confluence sont cultivées dans un milieu à base de DMEM avec 100 U/mL de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine et 250 µg/ml d'amphotéricine B auquel ont été ajoutés 10% de SVF, 50 nM de dexaméthasone, 10^{-6} M d'hydrocortisone, 0,2 mM d'indométhacine et 5 µg/mL d'insuline. Le milieu est changé délicatement 3 fois par semaine. Les vésicules lipidiques ont été colorées 50 minutes à température ambiante par un marquage avec une solution d'Oil Red O après fixation au PFA 4% 30-40 minutes à température

ambiante et rinçage en PBS 1X. Après incubation avec la solution d'Oil Red O, les puits sont rincés 3 fois avec de l'eau distillée.

I.4.2 Différenciation en ostéocytes

Le phénotype ostéogénique est obtenu après 21 jours de culture dans un milieu à base de DMEM avec 100U/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine et 250 µg/ml d'amphotéricine B auquel ont été ajoutés 10% de SVF, 10 mM de β-glycérol phosphate, 50 µg/mL d'acide ascorbique et 10^{-8} M de dexaméthasone. La minéralisation de la matrice extracellulaire est visualisée par un marquage au rouge d'alizarine. La couche cellulaire est fixée par de l'éthanol froid durant 1 heure (à température ambiante), rincée deux fois dans de l'eau distillée et incubée 30 minutes à température ambiante avec la solution d'Alizarin Red S 2% (p/v) ajustée à pH 4.1 avec de l'hydroxyde d'ammonium puis lavée avec de l'eau.

II. MODELE DE GREFFE SUR TRANCHES

II.1 Techniques de culture de tranches sur filtres

Ces travaux sont réalisés sur des souris de souche OF1 âgées de 7 à 9 jours. La méthode statique de culture de tranche sur filtre a été adaptée au laboratoire d'Histologie pour la culture de tranches d'hypothalamus. Pour cette étude nous l'avons appliquée à la culture de tranches d'hippocampe et de cortex-hippocampe.

Les souris sont sacrifiées par décapitation. Après cette étape, toutes les manipulations sont effectuées stérilement sous une hotte à flux laminaire. L'encéphale est prélevé intégralement puis le cervelet est enlevé, de même que le tiers ventral de l'encéphale. La partie restante est alors débitée en coupes frontales d'environ 300 μm à l'aide d'un trancheur motorisé (McIlwain). Les tranches sont séparées sous loupe binoculaire dans une solution saline équilibrée de Hanks (Gibco) additionnée de glucose (6,5 g/L). Les tranches sélectionnées sont déposées sur des membranes microporeuses stériles de 30 mm de diamètre (Millicell CM, pores 0,4 μm , Millipore). Chaque membrane est placée dans une boîte de Pétri de 33 mm de diamètre contenant 1 mL de milieu de culture stérile composé de 50% de milieu Eagle, 25% de sérum de cheval décomplémenté, 25% de solution saline équilibrée de Hanks, 1 mM de glutamine, 6,5 g/L de glucose et 100 U/mL de pénicilline, 100 $\mu\text{g/ml}$ de streptomycine et 250 $\mu\text{g/ml}$ d'amphotéricin B (= milieu de culture pour tranches). Les boîtes de Pétri sont ensuite placées dans un incubateur à 37°C sous 5% de CO₂ en atmosphère humide. Les tranches se trouvent ainsi à l'interface air/liquide et la diffusion du milieu de culture à travers la membrane permet d'assurer la survie du tissu. Le milieu est renouvelé tous les 3 jours.

II.2 Greffes de CMO et/ou de CMOA sur les tranches

Plusieurs protocoles de dépôt ont été expérimentés, que ce soit concernant la fraction cellulaire utilisée (CMO ou CMOA) ou la façon même de déposer les cellules sur les tranches : dans 1 mL de volume final ou 2 μ L, auquel cas les cellules sont déposées avec une pipette et dans 0.5 μ L à l'aide d'une seringue Hamilton. Ces protocoles sont détaillés ci-après et sont résumés dans le Tableau 5.

II.2.1 Greffe de CMO, CMOA

Après prélèvement de la MO, les cellules sont centrifugées (10 minutes à 100g) et la suspension est reprise dans du DMEM. Les cellules viables sont comptées au bleu de trypan sur hématimètre de Malassez et le volume de la suspension cellulaire est ajusté à différentes concentrations cellulaires pour être déposées sur les tranches 4 jours après leur mise en culture, à la faveur d'un changement de milieu. Aucun facteur de croissance supplémentaire n'est ajouté au milieu de culture qui est changé tous les 2 ou 3 jours.

Après 1 ou 5 passages, les CMOA sont récoltées et les cellules viables sont comptées au bleu de trypan sur hématimètre de Malassez. Les dépôts sur tranches sont effectués comme décrit précédemment. Les différents protocoles utilisés sont résumés dans le Tableau 5.

Nombre de cellules	Volume de dépôt	Type de cellules
2000	0,5 μ L	CMO
10 000	2 μ L	CMO CMOAP1 CMOAP5
10 000 (5000+5000)	2 μ L	CMO et CMOAP5
5000 par tranche	1 mL	CMOAP1

Tableau 5 : Résumé des protocoles de dépôt sur tranches.

II.3 Co-culture de tranches et de CMO/CMOA

Pour pouvoir évaluer les effets des facteurs solubles sécrétés par les CMO ou des CMOA sur les tranches d'hippocampe, nous avons mis au point un modèle de co-culture dans lequel aucun contact physique n'est possible entre les cellules et les tranches.

Les CMO sont déposées immédiatement après prélèvement sur le fond de plaques 6 puits (10^6 cellules/cm²) et les CMOA sont récoltées par trypsinisation puis réensemencées. Deux jours après la mise en culture sur plaque 6 puits des CMO ou des CMOA et trois jours après le début des cultures organotypiques, les membranes portant les tranches sont déposées dans les puits. Le milieu de culture pour CMOA est remplacé par du milieu pour culture de tranche (voir Tampons et solutions).

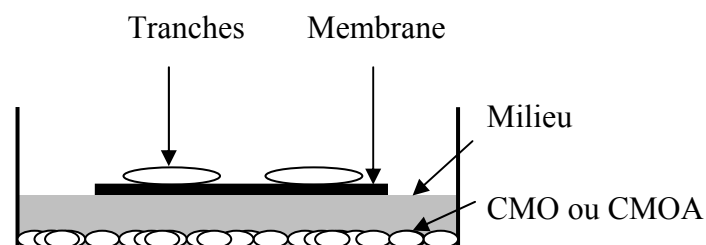


Figure 14 : schéma de la co-culture.

III. DEVENIR DES CMO/CMOA SUR LES TRANCHES DE TISSU EN CULTURE

III.1 Estimation de la prolifération

Afin d'évaluer les capacités de prolifération des CMO/CMOA au sein du tissu en culture, toutes les cellules exprimant la GFP (GFP+) ont été comptées sur les mêmes tranches 4, 7 et 10 jours après dépôt. Le suivi au jour le jour des cellules déposées sur les tranches est rendu possible par l'utilisation de cellules provenant d'animaux GFP-Ub et d'une loupe à fluorescence Olympus SZX9 ne nécessitant ainsi aucune fixation préalable.

III.2 Analyses immunohistochimiques

Le phénotypage des cellules du greffon est réalisé après fixation des tissus avec du PFA 2%, 1 heure à température ambiante et à l'obscurité.

La méthode d'immunofluorescence est décrite dans le chapitre II.2.2 du matériel et méthode, avec quelques modifications. Après fixation et rinçages par du PBS-Triton, les tranches sont incubées toute la nuit à température ambiante et sous agitation avec l'anticorps primaire (Tableau 6). Les tranches sont ensuite rincées trois fois en PBS et incubées deux heures à température ambiante sous agitation avec l'anticorps secondaire approprié (Tableau 6). A la fin de l'incubation, les tranches sont à nouveau rincées trois fois en PBS et sont montées entre lame et lamelle avec un milieu glycérolé (1 volume de glycérol, 1 volume de PBS). Les tranches sont conservées à 4°C et peuvent être observées au microscope à fluorescence.

Anticorps	Espèces	Dilution	Fournisseur
Anticorps primaires			
Anti-NeuN	Souris	1:500	Chemicon
Anti-NF200	Souris	1:2000	Boehringer
Anti-CNPase	Souris	1:200	Chemicon
Anti-GFAP	Lapin	1:500	Sigma
Anticorps secondaires			
Cyanine3 anti-mouse	Ane	1:2000	Jackson
Cyanine 3 anti-rabbit	Ane	1:2000	Jackson

Tableau 6 : Les différents anticorps utilisés, spécificités et dilutions.

IV. DEVENIR DES TRANCHES

IV.1 Quantification de la fluorescence et détection de la mort cellulaire endogène

Les techniques immunohistochimiques permettent d'étudier l'évolution phénotypique des cellules issues de la moelle osseuse, comme décrit dans le paragraphe précédent, mais également leur influence sur le tissu nerveux en quantifiant des marquages endogènes.

Analysis est un logiciel permettant de détecter automatiquement des « particules » sur une image en fonction de l'intensité des marquages. Il est donc nécessaire d'effectuer un seuillage précis : toutes les particules correspondant à un marquage doivent être détectées mais le fond ne doit pas être inclus. La région d'intérêt sur laquelle la détection est effectuée est fixée par le manipulateur. Les éventuels artefacts sont ensuite soustraits manuellement.

Les quantifications ont été réalisées pour deux marqueurs neuronaux, NeuN et NF200 et pour un marqueur de mort cellulaire, l'iodure de propidium.

Afin d'étudier la mort cellulaire endogène, nous avons utilisé le modèle de la co-culture (voir Co-culture de tranches et de CMO/CMOA

). Afin de quantifier l'effet des cellules issues de la moelle osseuse sur la dégradation des tranches d'hippocampe en culture, 10 μ M d'iodure de propidium ont été ajoutés au milieu. Cette molécule lipophile est un marqueur de la viabilité cellulaire car incapable de pénétrer les cellules vivantes. Les analyses sont effectuées 24 ou 72 heures après le début de la co-culture.

IV.2 Techniques de biologie moléculaire

IV.2.1 Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux sont extraits à l'aide d'une trousse commerciale. La technique est basée sur la technique proposée par Chomczynski et Sacchi qui combine le thiocyanate de guanidine (qui dénature les protéines et inhibe les ribonucléases) et une extraction au phénol-chloroforme (Chomczynski *et al.* 1987).

Les manipulations sont réalisées dans la glace et dans une centrifugeuse réfrigérée à 4°C. Les tranches de tissus sont immergées dans 1 mL de milieu de culture pour tranches, décollées de la membrane à l'aide d'un grattoir stérile, récupérées à l'aide d'une pipette 1000 µL et placées dans un tube Eppendorf stérile. Les fragments tissulaires sont alors sédimentés par centrifugation à 300 g durant 10 minutes, le surnageant est aspiré à l'aide d'une pompe à vide et le culot est repris dans 1 mL de solution dénaturante à base de phénol et d'agents chaotropiques (Trizol). 200 µL de chloroforme sont ajoutés à chaque fraction, l'ensemble est agité à la main pendant 10 secondes et, après refroidissement cinq minutes dans la glace, les tubes sont centrifugés 10 minutes à 12 000g.

Trois phases apparaissent dans le tube : la phase phénolique contenant les protéines et débris cellulaires, une interphase contenant l'ADN et une phase aqueuse contenant les ARN totaux. La phase aqueuse est récupérée dans un nouveau tube et un volume d'isopropanol est ajouté. Après agitation délicate par inversion, les ARN sont précipités 2 heures à -40°C afin d'améliorer le rendement d'extraction. Les ARN sont enfin sédimentés par une centrifugation de 30 minutes à 12 000g et lavés à l'éthanol 70 % (5 minutes, 5000g) afin d'éliminer les sels et les traces d'isopropanol, séchés à l'air libre puis repris dans 15 µL d'eau stérile. Les ARN sont laissés une nuit à 4°C avant dosage afin de faciliter leur dissolution.

La concentration des ARN totaux est déterminée par lecture de leur absorbance à 260 nm (A_{260}) sur un spectrophotomètre (Eppendorf), une unité d'absorbance correspondant à 40 $\mu\text{g/mL}$ d'ARN. La contamination protéique est appréciée par lecture de l'absorbance à 280 nm (A_{280}) ; la pureté des extraits d'ARN est satisfaisante lorsque le rapport absorbance A_{260}/A_{280} est compris entre 1,8 et 2. Les ARN sont conservés à -40° .

IV.2.2 Transcription inverse (RT) des ARN totaux

La réaction est réalisée dans un volume de 20 μL . Après dénaturation des ARN totaux dans 13 μL d'eau stérile à 72°C pendant 10 minutes, la transcription inverse est réalisée par addition du mélange réactionnel suivant :

- ✓ 4 μL de tampon 5 X d'enzyme (Promega)
- ✓ 1 μL d'un mélange de dNTP (6,25 mM chacun) (Amersham)
- ✓ 1 μL d'hexamères aléatoires pd(N)₆ (100 pmol/ μL) (Roche)
- ✓ 0,5 μL d'inhibiteurs de ribonucléases (40 U/ μL) (Promega)
- ✓ 0,5 μL de Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase, RNase H (200 U/ μL) (M-MLV RT) (Promega)

Le mélange est mis à incuber 10 minutes à 23°C pour l'hybridation des hexamères, 1 h à 42°C pour la transcription inverse et enfin cinq minutes à 95°C pour inactiver l'enzyme et dénaturer les hétéroduplex ARN/ADNc.

IV.3 PCR semi quantitative

La technique de RT-PCR « semi quantitative » a été utilisée afin d'étudier l'influence des cellules souches mésenchymateuses sur les tranches d'hippocampe en culture.

Cette technique consiste à co-amplifier simultanément dans le mélange réactionnel l'ADNc du gène d'intérêt et l'ADNc d'un gène de référence ubiquitaire et constitutif servant à la normalisation (Kinoshita *et al.* 1992; Zamorano *et al.* 1996). Le gène de la cyclophiline (CYC) a été choisi comme gène de référence.

La mise au point de la méthode consiste à rapprocher les cinétiques d'amplification des gènes d'intérêt et de référence, en modifiant la dilution de leurs couples d'amorces respectifs. La mesure d'intensité de fluorescence des amplicons est effectuée lors d'un même cycle, durant la phase exponentielle des cinétiques d'amplification.

De manière standard, chaque amorce est mise en solution à la concentration de 2 nmol/ μ L. Une solution de couple d'amorces contient un jeu de deux amorces (l'une sens, l'autre reverse pour le gène concerné), chacune à la concentration de 0,05 nmol/ μ L. Ainsi, deux solutions de couples d'amorces sont utilisées pour la mise au point de la technique : l'une pour amplifier le gène d'intérêt et l'autre pour amplifier le gène de référence. La mise au point de la technique se fait empiriquement sur les ARN totaux extraits à partir des cultures organotypiques de référence en modifiant la dilution de l'une des deux solutions d'amorces.

Les amorces utilisées (oligonucléotides de synthèse ; Eurogentec) ainsi que les conditions de co-amplifications sont récapitulées dans le Tableau 7. Les températures de fusion des amorces sont calculées selon la formule simplifiée : $T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$

Pour toutes les co-amplifications le thermocycleur (PTC-200, Polylabo) est programmé comme décrit précédemment (les programmes utilisés pour chaque co-amplification sont indiqués dans le Tableau 8). Après adjonction d'un tampon de charge, les produits de PCR obtenus sont séparés par une migration électrophorétique dans un gel d'agarose 1,5 % dans du

tampon TAE 0,5 X à 100 V. Les ADNc sont colorés au bromure d'éthidium (Sigma) et observés aux ultraviolets. La documentation et l'analyse des images des bandes de PCR observées sont réalisées avec un Gel Doc 2000 et le logiciel Quantity One 4.3.2 (BIO-RAD).

Amorces	Type cellulaire	Séquences	Hybridation	Nombre de cycles	Concentrations (gène d'intérêt / CYC)
β III tubuline	Neurones	3'TGAGGCCTCCTCTCACAAAGT5' 3'CGCACGACATCTAGGACTGA5'	60°C	34	50 μ M / 1 μ M
NF	Neurones	3'CCTCTGTACACACACCGACA5' 3'TAGCCTCAGGAGACTTCACG5'	60°C	34	50 μ M / 0,25 μ M
GFAP	Astrocytes	3'AGGCAGAAGCTCCAAGATGA5' 3'TTCTCTCCAAATCCACACGA5'	60°C	34	12,5 μ M / 1 μ M
CNPase	Oligodendrocytes	3'CATCCTCAGGAGCAAAGGAG5' 3'CTTGTAAGCATCAGCGGACA5'	60°C	34	25 μ M / 1 μ M
CYC	Tous	3'CTCCTTTGAGCTGTTTGCAG5' 5'CACCACATGCTTGCCATCC3'			

Tableau 7 : Séquences des amorces utilisées et leurs conditions d'utilisation pour la PCR semi-quantitative.

IV.3.1 PCR quantitative

Dispositif expérimental

Le matériel disponible est un LightCycler Roche. Il est composé d'un thermocycleur rapide (à air pulsé) associé à un système d'enregistrement de la fluorescence (microspectrofluorimètre), interfacé sur un ordinateur PC qui contrôle le fonctionnement de l'ensemble. Une lampe halogène produit, grâce à un filtre, une lumière monochromatique centrée à 485nm qui est transmise optiquement jusqu'aux capillaires. Le SYBR Green (Applied Biosystems), fluorophore présent dans le mélange réactionnel, est excité à cette longueur d'onde et émet une fluorescence verte à 520 nm. Le rayonnement émis est capté par un système de détection vidéo et les images des capillaires sont stockées dans la mémoire de l'ordinateur.

Le SYBR-Green est une molécule qui se fixe dans le petit sillon de l'hélice de l'ADN. Son rendement quantique de fluorescence (intensité du rayonnement émis) augmente significativement lorsqu'il est fixé à de l'ADN double-brin. Ainsi, grâce à cette molécule et au système d'enregistrement de la fluorescence qui a lieu à la fin de la phase d'élongation, la progression de l'amplification est suivie à chaque cycle et en temps réel. Un puits contrôle ne contenant pas d'ADN permet de visualiser la fluorescence propre du SYBR-Green non fixé et détermine le bruit de fond de ce composé lorsqu'il n'est pas lié à l'ADN. Il est important de noter que le SYBR-Green est très stable. Ainsi seulement 6% de son activité est perdue au bout de 30 cycles d'amplification.

☞ Quantification de l'ADN par la détection de fluorescence

A la fin de la PCR, le logiciel représente graphiquement l'augmentation de la fluorescence de chaque puits au cours des cycles successifs (Figure 15), le nombre de cycles étant placé en abscisse et le logarithme de l'intensité de la fluorescence en ordonnée. Les amplifications suivent une courbe sigmoïde en 3 phases :

- ✓ **Phase 1 (15 à 25 cycles):** la fluorescence du puits contenant de l'ADN ne se démarque pas du bruit de fond.
- ✓ **Phase 2 (5 cycles environ):** l'augmentation de la fluorescence passe par une phase exponentielle. Au cours de cette phase, la fluorescence est proportionnelle à la quantité d'ADN synthétisée et permet de quantifier la quantité d'ADNc initiale et donc celle du messenger d'intérêt.
- ✓ **Phase 3:** l'augmentation de la fluorescence ralentit et atteint un plateau.

Le cycle de PCR significatif est le cycle-seuil ou CT (*threshold cycle*) qui correspond au cycle au cours duquel la fluorescence d'un échantillon devient significativement différente du bruit de fond.

Pour nos expériences, nous avons choisi une quantification relative selon la méthode de Pfaffl (Pfaffl 2001). Des PCR effectuées en utilisant différentes dilutions d'ADNc permettent d'obtenir la pente (slope) de la courbe $CT = f(\log(\text{concentration}))$ donnée par l'appareil (Figure 15, A). La formule $E = 10(-1/\text{pente})$ permet de calculer l'efficacité E de la PCR pour chaque gène étudié. L'efficacité de la PCR doit être au minimum de 1,8 pour être considérées comme satisfaisante. La « semi-quantification » est effectuée en normalisant l'expression des ARNm d'intérêt par l'expression d'un ARNm dont l'expression ne varie pas selon les conditions (gène de ménage).

Courbe de fusion

Chaque produit d'ADN double brin synthétisé à une température de fusion (T_f) spécifique définie comme étant la température à laquelle 50% de l'ADN est sous forme double brin et 50% sous forme simple brin. Après le dernier cycle de PCR, la température est rapidement élevée à 95°C pour dénaturer l'ADN double brin, puis elle est abaissée jusqu'à la température d'hybridation des amorces, provoquant l'hybridation de la totalité des brins d'ADN. La température est ensuite élevée lentement à 95°C et une mesure continue de l'intensité de fluorescence est effectuée. Lorsque la température atteint la température de fusion, les doubles brins d'ADN se dissocient, ce qui se traduit par une courbe sigmoïde (Figure 15, B). Le logiciel calcule la dérivée première négative de la fluorescence en fonction de la température et permet de déterminer la température de fusion du brin d'ADN polymérisé, qui correspond à la température atteinte au maximum du pic. Le fait de n'avoir qu'un seul pic permet de s'assurer de la présence d'un seul produit d'amplification (Figure 15, C).

Gènes étudiés

Afin d'apprécier l'effet des CSM ou des CMO sur les tranches d'hippocampe en culture, nous avons choisi d'étudier 4 ARNm : Neurofilament et β III tubuline pour les effets sur les neurones, CNPase pour les effets sur les oligodendrocytes et GFAP pour les effets sur les astrocytes. Les séquences et conditions de PCR quantitatives sont détaillées dans le Tableau 8, ainsi que leurs efficacités de PCR

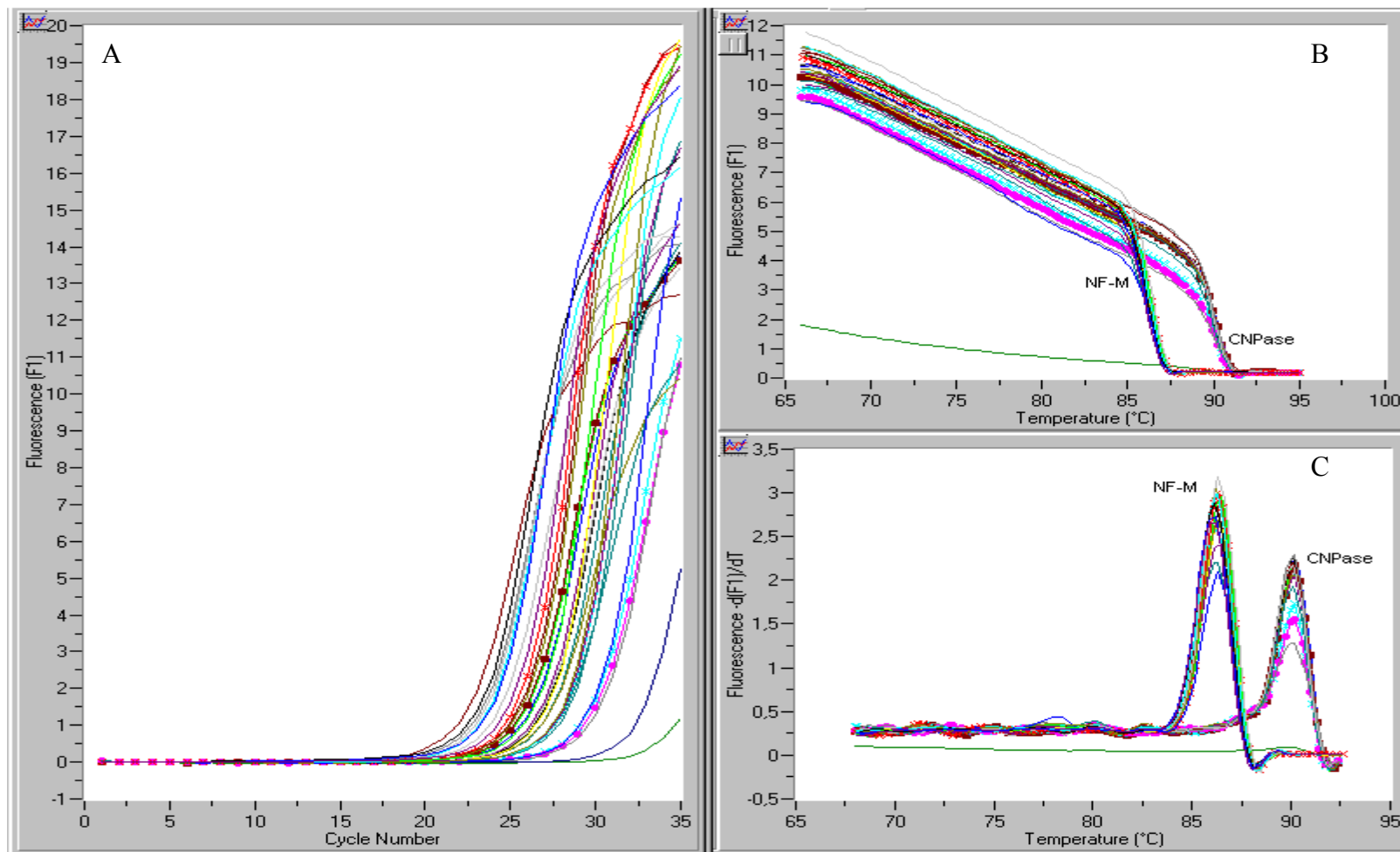


Figure 15 : Courbes d'analyses pour les qPCR de deux gènes d'intérêt, NF-M et CNPase.

A : fluorescence = f(nombre de cycles) ; B : fluorescence = f (températures) ; C = courbe de fusion.

Amorces pour qPCR	Type cellulaire	Séquences	Hybridation	Nombre de cycles	Efficacité de PCR
β III tubuline	Neurones	3' TGAGGCCTCCTCTCACAAGT 5' 3' CGCACGACATCTAGGACTGA 5'	64°C, 10s	< 40	1,8
NF	Neurones	3' CCTCTGTACACACACCGACA 5' 3' TAGCCTCAGGAGACTTCACG 5'	61°C, 8s	< 40	1,9
GFAP	Astrocytes	3'AGGCAGAAGCTCCAAGATGA 5' 3' TTCTCTCCAAATCCACACGA 5'	60°C, 8s	40	1,8
CNPase	Oligodendrocytes	3'CATCCTCAGGAGCAAAGGAG 5' 3' CTTGTAAGCATCAGCGGACA 5'	61°C, 8s	< 40	1,9
GAPDH	Tous	3' AACGACCCTTCATTGAC 5' 3' TCCACGACATACTCAGCAC 5'	57°C, 8s.	< 35	1,9

Tableau 8 : Séquences des amorces utilisées et leurs conditions d'utilisation en qPCR.

V. DEVENIR DES CMO/CMOA EN CULTURE

Au cours de nos expérimentations, nous avons remarqué des variations de comportement des cellules souches utilisées selon le nombre de passages en culture.

Afin de caractériser les cellules cultivées, nous avons mis en place une technique de « PCR array » (RT² Profiler™ PCR Array Mouse Mesenchymal Stem Cell) commercialisée par SABiosciences. Pour la lecture des plaques 96 puits, nous avons utilisé un système de PCR en temps réelle Applied Biosystem 7500. La technique de détection de la fluorescence est la même que décrite précédemment est reste basée sur l'utilisation de fluorophore comme le SYBRGreen. Afin de mettre en œuvre cette technique, il est également obligatoire d'utiliser les kits de RT (RT² First Strand Kit, SABiosciences) et de PCR (RT² SYBR Green/ROX PCR Master mix, SABiosciences) compatibles. Les amorces caractéristiques de la voie cellulaire permettant l'analyse des taux d'expression de 84 ARN messagers différents sont prédisposées dans les puits des plaques qui incluent également 5 gènes de ménage et 7 contrôles de PCR (voir Tableau 10). Pour nos expériences, le gène de ménage Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1 (Hprt1) a été choisi car son expression est constante pour toutes les conditions utilisées. Curtis *et al.* ont analysé différents la variabilité de différents gènes de ménage dans les cellules humaines MIAMI, dont Hprt1, GAPDH et ACTB. Pour ces trois gènes, la stabilité de l'expression génique de Hprt1 est supérieure à celle des deux autres gènes de ménage disponibles (Curtis *et al.* 2010). Précisons que l'optimisation des conditions de PCR a été réalisée préalablement par le fabricant et permet donc un gain de temps considérable. Bien entendu l'inconvénient de cette technique est son prix très élevé.

Le fabricant propose une classification fonctionnelle des gènes étudiés, qui sont censés être caractéristiques des lignées mésenchymateuses. Ces informations sont disponibles sur la page http://www.sabiosciences.com/rt_pcr_product/HTML/PAMM-082A.html.

Après des recherches bibliographiques et grâce aux bases de données PubMed « EntrezGene », BioGPS et ProtKB, nous nous sommes rendu compte que certains gènes ne pouvaient être répertoriés sans équivoque comme le fabricant le proposait. De plus les demandes concernant les références utilisées par SABiosciences sont restées, à ce jour, sans réponse. Aussi avons nous choisi de nous appuyer principalement sur trois articles afin d'établir une classification des gènes que nous avons étudiés : Delorme *et al.* 2008 et 2009, et Burhing *et al.* 2009 (Delorme *et al.* 2008; Buhning *et al.* 2009; Delorme *et al.* 2009).

Voie de signalisation	Gènes potentiellement impliqués
Ostéocyte	Bglap1, Bmp2, Bmp4, Bmp6, Bmp7, Colla1, Hdac1 (Lee <i>et al.</i> 2006), Hnfla (Gaur <i>et al.</i> 2005; Baksh <i>et al.</i> 2007), Igf1, Il6, Jag1, Kitl, Pparg, Ptk2, RhoA (McBeath <i>et al.</i> 2004), Runx2, Smurf1 (Zhao <i>et al.</i> 2003; Kaneki <i>et al.</i> 2006; Zhao <i>et al.</i> 2010), Smurf2 (Kaneki <i>et al.</i> 2006), Thy1, Vegfa.
Adipocyte	Igf1, Pparg, RhoA (Sordella <i>et al.</i> 2003).
Chondrocyte	Abcb1a (Kim <i>et al.</i> 2007), Bmp2, Bmp4, Bmp6, Bmp7, Sox9, Tgfb1 (Li <i>et al.</i> 2010b), Vegfa.
Endothéliale	Eng, Jag1, Kdr, Vegfa, Vwf
Vasculaire musculaire lisse	Pdgfrb, Mcam, Eng
Cellules souches (CSM, ES, CSN ou CSH)	Alcam, Anpep, Anxa5, CD44, CD45, Fgf2, Fzd9, Icam1, Jag1, Lif, Ngfr, Notch1, Pou5f1, Sox2, Tert, Thy1, Itgb1, Mcam, Nt5e, Pdgfrb, Prom1, Vcam, Wn3a (Katoh 2007; Kochegarov 2009), Zfp42

Tableau 9 : Classification fonctionnelle des gènes étudiés en PCR array

Pour les gènes étudiés n'apparaissant pas dans les articles de Delorme *et al.* 2008 et 2009 ou de Burhing *et al.* 2009, les références s'y rattachant sont indiquées entre parenthèses.

D'autres gènes ont été étudiés pour lesquels nous n'avons pas trouvé de lien ni avec les cellules souches mésenchymateuses, ni avec les cellules de leur lignée. Certains sont caractéristiques d'autres voies de signalisation (Casp3, impliquées dans l'apoptose). Aussi nous les classerons par la suite sous l'appellation « Autres gènes étudiés » : Casp3, Csf2, Csf3, Ctnnb1, Egf, Erbb2, Fgf10, Fut1, Fut4, Gdf15, Gtf3a, Hat1, Il10, Il1b, Itgax, Mitf, Mmp2, Nes, Pigs, Slc17a5, Smad4, Tbx5, Tgfb3, Vim.

Symboles	Position	UniGene	RefSeq	Symboles	Position	UniGene	RefSeq
Abcb1a	A01	Mm.207354	NM_011076	Mcam	E01	Mm.275003	NM_023061
Alcam	A02	Mm.288282	NM_009655	Mitf	E02	Mm.333284	NM_008601
Anpep	A03	Mm.4487	NM_008486	Mmp2	E03	Mm.29564	NM_008610
Anxa5	A04	Mm.1620	NM_009673	Nes	E04	Mm.331129	NM_016701
Bdnf	A05	Mm.1442	NM_007540	Ngfr	E05	Mm.283893	NM_033217
Bglap1	A06	Mm.389459	NM_007541	Notch1	E06	Mm.290610	NM_008714
Bmp2	A07	Mm.103205	NM_007553	Nt5e	E07	Mm.244235	NM_011851
Bmp4	A08	Mm.6813	NM_007554	Nudt6	E08	Mm.436967	NM_153561
Bmp6	A09	Mm.385759	NM_007556	Kat2b	E09	Mm.255025	NM_020005
Bmp7	A10	Mm.595	NM_007557	Pdgfrb	E10	Mm.4146	NM_008809
Casp3	A11	Mm.34405	NM_009810	Pigs	E11	Mm.295908	NM_201406
CD44	A12	Mm.423621	NM_009851	Pou5f1	E12	Mm.17031	NM_013633
Col1a1	B01	Mm.277735	NM_007742	Pparg	F01	Mm.3020	NM_011146
Csf2	B02	Mm.4922	NM_009969	Prom1	F02	Mm.6250	NM_008935
Csf3	B03	Mm.1238	NM_009971	Ptk2	F03	Mm.254494	NM_007982
Ctnnb1	B04	Mm.291928	NM_007614	Ptprc	F04	Mm.391573	NM_011210
Egf	B05	Mm.252481	NM_010113	Rhoa	F05	Mm.757	NM_016802
Eng	B06	Mm.225297	NM_007932	Runx2	F06	Mm.391013	NM_009820
Erbp2	B07	Mm.290822	NM_001003817	Slc17a5	F07	Mm.46932	NM_172773
Fgf10	B08	Mm.317323	NM_008002	Smad4	F08	Mm.100399	NM_008540
Fgf2	B09	Mm.473689	NM_008006	Smurf1	F09	Mm.27735	NM_029438
Fut1	B10	Mm.56933	NM_008051	Smurf2	F10	Mm.340955	NM_025481
Fut4	B11	Mm.63450	NM_010242	Sox2	F11	Mm.65396	NM_011443
Fzd9	B12	Mm.6256	XM_284144	Sox9	F12	Mm.286407	NM_011448
Gdf15	C01	Mm.31325	NM_011819	Tbx5	G01	Mm.103636	NM_011537
Gdf5	C02	Mm.4744	NM_008109	Tert	G02	Mm.10109	NM_009354
Gdf6	C03	Mm.302555	NM_013526	Tgfβ1	G03	Mm.248380	NM_011577
Gdf7	C04	Mm.271308	NM_013527	Tgfβ3	G04	Mm.3992	NM_009368
Gtf3a	C05	Mm.358698	NM_025652	Thy1	G05	Mm.3951	NM_009382

Symboles	Position	UniGene	RefSeq	Symboles	Position	UniGene	RefSeq
Hat1	C06	Mm.272472	NM_026115	Tnf	G06	Mm.1293	NM_013693
Hdac1	C07	Mm.202504	NM_008228	Vcam1	G07	Mm.76649	NM_011693
Hgf	C08	Mm.267078	NM_010427	Vegfa	G08	Mm.282184	NM_009505
Hnf1a	C09	Mm.332607	NM_009327	Vim	G09	Mm.268000	NM_011701
Icam1	C10	Mm.435508	NM_010493	Vwf	G10	Mm.22339	NM_011708
Ifng	C11	Mm.240327	NM_008337	Wnt3a	G11	Mm.1367	NM_009522
Igf1	C12	Mm.268521	NM_010512	Zfp42	G12	Mm.285848	NM_009556
Il10	D01	Mm.874	NM_010548	Gusb	H01	Mm.3317	NM_010368
Il1b	D02	Mm.222830	NM_008361	Hprt1	H02	Mm.299381	NM_013556
Il6	D03	Mm.1019	NM_031168	Hsp90ab1	H03	Mm.2180	NM_008302
Ins2	D04	Mm.4946	NM_008387	Gapdh	H04	Mm.343110	NM_008084
Itga6	D05	Mm.225096	NM_008397	Actb	H05	Mm.328431	NM_007393
Itgav	D06	Mm.227	NM_008402	MGDC	H06	N/A	SA_00106
Itgax	D07	Mm.22378	NM_021334	RTC	H07	N/A	SA_00104
Itgb1	D08	Mm.263396	NM_010578	RTC	H08	N/A	SA_00104
Jag1	D09	Mm.22398	NM_013822	RTC	H09	N/A	SA_00104
Kdr	D10	Mm.285	NM_010612	PPC	H10	N/A	SA_00103
Kitl	D11	Mm.45124	NM_013598	PPC	H11	N/A	SA_00103
Lif	D12	Mm.4964	NM_008501	PPC	H12	N/A	SA_00103

Tableau 10 : Gènes étudiés : symboles, position, UniGene et RefSeq.

Tampons et solutions

TECHNIQUES HISTOLOGIQUES

Hydrate de chloral 7%

Hydrate de chloral	7 g
Eau distillée	qsp 100 mL
Injecter par voie intrapéritonéale, une dose létale de 100 μ L pour 20 g de masse corporelle	

Tampon phosphate 0,2M pH 7,2

Na ₂ HPO ₄ , 12 H ₂ O	71, 62 g
KH ₂ PO ₄	27, 2 g
Eau distillée	qsp 1 L

Paraformaldéhyde 1% ou 4%

Paraformaldéhyde	10 g ou 40 g
Eau distillée	500 mL
Dissoudre la poudre dans l'eau distillée en chauffant à 60°C. Ajouter quelques gouttes de NaOH 5N jusqu'à éclaircissement de la solution.	
Tampon phosphate 0,2 M pH 7,2	500 mL

Tampon cryoprotecteur 15%

Tampon phosphate 0,2M pH 7,2	500 mL
Saccharose	150 g
Azoture de sodium	0,1 g
Eau distillée	500 mL

PBS simple, pH 7,2-7,4

Na ₂ HPO ₄ , 2H ₂ O	1, 42 g
KH ₂ PO ₄	0, 27 g
NaCl	8, 76 g
Eau distillée	qsp 1L
Ajuster le pH à 7,2-7,4.	

PBS-Triton X-100

Triton X-100	3 mL
PBS simple	qsp 1L

Diluant lait

Albumine sérique bovine	10 g
Lactoprotéines (Régilait)	100 g
Azoture de sodium	0,1 g
PBS-Triton X-100	qsp 1 L

Bleu de toluidine

Bleu de toluidine	0,25 g
Tétraborate de sodium	0,5 g
Eau distillée	qsp 100 mL

BIOLOGIE MOLECULAIRE**Tampon TAE 5X**

Trizma base	24,2 g
Acide acétique glacial	5,71 mL
EDTA (éthylène diamine tétra-acétique)	1,86 g
Eau distillée	qsp 1 L

Agarose 1,5% TAE 1X

Agarose	1,5 g
Tampon TAE 1X	qsp 100 mL

Chauffer pour dissoudre l'agarose.

Ajouter du bromure d'éthidium (BET) 1 mg / mL (60 µL pour un gel de 100 mL).

Laisser polymériser sous hotte.

Tampon de charge pour ADN

Bleu de bromophénol	0,0025 g
Saccharose	4 g
Eau stérile	qsp 100 mL

CULTURES CELLULAIRES**Milieu de culture pour CMOA**

Sérum de veau fœtal	50 mL
Glutamine	5 mL
DMEM	qsp 500 mL

Ajouter une solution d'antibiotiques : pénicilline 100 U/mL, streptomycine 100 mg/mL.

Milieu de différenciation adipogénique

Sérum de veau fœtal	1 mL
Insuline 1 mg/mL	50 µL
Dexaméthasone 0,005 M	100 µL
Indométhacine 20 mM	100 µL
Hydrocortisone 50 µM	200 µL
DMEM	qsp 10 mL

Ajouter une solution d'antibiotiques : pénicilline 100 U/mL, streptomycine 100 mg/mL.

Milieu de différenciation ostéogénique

Sérum de veau fœtal	1 mL
β -glycérol-phosphate (100 mM)	1 mL
Acide ascorbique (20 mg/mL)	25 μ L
Dexaméthasone	2 μ L
DMEM	qsp 10 mL

Ajouter une solution d'antibiotiques : pénicilline 100 U/mL, streptomycine 100 mg/mL.

Milieu de culture pour tranches

Sérum de cheval	25 mL
Milieu de Hanks (HBSS)	25 mL
Milieu de Eagle (BME)	50 mL
Glutamine 200 mM	2,5 mL
Glucose	6,5 g

Ajouter une solution d'antibiotiques : pénicilline 25 μ g/ μ L, streptomycine 25 μ g/mL, néomycine 50 μ g/mL.

Milieu pour détacher les tranches

Glucose	3,25 g
HBSS	qsp 50 mL

Ajouter une solution d'antibiotiques : pénicilline 25 μ g/ μ L, streptomycine 25 μ g/mL, néomycine 50 μ g/mL.

Coloration des vésicules lipidiques

Solution stock :

Oil red O	0,5 g
Isopropanol	qsp 100 mL

Préparer la solution de travail extemporanément :

Solution stock	2 mL
Isopropanol	3 mL

Filtrer avant utilisation.

Coloration des dépôts calciques

Alizarin red S	2 g
Eau distillée	qsp 100 mL

A préparer extemporanément.
Ajuster à pH 4,1 avec de l'hydroxyde d'ammonium (NH₄OH).
Filtrer la solution.

RESULTATS

1ère partie : Greffe de moelle osseuse *in vivo*

I. ANALYSES DE LA GREFFE DE CMO *IN VIVO*

I.1 Effet de l'irradiation

En tout premier lieu, il s'agissait d'avoir un aperçu des dommages structuraux causés par l'irradiation : les coupes de cerveaux des groupes 0 (ni irradiation, ni greffe) et 1 (irradiation sans greffe) ont donc été analysées par coloration au bleu de toluidine. Les coupes du groupe 0 ne présentent pas de différences avec celles du groupe 1. Aucune différence structurale ni aucune zone de gliose, d'inflammation, ou perte de neurones n'a été relevée (Figure 16, A et B). L'irradiation corporelle des souris receveuses n'altère donc pas l'encéphale de façon apparente en microscopie photonique dans les conditions de doses et de délais de nos expériences.

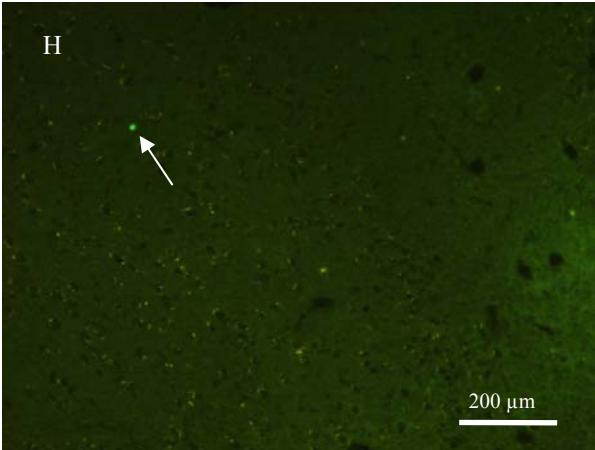
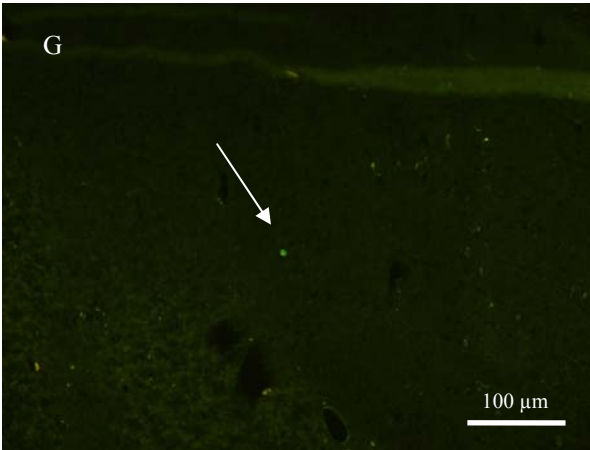
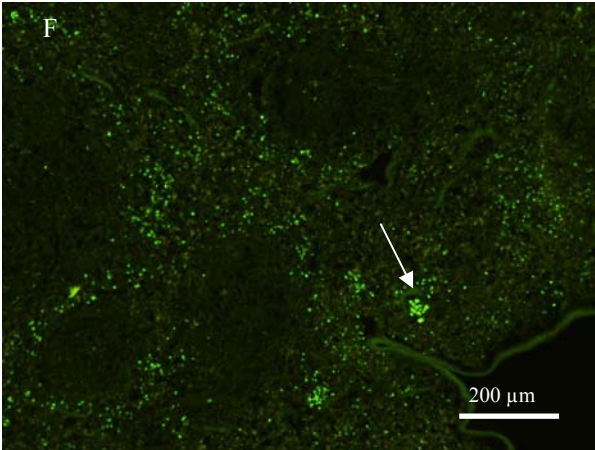
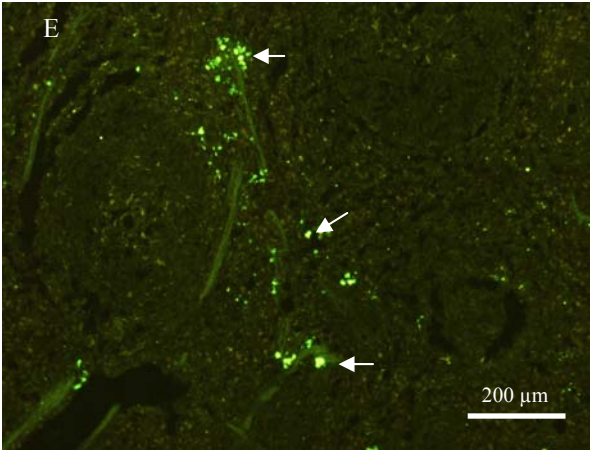
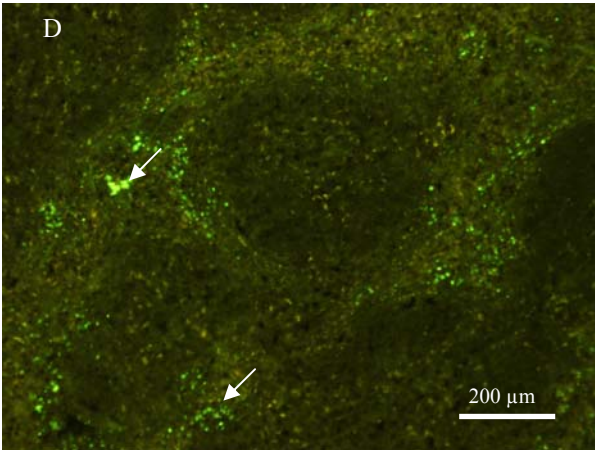
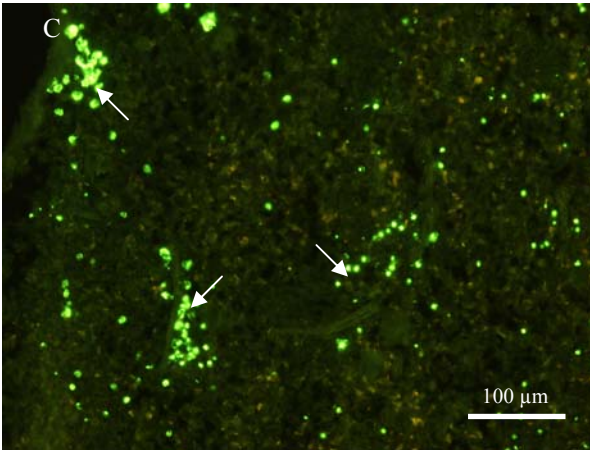
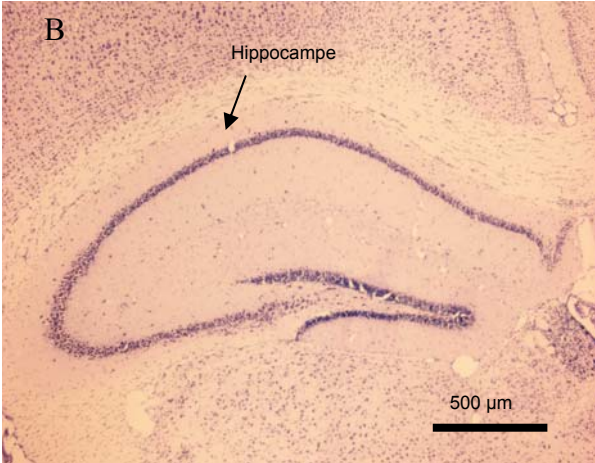
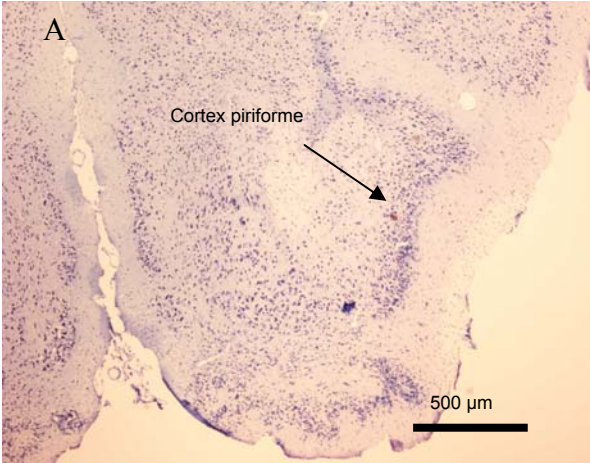
I.2 Tentative de repérage des CMO par le chimérisme du CMH

Pour étudier le nombre et la distribution des cellules médullaires greffées, nous avons procédé à une immunohistochimie avec l'anticorps anti H2q, spécifique du CMH des souris FvB (souris donneuses), sur des coupes de rates et de cerveau des groupes 0, 1, 2 et 3. Un marquage de la membrane plasmique est observé sur certaines cellules de la rate et du cerveau des femelles Balb/c de tous les groupes testés, y compris les groupes témoins (Figure 16). L'anticorps employé n'est donc pas spécifique du seul antigène H2q dans nos conditions techniques.

Figure 16 : Cerveaux et rates de souris Balb/c irradiées et greffées par des CMO de mâles FvB.

A et B : Aspect de la coloration au bleu de toluidine sur des coupes de cerveau de souris irradiées et greffées (groupe 1).

C à F : Marquage obtenu avec l'anticorps anti H2q chez les différents groupes de souris Balb/c greffées par des CMO de mâles FvB. Toutes les coupes présentent un marquage, y compris les groupes témoins et ceux témoins fixés à la PFA 1%. Peu de cellules sont observées dans l'encéphale en comparaison avec le nombre de cellules marquées observées sur les coupes de rates. C : Marquage intense dans la rate de souris témoin ni irradiée, ni greffée fixée au PFA 1%. D et E : témoin, irradiations seules. F : souris irradiée, greffée par des CMO et ayant reçu une co-injection de cellules apoptotiques. G et H : Marquage obtenu sur des coupes de cerveaux avec l'anticorps anti-H2q chez différents groupes de souris greffées par des CMO issues de mâles FvB. G : souris irradiée, greffée par des CMO. Les zones de marquages sont indiquées par les flèches. H : souris irradiée, greffée par des CMO et ayant reçu une co-injection de cellules apoptotiques.



I.3 Repérage des CMO : chimérisme chromosomique

La technique immunohistochimique ayant échoué, nous avons envisagé d'exploiter le chimérisme mâle/femelle occasionné par nos greffe. Nous avons choisi de développer la technique d'hybridation *in situ*, afin de reconnaître des gènes spécifiques du chromosome Y à l'aide d'une sonde synthétisée au laboratoire, *Ssty1* spécifique du chromosome Y de la souris (Bishop *et al.* 1987) et *SRY* humain (sonde commerciale).

Après extraction d'ADN à partir de sang de souris mâle de type FvB, les deux PCR sont réalisées avec respectivement des étapes d'hybridation à 60°C ou 65°C, afin de déterminer la température optimale d'hybridation. A l'issue des contrôles effectués par électrophorèse, nous constatons que le fragment d'ADN amplifié correspond au fragment attendu. Sur la figure 2, on observe deux bandes correspondant à un segment de 1511 pb à l'issue des PCR avec étape d'hybridation à 60°C et à 65°C. Seul ce segment a été amplifié, ce qui prouve que les amorces choisies sont spécifiques du fragment d'ADN choisi. De plus il apparaît que l'hybridation à 65°C présente le meilleur rendement : la bande correspondante est plus épaisse et il reste moins de matrice à la fin de la réaction. Le séquençage a confirmé que la séquence amplifiée correspond à celle du gène *Ssty1*. La sonde a été marquée par la fluorescéine 12-dUTP et la technique d'hybridation réalisée. A l'issue de celle-ci, deux types de marquage sont obtenus. Le premier est nucléaire, le deuxième est cytoplasmique selon les cellules observées, indépendamment de la région cérébrale. Aucun marquage n'est constaté sur les coupes témoins. Néanmoins, la sonde étant une sonde ADN et le gène *Ssty1* n'étant transcrit que dans les testicules, nous nous attendions à un marquage nucléaire. Qui plus est, quelle que soit la localisation du marquage, il consiste en deux spots fluorescents au lieu d'un seul attendu. Les résultats de la FISH avec la sonde commerciale n'ont pas abouti non plus, la différence entre espèces étant vraisemblablement trop importante malgré un fort pourcentage d'homologies. Ces résultats non concluants, nous ont incité à mettre en place un deuxième modèle de greffe

faisant appel à des CMO issues de souris mâles exprimant la GFP de façon ubiquitaire et les souris receveuses sont des femelles Balb/c.

Une dernière stratégie a été utilisée afin d'exploiter au mieux le matériel disponible et pour détecter la prise de la greffe et la présence - ou non - de CMO dans l'encéphale des souris.

L'ADN des cerveaux de souris Balb/c greffées par les CMO de mâles FvB a été extrait après optimisation de cette méthode sur tissus fixés. Une PCR "standard" et une électrophorèse sur gel d'agarose 1,2 % ont été réalisées, ce qui nous a permis de détecter une bande à 1500 pb pour le puits correspondant au cerveau greffé mais aucune bande dans le puits témoin (Figure 17), confirmant la spécificité de l'amorce choisie (*Ssty1*), et surtout la capacité de survie des CMO greffées jusqu'à 6 mois postgreffe et leur implantation dans l'encéphale des rongeurs après une injection systémique.

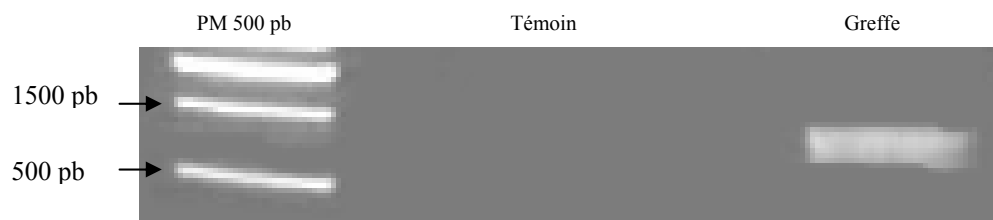


Figure 17 : Electrophorèse sur gel d'agarose 1,2% après amplification par PCR de *Ssty1*.

Aucune bande n'apparaît dans le puits témoin, qui correspond à un extrait d'ADN provenant d'un cerveau de souris irradiée mais non greffée. Une bande à 1500 pb est présente pour l'amplification par PCR d'un extrait d'ADN obtenu à partir d'un cerveau de souris irradiée et greffée par des CMO de mâle FvB (groupe 1) avec des amorces spécifiques pour le gène *Ssty1*.

II. ANALYSES DE LA GREFFE DE CMO : UTILISATION DE SOURIS MALES GFP

Après analyse des données de la littérature, nous avons choisi l'utilisation de CMO issues de souris exprimant la GFP de façon constitutive car cette protéine ne se dilue pas au cours des divisions cellulaires (contrairement à un marqueur comme le BrdU), ce qui est important dans le cas d'une prolifération cellulaire, n'influence pas le comportement cellulaire et autorise le repérage direct au microscope à fluorescence.

II.1 Localisation des CMO GFP+ greffées

Des cellules de GFP+ apparaissent dans les frottis sanguins et les coupes de MO des souris Balb/c femelles greffées 15 jours auparavant (Figure 18 A et B).

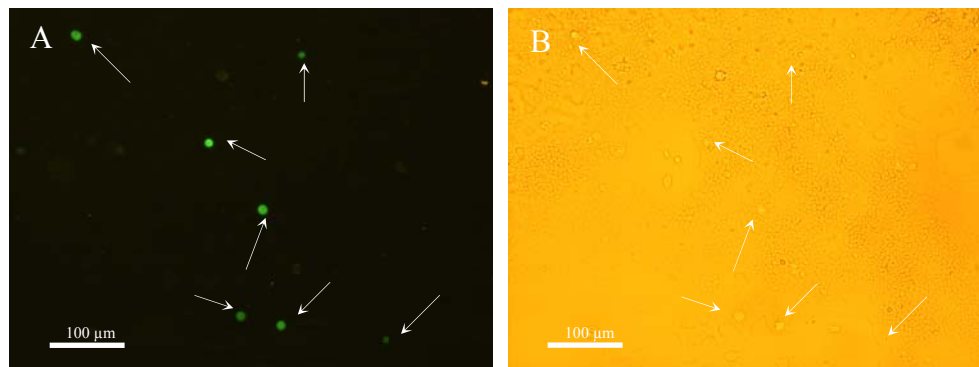


Figure 18 : Frottis sanguins de souris greffées par des CMO exprimant la GFP.

A : Observation au microscope à fluorescence.

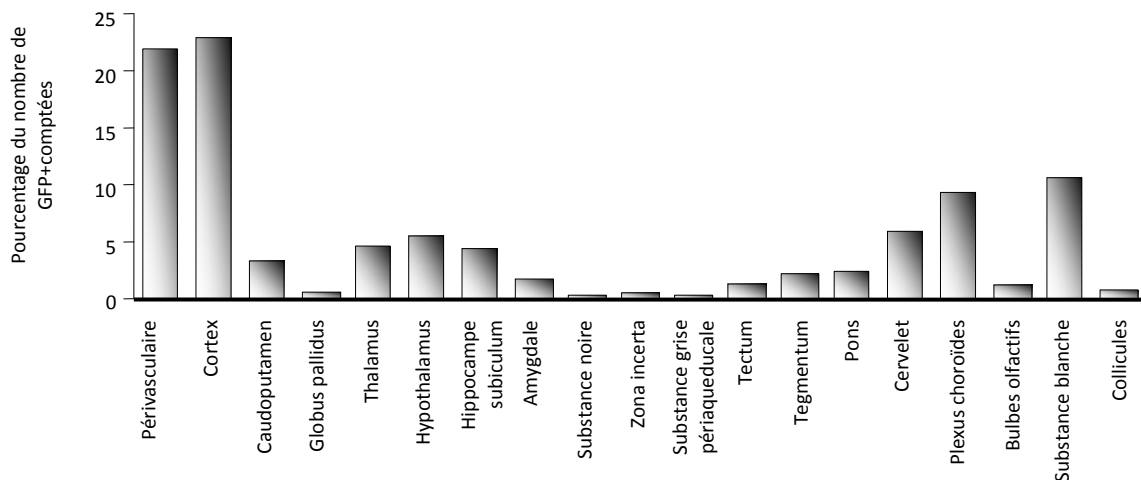
B : Même frottis observé en fond clair.

De même, ces cellules GFP sont présentes dans l'encéphale des souris greffées, en nombre variable selon l'animal. Pour le premier animal, la moyenne de cellules GFP+ dans l'encéphale est de 119 cellules par coupe contre 72,5 pour le second (25 coupes observées pour les deux animaux), 15 jours après la greffe.

Le comptage des cellules GFP+ a été effectué dans diverses régions cérébrales afin de rechercher l'existence éventuelle de sites de migration préférentiels. Les résultats sont exprimés en pourcentage du total des cellules GFP+. Les cellules greffées sont majoritairement périvasculaires (29,2%) et corticales (23,4%). On en trouve peu dans les noyaux profonds comme l'amygdale, la substance noire, la zona incerta, le globus pallidus, la substance grise périaqueducale, les bulbes olfactifs et les collicules (respectivement 0,8%, 0,23%, 0,17%, 0,23%, 0,47% et 0,77%). Néanmoins, de nombreuses cellules greffées migrent dans les plexus choroïdes, le cervelet et les faisceaux de substance blanche (13,6%, 12,8% et 14,4%). Le reste des cellules issues de la greffe de MO est réparti dans les autres régions cérébrales (Figure 19). Les cellules GFP+ ont donc colonisé l'ensemble de l'encéphale.

Figure 19 : Distribution des cellules GFP+ dans diverses régions cérébrales.

Résultats en pourcentage du total de GFP+ comptées dans l'encéphale, calculé sur CG2. Compte tenu des différences de volumes des régions considérées, il ne semble pas y avoir de site de migration privilégié, hormis les zones périvasculaires.



II.1.1 Différenciation des cellules GFP+

Afin de caractériser le phénotype des cellules greffées, différents marquages immunohistochimiques ont été réalisés et confrontés à la fluorescence GFP spontanée des cellules greffées. Nous avons ainsi mis en évidence des cellules doublement marquées : elles expriment à la fois NeuN et GFP, suggérant une différenciation neuronale des cellules greffées. Ainsi, pour le premier animal, 3% de cellules sont simultanément GFP+ et NeuN+, tandis que pour le second 0,8% des cellules GFP+ sont également NeuN+ (A, B, C). Nous n'avons pas noté de localisation préférentielle des cellules médullaires greffées NeuN+.

L'immunomarquage avec l'anticorps anti-CNPase sur des coupes de cerveaux de souris greffées avec des CMO issues de souris GFP+ a également permis de retrouver des cellules doublement marquées en faible proportion par rapport au total de cellules GFP+ retrouvées dans l'encéphale : 0,6% pour le premier animal et 1,28% pour le second (D, E, F). Les résultats sont résumés dans le Tableau 11.

De même certaines cellules issues de la greffe sont doublement marquées et expriment à la fois la protéine GFP et la protéine GFAP. La proportion de cellules doublement marquées GFP+ GFAP+ est très faible : 0,3% pour le premier animal et 0,2% pour le second (G, H, I).

Enfin, certaines CMO greffées expriment à la fois GFP+ et CD31 dans une proportion de 10% pour le premier animal (J, K, L) (Figure 20).

	NeuN	CNPase	GFAP	CD31
Premier animal	3 %	0.6 %	0.3 %	10 %
Deuxième animal	0.8 %	1.28 %	0.2 %	Non recherché

Tableau 11 : Proportions de cellules doublement marquées sur le total de cellules GFP par cerveau selon les animaux.

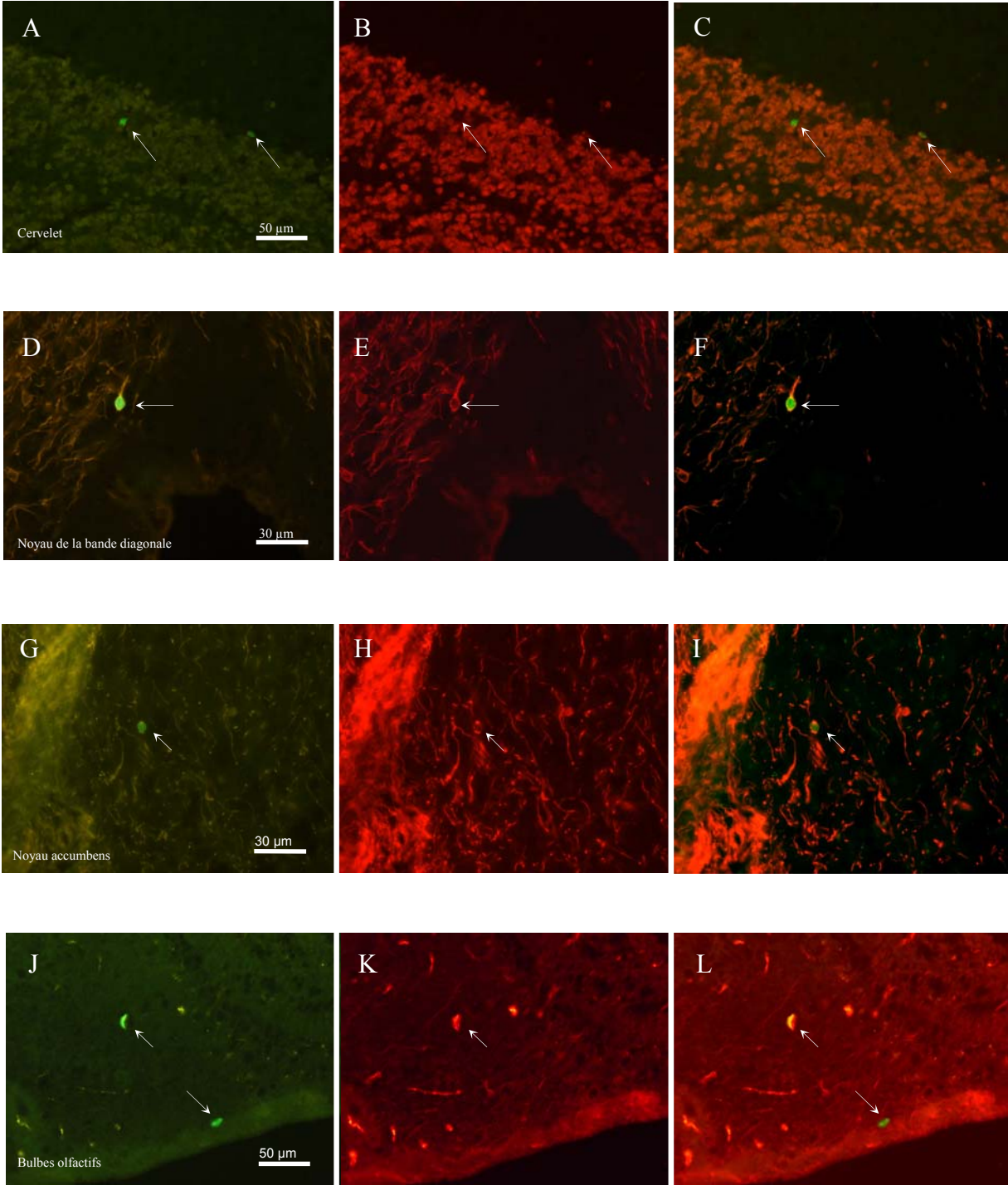
Figure 20 : Coupes de cerveau de souris greffée avec des CMO issues de souris exprimant la GFP marquées par immunohistochimie.

A, B, C : Coupes de cerveau marquées par NeuN et GFP au niveau du cervelet. Deux cellules GFP + sont visibles (flèches), dont une est également NeuN+ (flèche de droite).
A : marquage GFP, B : marquage NeuN, C : double marquage GFP, NeuN.

D, E, F : Coupes de cerveau marquées par CNPase et GFP au niveau du thalamus. Un double marquage est observé. D : marquage GFP, E : marquage CNPase, F : double marquage GFP, CNPase.

G, H, I : Coupes de cerveau marquées par GFAP et GFP au niveau du noyau Accumbens.
G : marquage GFP, H : marquage GFAP, I : double marquage GFP, GFAP.

J, K, L : Coupes de cerveaux marquées par CD31 et GFP au niveau des bulbes olfactifs. Deux cellules GFP+ sont visibles (flèches) dont une également CD31+. J : marquage GFP, K : marquage CD31, L : double marquage GFP, CD31.



2ème partie : Modèles d'étude *in vitro*

I. CULTURES ORGANOTYPIQUES D'HIPPOCAMPE DE SOURIS

Pour étudier l'effet des cellules de moelle osseuse et des cellules souches mésenchymateuses dans un tissu respectant en partie l'infrastructure du tissu nerveux, nous avons choisi l'utilisation du modèle de culture organotypique de cerveau de souris par la méthode statique de culture de tranches sur filtres (Stoppini *et al.* 1991) avec un dépôt de cellules à la surface des tranches supposé mimer les greffes de cellules.

La méthode statique de culture de tranches sur filtres a été préalablement mise au point au laboratoire d'Histologie pour la culture de tranches d'hypothalamus (Bayer *et al.* 1999) mais, pour cette étude, il a été nécessaire de l'adapter à la culture de tranches d'hippocampe.

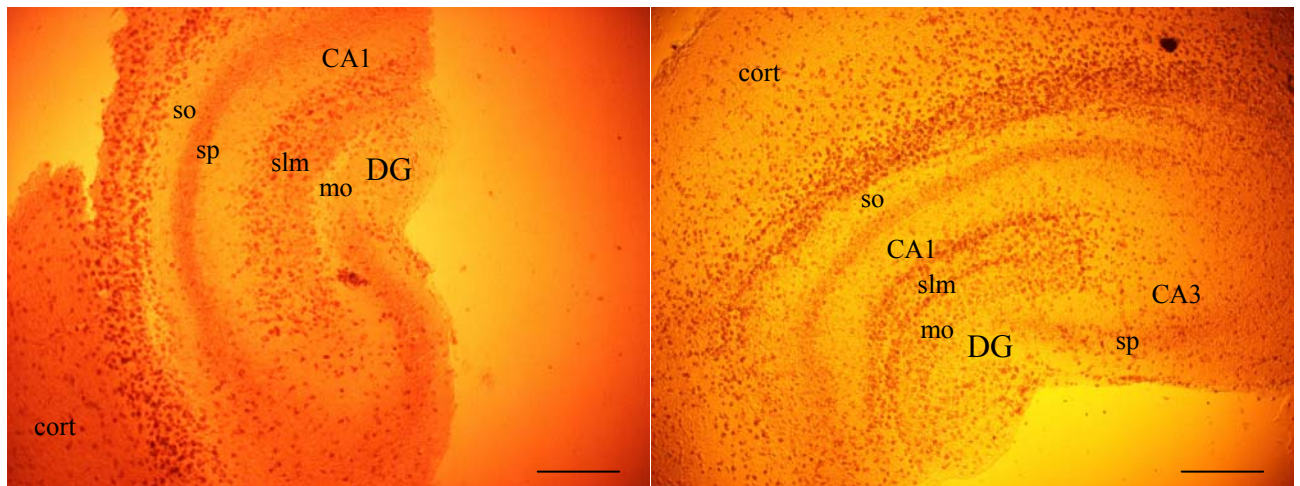
La mise en culture des tranches d'hippocampe s'effectue de la même façon que la culture de tranches d'hypothalamus si ce n'est qu'il faut limiter au maximum l'apport de liquide lors de la mise en place de la tranche sur le filtre. Si cette précaution est négligée, induit une prolifération massive de cellules gliales recouvrant la tranche entière (Figure 21) et pouvant dégrader le tissu nerveux et ainsi perturber les études ultérieures.

Figure 21 : Prolifération de cellules gliales sur deux tranches d'hippocampe avec cortex.

Les tranches n'ont pas été mises en culture de façon à limiter l'apport de liquide à leur surface, conduisant à une prolifération de cellules gliales, plus particulièrement au niveau de la couche moléculaire du gyrus denté, du stratum lacunosum moleculare et du corps calleux.

Barre d'échelle : 500 μ m

DG : gyrus denté - CA1 et CA3 : cornes d'Ammon 1 et 3 - mo : couche moléculaire - sp : couche de cellules pyramidales - so : stratum oriens - slm : stratum lacunosum, moléculaire.



II. COMPORTEMENT DES CELLULES GREFFÉES : SURVIE, PROLIFÉRATION, MIGRATION.

II.1 Utilisation de la fraction totale de moelle osseuse : CMO

Dans un premier temps, nous avons décidé d'utiliser la fraction totale de la moelle osseuse, comme cela avait été réalisé dans les expériences préliminaires décrites en première partie.

Les tranches ayant reçu un apport de cellules exprimant de façon ubiquitaire la GFP ont pu être suivies durant plusieurs jours grâce à une loupe à fluorescence.

10 000 CMO diluées dans 2 μ L de milieu ont été déposées sur chaque tranches d'hippocampe en culture. La reproductibilité de l'expérience a été évaluée, de même que les taux de survie et/ou de prolifération, par comptage des cellules GFP positives 3, 7 et 10 jours après dépôt des CMO. Des photos des mêmes tranches ont été prises, les contours du tissu ont été dessinés et la distribution des CMO a été indiqué sur l'image.

Les observations effectuées à la loupe illustrent la survie de cellules sur et autour de la tranche, plus ou moins près de cette dernière. Trois jours après le début de la co-culture, $43,9 \pm 7,1$ (erreur standard à la moyenne ou SEM) cellules GFP ont été comptées sur chaque tranche, alors que 10 000 cellules avaient été déposées. Cette moyenne augmente considérablement dans les jours suivants pour passer de $70,9 \pm 7,9$ au 7^{ème} jour à $115,1 \pm 12,5$ au 10^{ème} jour.

Concernant les cellules sur la membrane, à la périphérie des tranches, la tendance constatée est une agrégation progressive sur le pourtour de la tranche puis une pénétration du tissu nerveux. Ces CMO périphériques ont également été dénombrées. Contrairement à leurs homologues sur les tranches, leur nombre à 3 jours est élevé ($118,8 \pm 12,24$), et diminue au cours du temps pour atteindre $94,53 \pm 14$ au 7^{ème} jour et $81,13 \pm 17,3$ au 10^{ème} jour.

En ce qui concerne le nombre total de cellules (tranche + membrane), aucune évolution n'est constatée ($171,7 \pm 18,96$; $170,7 \pm 20,6$ au 3^{ème} et au 7^{ème} jour après dépôt). Dix jours après dépôt une légère augmentation est observée ($193,5 \pm 27,42$) mais elle n'est pas statistiquement significative (Figure 22).

Ces observations semblent corroborer l'hypothèse d'une migration des cellules greffées de la membrane vers la tranche. Les images prises après 3, 7 et 10 jours permettent de suivre des groupes de cellules et illustrent les phénomènes observés au cours du temps. L'augmentation du nombre de CMO par tranche pourrait être due à une prolifération active des CMO, comme illustré par la Figure 23.

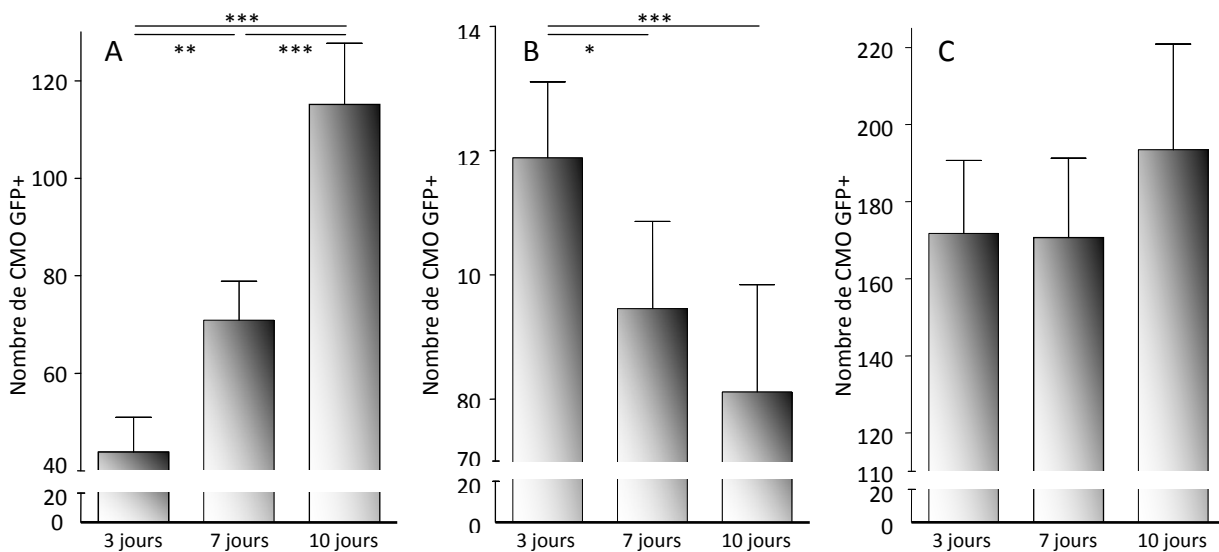


Figure 22 : Répartition des cellules GFP positives issues de la fraction totale de moelle osseuse sur cultures organotypiques.

Le nombre de CMO par tranche (A) augmente de 3 fois entre le 3^{ème} et le 10^{ème} jour après dépôt, tandis qu'il décroît sur la membrane (B). Le nombre total de cellules (tranche + membrane) reste sensiblement constant (C). n = 24 ; Les moyennes sont données avec l'erreur standard à la moyenne (SEM). Test statistique : ANOVA à un facteur ; post test : test des comparaisons multiples de Tukey. * p < 0,05 ; ** p < 0,01 ; *** p < 0,001.

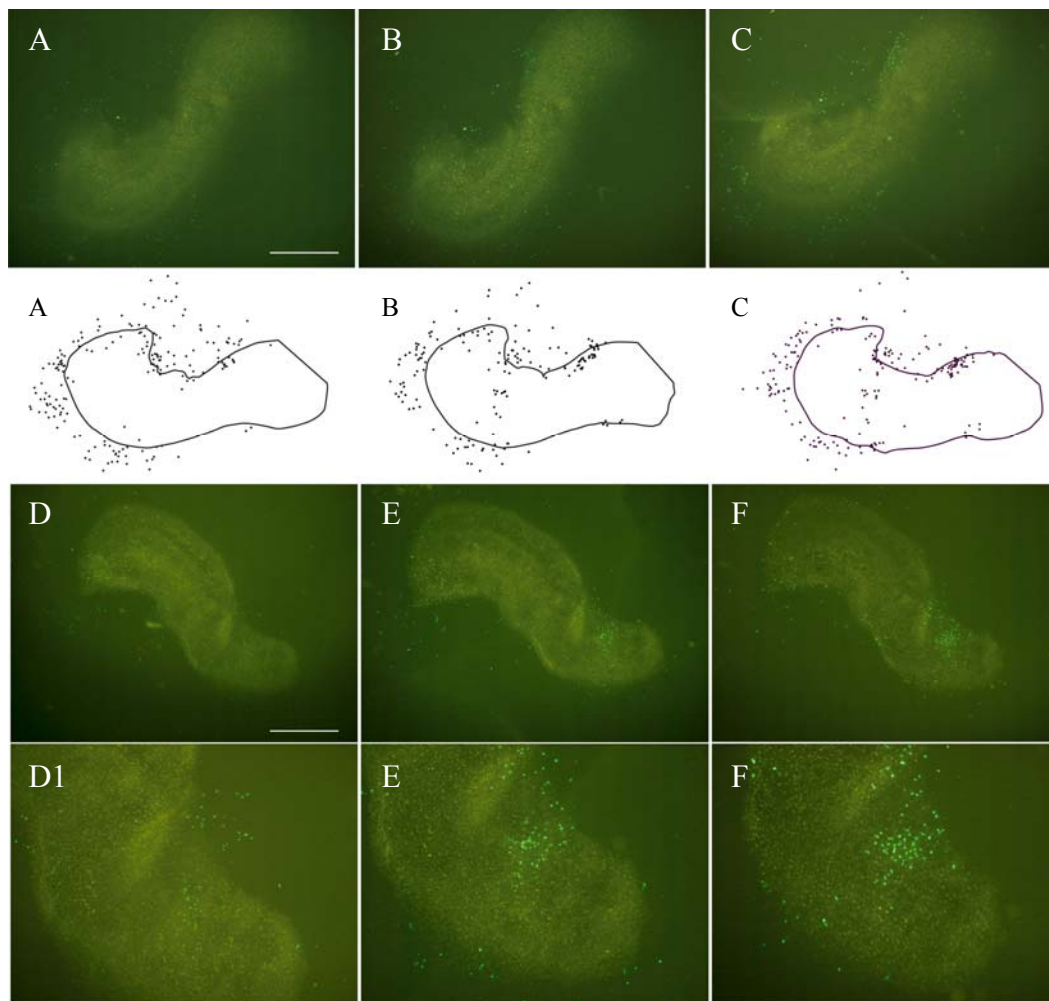


Figure 23 : Suivi de deux tranches d'hippocampe ayant reçu un dépôt de CMO exprimant la GFP.

A-C : Photographies représentant la même tranche d'hippocampe 3, 7 et 10 jours après dépôt. A1-C1 : Cartographies des cellules GFP positives correspondantes aux images précédentes illustrant la probable migration des cellules GFP positives du contour de la tranche à la tranche elle-même. D-F : Photographies représentant une même tranche d'hippocampe 3, 7 et 10 jours après dépôt. D1-F1 : Agrandissements d'une zone de la tranche précédente (A-C) correspondants chacun à 3, 7 et 10 jours après dépôt. Sur ces images le nombre d'augmentation des cellules GFP positives provient probablement d'une prolifération massive.

Barre d'échelle: 1 mm

II.2 Utilisation de cellules sélectionnées : CMOAP5

Les cellules souches mésenchymateuses peuvent être isolées grâce à leur propriété d'adhérence au plastique. Ainsi après quelques passages, le pourcentage de cellules contaminantes (fibroblastes, précurseurs, cellules matures) devient minoritaire. Pour cette raison nous avons commencé par utiliser des cellules au cinquième passage : CMOAP5.

Ces cellules ont été cultivées dans des milieux de différenciation, afin de vérifier leur capacité de multipotence. Après quelques jours de contact elles acquièrent une morphologie différente. Avec le milieu de culture induisant l'adipogénèse, des vésicules cytoplasmiques apparaissent et les cellules deviennent réactives à l'Oil Red O qui colore les vésicules lipidiques. Dans un milieu de culture conduisant à la différenciation des CMOA en ostéocytes, les cellules deviennent réactives à l'Alizarine Red S qui marque les dépôts calciques. Les cellules contrôles (qui n'ont subi aucun protocole de différenciation mais sont restées dans leur milieu de base) ne réagissent à aucune de ces deux colorations et leur aspect ne varie pas : elles conservent leur forme allongée, ressemblant à des fibroblastes.

Les mêmes expérimentations que celles décrites pour la fraction totale de MO ont été réalisées. Après trois jours de culture nous avons compté 2 fois plus de cellules sur les tranches que lors de l'expérimentation impliquant les CMO ($81,25 \pm 8,1$ versus $43,9 \pm 7,1$). Comme avec les CMO, la proportion de cellules sur la tranche est très faible par rapport au nombre de cellules déposées (moins de 1%). Leur variation dans les jours suivants est statistiquement significative, à la différence que nous observons une diminution des cellules GFP sur la tranche et non plus une augmentation : 7 jours après dépôt nous avons compté $62,6 \pm 6,3$ CMOAP5 sur les tranches et $42,8 \pm 4$ à 10 jours post dépôt, soit une diminution de 50% entre le début et la fin de l'expérience. Une diminution similaire a été observée sur les membranes (87.63 ± 8.3 ; 72 ± 7.48 ; 31.31 ± 2.8). Le nombre de cellules totales diminue donc fortement au cours du temps (168.9 ± 13.35 ; 134.5 ± 11.28 ; 74.19 ± 5.774) (Figure 24).

Sur la membrane comme sur la tranche les cellules sont mobiles. Afin de vérifier si la migration est effective, nous avons suivi de petits groupes de cellules. Nous avons ainsi confirmé leur mobilité mais sans pouvoir mettre en évidence de réel aspect trophique. Nous avons relevé des changements aléatoires de position plutôt que de migration claire dans ou en dehors des tranches d'hippocampe (Figure 25).

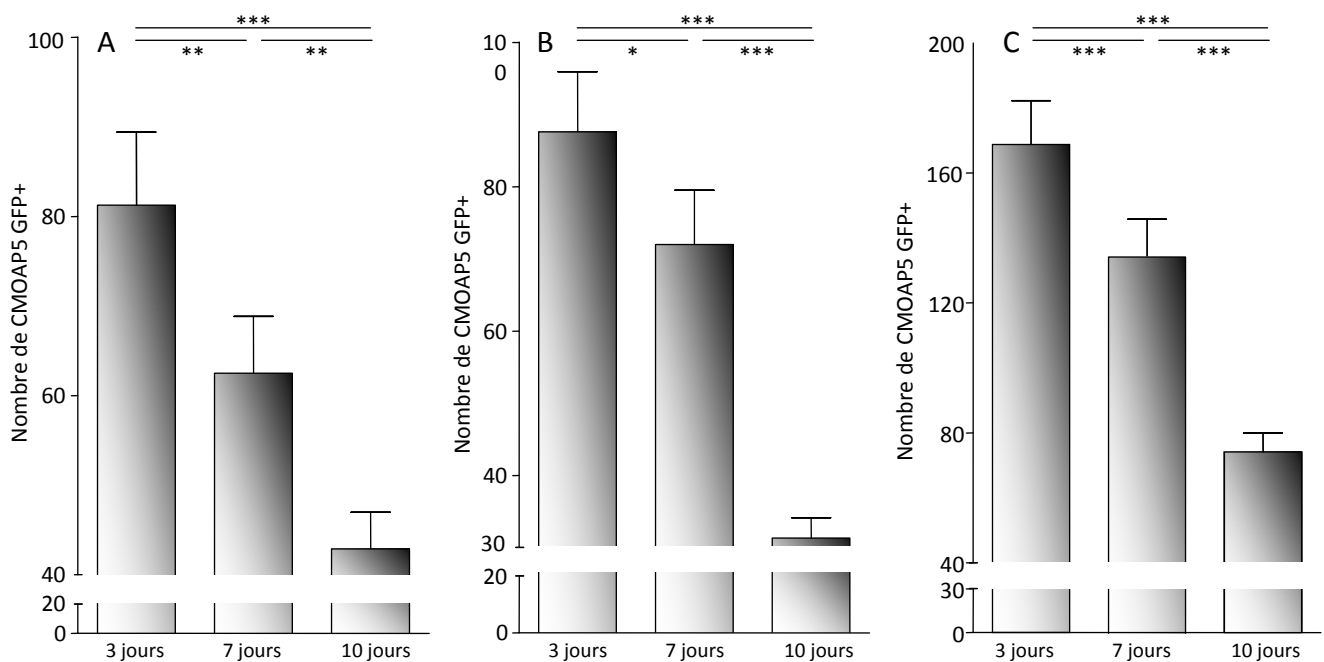


Figure 24 : Répartition des cellules GFP positives issues de la fraction totale de CMOAP5 sur cultures organotypiques.

Le nombre de CMOAP5 par tranche diminue de plus de 2 fois entre le 3ème et le 10ème jour après dépôt (A).

La même évolution est observée pour les CMOAP5 sur la membrane (B) et pour le total (C). n = 16 ; Les moyennes sont données avec l'erreur standard à la moyenne (SEM).

n=16 ; Test statistique : ANOVA à un facteur ; post test : test des comparaisons multiples de Tukey. * p < 0,05 ; ** p < 0,01 ; *** p < 0,001.

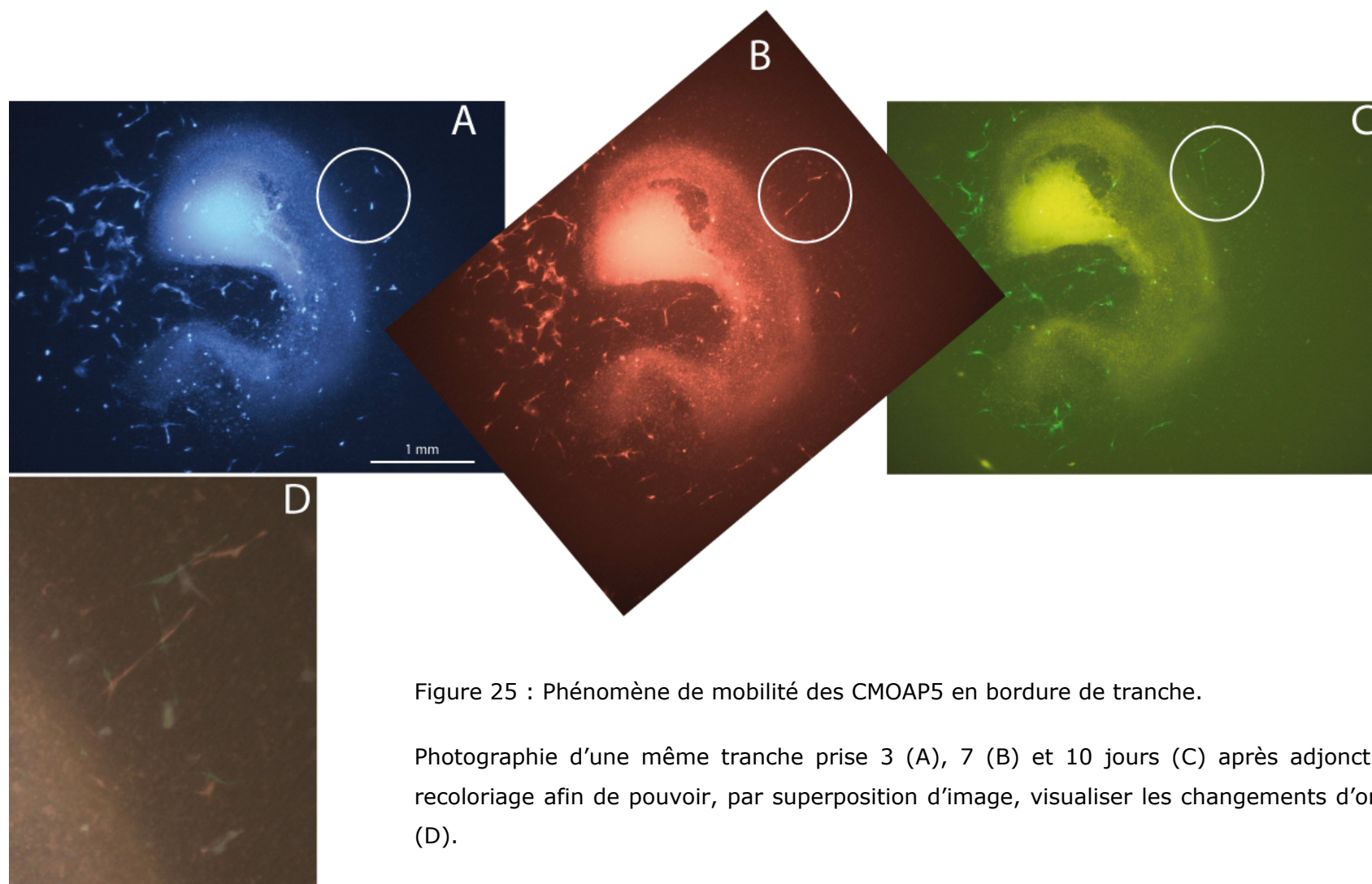


Figure 25 : Phénomène de mobilité des CMOAP5 en bordure de tranche.

Photographie d'une même tranche prise 3 (A), 7 (B) et 10 jours (C) après adjonction de CMOAP5 et recoloriage afin de pouvoir, par superposition d'image, visualiser les changements d'orientation cellulaire (D).

II.3 Utilisation de cellules sélectionnées : CMOAP1

La différence observée entre ces deux fractions cellulaires (CMO et CMOAP5) n'étant pas attendue, nous avons voulu vérifier si elle était imputable à la culture et plus particulièrement aux 5 passages des CMOAP5. Pour cela nous avons réitéré les mêmes expérimentations avec une fraction sélectionnée par adhérence au plastique utilisée juste après la première confluence (CMOAP1).

Après 3 jours de culture, le nombre de CMOAP1 sur la tranche est proche de celui obtenu avec la fraction CMOAP5 ($90,79 \pm 11,51$ vs $81,25 \pm 8,1$) mais, après 7 et 10 jours, ce nombre augmente significativement ($110,4 \pm 15,48$ et $115,3 \pm 16,89$). Le nombre de CMOAP1 sur la membrane diminue entre le 3^{ème} et le 10^{ème} jour après le début de l'expérience pour passer de $228,4 \pm 22,65$ à $175,5 \pm 20,93$. Le nombre de cellules totales (tranche + membrane) reste constant ($319,2 \pm 28,79$; $311,4 \pm 31,35$; $290,8 \pm 33,25$). Pour ce cas de figure nous pouvons aussi interpréter les variations de nombre de CMOAP1 par des phénomènes de migration de la membrane à la tranche, comme pour les CMO (Figure 26).

Afin de mieux appréhender les phénomènes de migration, les CMOAP1 ont été déposées dans un volume plus faible à l'aide d'une seringue Hamilton (voir Matériel et Méthodes : Greffes de CMO et/ou de CMOA sur les tranches). Cette façon de faire nous a permis de mettre en contact 2000 CMOAP1 dans 0,5 μ L de milieu. Bien que plus délicate à réaliser, cette méthode a permis d'observer l'évolution des CMOAP1 au cours du temps lorsque celles-ci sont concentrées à un point de la tranche plutôt que réparties sur sa surface. Les cartographies ont été dessinées comme décrit précédemment et de petits groupes de cellules ont pu être suivis. Il s'avère que les CMOAP1 ne sont pas statiques sur la tranche mais mobiles. Certaines bougent de quelques millimètres sans pour autant qu'une action trophique n'ait pu être détectée. Il est également visible sur ces photographies que la morphologie des CMOAP1 change entre le

2^{ème} et le 6^{ème} jour après leur contact avec le tissu nerveux : 2 et 4 jours après elles sont rondes tandis qu'au 6^{ème} jour elles acquièrent de petits prolongements cytoplasmiques.

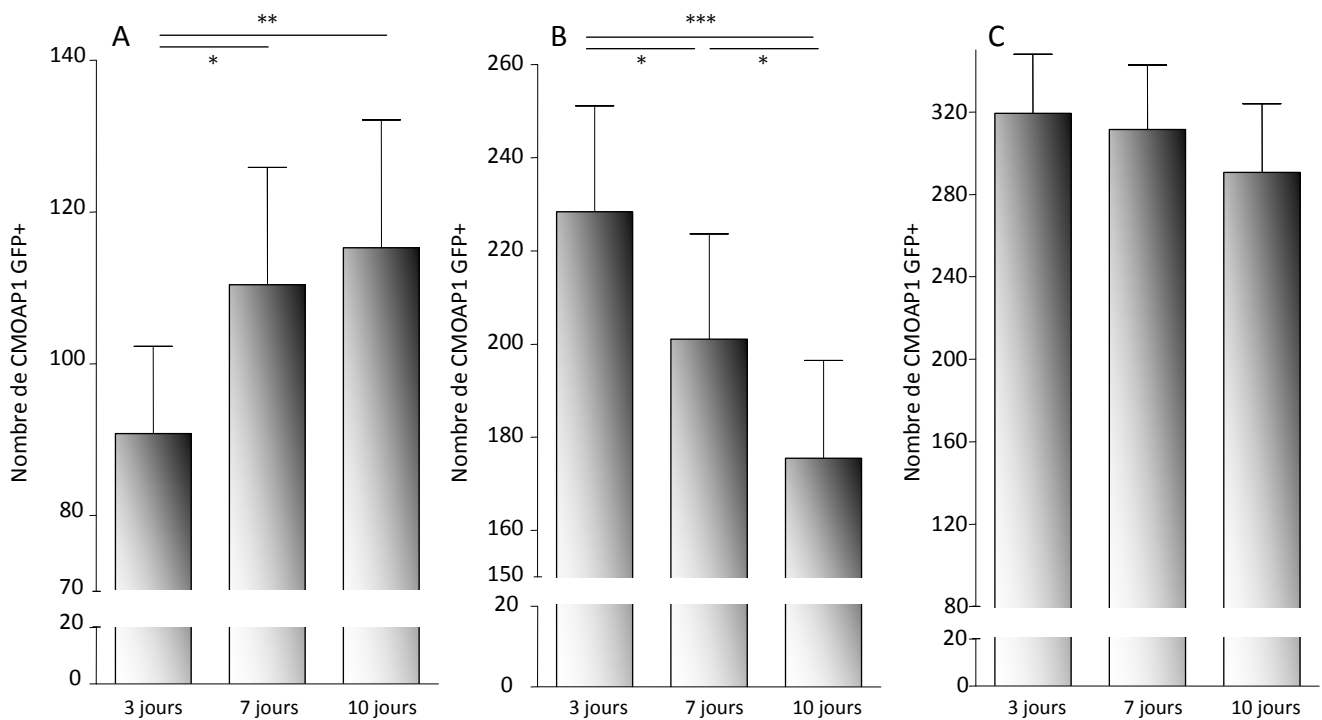


Figure 26 : Répartition des cellules GFP positives issues de la fraction totale de CMOAP1 sur cultures organotypiques.

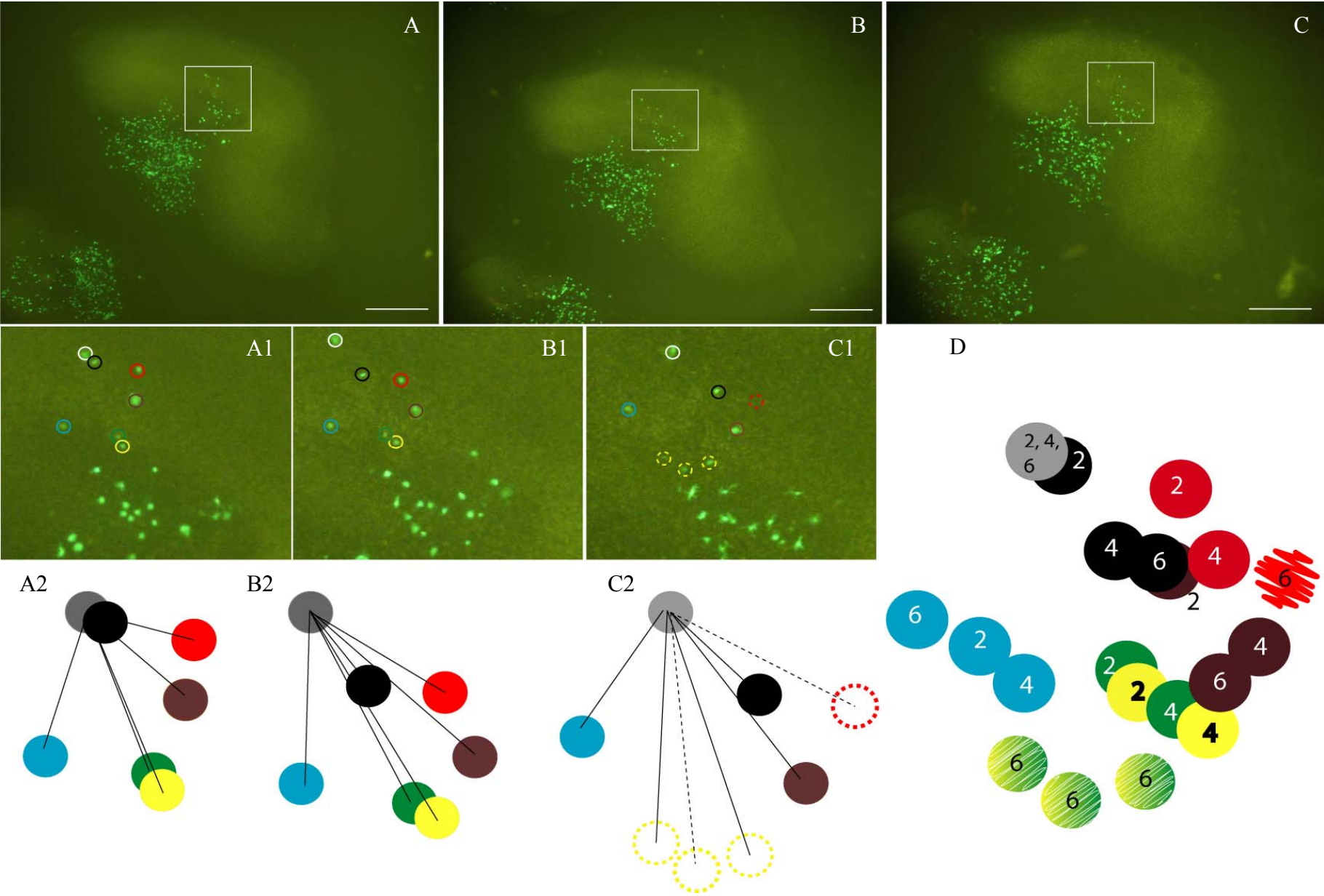
Le nombre de CMOAP1 par tranche augmente significativement au cours du temps (A) tandis que le nombre de cellules sur la membrane diminue (B). Le total de cellules (tranche + membrane) reste constant tout au long de l'expérience (C).

n=14 ; Les moyennes sont données avec l'erreur standard à la moyenne (SEM). Test statistique : ANOVA à un facteur ; post test : test des comparaisons multiples de Tukey.
 * p < 0,05 ; ** p < 0,01 ; *** p < 0,001.

Figure 27 : Hippocampe ayant reçu un dépôt de CMOAP1.

A-C : Une même tranche photographiée 2, 4 et 6 jours après dépôt de CMOAP1. Le dépôt de 2000 CMOAP1 dans 0,5 μ L permet de ne pas avoir de cellules GFP+ sur l'ensemble de la tranche. La plupart sont localisées en bord de tranche et les quelques cellules sur la tranche permettent un suivi précis de jour en jour. A1-C1 : Agrandissement des tranches précédentes. Sur chaque photographie quelques cellules ont été entourées. Chaque cercle de couleur correspond à une cellule. 6 jours après le début de l'expérience, certaines ont disparu (cercle rouge pointillé). D'autres se sont déplacées de telle sorte qu'il est aisé de les suivre (cercles pleins) tandis qu'il devient difficile de discriminer les dernières 6 jours après dépôt (cercles jaunes pointillés). A2-C2 : La position relative de chaque cellule est indiquée par les cercles de couleurs à 2, 4 et 6 jours après le dépôt des CMOAP1 sur la tranche. La cellule de repère est imagée par le cercle gris. D : chaque cercle correspond à une cellule à un jour précis après le dépôt des CMOAP1 sur la tranche. Les cellules ne semblent pas subir pas l'influence migratoire d'un facteur orientant les déplacements mais elles ne sont pas statiques sur le tissu. Les cercles jaunes et verts barrés de blanc correspondent aux cellules difficilement identifiables. Le cercle rouge barré de blanc correspond à une cellule qui n'est plus visible sur la tranche.

Barre d'échelle : 1 mm.



II.4 Utilisation de cellules sélectionnées additionnées à des cellules de la fraction totale de la moelle osseuse : CMOAP5/ CMO

Afin de vérifier si la différence de comportement entre les différentes fractions cellulaires provient de la présence de cellules contaminantes dans la fraction de CMO, nous avons également utilisé un paradigme expérimental dans lequel des CMO issues de souris non GFP sont mélangées à des CMOAP5 exprimant cette protéine fluorescente.

Après 3 jours de co-culture, le nombre de CMOAP5 issues du mélange CMOAP5/ CMO est de $43,36 \pm 7,073$, ce qui est très similaire à celui obtenu avec la fraction de CMO seule ($43,9 \pm 7,1$). 7 jours après le début de l'expérimentation, le nombre de cellules sur la tranche passe à $54,25 \pm 8,995$ et à $52 \pm 8,493$ 10 jours après dépôt. Concernant le nombre de cellules exprimant la GFP sur la membrane, une diminution significative est observée au cours du temps : 7 jours après dépôt $110,3 \pm 9,970$ cellules ont été comptabilisées, contre $88,75 \pm 10,72$ à 7 jours et $83,96 \pm 9,649$ à 10 jours. Le nombre de cellules totales (tranche + membrane) varie peu du 3^{ème} au 10^{ème} jour : $156,6 \pm 14,49$, $143 \pm 16,54$ et $136 \pm 16,61$ (3, 7 et 10 jours après dépôt). Ainsi il semblerait que le comportement global des CMOAP5 issues de la fraction mélangée CMOAP5/ CMO se comporte de façon très similaire à la fraction CMOAP1 seule, quoique moins accentuée. Cependant nous pouvons noter une différence frappante concernant la diminution du nombre de cellules totales, très probablement synonyme de mort cellulaire (Figure 28).

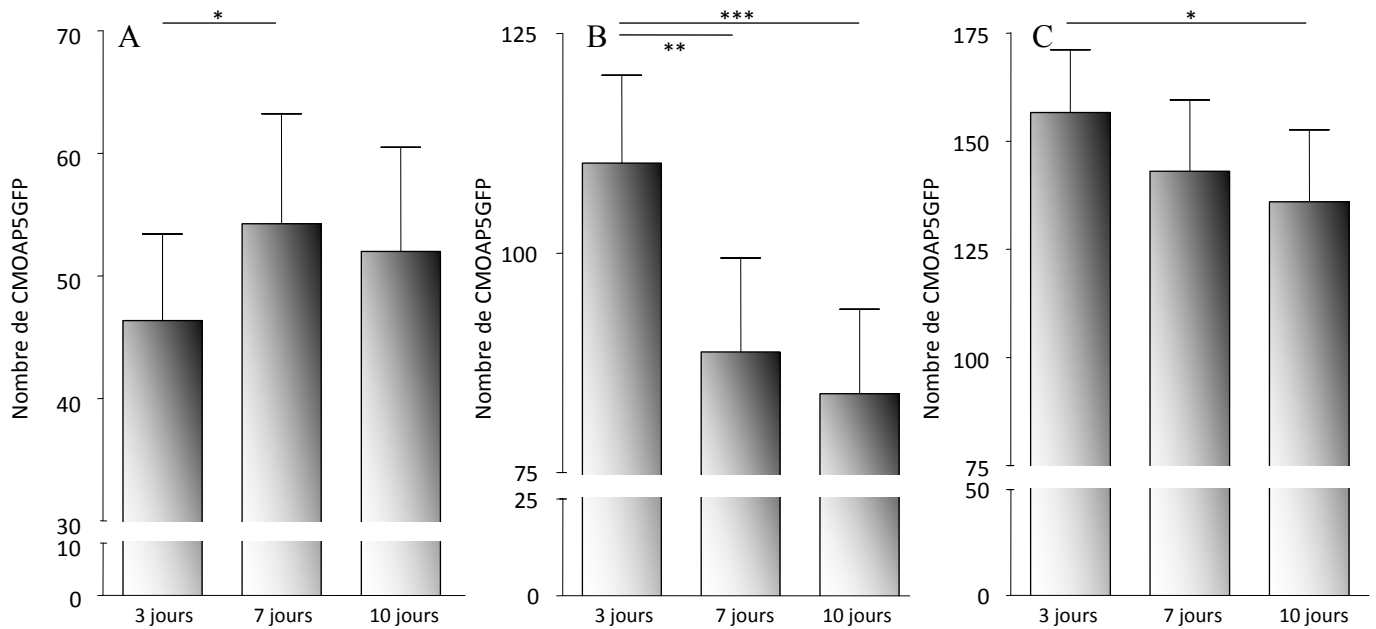


Figure 28 : Répartition des cellules GFP positives CMOAP5 associées à des CMO.

Les CMOA GFP positives ont été récoltées pour utilisation après le 5ème passage (CMOAP5), les CMO n'expriment pas la GFP. Le nombre de CMOAP5 par tranche augmente du 3ème au 7ème jour après dépôt pour se stabiliser entre le 7ème et le 10ème jour (A). Une diminution très significative du nombre de CMOAP5 est observée sur la membrane entre le 3ème et le 7ème jour post dépôt, diminution qui continue au 10ème jour après dépôt des CMOAP5 (B). Le nombre de CMOAP5 total diminue de façon significative entre le 3ème et le 10ème jour, bien que cette diminution soit faible (C). n =14 ; moyennes \pm SEM. Test statistique : ANOVA à un facteur ; post test : test des comparaisons multiples de Tukey. * p < 0,05 ; ** p < 0,01 ; *** p < 0,001.

III. ASPECTS MORPHOLOGIQUES, CAPACITE DE DIFFERENCIATION

III.1 Utilisation de la fraction totale de moelle osseuse : CMO

Trois jours après dépôt, les cellules GFP positives présentent majoritairement un aspect rond avec un petit diamètre. Les jours suivants, différents types morphologiques ont pu être décrits. A partir du 4^{ème} jour, de nombreuses cellules GFP positives deviennent multipolaires avec des prolongements plus ou moins nombreux. Certaines cellules acquièrent une morphologie ronde de large diamètre avec deux masses nucléaires. Les cellules multipolaires ont tendance à être moins abondantes que les grosses cellules rondes (Figure 29). Afin d'étudier le devenir des cellules GFP déposées sur la surface de la tranche et surtout de déterminer leur capacité de différenciation en cellules de phénotype neuronal, nous avons procédé à des études immunohistochimiques. Très peu de CMO GFP positives ont révélé un double marquage NeuN / GFP. Seule 1 cellule - sur un total de 1000 cellules comptées - a été reconnue par l'anticorps spécifique des neurones avec un marquage correspondant à celui attendu (à savoir nucléaire). La cellule, de faible diamètre, ne possède pas de prolongements. Un autre type de marquage non attendu a été révélé. Les cellules marquées ont un large diamètre et possèdent de nombreuses inclusions cytoplasmiques pouvant correspondre à des vésicules lysosomales alors que le marquage des neurones endogènes est typiquement nucléaire (Figure 30).

Aucun autre double marquage n'a été détecté (anti-CNPase pour les oligodendrocytes, anti-GFAP pour les astrocytes et pour des précurseurs neuraux et anti-NF pour les fibres des neurones).

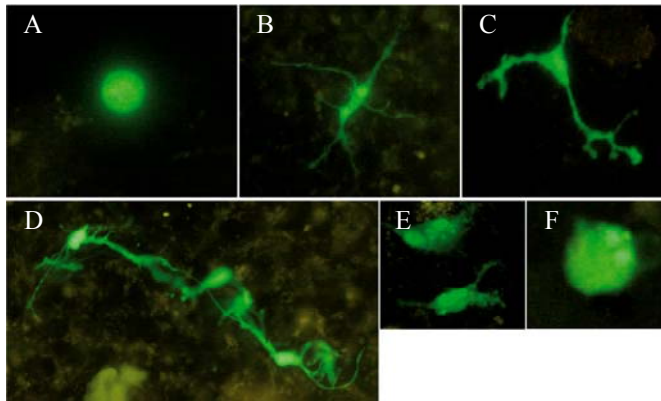


Figure 29 : Morphologie des CMO exprimant la GFP déposées sur les tranches d'hippocampe en culture.

A : 3 jours après dépôt de CMO. La majorité de ces cellules sont rondes avec un petit diamètre. B-D : 7 jours après dépôt de CMO. Les morphologies évoluent et certaines cellules

acquièrent des prolongements cytoplasmiques, leur donnant un aspect polygonal (B). Ces prolongements peuvent présenter des boursouflures (C) ou être fins et longs, rappelant les prolongements axonaux. E-F : 10 jours après dépôt de CMO. Des cellules présentent encore un aspect polygonal, quoique moins défini que précédemment (E) et d'autres cellules semblent posséder deux masses nucléaires visibles (F).

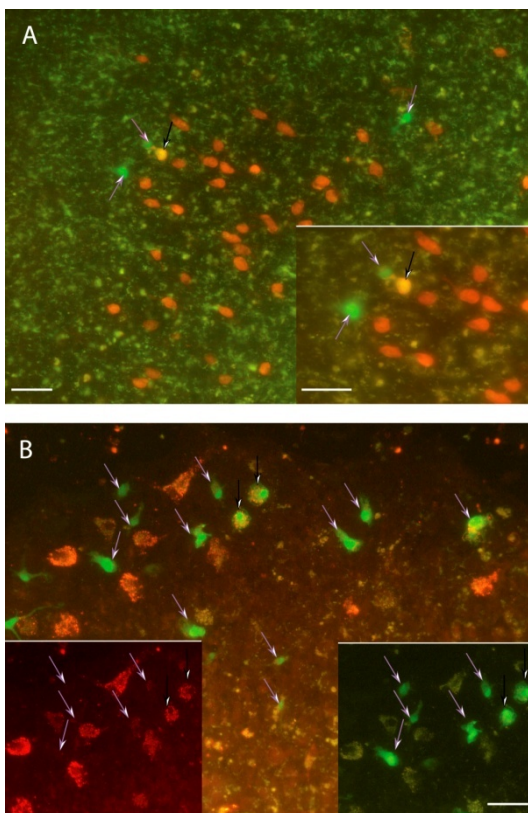


Figure 30 : Immunodétection de NeuN sur tranche d'hippocampe 7 jours après dépôt de CMO.

A : Sur cette image, trois cellules expriment uniquement la GFP (flèches mauves) et une cellule apparaît doublement marquée pour GFP et NeuN (flèche noire). Le marquage NeuN est typiquement nucléaire et marque les neurones matures. B : Plusieurs CMO sont visibles (flèches mauves) et certaines sont positivement marquées pour NeuN (flèches noires), mais l'aspect du marquage est cytoplasmique granulaire. Barre d'échelle : 50 μ m.

III.2 Utilisation de cellules sélectionnées : CMOAP1 et CMOAP5

Il est apparu que le tissu nerveux avait une grande influence sur la morphologie des CMOAP5. Au 3^{ème} jour après dépôt, les cellules sur la tranche sont petites et rondes tandis que sur la membrane leur diamètre est important et les cellules sont aplaties. L'aspect des cellules sur la membrane ne change pas au cours du temps. Sur la tranche par contre, les cellules acquièrent de longs prolongements et un aspect plus polygonal. Au fil de l'expérience, des cellules gliales s'échappent de la tranche et se rapprochent des CMOAP5 de la membrane, qui deviennent plus fines et différenciant des filaments (Figure 31 A-C).

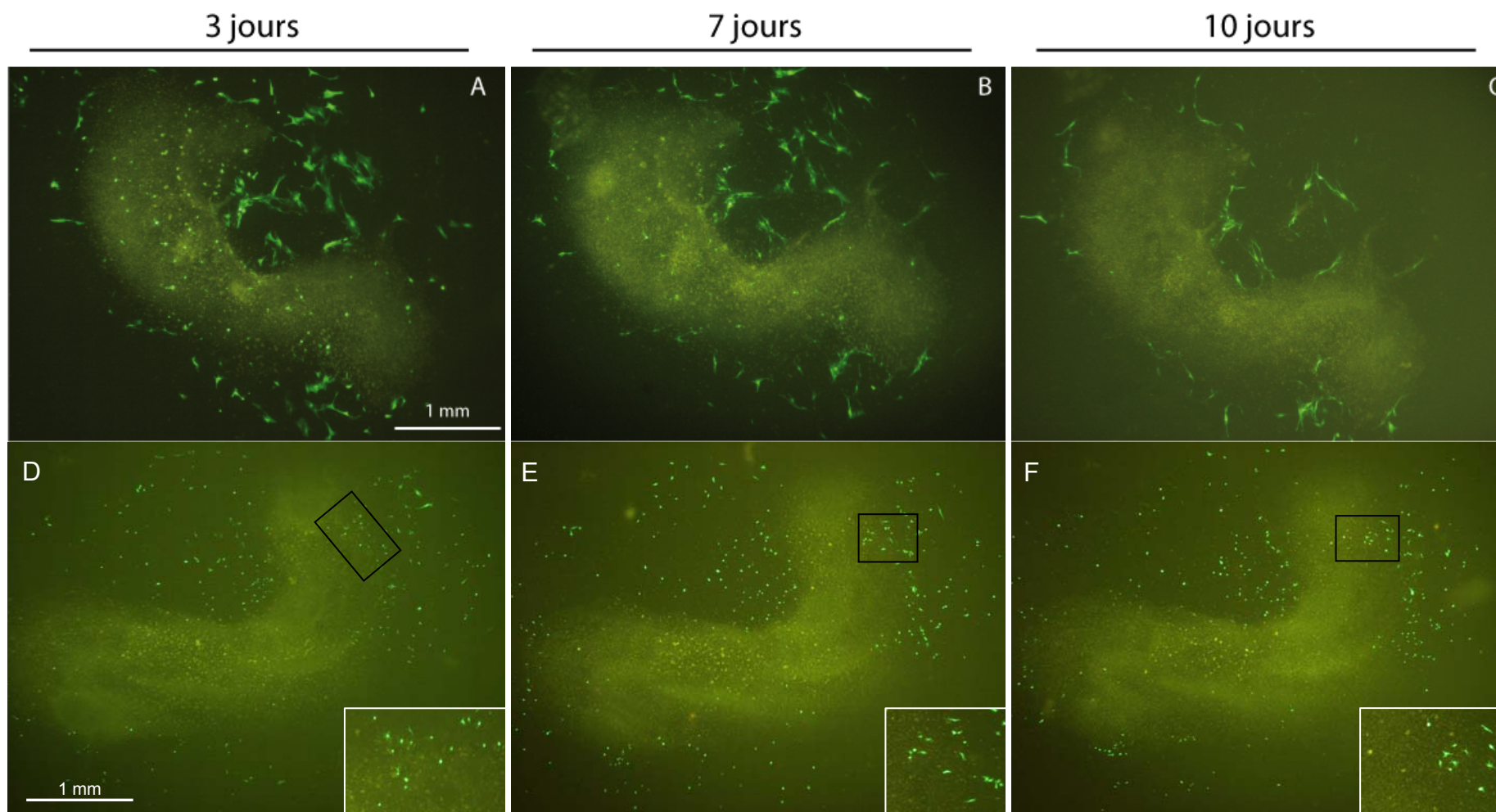
Grâce aux études immunohistochimiques, nous avons observé 2 CMOAP5 doublement marquées pour GFP et NeuN. Ces 2 cellules présentent l'aspect typique du marquage nucléaire NeuN et sont rondes plutôt que polygonales. Aucun autre marquage avec les anticorps utilisés n'a pu être mis en évidence. Pour cette fraction cellulaire, nous n'avons pas noté de variations d'intensité ou de distribution des marquages endogènes.

L'aspect des CMOAP1 n'évolue pas autant que celui des CMO ni des CMOAP5. La population présente sur la tranche et sur la membrane semble hétérogène mais principalement constituée de cellules petites et rondes ou à forme légèrement étoilée. De très rares cellules de grande surface ont été observées, mais jamais sur, ni très proches des tranches d'hippocampe. Certaines cellules ont une morphologie qui évolue au cours de l'expérience, la plupart différenciant des ramifications cytoplasmiques (Figure 31 D-F).

Figure 31: Tranches d'hippocampe 3, 7, et 10 jours après dépôt de CMOAP1 ou CMOAP5.

A-C : 3 jours après dépôt les CMOAP5 de la tranche ont un aspect rond et sont de faible diamètre, contrairement aux cellules adjacentes (A). Au fil des jours, le nombre total de cellules diminue fortement (B, C) et les cellules de la tranche acquièrent de grands prolongements cytoplasmique (C). Les cellules à fort diamètre observées 3 jours après le début de l'expérience ne sont pas retrouvées 10 jours plus tard.

D-F : 3 jours après dépôt, la plupart des CMOAP1 sur et en dehors de la tranche sont petites et rondes ou petites avec de légères ramifications (D). 7 jours après le début de l'expérience, la morphologie de certaines des cellules rondes évolue vers une forme étoilée (E et agrandissement), bien visible au 10e jour après la mise en contact avec les tranches (F et agrandissement).



III.3 Utilisation de souris NFH-GFP

L'utilisation de souris exprimant la GFP de façon ubiquitaire combinée à des études immunofluorescentes, ne permet pas l'affirmation catégorique de potentiels de différenciation de la part des cellules utilisées. Pour cela nous avons utilisé, en parallèle, des souris NFH-GFP exprimant cette protéine fluorescente exclusivement sous la dépendance du promoteur de neurofilaments. Cette protéine n'étant présente que dans les neurones, la détection ou non de fluorescence a permis de nous renseigner sans ambiguïté possible sur la transformation des CMOA en neurones matures. L'avantage de ce modèle tient principalement à la possibilité de détection des neurones directement à la loupe ou au microscope à fluorescence (Figure 32).

La première étape de ce travail a été le génotypage des portées obtenues par croisement de mères non NFH-GFP et de pères NFH-GFP. Les portées obtenues étaient constituées d'environ 50% de petits porteurs du gène et de 50% de petits sauvages (Figure 33). Nous avons ensuite étudié l'expression de cette protéine dans le cerveau du souriceau âgé de 1 jour. Après décapitation, fixation et congélation, des coupes sériées de cerveau ont été réalisées au cryostat et l'observation effectuée au microscope à fluorescence.

Le tissu caudal est mieux conservé que la partie frontale. Il est possible que la différence de marquage soit liée au stade du développement. Certains tractus sont bien visibles comme le tractus olfactif latéral, des fibres dans le noyau réticulé du thalamus, dans la commissure supraoptique, dans le fasciculus longitudinal médian, le tractus tegmental central, le tractus tectospinal et le lemnisque médian et latéral. Très peu de marquage a été repéré dans l'hippocampe et certains tractus ne sont pas visibles : corps calleux, chiasma optique, pyramides. Il est à noter également que les fibres descendantes du télencéphale ne sont pas marquées. Il est possible qu'il existe une différence d'expression de la GFP d'avant en arrière du cerveau.

Nous avons également contrôlé, sur des animaux âgés de 3 semaines, qu'aucune expression de la GFP n'était détectée dans les CMO, ni dans les cultures de CMOA, afin de nous assurer de la pertinence du modèle. Les expériences ultérieures ont été effectuées de la même façon que précédemment détaillée pour les CMO et les CMOA. Brièvement, nous avons déposé 2 μ L de cellules (10 000) sur chaque tranche en culture. Après 3, 7 et 10 jours de contact, aucune fluorescence n'a pu être détectée, laissant supposer une absence de différenciation des cellules greffées en neurones matures. Il est possible que le temps de culture n'ait pas été suffisant pour initier ou achever la maturation des CMO / CMOA.

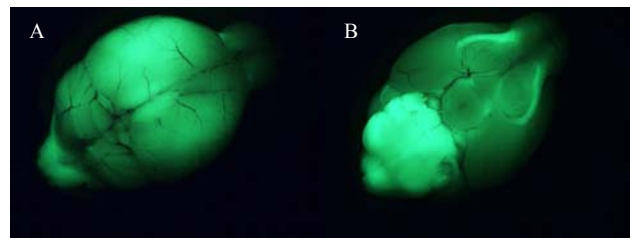


Figure 32 : Cerveau de souris NFH-GF âgée de 1 jour.

A : vue dorsale ; B : vue ventrale.

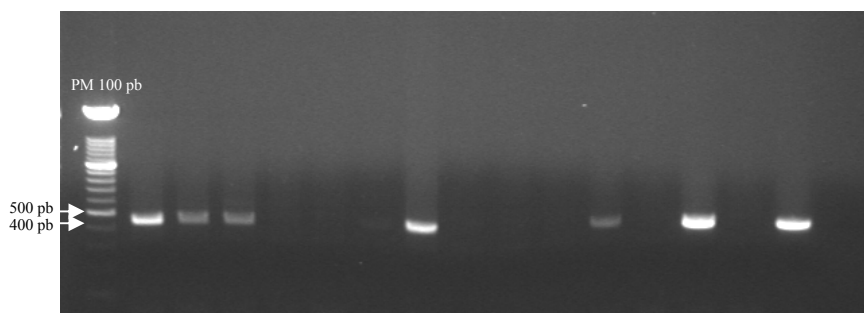


Figure 33 : Génotypage d'une portée de souris NFH-GFP par PCR avec amorces GFP.

Une bande à 448 pb apparaît dans 7 puits, permettant l'identification des petits exprimant le gène de la GFP. Dans les 8 autres puits, aucune bande n'est visible indiquant que les souriceaux sont sauvages.

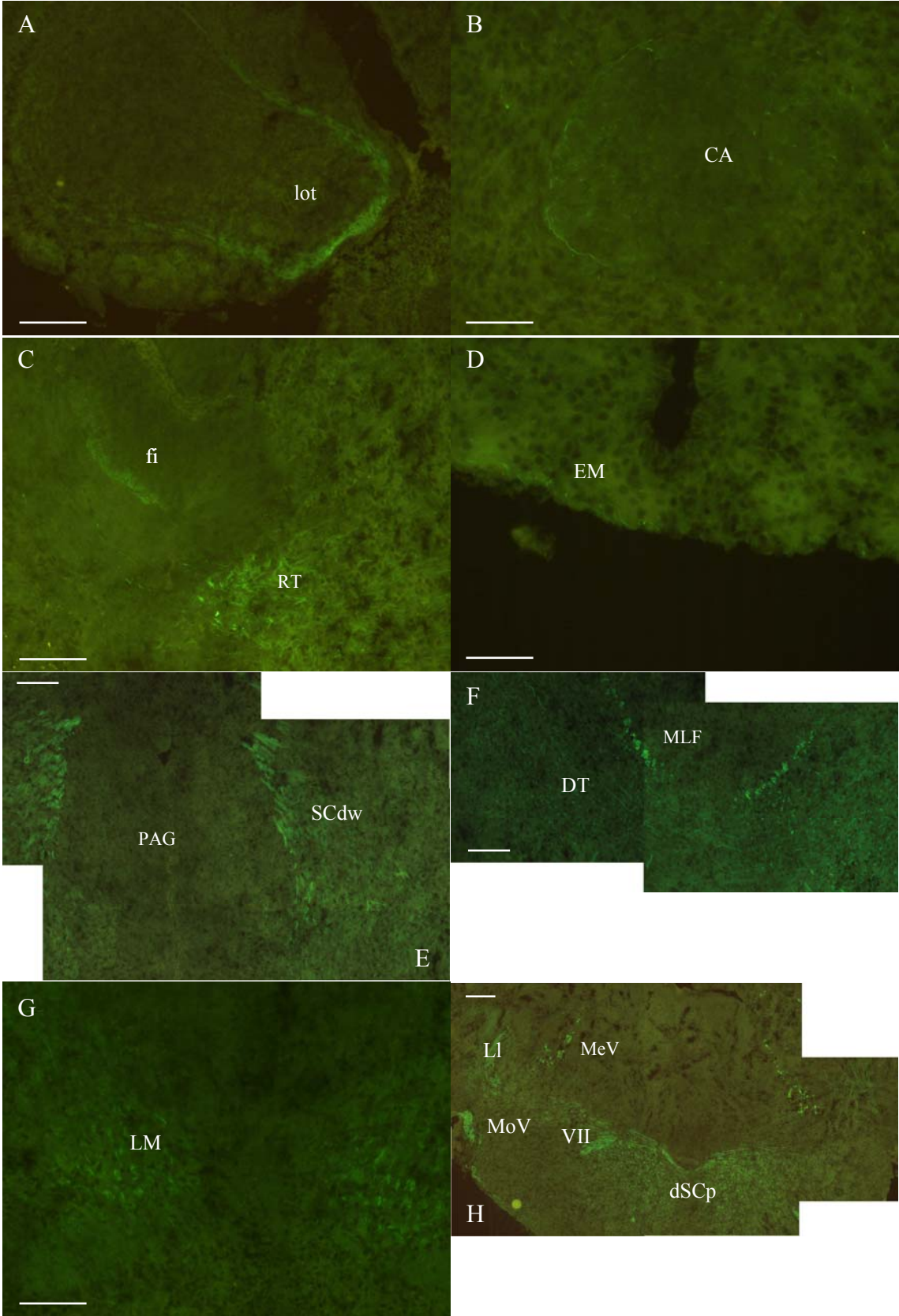
Figure 34 : Cerveau de souris NFH-GFP âgées de 1 jour.

Sur ces photographies plusieurs tractus de fibres sont visibles comme le tractus latéral olfactif (A, lot), la commissure antérieure (B, CA), la fimbria (C, fi), l'éminence médiane (D, EM), les collicules supérieurs (E, SCdw), le fascicule médian longitudinal (F, MLF), la décussation du tegmentum dorsal (F, DT), les lemnisques latéral et médian (H, LI et G, LM), la décussation des collicules supérieurs (dSCp) et des fibres du nerf VII (VII).

Certains noyaux sont également marqués : le noyau réticulé du thalamus (C, RT), le noyau du nerf V (H, MeV et MoV).

Aucun marquage n'est repérable dans la substance grise périaqueducale (E, PAG).

Barres d'échelles : A, H : 200 μm ; B, D : 50 μm ; C, E, F, G : 100 μm .



IV. INFLUENCE DES CELLULES ISSUES DE LA MOELLE OSSEUSE SUR LE TISSU NERVEUX

IV.1 Marqueurs du tissu nerveux

IV.1.1 Etude immunohistochimique de marqueurs neuronaux

Bien qu'aucune cellule GFP positive n'exprime les signaux attendus pour les autres anticorps (anti-CNPase pour les oligodendrocytes, anti-GFAP pour les astrocytes et pour des précurseurs neuraux et anti-NF pour les fibres des neurones), nous avons constaté une nette différence entre l'intensité et l'aspect du marquage avec NeuN et NF sur les tranches traitées (ayant reçu un dépôt de CMO) et sur les tranches témoins (sans adjonction de CMO). Les différences observées sont clairement en faveur des tranches traitées et ce dès le 4^{ème} jour après dépôt. Après 10 jours de culture, aucun marquage NF n'est visible sur les tranches témoins tandis que les tranches greffées expriment encore, à ce stade, une faible mais distincte immunoréactivité pour cet anticorps (Figure 35). Aucune différence visible n'a pu être mise en évidence pour les anticorps anti-CNPase et anti-GFAP.

Après avoir fixé les seuils d'intensité de marquage, le logiciel AnalySIS permet une détection des particules sur une région d'intérêt (ROI) déterminée par l'expérimentateur. Ces mesures ont été effectuées pour deux marqueurs neuronaux, NeuN et NF et pour des tranches ayant reçu un apport de CMOAP1.

Après 3 jours de contact entre les tranches d'hippocampe et les CMOAP1, $3,56 \pm 1,53$ % de la surface de la tranche témoin présentent un marquage pour NF contre $14,88 \pm 3,85$ % de surface marquée pour la tranche traitée par les cellules mésenchymateuses, soit environ 4 fois plus. Cet écart est encore significatif à 10 jours ($0,16 \pm 0,08$ % vs $3,029 \pm 0,5$ %) bien que le marquage soit beaucoup moins abondant. Le même comportement a été constaté avec le marquage NeuN que nous avons exprimé en nombre de cellules par mm^2 de tranche. A 3 jours

de contact CMOAP1 / tranche, la différence entre témoin et traité est significative : 4193 ± 355 pour les tranches traitées et 2118 ± 448 pour les tranches contrôles. Au 10^{ème} jour, la différence n'est plus significative mais il semble que la tendance reste la même (Figure 36).

Les études immunohistochimiques réalisées nous ont donc permis d'envisager un effet trophique des cellules issues de la moelle osseuse sur les tranches. Cependant ces études, purement qualitatives, ont dû être complétées par des études plus quantitatives. Nous avons donc choisi d'analyser les variations des taux d'expression des certains ARNm.

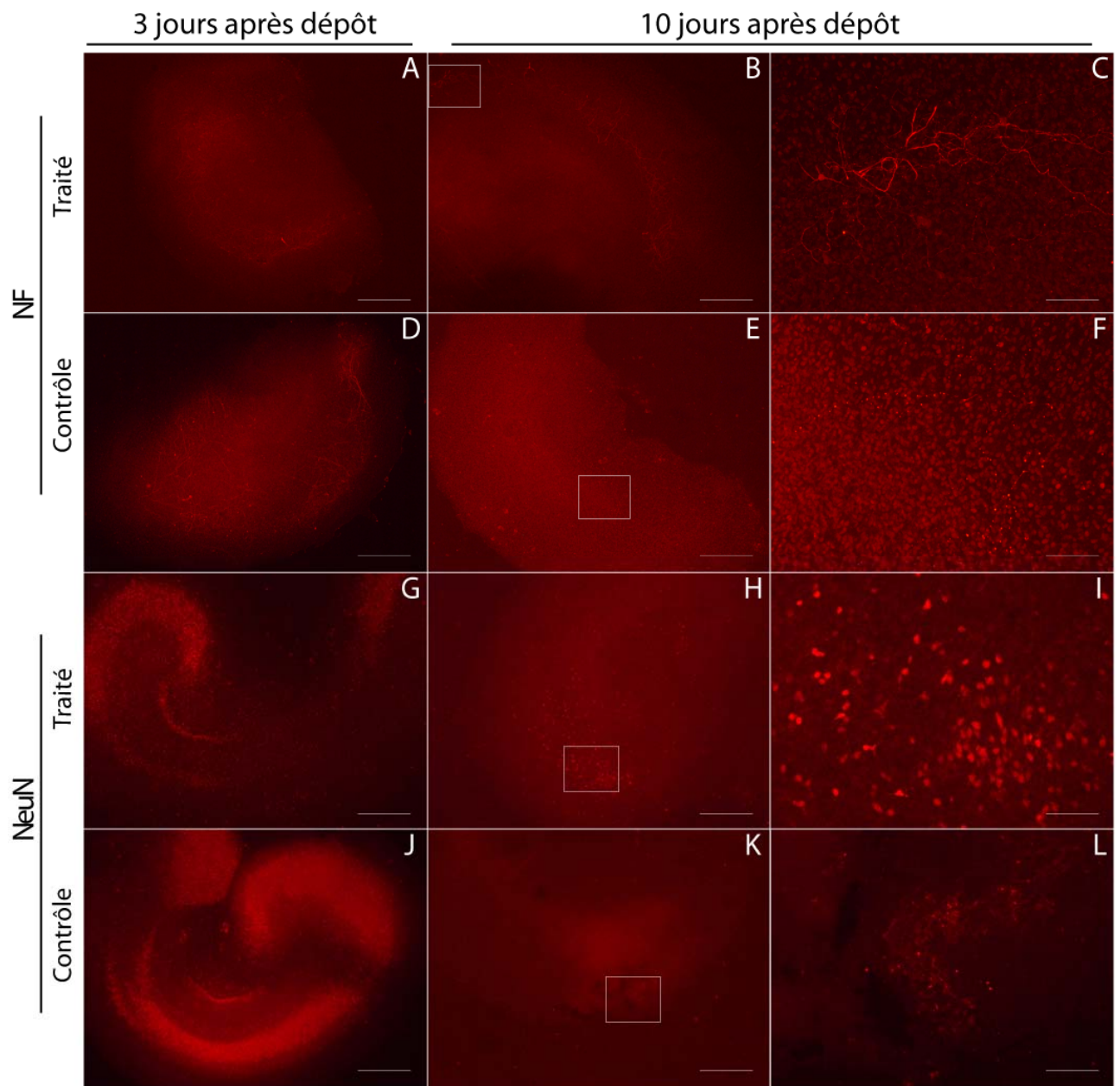


Figure 35 : Immunodétection de NF ou NeuN (G-L) sur des tranches d'hippocampe 3 (A, D, G et J) et 10 jours après avoir été traitées

(A-F) : NF ; (G-L) : NeuN 3 jours (A, D, G, J) et 10 jours (B, C, E, F, H, I, K, L) après dépôt de CMO (A-C ; G-I). Les contrôles ont reçu un dépôt de milieu sans cellules (D-F ; J-L). Barres d'échelles : 1 mm ou 100 μ m (C, F, I, L).

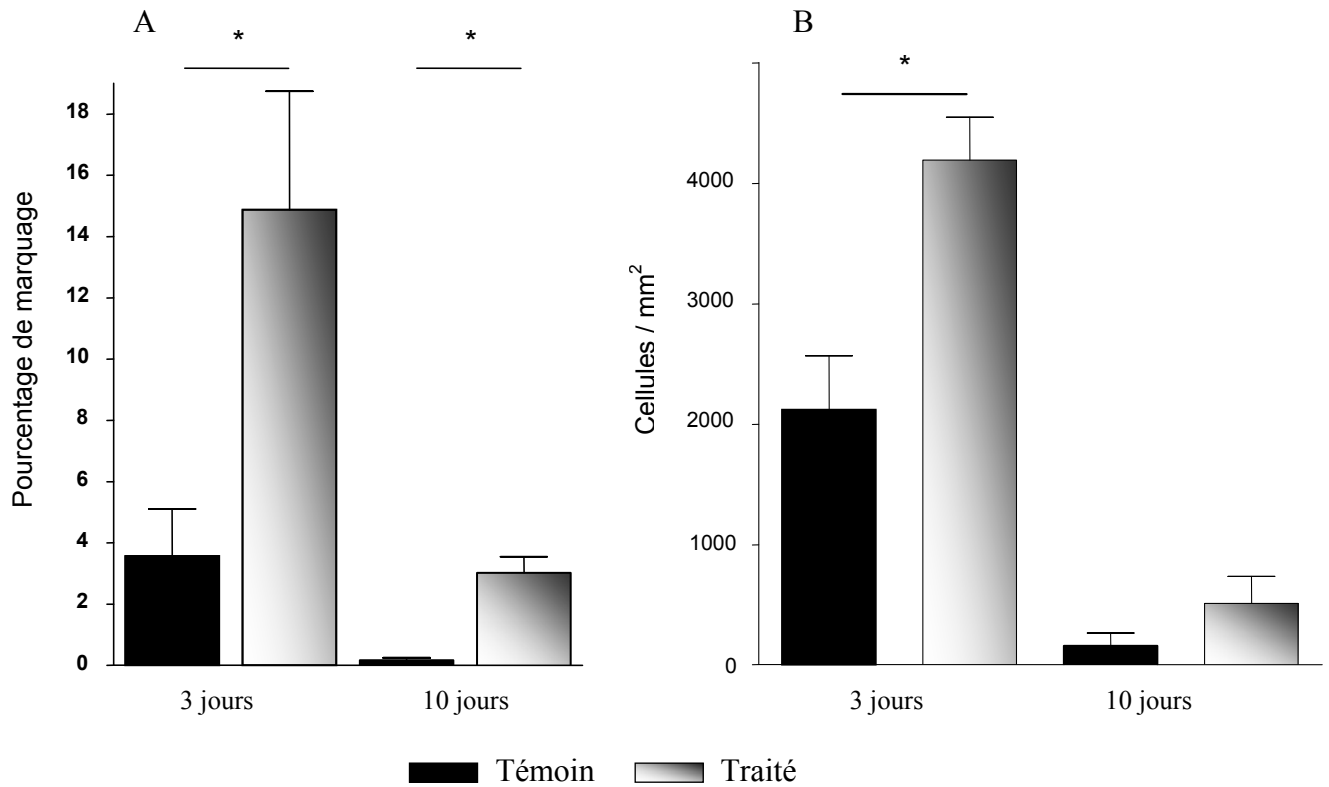


Figure 36 : Quantification du marquage obtenu après immunohistochimie sur tranches d'hippocampe après adjonction, ou non, de CMOAP1.

A : 3 et 10 jours après adjonction de CMOAP1 (traité) sur les tranches, la surface immunoréactive pour NF est plus étendue par rapport aux tranches non traité (sans CMOAP1 : témoin). B : 3 jours après adjonction de CMOAP1 (traité) sur les tranches, le marquage NeuN est plus important que celui présent sur les tranches témoins (sans CMOAP1 : témoin). n=5 ; Les moyennes sont données avec l'erreur standard à la moyenne. Test statistique : Mann Whitney ; * p < 0,05.

IV.1.2 Etude en PCR semi quantitative : β -III tubuline, CNPase, GFAP et NF

Des expériences préliminaires avec des tranches greffées ne s'étant pas révélées concluante, nous avons mis en place un modèle dans lequel les ARNm issus des tranches d'hippocampe ne seraient pas prélevés avec les ARNm des cellules issues de la moelle. Nous avons choisi le modèle de co-culture dans lequel les CMOA sont sur le fond de la plaque 6 puits et les membranes posées dessus. Aucun contact n'est alors possible entre les deux parties du système et les éventuelles variations observées ne peuvent provenir que de facteurs diffusibles (voir p.109, Co-culture de tranches et de CMO/CMOA). Ce protocole expérimental ne permettant pas de conserver la fraction totale de la moelle osseuse, la partie non adhérente étant éliminée au cours du premier changement de milieu, nous l'avons appelée CMOAP1, pour cellules souches mésenchymateuses utilisées à la première confluence correspondant au premier passage pour les dépôts sur tranches des expérimentations précédentes.

Après 4 jours de co-culture entre les tranches d'hippocampe et les CMOAP1, une augmentation significative des taux d'expression des ARNm de NF, β III-tubuline et CNPase a été observée. Aucune variation n'a été observée concernant les taux d'expression du messager GFAP. Concernant les CMOAP5, celles-ci n'ont eu aucune influence sur les taux d'expression des ARNm des tranches étudiées (Figure 37). Il semblerait même que la tendance soit à la baisse bien que les résultats ne soient pas statistiquement significatifs.

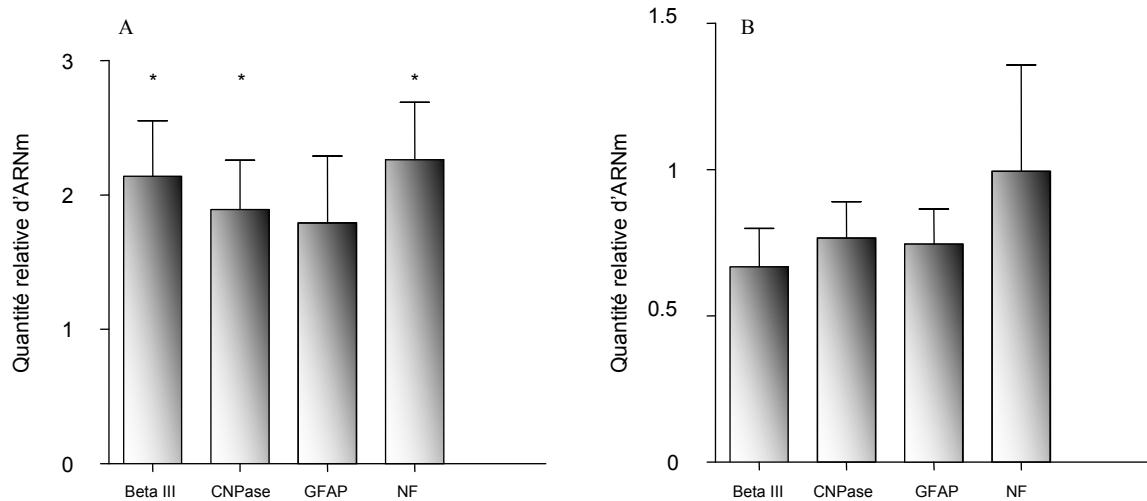


Figure 37 : Expression relative de β III tubuline, CNPase, GFAP et NF après co-culture avec des CMOAP1 ou des CMOAP5.

Les résultats sont normalisés par rapport à l'expression de GAPDH. A : Variations de l'expression des ARNm β III tubuline, CNPase, GFAP et NF de tranches d'hippocampe co-cultivées durant 4 jours avec des CMOAP1 par rapport aux témoins non greffés (=1). Une augmentation significative a pu être mise en évidence pour β III tubuline, CNPase et NF mais pas pour GFAP. B : Aucune variation significative n'a pu être mise en évidence pour les mêmes analyses effectuées avec la fraction cellulaire CMOAP5. $n = 5-10$. Les moyennes sont données avec l'erreur standard à la moyenne. Test statistique : Wilcoxon ; * $p < 0,05$.

IV.2 Effet protecteur

Les résultats précédents suggèrent un effet protecteur des CMOAP1 sur les tranches d'hippocampe en culture. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons décidé d'utiliser de l'iodure de propidium qui ne pénètre dans les cellules que si leur intégrité membranaire est rompue.

Les co-cultures ont été réalisées après 3 jours de culture organotypique et analysées 24 heures, 72 heures ou 7 jours après la mise en contact des tranches avec les CMOAP1. Au bout du premier jour de co-culture, le pourcentage de surface marquée par l'iodure de propidium est plus faible sur les tranches traitées par les CMOAP1 (7.8 ± 1) que sur les tranches contrôles (14.17 ± 1.9). La différence s'accroît au bout de 72 heures de mise en présence puisqu'il y a trois fois plus de surface marquée sur les témoins (12.96 ± 2.65) que chez les traitées (4.8 ± 0.46). Après 7 jours la tendance reste significative puisque 9.45 ± 1.42 % de la surface des tranches témoins est fluorescente contre 4.9 ± 0.73 % pour les tranches co-cultivées avec les CMOAP1 (Figure 38).

Les CMOAP1 protègent donc le tissu nerveux en culture contre la mort cellulaire par nécrose et/ou apoptose.

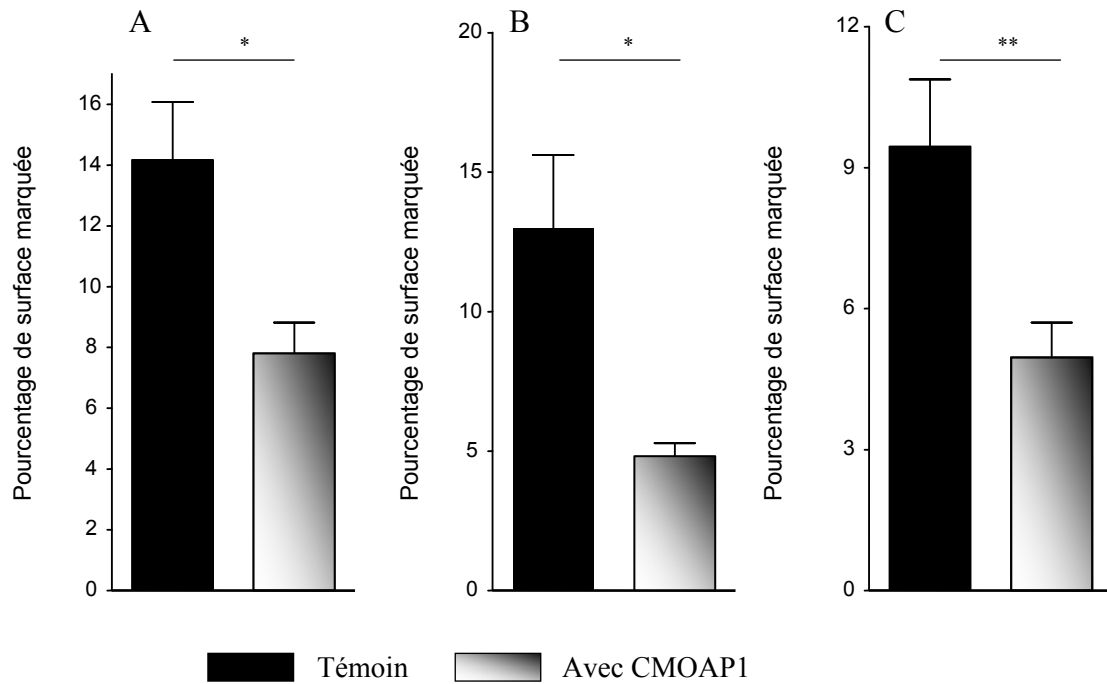


Figure 38 : Quantification de la mort cellulaire par l'iodure de propidium sur tranches d'hippocampe avec ou sans CMOAP1.

Le pourcentage de la surface marquée, 24h (A), 72h (B) et 7 jours (C) après la mise en contact des tranches avec les CMOAP1 est inférieur par rapport au marquage obtenu sur les tranches témoins.

n=15 à 21 ; Les moyennes sont données avec l'erreur standard à la moyenne.

Test statistique : Mann Whitney ; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

3ème Partie : Caractérisation des fractions cellulaires

I. GENES POTENTIELLEMENT ASSOCIES AUX CELLULES SOUCHES

Selon notre classification, le kit RT² Profiler™ PCR Array Mouse Mesenchymal Stem Cell permet l'étude des taux d'expression de 24 ARNm potentiellement associés aux cellules souches (CSM, CSH, ES, CSN) : Alcam, Anpep, Anxa5, CD44, Fgf2, Fzd9, Icam1, Jag1, Lif, Ngfr, Notch1, Pou5f1, Sox2, Tert, Thy1, Icam1, Itgb1, Mcam, Nt5e, Pdgfrb, Prom1, Ptprc, Vcam, Wnt3a (Katoh 2007; Kocheharov 2009), Zfp42. Seuls 4 ne sont pas suffisamment exprimés pour être analysés : Fzd9, Pou5f1, Wnt3a et Zfp42. Les résultats sont exprimés en unités arbitraires normalisées par le niveau d'expression de Hprt1 (moyenne des $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ \pm SEM) et sont considérés comme statistiquement significatifs quand $p < 0,05$ avec un test de Mann-Whitney. Les résultats sont résumés dans le Tableau 12.

Neuf augmentations significatives des taux d'expression d'ARNm ont été observées entre les fractions CMO et CMOAP1 : Alcam, Anpep, Fgf2, Icam1, Lif, Itgb1, Mcam, Nt5e. Le taux d'expression de Prom1 est significativement plus faible dans les CMOAP1 que dans la fraction totale de MO. Enfin Anxa5, CD44, CD45, Jag1, Ngfr, Notch1, Sox2, Tert, Thy1 et Pdgfrb ne varient pas entre ces deux fractions cellulaires. Douze augmentations significatives des taux d'expression des ARNm ont été observées entre CMO et CMOAP5 : Anxa5, CD44, Fgf2, Jag1, Lif, Ngfr, Notch1, Sox2, Itgb1, Mcam, Pdgfrb. Les taux d'expression de Vcam et de CD45 sont plus faibles pour la fraction CMOAP5 que pour la fraction CMO. Les taux d'expression des ARNm de Alcam, Anpep, Icam1, Tert, Thy1, Nt5e et Prom1 ne varient pas entre ces deux fractions. Les taux d'expression des ARNm de Anxa5, CD44, Fgf2, Jag1, Ngfr, Notch1, Sox2, Itgb1, Mcam, Nt5e et Pdgfrb sont significativement plus élevés dans la fraction CMOAP5 que dans la fraction CMOAP1. Quatre gènes sont moins exprimés par la fraction CMOAP5 que par la fraction CMO (Anpep, CD45, Icam1, Vcam). Quatre ne varient pas : Lif, Tert, Thy1, Prom1.

ARNm	Voies	CMOAP1 vs CMO	CMOAP5 vs CMO	CMOAP5 vs CMOAP1
Alcam	CSM	+++	Ns	---
Anpep	CSM	+++	Ns	---
Anxa5	CSM	Ns	++	+++
CD44	CSM	Ns	+	+++
Fgf2	CSM, CSN	+	+	+
Icam1	CSM	++	Ns	---
Jag1	CSH	Ns	+	+++
Lif	ES, CSH, CSM	++	++	Ns
Ngfr	CSN, CSH, CSM	Ns	++	+++
Notch1	CSH	Ns	++	++
Pou5f1	Cellules souches	NE	NE	NE
Sox2	Cellules souches	Ns	+	++
Tert	Cellules souches	Ns	Ns	Ns
Thy1	ES, CSH	Ns	Ns	Ns
Itgb1	CSM	+	++	+++
Mcam	CSM	+++	++	+++
Nt5e	CSM	+++	Ns	+++
Pdgfrb	CSM	Ns	++	++
Prom1	CSM	--	Ns	Ns
Ptprc	CSH	Ns	--	---
Vcam	CSM	Ns	-	-
Wnt3a	Cellules souches	NE	NE	NE
Zfp42	Cellules souches	NE	NE	NE
Fzd9	Cellules souches	NE	NE	NE

Tableau 12 : Variation d'expression des niveaux d'ARNm potentiellement associés aux cellules souches.

n = 8 ; + : augmentation significative des taux d'expression des ARNm p < 0,05 ; ++ : p < 0,01 ; +++ : p < 0,001. - : diminution significative des taux d'expression des ARNm p < 0,05 ; -- : p < 0,01 ; --- : p < 0,001. NE : Non exprimé. Test statistique : Mann-Whitney.

II. GENES POTENTIELLEMENT IMPLIQUES DANS DES VOIES DE DIFFERENCIATION

II.1 Voie de différenciation des ostéocytes

Selon notre classification, le kit RT² Profiler™ PCR Array Mouse Mesenchymal Stem Cell permet l'étude des taux d'expression de 17 ARNm potentiellement associés à la voie de différenciation des ostéocytes : Bglap1, Bmp2, Bmp4, Bmp6, Bmp7, Colla1, Hdac1, Hnfla, Igf1, Il6, Jag1, Kitl, Pparg, Ptk2, Runx2, Smurf1 et Smurf2. Seuls 4 ne sont pas suffisamment exprimés pour être analysés : Bmp7, Hdac1, Hnfla, Il6. Les résultats sont exprimés en unités arbitraires normalisées par le niveau d'expression de Hprt1 (moyenne des $2^{-(\Delta\text{CT})} \pm \text{SEM}$) et sont considérés comme statistiquement significatifs quand $p < 0,05$ avec un test de Mann-Whitney. Les résultats sont résumés dans le Tableau 13.

Entre les fractions CMO et CMOAP1, 7 gènes sont plus exprimés dans la deuxième fraction que dans la première : Bmp2, Bmp4, Colla1, Igf1, Pparg, Runx2 et Smurf1. Bglap1, Bmp6, Jag1, Kitl, Ptk2, RhoA et Smurf2 ne varient pas significativement. La fraction CMOAP5 a des taux d'expression plus élevés que CMO pour les ARNm Colla1, Igf1, Jag1, Kitl, Ptk2, Runx2, RhoA et Smurf1. Les gènes Bmp2, Bmp4, Bmp6, Pparg et Smurf 2 ne semblent pas être exprimés différemment entre CMOAP5 et CMO. Enfin cinq augmentations de taux d'expression d'ARNm ont été observées entre CMOAP1 et CMOAP5 : Jag1, Kitl, Ptk2, Runx2, RhoA et Smurf1. Bglap1, Bmp6, Igf1 et Pparg sont moins exprimés par CMOAP5 que par CMOAP1 et aucune variation significative n'a été observée pour Colla1 et Smurf2.

ARNm	CMOAP1 vs CMO	CMOAP5 vs CMO	CMOAP5 vs CMOAP1
Bglap1	Ns	-	---
Bmp2	+	Ns	--
Bmp4	++	Ns	--
Bmp6	+	Ns	--
Bmp7	Ne	Ne	Ne
Col1a1	+	+	Ns
Hdac1	Ne	Ne	Ne
Hnfla	Ne	Ne	Ne
Igf1	+++	++	---
Il6	Ne	Ne	Ne
Jag1	Ns	+	+++
Kitl	Ns	++	+++
Pparg	+++	Ns	---
Ptk2	Ns	++	+++
RhoA	Ns	++	+++
Runx2	++	++	++
Smurf1	++	++	+
Smurf2	Ns	Ns	Ns

Tableau 13 : Variation d'expression des niveaux d'ARNm potentiellement impliquée dans la voie de différenciation des ostéocytes.

n = 8 ; + : augmentation significative des taux d'expression des ARNm $p < 0,05$; ++ : $p < 0,01$; +++ : $p < 0,001$. - : diminution significative des taux d'expression des ARNm $p < 0,05$; -- : $p < 0,01$; --- : $p < 0,001$. NE : Non exprimé. Test statistique : Mann-Whitney.

Tableau 14 : Variation d'expression des niveaux d'ARNm potentiellement impliqué dans la voie de la différenciation des chondrocytes.

n = 8 ; + : augmentation significative des taux d'expression des ARNm $p < 0,05$; ++ : $p < 0,01$; +++ : $p < 0,001$. - : diminution significative des taux d'expression des ARNm $p < 0,05$; -- : $p < 0,01$; --- : $p < 0,001$. NE : Non exprimé. Test statistique : Mann-Whitney.

II.2 Voie de différenciation des chondrocytes

Selon notre classification, le kit RT² Profiler™ PCR Array Mouse Mesenchymal Stem Cell permet l'étude des taux d'expression de 8 ARNm potentiellement associés à la voie de différenciation des adipocytes : Abcb1a, Bmp2, Bmp4, Bmp6, Bmp7, Sox9, Tgfb1 et Vegfa. Bmp7 et Sox 9 ne sont pas suffisamment exprimés pour être analysés. Les résultats sont exprimés en unités arbitraires normalisées par le niveau d'expression de Hprt1 (moyenne des $2^{-(\text{delta CT})} \pm \text{SEM}$) et sont considérés comme statistiquement significatifs quand $p < 0,05$ avec un test de Mann-Whitney. Les résultats sont résumés dans le Tableau 14 .

Quatre gènes sont plus exprimés par la fraction des CMOAP1 que par celle des CMO : Abcb1a, Bmp2, Bmp4 et Vegfa. Les autres gènes ne présentent aucune variation significative de leur taux d'expression. Trois gènes sont moins exprimés par les CMO que par les CMOAP5 : Bmp2, Bmp4 et Bmp6 ; les autres ne varient pas. Enfin entre les fractions CMOAP1 et CMOAP5, nous avons observé une augmentation du taux d'expression des ARNm dans les CMOAP5 pour Abcb1a tandis que pour Vegfa c'est une diminution.

ARNm	CMOAP1 vs CMO	CMOAP5 vs CMO	CMOAP5 vs CMOAP1
Abcb1a	+++	Ns	---
Bmp2	+	Ns	--
Bmp4	++	Ns	--
Bmp6	+	Ns	--
Bmp7	Ne	Ne	Ne
Sox9	Ne	Ne	Ne
Tgfb1	Ns	Ns	Ns
Vegfa	++	Ns	---

II.3 Voie de différenciation des adipocytes

Selon notre classification, le kit RT² Profiler™ PCR Array Mouse Mesenchymal Stem Cell permet l'étude des taux d'expression de 3 ARNm potentiellement associés à la voie de différenciation des adipocytes : *Igf1*, *Pparg*, *RhoA*. Les résultats sont exprimés en unités arbitraires normalisées par le niveau d'expression de *Hprt1* (moyenne des $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ \pm SEM) et sont considérés comme statistiquement significatifs quand $p < 0,05$ avec un test de Mann-Whitney. Les résultats sont résumés dans le Tableau 15.

Pparg et *Vegfa* sont plus exprimés par la fraction CMOAP1 que par CMO. *RhoA* ne varie pas significativement. CMOAP5 exprime plus *Igf1* et *RhoA* que CMO, mais aucune différence n'a été observée pour *Pparg*. Enfin seul *RhoA* a un taux d'expression plus élevé dans la fraction CMOAP5 que dans la fraction CMOAP1. *Pparg* est moins exprimé par CMOAP5 que par CMOAP1.

ARNm	CMOAP1 vs CMO	CMOAP5 vs CMO	CMOAP5 vs CMOAP1
<i>Igf1</i>	+++	++	---
<i>Pparg</i>	+++	Ns	---
<i>RhoA</i>	Ns	++	+++

Tableau 15 : Variation d'expression des niveaux d'ARNm potentiellement impliqué dans la voie de la différenciation des adipocytes.

n = 8 ; + : augmentation significative des taux d'expression des ARNm $p < 0,05$; ++ : $p < 0,01$; +++ : $p < 0,001$. - : diminution significative des taux d'expression des ARNm $p < 0,05$; -- : $p < 0,01$; --- : $p < 0,001$. NE : Non exprimé. Test statistique : Mann-Whitney.

II.4 Voie de différenciation des cellules endothéliales

Selon notre classification, le kit RT² Profiler™ PCR Array Mouse Mesenchymal Stem Cell permet l'étude des taux d'expression de 4 ARNm potentiellement associés à la voie de différenciation des cellules endothéliales : Eng, Jag1, Kdr et Vegfa. Les résultats sont exprimés en unités arbitraires normalisées par le niveau d'expression de Hprt1 (moyenne des $2^{-(\Delta\text{CT})} \pm \text{SEM}$) et sont considérés comme statistiquement significatifs quand $p < 0,05$ avec un test de Mann-Whitney. Les résultats sont résumés dans le Tableau 16.

Seul Vegfa est plus exprimé par CMOAP1 que par CMO, les taux d'expression des autres gènes étudiés ne varient pas entre ces deux fractions cellulaires. Eng et Jag 1 sont plus exprimés par CMOAP5 que par CMO, Kdr et Vegfa ne varient pas significativement. Enfin les taux d'expression de Jag1 et Eng sont plus élevés dans la fraction CMOAP5 que dans la fraction CMOAP1, alors que Vegfa est moins exprimé par CMOAP5 que par CMOAP1. Kdr ne varie pas significativement d'une fraction à l'autre.

ARNm	CMOAP1 vs CMO	CMOAP5 vs CMO	CMOAP5 vs CMOAP1
Eng	Ns	++	++
Jag1	Ns	+	+++
Kdr	Ns	Ns	Ns
Vegfa	++	Ns	---

Tableau 16 : Variation d'expression des niveaux d'ARNm potentiellement impliqué dans la voie de la différenciation des cellules endothéliales.

n = 8 ; + : augmentation significative des taux d'expression des ARNm $p < 0,05$; ++ : $p < 0,01$; +++ : $p < 0,001$. - : diminution significative des taux d'expression des ARNm $p < 0,05$; -- : $p < 0,01$; --- : $p < 0,001$. NE : Non exprimé. Test statistique : Mann-Whitney.

II.5 Voie de différenciation des cellules vasculaires musculaires lisses

Selon notre classification, le kit RT² Profiler™ PCR Array Mouse Mesenchymal Stem Cell permet l'étude des taux d'expression de 3 ARNm potentiellement associés à la voie de différenciation des cellules vasculaires musculaires lisses : Pdgfrb, Mcam et Eng. Les résultats sont exprimés en unités arbitraires normalisées par le niveau d'expression de Hprt1 (moyenne des $2^{-(\text{delta CT})} \pm \text{SEM}$) et sont considérés comme statistiquement significatifs quand $p < 0,05$ avec un test de Mann-Whitney. Les résultats sont résumés dans le Tableau 17

Seuls Pdgfrb et Eng ne varient pas significativement entre CMO et CMOAP1. Mcam est plus exprimé par CMOAP1 et CMOAP1 que par CMO et plus exprimé par CMOAP5 que par CMOAP1. Pdgfrb et Eng ont un taux d'expression plus important dans la fraction CMOAP5 que dans la fraction CMOAP1 ou dans la fraction CMO.

ARNm	CMOAP1 vs CMO	CMOAP5 vs CMO	CMOAP5 vs CMOAP1
Pdgfrb	Ns	++	++
Mcam	+++	++	+++
Eng	Ns	++	++

Tableau 17 : Variation d'expression des niveaux d'ARNm potentiellement impliqué dans la voie de la différenciation des cellules vasculaires musculaires lisses.

n = 8 ; + : augmentation significative des taux d'expression des ARNm $p < 0,05$; ++ : $p < 0,01$; +++ : $p < 0,001$. - : diminution significative des taux d'expression des ARNm $p < 0,05$; -- : $p < 0,01$; --- : $p < 0,001$. NE : Non exprimé. Test statistique : Mann-Whitney.

III. AUTRES GENES ETUDIES

Vingt quatre gènes étudiés avec le kit RT² Profiler™ PCR Array Mouse Mesenchymal Stem Cell n'ont pu être reliés à une voie de signalisation découlant des CSM, aussi les avons nous regroupé dans cette dernière catégorie. Par exemple Casp3 est impliquée dans la voie de signalisation de l'apoptose et est donc exprimée par de nombreux type cellulaire. Les résultats sont exprimés en unités arbitraires normalisées par le niveau d'expression de Hprt1 (moyenne des $2^{-(\Delta\text{CT})} \pm \text{SEM}$) et sont considérés comme statistiquement significatifs quand $p < 0,05$ avec un test de Mann-Whitney. Les résultats sont résumés dans le Tableau 18

Csf2, Csf3, Egf, Fgf10, Fut1 et Fut4 ne sont pas suffisamment exprimés par nos différentes fractions cellulaires pour être analysés. La fraction CMOAP1 exprime plus Gdf15, Il10, Itgax, Mitf, Mmp2, Tgfb3 et Vim que la fraction des CMO. Casp3, Gtf3a, Hat1 et Il1b sont moins exprimés dans la fraction des CMOAP1 que dans la fraction des CMO. Enfin aucune variation significative entre ces deux fractions n'a été observé pour les gènes Ctnnb1, Nes, Pigs, Slc17a5, Smad4 et Tbx5. Les taux d'expression de Casp3, Ctnnb1, Erbb2, Gtf3a, Hat1, Mmp2, Nes, Pigs, Slc17a5, Vim et Smad4 sont plus élevé dans CMOAP5 que dans CMOAP1, mais Gdf15, Il10, Itgax, Mitf et Tgfb3 sont plus exprimés par CMOAP1 que par CMOAP5. Il1b et Tbx5 ne varient pas entre ces deux fractions. Enfin dans la fraction cellulaire CMOAP5, les taux d'expression de Ctnnb1, Erbb2, Gtf3a, Mitf, Mmp2, Nes, Pigs, Slc17a5, Smad4, Vim et Tgfb3 sont plus élevé que dans la fraction CMO. Casp3, Hat1, Il1b sont moins exprimés par CMOAP5 que par CMO et Gdf15, Itgax et Tbx5 ne varient pas.

ARNm	CMOAP1 vs CMO	CMOAP5 vs CMO	CMOAP5 vs CMOAP1
Casp3	--	--	+
Csf2	Ne	Ne	Ne
Csf3	Ne	Ne	Ne
Ctnnb1	Ns	++	+++
Egf	Ne	Ne	Ne
ErbB2	+	++	+
Fgf10	Ne	Ne	En
Fut1	Ne	Ne	Ne
Fut4	Ne	Ne	Ne
Gdf15	+++	Ns	---
Gtf3a	-	+	++
Hat1	---	-	++
Il10	++	+	---
Il1b	--	--	Ns
Itgax	++	Bs	---
Mitf	+++	++	---
Mmp2	++	++	++
Nes	Ns	++	+++
Pigs	Ns	+	+
Slc17a5	Ns	+	+
Smad4	Ns	+	+
Tbx5	Ns	Ns	Ns
Tgfb3	+++	++	-
Vim	++	++	+++

Tableau 18 : Variation des taux d'expression des autres ARNm étudiés.

n = 8 ; + : augmentation significative des taux d'expression des ARNm p < 0,05 ; ++ : p < 0,01 ; +++ : p < 0,001. - : diminution significative des taux d'expression des ARNm p < 0,05 ; -- : p < 0,01 ; --- : p < 0,001. NE : Non exprimé. Test statistique : Mann-Whitney.

DISCUSSION

1ère partie : Greffe de moelle osseuse *in vivo*

Cette étude préliminaire consistait à valider certains protocoles de repérage de CMO greffées en périphérie. Il s'agissait également de confirmer certaines données de la littérature quant à leurs facultés de migration ou de trans-différenciation et de rechercher d'éventuels effets délétères des irradiations telles qu'elles sont administrées dans les protocoles de greffes mis en œuvre.

Dans nos conditions d'expérimentation, nous n'avons pas constaté de dégâts structuraux visibles sur l'encéphale suite à l'irradiation corporelle totale des souris. En effet, aucune zone de lésions n'est apparue après coloration au bleu de toluidine. L'irradiation corporelle des souris semble donc un moyen adapté pour détruire le compartiment hématopoïétique et favoriser la prise de greffe de CMO ou de cellules dérivées.

Afin de repérer les CMO greffées, divers protocoles ont été testés. Le premier consistait à utiliser un chimérisme du complexe majeur d'histocompatibilité en greffant des cellules issues de souris mâles FvB chez des souris femelles Balb/c, les premières exprimant H2q tandis que les deuxièmes expriment H2d. Cette technique, utilisée en routine pour le repérage des cellules greffées en immunocytométrie s'est révélée inadaptée en immunohistochimie : la fixation nécessaire des tissus pour cette technique conduisant à l'obtention de marquages aspécifiques. Le PFA est un fixateur chimique pouvant inhiber la fixation de certains anticorps, en particulier ceux reconnaissant des épitopes dépendants de la conformation de certaines glycoprotéines (Nurden *et al.* 1997). Ainsi, les anticorps antiH2q et antiH2d ne sont pas adaptés pour des études immunohistochimiques et restent spécifiques pour une utilisation en cytométrie en flux ou sur cellules non fixées.

Cette stratégie de repérage ayant échoué, nous avons décidé de mettre au point des techniques de greffes de CMO provenant de souris mâles exprimant de façon ubiquitaire la GFP chez des souris femelles n'exprimant pas cette protéine. De cette sorte, nous conservons un double chimérisme : GFP+/GFP- et mâle/femelle. A l'issue de 15 jours post greffe, des cellules

GFP+ ont été retrouvées en grande quantité dans le sang, la MO, la rate et l'encéphale des souris receveuses, tandis qu'aucune fluorescence n'a été observée chez les souris témoins non greffées, confirmant l'efficacité et la spécificité de cette technique, de même que la capacité de migration par le système sanguin des CMO greffées. Dans la littérature, de nombreux auteurs s'accordent sur la capacité de migration de cellules souches issues de MO dans l'encéphale de souris irradiées ou de rats lésés et sur leur migration préférentielle autour des vaisseaux, en accord avec nos résultats (Azizi *et al.* 1998; Kopen *et al.* 1999; Brazelton *et al.* 2000; Mezey *et al.* 2000; Donadoni *et al.* 2004). Lors d'expériences de greffes suite à des lésions cérébrales, les auteurs ont constaté une forte propension de ces cellules à migrer au site de la lésion (Chen *et al.* 2001; Shichinohe *et al.* 2004). Dans nos conditions d'expérimentations et en absence de lésions de l'encéphale, nous n'avons pas observé ce phénomène, hormis pour les régions périvasculaires, bien que les pourcentages de GFP+ différent selon les régions (Figure 19). Cependant, compte tenu des différences de volume entre celles-ci, il ne semble pas que cela ces variations soient significatives. Les cellules GFP+ sont réparties dans l'ensemble de l'encéphale, aussi bien dans le cortex que dans les noyaux du thalamus ou de l'hypothalamus ou encore dans les faisceaux de substance blanche. Aucun site de migration préférentiel n'a pu être mis en évidence par cette technique. Cependant, aucune étude statistique n'a été réalisée. Afin de contrôler la prise de greffe des CMO issues de mâles FvB chez les femelles Balb/c, une étude par PCR a été réalisée. Les résultats préliminaires permettent d'affirmer que les CMO greffées survivent dans l'encéphale 6 mois après la greffe puisqu'une amplification d'un gène spécifique du chromosome Y de souris a été obtenue à partir de coupes sériées de cerveaux de souris Balb/c greffées. Disposant d'amorces spécifiques du chromosome Y, nous avons tenté de mettre au point de la FISH selon le protocole de Donadoni (Donadoni *et al.* 2004). Aucun résultat probant n'ayant

été obtenu nous avons choisi d'effectuer la suite des expérimentations en utilisant des souris exprimant la GFP de façon constitutive comme animaux donneurs.

C'est pour cette raison technique que les études immunohistochimiques préliminaires ont été réalisées sur les coupes de cerveau issues des souris Balb/c femelles greffées par des CMO de mâles GFP, malgré la faible quantité de matériel disponible concourant à l'impossibilité de réaliser des études statistiques. Les résultats obtenus par cette technique restent donc exclusivement descriptifs et demandent à être confirmés sur une plus large population. Grâce à cette stratégie, nous avons mis en évidence la possibilité qu'ont les CMO ou des cellules dérivées d'exprimer, après greffe, des marqueurs spécifiques de plusieurs lignées cellulaires, telle que CD31 caractéristique des cellules endothéliales, NeuN protéine neuronale, GFAP exprimée par les astrocytes et par les précurseurs neuraux et CNPase, enzyme contribuant à la synthèse de la myéline et qui est caractéristique des cellules de Schwann dans le système nerveux périphérique et des oligodendrocytes dans le SNC. Chez les deux animaux étudiés, la proportion de cellules doublement marquées est faible (Tableau 11), néanmoins ces résultats suggèrent la possible différenciation des cellules issues de la greffe confortant l'hypothèse de la trans-différenciation évoquée dans de nombreuses études. Ainsi Woodbury *et al.* ont démontré que les cellules mésenchymateuses de la MO mises en culture peuvent arborer un phénotype neuronal sous certaines conditions expérimentales (Woodbury *et al.* 2000). Les cellules ainsi mises en culture expriment des protéines spécifiques telles que NeuN, neurofilament-M ou encore tau. D'autres études *in vitro* sont venues étayer cette hypothèse (Levy *et al.* 2003; Kondo *et al.* 2005; Wislet-Gendebien *et al.* 2005; Mizobe *et al.* 2006; Song *et al.* 2008). D'autres, comme Mezey *et al.*, ont montré la capacité de ces cellules de se "différencier" *in vivo* en cellules exprimant NeuN (Mezey *et al.* 2000; Corti *et al.* 2002; Mezey *et al.* 2003). Dans leurs études ces auteurs ont montré que certaines CMO exprimaient la GFAP, ou encore des marqueurs spécifiques de la microglie tel que F4/80 (Eglitis *et al.*

1997). Le marqueur majoritaire lors de doubles marquages restant cependant celui des cellules endothéliales. Dans notre étude, nous constatons également qu'une faible proportion de CMO exprime des marqueurs spécifiques de cellules non mésenchymateuses, tels que NeuN, GFAP ou encore CNPase. Nos résultats sont donc en accord avec ces auteurs. Que les cellules se transdifférencient une fois implantées dans l'encéphale n'est pourtant pas la seule hypothèse expliquant cette évolution de phénotype chimique. En effet, l'hypothèse d'une fusion entre les cellules greffées et les cellules hôtes reste encore à approfondir. Beaucoup d'auteurs s'accordent sur ce point (Terada *et al.* 2002; Vassilopoulos *et al.* 2003) et mettent en évidence la capacité de fusion des cellules issues de la MO avec des cellules souches embryonnaires *in vitro*, cette fusion spontanée des cellules conduisant les cellules issues de la MO à exprimer le phénotype des cellules hôtes. Ce phénomène de fusion des cellules mésenchymateuses avec d'autres a été mis en évidence dans différents organes comme le foie (Vassilopoulos *et al.* 2003; Wang *et al.* 2003), le cœur ou même le SNC (Alvarez-Dolado *et al.* 2003). Ces phénomènes de fusion ne sont d'ailleurs pas restreints aux seuls CSM mais ont été mis en évidence pour d'autres types cellulaires comme les cellules souches embryonnaires (Ying *et al.* 2002; Horvath *et al.* 2006), les cellules souches hématopoïétiques (Cogle *et al.* 2004; Nygren *et al.* 2004) ou les cellules souches neurales (Jessberger *et al.* 2007). Nos études ne nous permettent pas, à ce stade, de pencher en faveur de l'une ou l'autre des hypothèses, puisque nous n'avons pas analysé le matériel nucléaire des CMO implantées.

Certains auteurs n'adhèrent à aucune de ces deux hypothèses, réfutant la possibilité d'évolution du phénotype chimique des CMO greffées (Castro *et al.* 2002; Ono *et al.* 2003; Vallieres *et al.* 2003). Ils s'accordent sur la préservation des capacités hématopoïétiques des CMO greffées. Cette discordance d'opinion entre tous tient probablement à des différences de protocoles, tant au niveau des modèles animaux que des techniques de repérage et d'identification des CMO greffées. D'ailleurs, dans leur revue, Price et Williams mettent en

avant les divers travaux réalisés dans le domaine de la plasticité des cellules souches issues de tissus adultes, principalement les cellules souches neurales (Price *et al.* 2001). Tous ces travaux confortent l'existence d'une capacité d'évolution des phénotypes chimiques des cellules souches issues de tissus adultes. De plus, la transplantation de cellules issues de la MO chez des rats lésés ou ischémiés conduit à une amélioration des capacités sensorimotrices diminuées (Norflus *et al.* 1998; Chen *et al.* 2001; Jeong *et al.* 2003; Chu *et al.* 2004; Yoo *et al.* 2008).

Pour nos travaux de thèse, l'utilisation d'un modèle de cultures organotypiques de cerveau a été choisi car présentant le double avantage des modèles *in vivo* (conservation de la structure et des connexions) et *in vitro* (contrôle des conditions de culture). Ces modèles sont également plus commodes pour l'analyse des interactions entre les cellules greffées et le tissu nerveux. Cette approche *in vitro* permettra, outre l'analyse des phénomènes de transdifférenciation cellulaire évoqués précédemment, des études sur les effets d'une transplantation sur du tissu nerveux dans des conditions contrôlées.

2ème partie : Modèles d'étude *in vitro*

Les études préliminaires nous ayant confirmé dans les capacités des CMO à migrer, survivre et se différencier dans l'encéphale, nous avons décidé de mettre en place un modèle d'étude des comportements cellulaires *in vitro*. Pour cela nous avons choisi l'utilisation de cultures organotypiques d'hippocampe qui permet la conservation de la structure tridimensionnelle du tissu. Cette technique relativement ancienne (Stoppini *et al.* 1991; Gahwiler *et al.* 1997) peut être utilisée pour de nombreuses études concernant la survie de populations neuronales, les dommages neuronaux, la neuroprotection, la neurogenèse ou encore la transmission synaptique (Bayer *et al.* 1999; Noraberg *et al.* 1999; Mulholland *et al.* 2004; Raineteau *et al.* 2004; Chechneva *et al.* 2005; Laskowski *et al.* 2005). Des études développementales peuvent également être réalisées, puisque conservant la circuiterie neuronale locale, les interactions neuronales et gliales et la capacité à former de nouvelles synapses avec d'autres régions cérébrales quand elles sont cultivées ensemble (Lyng *et al.* 2007). Elle permet de mimer des atteintes du système nerveux central comme l'ischémie (Pringle *et al.* 1996; Pringle *et al.* 1997; Cavaliere *et al.* 2005) ou la maladie de Parkinson (Neely *et al.* 2007). Depuis quelques années ce modèle a été utilisé pour étudier les interactions entre le tissu nerveux et les cellules souches (Tabatabai *et al.* 2005; Anwar *et al.* 2008) dont les cellules de moelle osseuse, plus particulièrement les cellules souches stromales – ou mésenchymateuses (Wehner *et al.* 2003; Zhong *et al.* 2003; Abouelfetouh *et al.* 2004; Mizobe *et al.* 2006; Kamei *et al.* 2007). Bien qu'au sein de notre laboratoire la culture de tranches d'hypothalamus soit maîtrisée (Bayer *et al.* 1999), nous avons choisi l'utilisation de l'hippocampe. D'une part parce que ce système est connu en détail, d'autre part parce que possédant une zone de neurogenèse conservée chez l'adulte. Enfin car ces zones peuvent être retrouvées dans un système de culture organotypique (Chechneva *et al.* 2005).

I. COMPORTEMENT DES CELLULES GREFFÉES

Nous avons ainsi mis en place un modèle de « greffe » sur tranche, les cellules étant déposées à la surface de cette dernière. La reproductibilité de la technique et la capacité de survie des cellules transplantées ont été vérifiées par comptage des cellules GFP positives sur et en dehors de la tranche en fonction du temps, permettant la validation de notre modèle d'étude.

I.1 Survie des cellules sur les tranches

Nous avons tout d'abord utilisé la fraction cellulaire totale issue de la moelle osseuse puisque les résultats préliminaires ont été obtenus de cette sorte. Dans nos expériences, 10 000 cellules ont été déposées dans 2 μ L de milieu, permettant de recouvrir la totalité de la surface de la tranche. Le nombre de cellules effectivement transplantées sur l'hippocampe ou fixées sur la membrane autour du tissu a été compté trois jours après la greffe. Une grande majorité des cellules ont disparu et seules quelques dizaines ont survécu, représentant environ 1% du total déposé. Le nombre de cellules restant sur le tissu nerveux ou la membrane est de l'ordre de grandeur de la fraction de CSM de la moelle osseuse (compris entre 1% à 1‰). Ce nombre reste stable au cours du temps, confirmant la capacité de survie des CMO sur du tissu nerveux en culture, de la même façon qu'*in vivo* après injection périphérique.

Il est ensuite apparu important de sélectionner les cellules afin d'éliminer une partie des contaminants hématopoïétiques, des progéniteurs déjà engagés dans une voie de différenciation, des cellules matures et pour enrichir la fraction cellulaire en cellules souches. Leur propriété d'adhérence au plastique des CSM, initialement décrite par Friedenstein en 1976 (cité par (Prockop 1997)) et un milieu de culture simple furent utilisés (Krampera *et al.* 2003). Après avoir vérifié leur multipotence par induction de leur différenciation en adipocytes et en ostéocytes, les mêmes expérimentations que celles décrites pour la fraction totale de MO ont été réalisées. Après 3 jours de mise en contact entre les CMOAP5 et les

cultures organotypiques, 171.7 ± 18.9 CMOAP5 GFP+ ont été comptées sur le total déposé, soit environ 1% des cellules greffées. Ce chiffre correspond à celui trouvé pour les expérimentations réalisées avec les CMO (168.9 ± 13.35). Par la suite il diminue pour atteindre 74.2 ± 5.7 dix jours après la greffe, ce qui représente une disparition de plus de la moitié des cellules, très certainement liée à des phénomènes de mort cellulaire par nécrose ou apoptose.

Afin de vérifier si la culture des CMOA avait un effet délétère sur leur survie au sein de la tranche, les mêmes expériences ont été réitérées mais en sélectionnant des CMOA à leur premier passage (CMOAP1). Trois jours après dépôt, le nombre de CMOAP1 présentes sur la tranche ou la membrane est près de deux fois plus élevé que celui des CMO ou des CMOAP5 dans les mêmes conditions (319.2 ± 28.79 , 171.7 ± 18.9 , 168.9 ± 13.35 respectivement). Comme pour la fraction non sélectionnée, ce chiffre reste stable jusqu'à 10 jours après la transplantation, confirmant l'hypothèse d'une influence de la culture sur la capacité de survie des CSM dans nos conditions expérimentales. Cependant, pour vérifier si le fractionnement des cellules présentes dans la moelle osseuse ne pouvaient pas induire ce changement de comportement, 5000 CMOAP5 issues de donneurs GFP+ ont été mélangées à 5000 CMO provenant de donneurs non GFP. De cette sorte, seules les CMOAP1 ont été suivies à la loupe à fluorescence en conservant l'éventuel effet des CMO. Il est apparu que le nombre de cellules GFP positives reste stable durant toute l'expérimentation : $156. \pm 14.49$ à 3 jours et 136 ± 16.61 à 10 jours, soit la moitié moins que pour les expériences réalisées avec les CMOAP1 non mélangées à des CMO. Précisons toutefois que le nombre de CMOAP1 dans le mélange CMOAP1/CMO était réduit de moitié par rapport à la fraction de CMOAP1 « pure » afin de conserver un nombre total de 10 000 cellules déposées sur les tranches. Les variations des taux de survie des CSM déposées sur les tranches d'hippocampe semblent donc plus liées à un effet néfaste de la culture (Figure 24, Figure 26, Figure 28).

Dans la littérature, il est précisé que, comme toutes les cellules somatiques, les CSM ont une durée de vie limitée en culture. Ce phénomène - qui se caractérise par des changements morphologiques et par un arrêt de la prolifération - a été mis en évidence dans les années 1960 par Léonard Hayflick (Hayflick 1965) et Bruder et al. ont ainsi évalué le nombre de doublement de la population à 40 avant l'entrée en sénescence (Bruder *et al.* 1997). Banfi *et al.* rapportent aussi l'effet de la culture sur les potentialités de ces cellules, notamment par une diminution de leurs capacités prolifératives et de différenciation en cellules de la lignée mésenchymateuse et ce, dès le premier passage (Banfi *et al.* 2000). Récemment, Wagner et al. ont étudié l'impact de l'expansion *in vitro* de CSM provenant de différents donneurs humains et rapporté que la sénescence répliquative des CSM était continue et débutait au premier passage en culture : le phénotype, les potentiels de différenciation et l'expression génique globale sont altérés (Wagner *et al.* 2008). De nombreuses études démontrent également la perte progressive de la longueur des télomères au fil des doublements de populations ou selon l'âge du donneur. Baxter et al. estiment que la perte de longueur des télomères est de 17 paires de bases par an chez l'homme et que, en culture, les divisions cellulaires sont stoppées quand les télomères atteignent 10 Kb (Baxter *et al.* 2004). D'autres s'accordent sur cette diminution de longueur en culture, bien qu'un désaccord existe quant à la taille initiale. Pour exemple, Bonab et al. trouvent une diminution de 9,6 Kb au premier passage à 8,7 au neuvième passage pour des donneurs de 25 ans de moyenne d'âge (Bonab *et al.* 2006). D'autres études ont comparé les taux de prolifération entre des CSM issues de donneurs jeunes et de donneurs âgés et il en ressort que les taux de prolifération sont inférieurs dans la première population, comparée à la seconde (Digirolamo *et al.* 1999; Banfi *et al.* 2000; Baxter *et al.* 2004; Zhou *et al.* 2008). Il en est de même pour la proportion de CSM (Baxter *et al.* 2004). En confrontant nos résultats avec les données de la littérature, nous pouvons supposer

que le nombre de passages en culture influence négativement les capacités de survie des CMOA au sein des tranches d'hippocampe en culture.

I.2 Migration / prolifération

Les expérimentations conduites avec la fraction de CMO ont montré que, bien que le nombre total de cellules reste stable tout au long de l'expérience, le nombre de cellules par tranche et autour varie considérablement. Ainsi nous avons pu dénombrer presque 3 fois plus de CMO sur les tranches à 10 jours post dépôt qu'à 3 jours. Cette augmentation considérable peut provenir soit d'une prolifération cellulaire massive, soit d'une migration des cellules de la périphérie vers le tissu nerveux. Les comptages réalisés sont en faveur de cette dernière hypothèse puisque le nombre de cellules sur les membranes diminue du 3^{ème} au 10^{ème} jour post greffe tandis que le total reste stable. Cependant nous ne pouvons pas exclure que la variation du nombre de cellules sur les tranches soit due à une prolifération des CMO comme illustré sur la Figure 23 et par le nombre de cellules sur la membrane qui ne diminue que d'un facteur 1.5. En ce qui concerne les fractions de CMOAP1 et de CMOAP1 / CMO cette tendance reste similaire à celle décrite ci-dessus, quoique moins marquée pour les CMOAP1 / CMO. A l'inverse, le nombre de CMOAP5 sur la tranche comme sur la membrane ne permet pas de conclure à une capacité de migration. Afin d'appuyer cette théorie, nous avons réalisé des cartographies correspondant à chacun des points comptés et avons pu observer l'agrégation des cellules de la périphérie vers la surface de la tranche sans qu'aucun effet trophique ne soit détecté (Figure 23). De plus, le faible nombre de cellules à la surface de la tranche ou en périphérie ainsi que le protocole de dépôt à la seringue Hamilton ont permis de suivre de petits groupes de cellules. Les analyses des images révèlent de petits changements de position plus que de réelles migrations, tant pour les CMOAP5 que pour les CMOAP1 (Figure 25 et Figure 27). Il est probable que, dans les modèles lésionnels ou ischémiés, les cellules soient attirées par des facteurs sécrétés par les zones endommagées. Bantubungi et al.

ont démontré une influence du SCF et de son récepteur c-kit dans les phénomènes de migration et d'implantation des CSM aux sites de lésions et *in vitro* (Bantubungi *et al.* 2008). D'autres travaux mettent en évidence l'implication de MCP-1 (monocyte chemo-attractant protein-1), MIP-1f (macrophage inflammatory protein-1f) et de l'interleukin-8 (IL-8) (Wang *et al.* 2002; Kan *et al.* 2005). Nos données préliminaires confirment la capacité migratoire des CMO et s'accordent à celles de la littérature qui la mettent en évidence dans des modèles de greffe de cellules souches mésenchymateuses *in vitro* (Sarnowska *et al.* 2009) ou après lésions *in vivo* (Azizi *et al.* 1998; Kopen *et al.* 1999; Zhao *et al.* 2002; Shichinohe *et al.* 2004; Yoo *et al.* 2008; Delcroix *et al.* 2009).

I.3 Différenciation

Les cellules qui ont survécu sur le tissu subissent clairement des changements morphologiques. Ainsi, après trois jours de co-culture, les CMO, CMOAP5 et CMOAP5 sont majoritairement petites et rondes sur le tissu. Plus tard, d'autres morphologies apparaissent (Figure 29). Deux types majoritaires ont été observés : des cellules rondes à fort diamètre et des cellules multipolaires de taille moyenne. La fraction de CMO est très hétérogène et contient des cellules multipotentes, des progéniteurs ou des cellules hématopoïétiques destinées à devenir, par exemple, des composants du système immunitaire. Certaines de ces cellules peuvent avoir des capacités de phagocytose pouvant expliquer le marquage cytoplasmique granulaire, peut être lysosomal, obtenu avec l'anticorps anti-NeuN dans certaines grosses cellules (Figure 30). De très rares cellules GFP positives exprimant NeuN ont été trouvées au cours de nos études, quelle que soit la fraction cellulaire utilisée. Ce résultat est à mettre en parallèle avec le faible nombre de cellules effectivement sur les tranches de tissu mais confirme cependant la possibilité d'une différenciation en cellules de type neurone, même à de très faibles proportions dans nos conditions. Le modèle de transplantation de CMO ou de CMOA provenant d'animaux modifiés pour exprimer la GFP

sous le contrôle du promoteur neurofilament (NF), donc exclusivement dans des neurones, n'a pas abouti non plus, allant dans le sens d'un très faible taux de différenciation ou de la trop courte durée de l'étude. Nous n'avons pu mettre en évidence d'autres évolutions des phénotypes chimiques dans ces conditions expérimentales.

Des études *in vivo* et *in vitro* rapportent la capacité d'évolution des cellules souches mésenchymateuses en divers types cellulaires *in vivo* ou *in vitro* comme des cardiomyocytes (Nygren *et al.* 2004), des hépatocytes, des cellules tubulaires rénales, des cellules épithéliales bronchiolaires, des myofibroblastes (Anjos-Afonso *et al.* 2004) aussi bien que des cellules neurales comme les neurones ou les cellules gliales (Prockop 1997; Kopen *et al.* 1999; Petersen *et al.* 1999; Brazelton *et al.* 2000; Sanchez-Ramos *et al.* 2000; Woodbury *et al.* 2000; Reyes *et al.* 2001; Jiang *et al.* 2002b; Woodbury *et al.* 2002; Zhao *et al.* 2002; Jiang *et al.* 2003; Levy *et al.* 2003; Wislet-Gendebien *et al.* 2003; Hermann *et al.* 2004; Gregory *et al.* 2005; Deng *et al.* 2006; Fu *et al.* 2006; Kim *et al.* 2006; Shiota *et al.* 2007). D'autres équipes démontrent qu'elles en acquièrent également les caractéristiques fonctionnelles (Cho *et al.* 2005; Wislet-Gendebien *et al.* 2005; Tropel *et al.* 2006; Trzaska *et al.* 2007a).

Nos résultats, tant *in vivo* qu'*in vitro* confirment la possibilité d'évolution des phénotypes chimiques des CMO et des CMOA. Le faible taux de doubles marquages GFP/NeuN obtenu peut également être mis en parallèle avec la courte durée des analyses effectuées. La rareté de ces événements ne peut, quoiqu'il en soit, expliquer les réelles améliorations des scores neurologiques observés dans des modèles *in vivo* de lésions du système nerveux central (Chen *et al.* 2001; Zhao *et al.* 2002; Mahmood *et al.* 2005; Mahmood *et al.* 2006).

II. REACTION DU TISSU NERVEUX A L'APPORT DE CELLULES

II.1 Etude en immunofluorescence

Les études effectuées pour apprécier les potentialités des CMO en termes de différenciation n'ont pas abouti aux résultats escomptés, cependant les analyses immunohistochimiques réalisées ont révélé des différences dans la qualité du marquage obtenu. Pour les tranches ayant reçu un apport de cellules issues de la MO nous avons constaté la présence de fibres jusqu'à 10 jours après dépôt, tandis que sur les témoins elles n'étaient quasiment plus visibles. Le même résultat a été obtenu avec l'anticorps anti-NeuN (Figure 35). Aucune différence n'a été constatée pour la fraction CMOAP5.

Le logiciel AnalySIS permet de quantifier le marquage après seuillage de l'intensité de fluorescence. Cette analyse a été réalisée après greffe de CMOAP1. Les résultats obtenus sont probants puisqu'une différence significative est obtenue après 3 et 10 jours de contact tranches / CMOAP1 par rapport aux témoins (14.88 ± 3.85 % vs 3.56 ± 1.53 % et 0.16 ± 0.08 % vs 3.029 ± 0.5 % respectivement). La même différence a été observée avec le marquage NeuN quoique moins accentuée et non significative 10 jours après-dépôt (Figure 36). Ces résultats suggèrent une action bénéfique des CMOAP1 sur les tranches d'hippocampe en culture. Les données de la littérature s'accordent avec nos résultats puisque l'effet bénéfique des CSM a également été démontré *in vitro* (Zhong *et al.* 2003; Sarnowska *et al.* 2009).

II.2 Etude des taux d'expression des ARN messagers

Etant donné la limite des analyses de fluorescence, nous avons décidé de mettre en œuvre des études permettant de quantifier, en référence à un gène de ménage, les taux d'expression de différents ARNm : CNPase, NF, β III-tubuline et GFAP. Le premier paradigme expérimental ne nous semblant pas fiable, à savoir le dépôt direct sur les tranches et l'extraction des ARN totaux tranches + cellules, nous avons mis en place un modèle de co-culture dans lequel les CMO ou les CMOAP5 étaient cultivées au fond de la boîte de Pétri et les tranches sur la membrane. De cette sorte nous pouvions extraire exclusivement les ARN issus des tranches d'hippocampe. Les effets observés ne pouvant provenir que de facteurs solubles sécrétés. Cependant, les CMO non adhérentes étant éliminées en grande majorité au premier changement de milieu, cette fraction fut considérée comme étant équivalente à la fraction CMOAP1. Au quatrième jour de co-culture, les taux d'expression des ARNm CNPase, NF, β III-tubuline sont significativement plus élevés pour les tranches qui ont été co-cultivées avec des CMOAP1 que les contrôles, mais ne varient pas significativement pour les études avec les CMOAP5, s'accordant aux précédents résultats (survie, migration / prolifération) et confirmant l'hypothèse d'une influence néfaste de la culture préalable des CMOA (Figure 37).

II.3 Etude de la mort cellulaire

Afin de déterminer si les CMOAP1 avaient une action bénéfique sur la mort cellulaire se produisant au cours des cultures organotypiques, nous avons utilisé une technique de coloration à l'iodure de propidium. Ce composé s'intègre dans les cellules dont l'intégrité de la membrane plasmique est détériorée et se lie aux acides nucléiques, ce qui provoque sa fluorescence. Il n'est pas toxique pour les neurones viables et est classiquement utilisé comme indicateur de viabilité cellulaire, y compris pour les cultures organotypiques (Noraberg *et al.*

1999). Les mesures de fluorescence ont été effectuées 24 heures, 72 heures ou 7 jours après le début des co-cultures et ont révélé une diminution significative de la mort cellulaire des tranches traitées par les CMOAP1 par rapport aux témoins, pouvant aller jusqu'à un facteur trois à 72 heures (Figure 38). Ces données confirment l'effet bénéfique des CMOAP1 pour le tissu nerveux en culture, sans qu'un contact direct ne soit nécessaire. Il ne nous est cependant pas possible de déterminer si cet effet correspond à une diminution de l'apoptose, l'iodure de propidium ne permettant pas de discriminer cette voie de mort cellulaire.

L'action neuroprotectrice des CSM est bien illustrée *in vivo* et *in vitro* et les effets thérapeutiques consécutifs à leur utilisation sont expliqués par leur capacité à promouvoir la neurogenèse endogène, la pousse neuritique et axonale et à protéger les cellules néoformées d'un environnement délétère (Chen *et al.* 2003a; Crigler *et al.* 2006; Shichinohe *et al.* 2008; Vercelli *et al.* 2008; Yoo *et al.* 2008). Une étude clinique a également prouvé la faisabilité et l'efficacité potentielles d'injections intraveineuses de CSM autologues chez des patients ayant subi une ischémie cérébrale (Bang *et al.* 2005). Les données de la littérature indiquent également que les CSM ont une action réparatrice sur le tissu nerveux par la sécrétion de facteurs solubles incluant BDNF (brain-derived neurotrophic factor), bFGF (basic fibroblast growth factor) et NGF (nerve growth factor) (Mahmood *et al.* 2004; Crigler *et al.* 2006) plus que par une réelle différenciation suivie d'un remplacement cellulaire (Phinney 2007; Ohtaki *et al.* 2008), s'accordant avec les résultats obtenus au cours de notre étude.

3ème Partie : Caractérisation des fractions cellulaires

I. HETEROGENEITE DES FRACTIONS CELLULAIRES

La MO est un tissu très hétérogène qui comprend les cellules souches hématopoïétiques et leurs cellules de soutien, mais aussi leurs descendances. Il a été démontré par différentes équipes que les CSM pouvaient être sélectionnées par leur capacité d'adhérence au plastique. Friedenstein rapporte que, parmi les cellules issues de la moelle osseuse, un faible contingent adhère au support. Ces cellules, d'abord hétérogènes, se mettent à proliférer après une phase de dormance de 2 à 4 jours et prennent alors un aspect fibroblastique (Friedenstein *et al.* 1976). Pittenger *et al.* utilisent des CSM humaines caractérisées par leur capacité d'adhésion au plastique, de prolifération, leur morphologie ainsi que par des marqueurs de surface, les contaminants hématopoïétiques étant enlevés par rinçage du milieu de culture (Pittenger *et al.* 1999). D'autres équipes ont également utilisé cette propriété pour isoler les CSM humaines (Colter *et al.* 2000; Muraglia *et al.* 2000) et Tondreau *et al.* ont montré, en comparant ce type de sélection avec des immunodéplétions, qu'il était nécessaire de procéder à au moins 3 passages pour obtenir une fraction de CSM humaines homogènes avec un niveau de pureté satisfaisant (Tondreau *et al.* 2004a).

Dans les différentes populations cellulaires utilisées au cours de notre étude, nous avons constaté de nombreuses variations des niveaux d'expression des ARNm potentiellement impliqués dans les voies de signalisation des cellules souches ou les voies de différenciation en ostéocytes, adipocytes, chondrocytes, cellules endothéliales ou encore cellules vasculaires musculaires lisses.

Plus de la moitié des gènes considérés comme associés aux cellules souches ont un niveau d'expression plus élevé dans les CMOAP5 que dans les CMO (11/20). Ces augmentations sont observables également entre les fractions CMOAP1 et CMOAP5. Seuls 8 sont plus exprimés par les CMOAP1 que par les CMO. Parmi les gènes étudiés, certains sont caractéristiques des CSM, comme *Alcam*, *Anxa5*, *CD44*, *Itgb1*, *Mcam*, *Nt5e* et *Pdgfrb* et leur niveau d'expression est plus important dans la fraction de CMOAP5 que dans la fraction de

CMO et / ou de CMOAP1. D'autres sont plus spécifiques des cellules souches hématopoïétiques, comme CD45 (=Ptprc) et son expression diminue fortement dans la fraction CMOAP5 comparée aux deux autres fractions cellulaires étudiées. Cependant certains gènes potentiellement associés aux cellules souches mésenchymateuses, comme Alcam, Anpep, Icam1 et Vcam sont moins exprimés par CMOAP5 que par CMOAP1 et Notch1, qui est plutôt exprimé par les CSH, l'est plus dans les CMOAP5 que dans les CMOAP1. Enfin nous avons observé une augmentation de l'expression par les CMOAP5 de gènes impliqués dans les voies de signalisation de plusieurs types de cellules souches : Fgf2, Lif, Ngfr et Sox2.

Des travaux rapportent la capacité d'adhérence des précurseurs hématopoïétiques dans les cultures de CSM murines. Ainsi Simmons *et al.* ont-ils mis en évidence la capacité des CSH humaines à se lier au support stromal en culture grâce à des molécules d'adhésion (Simmons *et al.* 1992) et les travaux de Phinney démontrent, en plus d'une grande variabilité selon la souche murine utilisée, que des contaminants lymphohématopoïétiques subsistent dans les cultures jusqu'à 20 jours de culture, comprenant au moins 1 passage (Phinney *et al.* 1999). De plus les CSM murines perdent leur capacité de prolifération et de différenciation dans les cultures de longue durée (Banfi *et al.* 2000; Sekiya *et al.* 2002), ce qui rend l'obtention d'une culture de CSM homogène par leur propriété d'adhérence au plastique difficile. Certaines équipes ont cependant optimisé des protocoles afin de pallier cet inconvénient (Meirelles Lda *et al.* 2003; Tropel *et al.* 2004; Sung *et al.* 2008).

Aux vues de nos résultats et des données de la littérature, il semblerait ainsi que notre protocole de culture puisse entraîner un léger phénomène de sélection des CSM quand le nombre de passages est suffisant mais nous pouvons également supposer que la fraction CMOAP5 n'est pas homogène mais constituée de CSM, de cellules plus ou moins différenciées selon la lignée mésenchymateuse (ostéocytes, adipocytes, chondrocytes) et très probablement de cellules de type hématopoïétique.

II. CMOAP5 : UNE FRACTION ENRICHIE EN CELLULES SOUCHES

II.1 Fgf2, Lif et Sox2

Au cours de nos études, nous avons pu mettre en évidence l'augmentation significative des niveaux d'expression des ARNm de Fgf2, Lif et Sox2 selon les passages en cultures (Résultats, 3ème Partie : Caractérisation des fractions cellulaires) or ces gènes sont impliqués dans le maintien de la pluripotence des cellules souches embryonnaires (Niwa 2001; Burdon *et al.* 2002; Friel *et al.* 2005) et sont mitogéniques. Il a par ailleurs été démontré que les CSM murines sélectionnées par adhérence préférentielle au plastique puis par immunodéplétions (anti-CD11b, anti-CD34 et anti-CD45) perdent leur capacité de prolifération. Ce phénomène peut être pallié par apport de Fgf2 et de Lif au milieu de culture (Baddoo *et al.* 2003). Plus récemment il a été démontré que Fgf2 et Fgf4 stimulent la prolifération des CSM Sca1 positives (Choi *et al.* 2008) et que Lif pouvait être un marqueur des progéniteurs précoces des CSM (Whitney *et al.* 2009). Nos résultats, conformément aux données de la littérature, suggèrent donc que la fraction CMOAP5 est effectivement enrichie en progéniteurs précoces, comparée aux deux autres fractions cellulaires.

II.2 Bdnf, nestine, Ngfr et CD44

Certaines variations étaient attendues, comme l'augmentation des niveaux d'expression des messagers de Bdnf (Brain derived neurotrophic factor), Nes (nestine) et CD44 puisqu'ils semblent participer aux améliorations fonctionnelles observées après greffe de CSM dans des modèles lésionnels du SNC ou pour induire des différenciations en cellules nerveuses. Cultivées dans un milieu enrichi en BDNF et en acide rétinoïque, les CSM murines Sca1+ expriment des marqueurs neuraux précoces tels que Nestine, GFAP ou NeuN (Sanchez-

Ramos *et al.* 2000). L'expression de BDNF semble cependant restreinte à certaines sous populations de cellules souches mésenchymateuses. En co-culture avec des neuroblastomes traités par du glutamate, le taux de survie neuronale est directement corrélé aux niveaux de BDNF sécrétés ; l'immunoneutralisation du BDNF ne suffit pas à empêcher cette action neuroprotectrice, ce qui suggère que ce facteur de croissance y contribue sans être suffisant (Crigler *et al.* 2006). L'amélioration des taux de survie a également été mise en évidence lors de co-culture de CSM exprimant BDNF et de neurones fœtaux (Hokari *et al.* 2008). Après mise en contact de tranches de cortex et de moelle épinière avec des CSM de rat, la croissance axonale est augmentée, par rapport aux tranches contrôles. Les CSM de ce modèle expriment différents facteurs de croissance, dont BDNF (Kamei *et al.* 2007). L'expression de nestine est un marqueur précoce de différenciation neuronale et certaines études révèlent qu'il est nécessaire que les CSM l'expriment avant aboutir à la différenciation en neurones matures fonctionnels (Wislet-Gendebien *et al.* 2005). CD44 est une protéine de surface capable de s'associer au cytosquelette et à la matrice extracellulaire. Elle interviendrait dans l'activation des lymphocytes, l'hématopoïèse, la migration cellulaire, la guidance axonale et la formation des métastases (Ponta *et al.* 1998). C'est par ailleurs un marqueur classique des CSM (Baddoo *et al.* 2003; Meirelles Lda *et al.* 2003; Nadri *et al.* 2007; Sung *et al.* 2008; Taha *et al.* 2010; Valorani *et al.* 2010).

Au vu de nos résultats et des données de la littérature, il est surprenant qu'aucun effet n'ait été mis en évidence concernant la neuroprotection des tranches cocultivées avec des CMOAP5, même si notre étude reste au niveau des transcrits et non des protéines. L'expression accrue du messenger du récepteur au NFG (Nerve growth factor) dans cette fraction suggère par ailleurs que les CMOAP5 pourraient être sensibles aux facteurs sécrétés par le tissu nerveux ; le dosage du NGF pourrait apporter des éléments de réponse à cet égard.

III. CMOAP1 : UNE FRACTION CELLULAIRE PROTECTRICE POUR LE TISSU NERVEUX EN CULTURE

Au cours de nos études, nous avons mis en évidence une différence d'effet des cellules sur le tissu nerveux selon la fraction cellulaire utilisée, avec un effet moindre des CMOAP5 alors que nous nous attendions à une amélioration de la survie des cultures organotypiques en contact ou en co-culture avec celles-ci.

Nous nous sommes alors intéressés aux autres variations observées, principalement à celles qui mettaient en évidence un niveau d'expression plus élevé au sein de la fraction CMOAP1 car certains de ces gènes sont impliqués dans des processus physiologiques telles l'angiogenèse, la neurogenèse, la diminution de la mort neuronale ou encore la croissance neuritique. La plupart des histogrammes (voir Annexe 1) reflétant ces variations ont un aspect en cloche, c'est-à-dire que les taux d'expression des messagers sont significativement plus faibles pour les CMO et pour les CMOAP5, comparativement aux CMOAP1. A noter l'exception du gène de la caspase 3, très exprimé dans les CMO, moins dans les CMOAP5 et très faiblement dans les CMOAP1.

III.1 Expression de Casp3

L'apoptose sert principalement à maintenir l'homéostasie tissulaire via une balance morts cellulaires / prolifération. La caspase 3 (Cysteinylyl Aspartate-specific proteinase) tient un rôle majeur dans cette machinerie (Nicholson 1999) et il a été démontré qu'il existait un lien important entre les voies de mort cellulaire et le développement des cellules souches embryonnaires, notamment par une régulation négative de l'autorenouvellement de celles-ci, conduisant à des différenciations cellulaires (Miura *et al.* 2004; Fujita *et al.* 2008). Dans notre modèle de culture, le messager de Casp 3 est plus faiblement exprimé dans les CMOAP1 que dans les deux autres fractions cellulaires. Dans la fraction totale de MO de nombreuses

cellules peuvent être engagées sur la voie de l'apoptose ou de la différenciation. Les cellules non viables sont ensuite éliminées par les changements de milieux de culture puisque non adhérentes, ce qui peut expliquer la chute significative des taux d'expression du messager. La légère augmentation observée avec les CMOAP5 peut provenir de l'engagement apoptotique de cellules ayant achevé leur maturation.

III.2 Anpep, VEGFa : angiogénèse

Anpep (alanyl aminopeptidase) est une métallo protéase largement exprimée dans l'organisme, y compris dans le cerveau, où elle participerait au métabolisme des neuropeptides relargués aux terminaisons nerveuses (achèvement de la maturation et/ou inactivation) (Roques 2000; Noble *et al.* 2001). Son expression dans les cellules endothéliales suggèrent aussi un rôle dans l'angiogénèse (Sato 2004).

L'expression de VEGFa (Vascular endothelial growth factor a) est régulée à tous les niveaux possibles (transcription, stabilité du messager, traduction) ; elle est fortement impliquée dans l'*angiogénèse* et dans les processus tumoraux (Grepin *et al.* 2009). En plus de ces rôles, le VEGF est impliqué dans la neurogénèse adulte et la neuroprotection (Lee *et al.* 2009a) ; il constitue une cible thérapeutique importante pour traiter les accidents vasculaires cérébraux (Navaratna *et al.* 2009). Pour exemple, dans un modèle d'ischémie focale transitoire murin, il a été démontré que ce facteur de croissance diminue le volume de la zone ischémisée, améliore les scores neurologiques et diminue les cellules TUNEL positives, en coïncidence avec une diminution de l'expression de caspase 3 (Wang *et al.* 2005). De plus il augmente la prolifération des progéniteurs présents dans la zone sous-ventriculaire et le gyrus denté. En surexprimant le VEGF chez la souris, la croissance dendritique de neurones corticaux nouvellement générés est améliorée (Wang *et al.* 2009b).

Nos résultats révèlent une augmentation de l'expression de Vegfa et de Anpep pour la fraction CMOAP1 par rapport à CMOAP5. Corrélés aux données de la littérature, nous pouvons

supposer que l'expression de ces deux facteurs a un rôle dans la différence d'effet observé sur les tranches d'hippocampe en culture, à savoir une expression plus forte des marqueurs NF et NeuN après la mise en contact avec des CMOAP1 qu'avec des CMOAP5 et une amélioration de la viabilité cellulaire suite à la mise en présence des tranches avec CMOAP1 (marquage à l'iodure de propidium).

III.3 Alcam, Tnf, Igf1 et Hgf

Alcam (Activated leucocyte cell adhesion molecule = CD166) est une glycoprotéine appartenant à la super famille des immunoglobulines. En plus de son expression dans les CSM, on la trouve dans le SNC. Chez les poissons zèbre cette protéine est fonctionnellement impliquée dans la croissance et la guidance des axones des cellules ganglionnaires de la rétine (Stuermer *et al.* 2000) ainsi que de leur différenciation (Diekmann *et al.* 2009). Chez le poulet, CD166 pourrait être impliquée dans l'extension d'axones moteurs spinaux, d'autant plus que l'utilisation d'un anticorps anti-CD166 inhibe la croissance neuritique (DeBernardo *et al.* 1995; DeBernardo *et al.* 1996). Chez la souris il semble néanmoins que cette protéine ne soit pas essentielle *per se* pour le développement des axones des cellules ganglionnaires (Buhusi *et al.* 2009).

Les messagers de certains facteurs de croissance - jouant classiquement un rôle important dans les phénomènes de neurogenèse - sont fortement exprimés dans les CMOAP1. Le tumor necrosis factor (TNF) influence la survie neuronale, la prolifération cellulaire, la régulation des cellules immunitaires et la tumorigenèse (MacEwan 2002b; MacEwan 2002a). Dans le SNC son rôle semble conflictuel et dépendrait de ces récepteurs TNF-R1 et TNF-R2. Dans un modèle *in vitro* Marchetti *et al.* ont démontré que le signal médié par TNF via son récepteur TNF-R1 protège les neurones corticaux des dommages causés par du glutamate (Marchetti *et al.* 2004) alors que Iosif *et al.* ont récemment mis en évidence un effet suppresseur de la prolifération des cellules de la SVZ après ischémie (Iosif *et al.* 2008) ; l'inhibition du TNF par

utilisation d'un antagoniste diminue les zones d'ischémie mais abolit la neurogenèse hippocampale (McCoy *et al.* 2008).

L'hippocampe exprime également les récepteurs à l'IGF1 (Insulin like growth factor 1) qui favorise la neurogenèse et la synaptogenèse dans l'hippocampe adulte (Aleman *et al.* 2009; Lee *et al.* 2009a) et initie la spécification axonale de même que l'établissement de la polarité neuronale (Sosa *et al.* 2006). Ce facteur de croissance semble être un modulateur important des fonctions supérieures cérébrales (cognition) (Torres-Aleman 2010).

Akimoto *et al.* ont démontré l'existence du récepteur c-met à l'hepatocyte growth factor (HGF) dans l'hippocampe, avec une localisation dendritique majoritaire. Ce récepteur est hautement phosphorylé et l'application de HGF augmente à la fois la LTP (Long term potentiation) et les courants entrant induits par le NMDA (N-méthyl-D-aspartate), suggérant l'importance fonctionnelle de cette voie de signalisation (Akimoto *et al.* 2004). HGF et c-met sont également exprimés le long du rostral migratory stream (de la zone sous-ventriculaire aux bulbes olfactifs) et des modèles *in vitro* indiquent un effet attractif et inductif sur les neuroblastes de cette zone (Garzotto *et al.* 2008). D'autres études mettent en évidence l'implication de ce facteur dans la croissance des neurites, la neurogenèse, l'angiogenèse, la tumorigenèse et de façon plus générale dans les processus développementaux (pour revues : Maina *et al.* 1999; Abounader *et al.* 2005).

Comme dans le paragraphe précédent, ces différentes molécules sont plus exprimées par la fraction CMOAP1 que par les deux autres. Mise en contact avec les tranches de tissu nerveux, cette fraction cellulaire pourrait améliorer la croissance dendritique (CD166), la neurogenèse (IGF1, HGF) et la synaptogenèse (IGF1). La nette amélioration de la conservation des cultures organotypiques (notamment en ce qui concerne les marqueurs NF et NeuN) dans nos modèles avec mise en présence de CMOAP1 pourraient être liées à ces augmentations d'expression, et pallier à la plus faible expression des facteurs BDNF ou nestine

classiquement impliqués dans des mécanismes neuroprotecteurs. Il reste à déterminer si TNF à un rôle protecteur ou non dans nos conditions expérimentales.

III.4 Interleukine 10

L'interleukine 10 (IL-10) est une cytokine pléiotropique anti-inflammatoire majeure, produite principalement par les macrophages. Elle est aussi fortement exprimée par la microglie et les astrocytes et inhibe la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (comme l'interféron gamma). De nombreuses études mettent en évidence son rôle protecteur lors de lésions du SNC (Schroeter *et al.* 2005; Planas *et al.* 2006).

Il-10 est induite dans le SNC suite à des traumatismes cérébraux ou des ischémies. Il a été démontré que cette cytokine atténue la réactivité astrogliale de façon dose-dépendante, diminue la réactivité des macrophages/microglie et l'élévation du TNF- α consécutive à une lésion corticale (Balasingam *et al.* 1996). Dans des modèles d'ischémies focales ou globales, l'IL-10 endogène ou exogène, provoque une diminution de la zone d'ischémie par rapport à des animaux non traités (Spera *et al.* 1998; Ooboshi *et al.* 2005; de Bilbao *et al.* 2009). Ces effets protecteurs pourraient être liés à une diminution de l'expression de TNF- α et de IL-1 β ainsi qu'à une augmentation de NGF et de glutathione, voire à un effet neuroprotecteur direct. De Bilbao *et al.* ont noté que l'expression de la caspase 3 était réduite de 18% chez des animaux ischémiés surexprimant IL-10 par rapport aux animaux contrôles ; d'autre part elle inhibe l'augmentation de la liaison de NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) à l'ADN médiée par le glutamate, dans un modèle *in vitro* de mort neuronale (Bachis *et al.* 2001). L'interleukine 10 préserve également les fonctions nigrostriatales de rats exposés à la neurotoxine 6-OHDA : les déficits moteurs sont réduits, la perte des neurones dopaminergiques et la déficience en dopamine sont significativement diminuées (Johnston *et al.* 2008).

Nos résultats montrent augmentation des taux d'expression du messager de l'IL10 dans les CMOAP1 et sont donc très cohérents avec l'effet favorable de ces cellules sur les cultures de tranches. Deux études récentes suggèrent par ailleurs que les améliorations fonctionnelles et structurelles consécutives à une injection de CSM à des animaux ischémiés pourraient être liées à l'augmentation de l'expression de cette cytokine (Liu *et al.* 2009; Li *et al.* 2010a).

III.5 Super-famille du TGF- β

Les facteurs de croissance appartenant à la super-famille du TGF- β sont impliqués dans des événements majeurs du développement. Elle est subdivisée en plusieurs sous-familles : GDNF, Activine, TGF- β , groupe DVR (qui comporte aussi les BMP) et GFD-15/MIC (Kriegstein *et al.* 2002). Nous avons observé des taux d'expression significativement plus élevés dans la fraction CMOAP1 que dans les deux autres pour les ARNm *Tgfb3*, *Bmp2*, *Bmp4*, et *GDF15*. L'expression de *Bmp6* n'est pas significativement différente entre CMO et CMOAP1. Toutes les protéines issues de ces messagers appartiennent à la super famille des TGF- β .

III.5.1 Transforming growth factor beta 3

Tgfb3 (Transforming growth factor beta 3) fait partie de la sous famille TGF- β . Dans des modèles *in vitro* et *in vivo*, il a été démontré que ce facteur induit la survie neuronale en association avec GDNF et coopère avec Shh pour induire la différenciation de cellules embryonnaires du mésencéphale ventral en neurones dopaminergiques (Peterziel *et al.* 2002; Farkas *et al.* 2003; Roussa *et al.* 2006). De plus, les isoformes de TGF- β stimulent la production de VEGF par des cellules tumorales hypophysaires de souris. Des souris invalidées pour les isoformes *Tgfb1* et *Tgfb2* présentent de graves problèmes de vascularisation cérébrale et ont un taux de mortalité à la naissance très élevé (Renner *et al.* 2002; Mu *et al.* 2008).

III.5.2 Bone morphogenic proteins

BMP2, 4 et 6 jouent un rôle majeur dans les processus de développement en participant à la spécification des couches germinales. Ce processus est dynamique et participe d'une balance entre l'activation coordonnée et l'inhibition régionale des signaux Wnt, Nodal et BMP (Watabe *et al.* 2009). Ainsi BMP2 inhibe la prolifération des progéniteurs mésenchymateux en « antagonisant » le signal Wnt (Liu *et al.* 2006b) et induit la différenciation ostéoblastique/chondroblastique (Roelen *et al.* 2003). Kleber *et al.* ont démontré, dans un modèle *in vitro* de culture de cellules souches neurales dérivées des crêtes neurales, que le signal BMP2 régule la maintenance des cellules souches en synergie avec Wnt, tandis que les facteurs isolés favorisent la décision de la spécification : Wnt permet l'acquisition de phénotypes sensoriels et BMP2 l'inhibe (Kleber *et al.* 2005). Il semblerait que les propriétés du signal BMP2 soient dépendantes du temps, puisque certains auteurs ont démontré qu'à des stades embryonnaires plus tardifs BMP2 induit la différenciation neuronale (Lo *et al.* 1997) ; dans un modèle de culture de bulbe olfactif, Tran *et al.* ont démontré que BMP2 favorise la croissance dendritique (Tran *et al.* 2008). Le même type de résultats a été obtenu avec BMP4 : les travaux de Maeda *et al.* suggèrent que cette protéine dirige la différenciation des CSM humaines en ostéoblastes et ceux de Lim *et al.* montrent que les signaux BMPs inhibent la neurogenèse de cellules issues de la zone sous-ventriculaire tout en favorisant la différenciation gliale (Lim *et al.* 2000; Maeda *et al.* 2004). De plus, l'utilisation synergique de LIF et de BMP4 - ou BMP2 - conduit à l'augmentation de l'autorenouvellement des cellules souches embryonnaires par l'intermédiaire de la protéine Id et de l'inhibition de la voie ERK (Ying *et al.* 2003; Qi *et al.* 2004) ; or un traitement par BMP4 de ces cellules à des stades tardifs en culture promeut la différenciation en neurones périphériques (Mizuseki *et al.* 2003). Notre modèle d'étude est un modèle de culture organotypique de tranches d'hippocampe de souris âgées de 7 jours sur ou sous lesquelles ont été déposées des cellules issues de la MO,

sélectionnées ou non par adhérence au plastique. Nous avons observé une expression plus élevée des taux d'expression des ARNm de Bmp2 et Bmp4 pour la fraction CMOAP1, fraction qui participe à l'amélioration de la conservation du tissu nerveux en culture. Nous pouvons donc supposer que notre modèle se rapproche des stades tardifs de développement, voire du modèle de culture de bulbe olfactif avec les effets d'induction de différenciation neuronale rapportés par les auteurs. Une étude récente utilisant des modèles *in vitro* de la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson rapporte par ailleurs que la co-culture de neurones atteints avec des cellules souches de la pulpe dentaire a des effets neuroprotecteurs et que ces cellules souches expriment de nombreuses neurotrophines, dont BMP2, tant au niveau du messageur que de la protéine (Apel *et al.* 2009).

Nous avons également observé des taux d'expression élevés du messageur de BMP6 dans la fraction cellulaire CMOAP1. BMP6 semble avoir des effets protecteurs et être impliquée dans les processus de réparations neuronales consécutifs à diverses atteintes neuronales. Ainsi un pré ou post traitement de cellules corticales après un stress important médié par H₂O₂ diminue la mort cellulaire et l'activité de la caspase 3 (Du *et al.* 2007) ; dans un modèle de culture de cellules septales de rat (stade E15), l'exposition prolongée à BMP6 augmente l'activité cholinestérase - sans augmenter le nombre de neurones - et préserve cette activité en cas de stress cellulaire (Nonner *et al.* 2001). *In vivo*, l'analyse de la distribution de cette protéine après lésion du tissu nerveux suggère qu'elle pourrait participer à la régulation de la résistance neuronale et de l'astroglie après lésion du cerveau adulte (Martinez *et al.* 2001; Zhang *et al.* 2006). D'ailleurs, l'injection de BMP6 24 heures avant une ischémie diminue le volume de l'infarctus et réduit l'apoptose neuronale (Wang *et al.* 2001).

III.5.3 Growth differentiation factor 15

Aussi connu sous le nom de MIC-1 (pour Macrophage-inhibitory cytokine 1), GDF-15 est le petit dernier de la grande famille des TGF- β . Identifié par Böttner *et al.* en 1999, il avait été cloné indépendamment en 1997 par Bootcov *et al.* (Bootcov *et al.* 1997; Bottner *et al.* 1999).

L'expression du messenger peut être détecté par hybridation *in situ* dans les cellules épithéliales de l'intestin grêle et du tractus respiratoire, dans les glandes mammaires, la prostate, le placenta et certaines sous populations de macrophages. Dans le système nerveux central, la protéine a pu être détectée dans les plexus choroïdes et dans le liquide céphalorachidien (Bottner *et al.* 1999; Strelau *et al.* 2000). La protéine semble avoir des effets neurotrophiques et neuroprotecteurs élevés, tant pour le SNC que pour le système nerveux périphérique. Dans des modèles *in vitro*, il a été démontré que GDF-15 n'agit ni sur la neurogenèse ni sur l'astrogenèse, mais qu'il accroît la capacité de survie des neurones dopaminergiques soumis à un stress par le fer (Strelau *et al.* 2000) ou des neurones cérébelleux après diminution des niveaux de potassium dans le milieu de culture (Subramaniam *et al.* 2003). *In vivo*, GDF-15 est surexprimé après lésion corticale par le froid et l'administration de GDF-15 à des rats lésés par la 6-hydroxydopamine prévient l'asymétrie rotationnelle et protège les neurones dopaminergiques de la substance noire *pars compacta* (Strelau *et al.* 2000; Strelau *et al.* 2003). Les souris déficientes en GDF-15 présentent une perte progressive des motoneurones spinaux, faciaux et trigéminaux s'accompagnant de déficits moteurs ; par contre, les neurones dopaminergiques ne sont pas affectés. Dans la même étude, après lésion du nerf facial chez un souriceau âgé de 1 jour et injection de la protéine, 35% de survie des motoneurones a été relevé, contre 15% pour les témoins (Strelau *et al.* 2009).

CONCLUSION

Nos travaux soulignent un effet très net du nombre de passages sur les capacités des cellules souches mésenchymateuses à migrer dans le tissu nerveux et à protéger des tranches d'hippocampe en culture. Il est intéressant de noter que des CSM sélectionnées après 10 passages peuvent avoir un effet délétère sur le tissu nerveux dans un modèle *in vitro* qui mime le traitement immédiat d'une ischémie avec des facteurs sécrétés par les CSM (Horn *et al.* 2009). Mais, sélectionnées après 2 ou 3 passages seulement, des effets protecteurs sont observés sur le même modèle d'ischémie *in vitro* lorsque les cellules sont transplantées ou co-cultivées avec le tissu (Sarnowska *et al.* 2009). Dans nos conditions, après 5 passages, les CMOAP5 ont un taux de survie faible et n'ont pas d'effet sur le tissu alors que les CMOAP1 sont capables d'y survivre, de migrer, certainement de proliférer et surtout de le protéger contre des phénomènes de mort cellulaire précoce. Dans nos conditions, après 5 passages, les cellules entrent probablement en sénescence et meurent à une vitesse plus rapide que si elles n'avaient pas, ou peu, subi d'expansion. Comme rapporté dans la littérature, ces phases de croissance *in vitro* provoquent un vieillissement cellulaire illustré par la diminution de la taille des télomères et engendrent des changements dans les propriétés cellulaires. Il est également probable que les CMOAP5 produisent moins de facteurs de croissance que leurs homologues « plus jeunes » et n'aient donc plus d'influence bénéfique sur le tissu nerveux.

Nous avons ensuite caractérisé des messagers reliés, pour une part, à la voie des cellules souches mésenchymateuses, incluant des marqueurs de cellules souches typiques et des gènes potentiellement impliqués dans les voies de différenciation. Ainsi, bien que certaines évolutions des taux d'expression des ARNm soient attendues, comme CD44 qui présente une nette augmentation entre CMOAP1 et CMOAP5, d'autres nous ont semblées plus troublantes. C'est le cas pour de nombreux facteurs de croissance de la famille TGF- β , ou encore Il10. Ces molécules ont en effet été souvent associées à des effets améliorant la survie neuronale, la neurogenèse ou l'angiogenèse ou encore la croissance dendritique et/ou axonale.

Bien qu'il soit connu que l'expansion *in vitro* des cellules souches mésenchymateuses conduit à la diminution voire une perte de leur capacité d'autorenouvellement et à leur engagement dans les voies de différenciations caractéristiques de cette lignée et par là même à la perte de leurs caractéristiques souches - en terme de plasticité -, il reste essentiel, pour promouvoir de nouvelles thérapies, de disposer d'une réserve cellulaire suffisante, donc de parvenir à établir une balance entre effets recherchés / amplification *in vitro*. De plus, même si les fractions sélectionnées par l'adhérence au plastique ne sont pas dépourvues de contaminants hématopoïétiques, nous avons vu que cela ne constituait pas un frein à la protection structurelle du tissu nerveux.

Nous pouvons donc considérer que notre étude supporte l'hypothèse selon laquelle les cellules issues de la moelle osseuse et ayant subi une légère expansion *in vitro* (CMOAP1) établissent un micro environnement favorable à la réparation tissulaire dans le SNC.

PERSPECTIVES

Durant cette étude, nous avons analysé les interactions entre des cellules de moelle osseuse sélectionnées par adhérence au plastique ou la fraction totale de cellules de moelle osseuse et des cultures organotypiques de tranches d'hippocampe. Il nous a semblé que ce sujet était intéressant et d'actualité et pourrait avoir une importance significative afin de mieux comprendre le potentiel thérapeutique des CSM utilisées en traitement de pathologies neurologiques.

Nous avons utilisé un modèle d'étude *in vitro*, élaboré et bien établi, de cultures organotypiques de tranches d'hippocampe. En suggérant un effet du nombre de passages sur les capacités régénératives des CSM, ce travail interroge sur un aspect important de la thérapie cellulaire utilisant des cellules souches. Il est cependant nécessaire de pousser plus avant les expérimentations afin de préciser les conclusions concernant les effets neuroprotecteurs.

Les expériences de co-cultures avec les CMOAP1 et CMOAP5 devront être réitérées afin de conduire des analyses protéiques (western blott et/ou immunohistochimie) et de toxicité.

Des études concernant plus particulièrement les CMOA devront être menées. Il sera nécessaire de les caractériser afin de mettre en évidence une possible différence de phénotype entre les fractions cellulaires, de même qu'il serait nécessaire d'étudier les fractions intermédiaires (CMOAP2, CMOAP3, CMOAP4). Après le premier screening effectué sur les ARNm, il s'avère indispensable d'effectuer des études protéomiques afin de valider cette première approche. De même il serait très intéressant de refaire ces mêmes études avec des CMOAP1 / CMOAP5 ayant été mises en contact préalablement avec le tissu nerveux qui peut modifier leurs propriétés intrinsèques.

Enfin il s'agira de vérifier si une population cellulaire présente parmi les CMOAP1 pourrait être enrichie afin d'offrir un potentiel thérapeutique plus avantageux.

BIBLIOGRAPHIE

ABOUELFETOUH, A., T. KONDOH, et al.

Morphological Differentiation of Bone Marrow Stromal Cells into Neuron-Like Cells after Co-Culture with Hippocampal Slice
Brain Res (2004). **1029**(1): 114-119.

ABOUNADER, R. and J. LATERRA

Scatter Factor/Hepatocyte Growth Factor in Brain Tumor Growth and Angiogenesis
Neuro Oncol (2005). **7**(4): 436-451.

AKIMOTO, M., A. BABA, et al.

Hepatocyte Growth Factor as an Enhancer of Nmda Currents and Synaptic Plasticity in the Hippocampus
Neuroscience (2004). **128**(1): 155-162.

ALEMAN, A. and I. TORRES-ALEMAN

Circulating Insulin-Like Growth Factor I and Cognitive Function: Neuromodulation Throughout the Lifespan
Prog Neurobiol (2009). **89**(3): 256-265.

ALMEIDA-PORADA, G., E. D. ZANJANI, et al.

Bone Marrow Stem Cells and Liver Regeneration
Exp Hematol (2010). **38**(7): 574-580.

ALVAREZ-DOLADO, M., R. PARDAL, et al.

Fusion of Bone-Marrow-Derived Cells with Purkinje Neurons, Cardiomyocytes and Hepatocytes
Nature (2003). **425**(6961): 968-973.

AMIN, E. M., B. A. REZA, et al.

Microanatomical Evidences for Potential of Mesenchymal Stem Cells in Amelioration of Striatal Degeneration
Neurol Res (2008). **30**(10): 1086-1090.

ANDREWS, P. W.

From Teratocarcinomas to Embryonic Stem Cells
Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci (2002). **357**(1420): 405-417.

ANJOS-AFONSO, F., E. K. SIAPATI, et al.

In Vivo Contribution of Murine Mesenchymal Stem Cells into Multiple Cell-Types under Minimal Damage Conditions
J Cell Sci (2004). **117**(Pt 23): 5655-5664.

ANWAR, M. R., C. M. ANDREASEN, et al.

Dopaminergic Differentiation of Human Neural Stem Cells Mediated by Co-Cultured Rat Striatal Brain Slices
J Neurochem (2008). **105**(2): 460-470.

APEL, C., O. V. FORLENZA, et al.

The Neuroprotective Effect of Dental Pulp Cells in Models of Alzheimer's and Parkinson's Disease
J Neural Transm (2009). **116**(1): 71-78.

ASHE, H. L. and J. BRISCOE

The Interpretation of Morphogen Gradients
Development (2006). **133**(3): 385-394.

AXELROD, H. R.

Embryonic Stem Cell Lines Derived from Blastocysts by a Simplified Technique
Dev Biol (1984). **101**(1): 225-228.

AZIZI, S. A., D. STOKES, et al.

Engraftment and Migration of Human Bone Marrow Stromal Cells Implanted in the Brains of Albino Rats--Similarities to Astrocyte Grafts
Proc Natl Acad Sci U S A (1998). **95**(7): 3908-3913.

BACHIS, A., A. M. COLANGELO, et al.

Interleukin-10 Prevents Glutamate-Mediated Cerebellar Granule Cell Death by Blocking Caspase-3-Like Activity
J Neurosci (2001). **21**(9): 3104-3112.

BACHOUD-LEVI, A. C., V. GAURA, et al.

Effect of Fetal Neural Transplants in Patients with Huntington's Disease 6 Years after Surgery: A Long-Term Follow-up Study
Lancet Neurol (2006). **5**(4): 303-309.

BADDOO, M., K. HILL, et al.

Characterization of Mesenchymal Stem Cells Isolated from Murine Bone Marrow by Negative Selection
J Cell Biochem (2003). **89**(6): 1235-1249.

BAHARVAND, H. and K. I. MATTHAEI

The Ultrastructure of Mouse Embryonic Stem Cells
Reprod Biomed Online (2003). **7**(3): 330-335.

BAKSH, D., G. M. BOLAND, et al.

Cross-Talk between Wnt Signaling Pathways in Human Mesenchymal Stem Cells Leads to Functional Antagonism During Osteogenic Differentiation
J Cell Biochem (2007). **101**(5): 1109-1124.

BALASINGAM, V. and V. W. YONG

Attenuation of Astroglial Reactivity by Interleukin-10
J Neurosci (1996). **16**(9): 2945-2955.

BANFI, A., A. MURAGLIA, et al.

Proliferation Kinetics and Differentiation Potential of Ex Vivo Expanded Human Bone Marrow Stromal Cells: Implications for Their Use in Cell Therapy
Exp Hematol (2000). **28**(6): 707-715.

BANG, O. Y., J. S. LEE, et al.

Autologous Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Stroke Patients
Ann Neurol (2005). **57**(6): 874-882.

BANTUBUNGI, K., D. BLUM, et al.

Stem Cell Factor and Mesenchymal and Neural Stem Cell Transplantation in a Rat Model of Huntington's Disease
Mol Cell Neurosci (2008). **37**(3): 454-470.

BARTHOLOMEW, A., C. STURGEON, et al.

Mesenchymal Stem Cells Suppress Lymphocyte Proliferation in Vitro and Prolong Skin Graft Survival in Vivo
Exp Hematol (2002). **30**(1): 42-48.

BAXTER, M. A., R. F. WYNN, et al.

Study of Telomere Length Reveals Rapid Aging of Human Marrow Stromal Cells Following in Vitro Expansion
Stem Cells (2004). **22**(5): 675-682.

BAYER, L., C. JACQUEMARD, et al.

Survival of Rat Mch (Melanin-Concentrating Hormone) Neurons in Hypothalamus Slice Culture: Histological, Pharmacological and Molecular Studies
Cell Tissue Res (1999). **297**(1): 23-33.

BENNACEUR-GRISCELLI, A., C. PONDARRE, et al.

Stromal Cells Retard the Differentiation of Cd34(+)Cd38(Low/Neg) Human Primitive Progenitors Exposed to Cytokines Independent of Their Mitotic History
Blood (2001). **97**(2): 435-441.

BENVENUTI, S., R. SACCARDI, et al.

Neuronal Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells: Changes in the Expression of the Alzheimer's Disease-Related Gene Seladin-1
Exp Cell Res (2006). **312**(13): 2592-2604.

BIANCO, P., P. G. ROBEY, et al.

Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays
Cell Stem Cell (2008). **2**(4): 313-319.

BISHOP, C. E. and D. HATAT

Molecular Cloning and Sequence Analysis of a Mouse Y Chromosome Rna Transcript Expressed in the Testis
Nucleic Acids Res (1987). **15**(7): 2959-2969.

BJORNSON, C. R., R. L. RIETZE, et al.

Turning Brain into Blood: A Hematopoietic Fate Adopted by Adult Neural Stem Cells in Vivo
Science (1999). **283**(5401): 534-537.

BONAB, M. M., K. ALIMOGHADDAM, et al.

Aging of Mesenchymal Stem Cell in Vitro
BMC Cell Biol (2006). **7**: 14.

BOOTCOV, M. R., A. R. BAUSKIN, et al.

Mic-1, a Novel Macrophage Inhibitory Cytokine, Is a Divergent Member of the Tgf-Beta Superfamily
Proc Natl Acad Sci U S A (1997). **94**(21): 11514-11519.

BORLONGAN, C. V., J. G. LIND, et al.

Bone Marrow Grafts Restore Cerebral Blood Flow and Blood Brain Barrier in Stroke Rats
Brain Res (2004). **1010**(1-2): 108-116.

BOSSOLASCO, P., L. COVA, et al.

Neuro-Glial Differentiation of Human Bone Marrow Stem Cells in Vitro
Exp Neurol (2005). **193**(2): 312-325.

BOTTNER, M., C. SUTER-CRAZZOLARA, et al.

Expression of a Novel Member of the Tgf-Beta Superfamily, Growth/Differentiation Factor-15/Macrophage-Inhibiting Cytokine-1 (Gdf-15/Mic-1) in Adult Rat Tissues
Cell Tissue Res (1999). **297**(1): 103-110.

BOUCHERIE, C., A. S. CAUMONT, et al.

In Vitro Evidence for Impaired Neuroprotective Capacities of Adult Mesenchymal Stem Cells Derived from a Rat Model of Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis (Hsod1(G93a))
Exp Neurol (2008). **212**(2): 557-561.

BRAZELTON, T. R., F. M. ROSSI, et al.

From Marrow to Brain: Expression of Neuronal Phenotypes in Adult Mice
Science (2000). **290**(5497): 1775-1779.

BRUDER, S. P., N. JAISWAL, et al.

Growth Kinetics, Self-Renewal, and the Osteogenic Potential of Purified Human Mesenchymal Stem Cells During Extensive Subcultivation and Following Cryopreservation
J Cell Biochem (1997). **64**(2): 278-294.

BUHRING, H. J., S. TREML, et al.

Phenotypic Characterization of Distinct Human Bone Marrow-Derived Msc Subsets
Ann N Y Acad Sci (2009). **1176**: 124-134.

BUHUSI, M., G. P. DEMYANENKO, et al.

Alcam Regulates Mediolateral Retinotopic Mapping in the Superior Colliculus
J Neurosci (2009). **29**(50): 15630-15641.

BURDON, T., A. SMITH, et al.

Signalling, Cell Cycle and Pluripotency in Embryonic Stem Cells
Trends Cell Biol (2002). **12**(9): 432-438.

BURDON, T., C. STRACEY, et al.

Suppression of Shp-2 and Erk Signalling Promotes Self-Renewal of Mouse Embryonic Stem Cells
Dev Biol (1999). **210**(1): 30-43.

CANCEDDA, R., G. BIANCHI, et al.

Cell Therapy for Bone Disease: A Review of Current Status
Stem Cells (2003). **21**(5): 610-619.

CAPLAN, A. I.

Mesenchymal Stem Cells
J Orthop Res (1991). **9**(5): 641-650.

CARTWRIGHT, P., C. MCLEAN, et al.

Lif/Stat3 Controls Es Cell Self-Renewal and Pluripotency by a Myc-Dependent Mechanism
Development (2005). **132**(5): 885-896.

CASTRO, R. F., K. A. JACKSON, et al.

Failure of Bone Marrow Cells to Transdifferentiate into Neural Cells in Vivo
Science (2002). **297**(5585): 1299.

CAVALIERE, F., K. DINKEL, et al.

Microglia Response and P2 Receptor Participation in Oxygen/Glucose Deprivation-Induced Cortical Damage
Neuroscience (2005). **136**(3): 615-623.

CHALLEN, G. A. and M. H. LITTLE

A Side Order of Stem Cells: The Sp Phenotype
Stem Cells (2006). **24**(1): 3-12.

CHARBORD, P.

Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells: Historical Overview and Concepts
Hum Gene Ther (2010).

CHARBORD, P., E. LIVNE, et al.

Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells: A Systematic Reappraisal Via the Genostem Experience
Stem Cell Rev (2010).

CHECHNEVA, O., K. DINKEL, et al.

Identification and Characterization of Two Neurogenic Zones in Interface Organotypic Hippocampal Slice Cultures
Neuroscience (2005). **136**(1): 343-355.

CHEN, J., Y. LI, et al.

Intravenous Bone Marrow Stromal Cell Therapy Reduces Apoptosis and Promotes Endogenous Cell Proliferation after Stroke in Female Rat
J Neurosci Res (2003a). **73**(6): 778-786.

CHEN, J., Y. LI, et al.

Therapeutic Benefit of Intravenous Administration of Bone Marrow Stromal Cells after Cerebral Ischemia in Rats
Stroke (2001). **32**(4): 1005-1011.

CHEN, J., Z. G. ZHANG, et al.

Intravenous Administration of Human Bone Marrow Stromal Cells Induces Angiogenesis in the Ischemic Boundary Zone after Stroke in Rats
Circ Res (2003b). **92**(6): 692-699.

CHENN, A. and S. K. MCCONNELL

Cleavage Orientation and the Asymmetric Inheritance of Notch1 Immunoreactivity in Mammalian Neurogenesis
Cell (1995). **82**(4): 631-641.

CHO, J. S., H. W. PARK, et al.

Transplantation of Mesenchymal Stem Cells Enhances Axonal Outgrowth and Cell Survival in an Organotypic Spinal Cord Slice Culture
Neurosci Lett (2009). **454**(1): 43-48.

CHO, K. J., K. A. TRZASKA, et al.

Neurons Derived from Human Mesenchymal Stem Cells Show Synaptic Transmission and Can Be Induced to Produce the Neurotransmitter Substance P by Interleukin-1 Alpha
Stem Cells (2005). **23**(3): 383-391.

CHOI, M. R., H. Y. KIM, et al.

Selection of Optimal Passage of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells for Stem Cell Therapy in Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis
Neurosci Lett (2010). **472**(2): 94-98.

CHOI, S. C., S. J. KIM, et al.

Fibroblast Growth Factor-2 and -4 Promote the Proliferation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells by the Activation of the Pi3k-Akt and Erk1/2 Signaling Pathways
Stem Cells Dev (2008). **17**(4): 725-736.

CHOMCZYNSKI, P. and N. SACCHI

Single-Step Method of Rna Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction
Anal Biochem (1987). **162**(1): 156-159.

CHU, K., M. KIM, et al.

Human Neural Stem Cells Improve Sensorimotor Deficits in the Adult Rat Brain with Experimental Focal Ischemia
Brain Res (2004). **1016**(2): 145-153.

COGLE, C. R., A. T. YACHNIS, et al.

Bone Marrow Transdifferentiation in Brain after Transplantation: A Retrospective Study
Lancet (2004). **363**(9419): 1432-1437.

COLTER, D. C., R. CLASS, et al.

Rapid Expansion of Recycling Stem Cells in Cultures of Plastic-Adherent Cells from Human Bone Marrow
Proc Natl Acad Sci U S A (2000). **97**(7): 3213-3218.

CONBOY, M. J., A. O. KARASOV, et al.

High Incidence of Non-Random Template Strand Segregation and Asymmetric Fate Determination in Dividing Stem Cells and Their Progeny
PLoS Biol (2007). **5**(5): e102.

CONTI, L., S. M. POLLARD, et al.

Niche-Independent Symmetrical Self-Renewal of a Mammalian Tissue Stem Cell
PLoS Biol (2005). **3**(9): e283.

CORCIONE, A., F. BENVENUTO, et al.

Human Mesenchymal Stem Cells Modulate B-Cell Functions
Blood (2006). **107**(1): 367-372.

CORSELLI, M., C. W. CHEN, et al.

Perivascular Ancestors of Adult Multipotent Stem Cells
Arterioscler Thromb Vasc Biol (2010).

CORTI, S., F. LOCATELLI, et al.

Modulated Generation of Neuronal Cells from Bone Marrow by Expansion and Mobilization of Circulating Stem Cells with in Vivo Cytokine Treatment
Exp Neurol (2002). **177**(2): 443-452.

COULOMBEL, L.

Cellules Souches Tissulaires Adultes : *Seing Is Not Being*
Medecine Science (2003). **19**: 683-684.

COULOMBEL, L.

[Adult Stem Cells: Their Scientific Interest and Therapeutic Future]
Gynecol Obstet Fertil (2007). **35**(9): 806-810.

CRIGLER, L., R. C. ROBEY, et al.

Human Mesenchymal Stem Cell Subpopulations Express a Variety of Neuro-Regulatory Molecules and Promote Neuronal Cell Survival and Neurogenesis
Exp Neurol (2006). **198**(1): 54-64.

CURTIS, K. M., L. A. GOMEZ, et al.

Eflalpha and Rpl13a Represent Normalization Genes Suitable for Rt-Qpcr Analysis of Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells
BMC Mol Biol (2010). **11**: 61.

D'IPPOLITO, G., S. DIABIRA, et al.

Marrow-Isolated Adult Multilineage Inducible (Miami) Cells, a Unique Population of Postnatal Young and Old Human Cells with Extensive Expansion and Differentiation Potential
J Cell Sci (2004). **117**(Pt 14): 2971-2981.

D'IPPOLITO, G., G. A. HOWARD, et al.

Isolation and Characterization of Marrow-Isolated Adult Multilineage Inducible (Miami) Cells
Exp Hematol (2006). **34**(11): 1608-1610.

DA SILVA MEIRELLES, L., A. I. CAPLAN, et al.

In Search of the in Vivo Identity of Mesenchymal Stem Cells
Stem Cells (2008). **26**(9): 2287-2299.

DA SILVA MEIRELLES, L., P. C. CHAGASTELLES, et al.

Mesenchymal Stem Cells Reside in Virtually All Post-Natal Organs and Tissues
J Cell Sci (2006). **119**(Pt 11): 2204-2213.

DAZZI, F., R. RAMASAMY, et al.

The Role of Mesenchymal Stem Cells in Haemopoiesis
Blood Rev (2006). **20**(3): 161-171.

DE BILBAO, F., D. ARSENIJEVIC, et al.

In Vivo over-Expression of Interleukin-10 Increases Resistance to Focal Brain Ischemia in Mice
J Neurochem (2009). **110**(1): 12-22.

DEBERNARDO, A. P. and S. CHANG

Native and Recombinant Dm-Grasp Selectively Support Neurite Extension from Neurons That Express Grasp
Dev Biol (1995). **169**(1): 65-75.

DEBERNARDO, A. P. and S. CHANG

Heterophilic Interactions of Dm-Grasp: Grasp-Ngcam Interactions Involved in Neurite Extension
J Cell Biol (1996). **133**(3): 657-666.

DEDA, H., M. C. INCI, et al.

Treatment of Amyotrophic Lateral Sclerosis Patients by Autologous Bone Marrow-Derived Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A 1-Year Follow-Up
Cytotherapy (2009). **11**(1): 18-25.

DELCROIX, G. J., M. JACQUART, et al.

Mesenchymal and Neural Stem Cells Labeled with Hedp-Coated Spio Nanoparticles: In Vitro Characterization and Migration Potential in Rat Brain
Brain Res (2009). **1255**: 18-31.

DELCROIX, G. J., P. C. SCHILLER, et al.

Adult Cell Therapy for Brain Neuronal Damages and the Role of Tissue Engineering
Biomaterials (2010). **31**(8): 2105-2120.

DELORME, B., J. RINGE, et al.

Specific Plasma Membrane Protein Phenotype of Culture-Amplified and Native Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells
Blood (2008). **111**(5): 2631-2635.

DELORME, B., J. RINGE, et al.

Specific Lineage-Priming of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Provides the Molecular Framework for Their Plasticity
Stem Cells (2009). **27**(5): 1142-1151.

DENG, J., B. E. PETERSEN, et al.

Mesenchymal Stem Cells Spontaneously Express Neural Proteins in Culture and Are Neurogenic after Transplantation
Stem Cells (2006). **24**(4): 1054-1064.

DECHASEAUX, F., F. GINDRAUX, et al.

Direct Selection of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Using an Anti-Cd49a Antibody Reveals Their
Cd45^{med},Low Phenotype
Br J Haematol (2003). **122**(3): 506-517.

DEVINE, S. M. and R. HOFFMAN

Role of Mesenchymal Stem Cells in Hematopoietic Stem Cell Transplantation
Curr Opin Hematol (2000). **7**(6): 358-363.

DEY, N. D., M. C. BOMBARD, et al.

Genetically Engineered Mesenchymal Stem Cells Reduce Behavioral Deficits in the Yac 128 Mouse Model of Huntington's
Disease
Behav Brain Res (2010). **214**(2): 193-200.

DEZAWA, M., H. KANNO, et al.

Specific Induction of Neuronal Cells from Bone Marrow Stromal Cells and Application for Autologous Transplantation
J Clin Invest (2004). **113**(12): 1701-1710.

DIEKMANN, H. and C. A. STUERMER

Zebrafish Neurolin-a and -B, Orthologs of Alcam, Are Involved in Retinal Ganglion Cell Differentiation and Retinal Axon
Pathfinding
J Comp Neurol (2009). **513**(1): 38-50.

DIGIROLAMO, C. M., D. STOKES, et al.

Propagation and Senescence of Human Marrow Stromal Cells in Culture: A Simple Colony-Forming Assay Identifies
Samples with the Greatest Potential to Propagate and Differentiate
Br J Haematol (1999). **107**(2): 275-281.

DOMINICI, M., K. LE BLANC, et al.

Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. The International Society for Cellular Therapy
Position Statement
Cytotherapy (2006). **8**(4): 315-317.

DONADONI, C., S. CORTI, et al.

Improvement of Combined Fish and Immunofluorescence to Trace the Fate of Somatic Stem Cells after Transplantation
J Histochem Cytochem (2004). **52**(10): 1333-1339.

DU, J., Y. ZHU, et al.

Protective Effect of Bone Morphogenetic Protein-6 on Neurons from H₂O₂ Injury
Brain Res (2007). **1163**: 10-20.

EGLITIS, M. A. and E. MEZEY

Hematopoietic Cells Differentiate into Both Microglia and Macrogia in the Brains of Adult Mice
Proc Natl Acad Sci U S A (1997). **94**(8): 4080-4085.

EVANS, M. J. and M. H. KAUFMAN

Establishment in Culture of Pluripotential Cells from Mouse Embryos
Nature (1981). **292**(5819): 154-156.

FARKAS, L. M., N. DUNKER, et al.

Transforming Growth Factor-Beta(S) Are Essential for the Development of Midbrain Dopaminergic Neurons in Vitro and in
Vivo
J Neurosci (2003). **23**(12): 5178-5186.

FORBES, S. J., P. VIG, et al.

Adult Stem Cell Plasticity: New Pathways of Tissue Regeneration Become Visible
Clin Sci (Lond) (2002). **103**(4): 355-369.

FRIEDENSTEIN, A. J., R. K. CHAILAKHJAN, et al.

The Development of Fibroblast Colonies in Monolayer Cultures of Guinea-Pig Bone Marrow and Spleen Cells
Cell Tissue Kinet (1970). **3**(4): 393-403.

FRIEDENSTEIN, A. J., J. F. GORSKAJA, et al.

Fibroblast Precursors in Normal and Irradiated Mouse Hematopoietic Organs
Exp Hematol (1976). **4**(5): 267-274.

FRIEL, R., S. VAN DER SAR, et al.

Embryonic Stem Cells: Understanding Their History, Cell Biology and Signalling
Adv Drug Deliv Rev (2005). **57**(13): 1894-1903.

FU, Y. S., Y. C. CHENG, et al.

Conversion of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells in Wharton's Jelly to Dopaminergic Neurons in Vitro: Potential Therapeutic Application for Parkinsonism
Stem Cells (2006). **24**(1): 115-124.

FUJITA, J., A. M. CRANE, et al.

Caspase Activity Mediates the Differentiation of Embryonic Stem Cells
Cell Stem Cell (2008). **2**(6): 595-601.

GAHWILER, B. H., M. CAPOGNA, et al.

Organotypic Slice Cultures: A Technique Has Come of Age
Trends Neurosci (1997). **20**(10): 471-477.

GARZOTTO, D., P. GIACOBINI, et al.

Hepatocyte Growth Factor Regulates Migration of Olfactory Interneuron Precursors in the Rostral Migratory Stream through Met-Grb2 Coupling
J Neurosci (2008). **28**(23): 5901-5909.

GAUR, T., C. J. LENGNER, et al.

Canonical Wnt Signaling Promotes Osteogenesis by Directly Stimulating Runx2 Gene Expression
J Biol Chem (2005). **280**(39): 33132-33140.

GAURA, V., A. C. BACHOUD-LEVI, et al.

Striatal Neural Grafting Improves Cortical Metabolism in Huntington's Disease Patients
Brain (2004). **127**(Pt 1): 65-72.

GINDRAUX, F., Z. SELMANI, et al.

Human and Rodent Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells That Express Primitive Stem Cell Markers Can Be Directly Enriched by Using the Cd49a Molecule
Cell Tissue Res (2007). **327**(3): 471-483.

GONCZY, P.

Mechanisms of Asymmetric Cell Division: Flies and Worms Pave the Way
Nat Rev Mol Cell Biol (2008). **9**(5): 355-366.

GOODELL, M. A., K. BROSE, et al.

Isolation and Functional Properties of Murine Hematopoietic Stem Cells That Are Replicating in Vivo
J Exp Med (1996). **183**(4): 1797-1806.

GRECO, S. J. and P. RAMESHWAR

Recent Advances and Novel Approaches in Deriving Neurons from Stem Cells
Mol Biosyst (2010). **6**(2): 324-328.

GREGORY, C. A., D. J. PROCKOP, et al.

Non-Hematopoietic Bone Marrow Stem Cells: Molecular Control of Expansion and Differentiation
Exp Cell Res (2005). **306**(2): 330-335.

GREPIN, R. and G. PAGES

[the Vascular Endothelial Growth Factor (Vegf): A Model of Gene Regulation and a Marker of Tumour Aggressiveness. An Obvious Therapeutic Target?]
J Soc Biol (2009). **203**(2): 181-192.

GRIGORIADIS, A. E., J. N. HEERSCHKE, et al.

Differentiation of Muscle, Fat, Cartilage, and Bone from Progenitor Cells Present in a Bone-Derived Clonal Cell Population: Effect of Dexamethasone
J Cell Biol (1988). **106**(6): 2139-2151.

GROH, M. E., B. MAITRA, et al.

Human Mesenchymal Stem Cells Require Monocyte-Mediated Activation to Suppress Alloreactive T Cells
Exp Hematol (2005). **33**(8): 928-934.

GUILLOT, P. V., C. GOTHERSTROM, et al.

Human First-Trimester Fetal Msc Express Pluripotency Markers and Grow Faster and Have Longer Telomeres Than Adult Msc
Stem Cells (2007). **25**(3): 646-654.

GUO, L., F. YIN, et al.

Differentiation of Mesenchymal Stem Cells into Dopaminergic Neuron-Like Cells in Vitro
Biomed Environ Sci (2005). **18**(1): 36-42.

HADNAGY, A., L. GABOURY, et al.

Sp Analysis May Be Used to Identify Cancer Stem Cell Populations
Exp Cell Res (2006). **312**(19): 3701-3710.

HAU, S., D. M. REICH, et al.

Evidence for Neuroprotective Properties of Human Umbilical Cord Blood Cells after Neuronal Hypoxia in Vitro
BMC Neurosci (2008). **9**: 30.

HAYFLICK, L.

The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains
Exp Cell Res (1965). **37**: 614-636.

HELLMANN, M. A., H. PANET, et al.

Increased Survival and Migration of Engrafted Mesenchymal Bone Marrow Stem Cells in 6-Hydroxydopamine-Lesioned Rodents
Neurosci Lett (2006). **395**(2): 124-128.

HERMANN, A., R. GASTL, et al.

Efficient Generation of Neural Stem Cell-Like Cells from Adult Human Bone Marrow Stromal Cells
J Cell Sci (2004). **117**(Pt 19): 4411-4422.

HERMANN, A., S. LIEBAU, et al.

Comparative Analysis of Neuroectodermal Differentiation Capacity of Human Bone Marrow Stromal Cells Using Various Conversion Protocols
J Neurosci Res (2006). **83**(8): 1502-1514.

HESS, D. C., W. D. HILL, et al.

Bone Marrow as a Source of Endothelial Cells and Neun-Expressing Cells after Stroke
Stroke (2002). **33**(5): 1362-1368.

HIRSCHI, K. K. and P. A. D'AMORE

Pericytes in the Microvasculature
Cardiovasc Res (1996). **32**(4): 687-698.

HOKARI, M., S. KURODA, et al.

Bone Marrow Stromal Cells Protect and Repair Damaged Neurons through Multiple Mechanisms
J Neurosci Res (2008). **86**(5): 1024-1035.

HOMBACH-KLONISCH, S., S. PANIGRAHI, et al.

Adult Stem Cells and Their Trans-Differentiation Potential--Perspectives and Therapeutic Applications
J Mol Med (2008). **86**(12): 1301-1314.

HORITA, Y., O. HONMOU, et al.

Intravenous Administration of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Gene-Modified Human Mesenchymal Stem Cells Protects against Injury in a Cerebral Ischemia Model in the Adult Rat
J Neurosci Res (2006). **84**(7): 1495-1504.

HORN, A. P., R. L. FROZZA, et al.

Conditioned Medium from Mesenchymal Stem Cells Induces Cell Death in Organotypic Cultures of Rat Hippocampus and Aggravates Lesion in a Model of Oxygen and Glucose Deprivation
Neurosci Res (2009). **63**(1): 35-41.

HORVATH, E. M., Z. LACZA, et al.

Graft Derived Cells with Double Nuclei in the Penumbra Region of Experimental Brain Trauma
Neurosci Lett (2006). **396**(3): 182-186.

HOU, L. and T. HONG

Stem Cells and Neurodegenerative Diseases
Sci China C Life Sci (2008). **51**(4): 287-294.

HUANG, S. and D. E. INGBER (2004). From Stem Cells to Functional Tissue Architecture. Stem Cells, Handbook. S. Stewart. Totowa, Humana Press Inc. . **1**: 45-56.

IOSIF, R. E., H. AHLENIUS, et al.

Suppression of Stroke-Induced Progenitor Proliferation in Adult Subventricular Zone by Tumor Necrosis Factor Receptor 1
J Cereb Blood Flow Metab (2008). **28**(9): 1574-1587.

JACKSON, K. A., T. MI, et al.

Hematopoietic Potential of Stem Cells Isolated from Murine Skeletal Muscle
Proc Natl Acad Sci U S A (1999). **96**(25): 14482-14486.

JANG, S., H. H. CHO, et al.

Functional Neural Differentiation of Human Adipose Tissue-Derived Stem Cells Using Bfgf and Forskolin
BMC Cell Biol (2010). **11**: 25.

JEONG, S. W., K. CHU, et al.

Human Neural Stem Cell Transplantation Promotes Functional Recovery in Rats with Experimental Intracerebral Hemorrhage
Stroke (2003). **34**(9): 2258-2263.

JESSBERGER, S., G. D. CLEMENSON, JR., et al.

Spontaneous Fusion and Nonclonal Growth of Adult Neural Stem Cells
Stem Cells (2007). **25**(4): 871-874.

JIANG, Y., D. HENDERSON, et al.

Neuroectodermal Differentiation from Mouse Multipotent Adult Progenitor Cells
Proc Natl Acad Sci U S A (2003). **100 Suppl 1**: 11854-11860.

JIANG, Y., B. N. JAHAGIRDAR, et al.

Pluripotency of Mesenchymal Stem Cells Derived from Adult Marrow
Nature (2002a). **418**(6893): 41-49.

JIANG, Y., B. VAESSEN, et al.

Multipotent Progenitor Cells Can Be Isolated from Postnatal Murine Bone Marrow, Muscle, and Brain
Exp Hematol (2002b). **30**(8): 896-904.

JIN, K., X. O. MAO, et al.

Induction of Neuronal Markers in Bone Marrow Cells: Differential Effects of Growth Factors and Patterns of Intracellular Expression
Exp Neurol (2003). **184**(1): 78-89.

JOHNSTON, L. C., X. SU, et al.

Human Interleukin-10 Gene Transfer Is Protective in a Rat Model of Parkinson's Disease
Mol Ther (2008). **16**(8): 1392-1399.

JONES, E. A., A. ENGLISH, et al.

Optimization of a Flow Cytometry-Based Protocol for Detection and Phenotypic Characterization of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells from Human Bone Marrow
Cytometry B Clin Cytom (2006). **70**(6): 391-399.

KABOS, P., M. EHTESHAM, et al.

Generation of Neural Progenitor Cells from Whole Adult Bone Marrow
Exp Neurol (2002). **178**(2): 288-293.

KAMEI, N., N. TANAKA, et al.

Bone Marrow Stromal Cells Promoting Corticospinal Axon Growth through the Release of Humoral Factors in Organotypic Cocultures in Neonatal Rats
J Neurosurg Spine (2007). **6**(5): 412-419.

KAN, I., E. MELAMED, et al.

Integral Therapeutic Potential of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells
Curr Drug Targets (2005). **6**(1): 31-41.

KANEKI, H., R. GUO, et al.

Tumor Necrosis Factor Promotes Runx2 Degradation through up-Regulation of Smurf1 and Smurf2 in Osteoblasts
J Biol Chem (2006). **281**(7): 4326-4333.

KARPOWICZ, P., C. MORSHEAD, et al.

Support for the Immortal Strand Hypothesis: Neural Stem Cells Partition DNA Asymmetrically in Vitro
J Cell Biol (2005). **170**(5): 721-732.

KARPOWICZ, P., M. PELLIKKA, et al.

The Germline Stem Cells of *Drosophila Melanogaster* Partition DNA Non-Randomly
Eur J Cell Biol (2009). **88**(7): 397-408.

KATOH, M.

Stat3-Induced Wnt5a Signaling Loop in Embryonic Stem Cells, Adult Normal Tissues, Chronic Persistent Inflammation, Rheumatoid Arthritis and Cancer (Review)
Int J Mol Med (2007). **19**(2): 273-278.

KIM, H., H. Y. KIM, et al.

Dose-Dependent Efficacy of Alz-Human Mesenchymal Stem Cells Transplantation into Cisterna Magna in Sod1-G93a Alz Mice
Neurosci Lett (2010). **468**(3): 190-194.

KIM, S., O. HONMOU, et al.

Neural Differentiation Potential of Peripheral Blood- and Bone-Marrow-Derived Precursor Cells
Brain Res (2006). **1123**(1): 27-33.

KIM, S. G., C. H. JEON, et al.

P-Glycoprotein Expression in Extracellular Matrix Formation of Chondrogenic Differentiation of Human Adult Stem Cells
Cell Biol Int (2007). **31**(9): 1042-1048.

KIM, S. U. and J. DE VELLIS

Stem Cell-Based Cell Therapy in Neurological Diseases: A Review
J Neurosci Res (2009). **87**(10): 2183-2200.

KINOSHITA, T., J. IMAMURA, et al.

Quantification of Gene Expression over a Wide Range by the Polymerase Chain Reaction
Anal Biochem (1992). **206**(2): 231-235.

KIUCHI, N., K. NAKAJIMA, et al.

Stat3 Is Required for the Gp130-Mediated Full Activation of the C-Myc Gene
J Exp Med (1999). **189**(1): 63-73.

KLEBER, M., H. Y. LEE, et al.

Neural Crest Stem Cell Maintenance by Combinatorial Wnt and Bmp Signaling
J Cell Biol (2005). **169**(2): 309-320.

KLYUSHNENKOVA, E., J. D. MOSCA, et al.

T Cell Responses to Allogeneic Human Mesenchymal Stem Cells: Immunogenicity, Tolerance, and Suppression
J Biomed Sci (2005). **12**(1): 47-57.

KOCHEGAROV, A.

Small Molecules for Stem Cells
Expert Opin Ther Pat (2009). **19**(3): 275-281.

KOH, S. H., K. S. KIM, et al.

Implantation of Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells as a Neuroprotective Therapy for Ischemic Stroke in Rats
Brain Res (2008).

KOHYAMA, J., H. ABE, et al.

Brain from Bone: Efficient "Meta-Differentiation" Of Marrow Stroma-Derived Mature Osteoblasts to Neurons with Noggin or a Demethylating Agent
Differentiation (2001). **68**(4-5): 235-244.

KONDO, T., S. A. JOHNSON, et al.

Sonic Hedgehog and Retinoic Acid Synergistically Promote Sensory Fate Specification from Bone Marrow-Derived Pluripotent Stem Cells
Proc Natl Acad Sci U S A (2005). **102**(13): 4789-4794.

KOPEN, G. C., D. J. PROCKOP, et al.

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 (1999). **96**(19): 10711-10716.

KRAMPERA, M., S. GLENNIE, et al.

Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Inhibit the Response of Naive and Memory Antigen-Specific T Cells to Their Cognate Peptide
Blood (2003). **101**(9): 3722-3729.

KRAMPERA, M., S. MARCONI, et al.

Induction of Neural-Like Differentiation in Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow, Fat, Spleen and Thymus
Bone (2007). **40**(2): 382-390.

KRIEGLSTEIN, K., J. STRELAU, et al.

Tgf-Beta and the Regulation of Neuron Survival and Death
J Physiol Paris (2002). **96**(1-2): 25-30.

LAIRD, D. J., U. H. VON ANDRIAN, et al.

Stem Cell Trafficking in Tissue Development, Growth, and Disease
Cell (2008). **132**(4): 612-630.

LAKSHMIPATHY, U. and C. VERFAILLIE

Stem Cell Plasticity
Blood Rev (2005). **19**(1): 29-38.

LANSDORP, P. M.

Immortal Strands? Give Me a Break
Cell (2007). **129**(7): 1244-1247.

LASKOWSKI, A., W. SCHMIDT, et al.

Bfgf and Egf Modulate Trauma-Induced Proliferation and Neurogenesis in Juvenile Organotypic Hippocampal Slice Cultures
Brain Res (2005). **1037**(1-2): 78-89.

LE BLANC, K., F. FRASSONI, et al.

Mesenchymal Stem Cells for Treatment of Steroid-Resistant, Severe, Acute Graft-Versus-Host Disease: A Phase Ii Study
Lancet (2008). **371**(9624): 1579-1586.

LE BLANC, K., C. TAMMIK, et al.

Hla Expression and Immunologic Properties of Differentiated and Undifferentiated Mesenchymal Stem Cells
Exp Hematol (2003). **31**(10): 890-896.

LEBLOND, C. P. and B. E. WALKER

Renewal of Cell Populations
Physiol Rev (1956). **36**(2): 255-276.

LEE, E. and H. SON

Adult Hippocampal Neurogenesis and Related Neurotrophic Factors
BMB Rep (2009a). **42**(5): 239-244.

LEE, H. W., J. H. SUH, et al.

Histone Deacetylase 1-Mediated Histone Modification Regulates Osteoblast Differentiation
Mol Endocrinol (2006). **20**(10): 2432-2443.

LEE, J., S. KURODA, et al.

Migration and Differentiation of Nuclear Fluorescence-Labeled Bone Marrow Stromal Cells after Transplantation into Cerebral Infarct and Spinal Cord Injury in Mice
Neuropathology (2003). **23**(3): 169-180.

LEE, J. K., H. K. JIN, et al.

Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Reduce Brain Amyloid-Beta Deposition and Accelerate the Activation of Microglia in an Acutely Induced Alzheimer's Disease Mouse Model
Neurosci Lett (2009b). **450**(2): 136-141.

LEE, J. K., H. K. JIN, et al.

Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Attenuate Amyloid Beta-Induced Memory Impairment and Apoptosis by Inhibiting Neuronal Cell Death
Curr Alzheimer Res (2010a).

LEE, J. K., H. K. JIN, et al.

Intracerebral Transplantation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Reduces Amyloid-Beta Deposition and Rescues Memory Deficits in Alzheimer's Disease Mice by Modulation of Immune Responses
Stem Cells (2010b). **28**(2): 329-343.

LEE, P. H. and H. J. PARK

Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Therapy as a Candidate Disease-Modifying Strategy in Parkinson's Disease and Multiple System Atrophy
J Clin Neurol (2009c). **5**(1): 1-10.

LESCAUDRON, L., D. UNNI, et al.

Autologous Adult Bone Marrow Stem Cell Transplantation in an Animal Model of Huntington's Disease: Behavioral and Morphological Outcomes
Int J Neurosci (2003). **113**(7): 945-956.

LETOURNEL, F., A. BOCQUET, et al.

Neurofilament High Molecular Weight-Green Fluorescent Protein Fusion Is Normally Expressed in Neurons and Transported in Axons: A Neuronal Marker to Investigate the Biology of Neurofilaments
Neuroscience (2006). **137**(1): 103-111.

LEVY, Y. S., D. MERIMS, et al.

Induction of Neuron-Specific Enolase Promoter and Neuronal Markers in Differentiated Mouse Bone Marrow Stromal Cells
J Mol Neurosci (2003). **21**(2): 121-132.

LI, J., H. ZHU, et al.

Human Mesenchymal Stem Cell Transplantation Protects against Cerebral Ischemic Injury and Upregulates Interleukin-10 Expression in Macaca fascicularis
Brain Res (2010a). **1334**: 65-72.

LI, Y., M. CHOPP, et al.

Intraatrial Transplantation of Bone Marrow Nonhematopoietic Cells Improves Functional Recovery after Stroke in Adult Mice
J Cereb Blood Flow Metab (2000). **20**(9): 1311-1319.

LI, Z., S. J. YAO, et al.

Chondrogenesis of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Fibrin-Polyurethane Composites Is Modulated by Frequency and Amplitude of Dynamic Compression and Shear Stress
Tissue Eng Part A (2010b). **16**(2): 575-584.

LIM, D. A., A. D. TRAMONTIN, et al.

Noggin Antagonizes Bmp Signaling to Create a Niche for Adult Neurogenesis
Neuron (2000). **28**(3): 713-726.

LINDVALL, O. and Z. KOKAIA

Stem Cells in Human Neurodegenerative Disorders--Time for Clinical Translation?
J Clin Invest (2010). **120**(1): 29-40.

LIU, H., O. HONMOU, et al.

Neuroprotection by Plgf Gene-Modified Human Mesenchymal Stem Cells after Cerebral Ischaemia
Brain (2006a). **129**(Pt 10): 2734-2745.

LIU, N., R. CHEN, et al.

Expression of Il-10 and Tnf-Alpha in Rats with Cerebral Infarction after Transplantation with Mesenchymal Stem Cells
Cell Mol Immunol (2009). **6**(3): 207-213.

LIU, Z., Y. TANG, et al.

A Dishevelled-1/Smad1 Interaction Couples Wnt and Bone Morphogenetic Protein Signaling Pathways in Uncommitted Bone Marrow Stromal Cells
J Biol Chem (2006b). **281**(25): 17156-17163.

LLUIS, F. and M. P. COSMA

Cell-Fusion-Mediated Somatic-Cell Reprogramming: A Mechanism for Tissue Regeneration
J Cell Physiol (2010). **223**(1): 6-13.

LO, L., L. SOMMER, et al.

Mash1 Maintains Competence for Bmp2-Induced Neuronal Differentiation in Post-Migratory Neural Crest Cells
Curr Biol (1997). **7**(6): 440-450.

LOEFFLER, M. and I. ROEDER

Tissue Stem Cells: Definition, Plasticity, Heterogeneity, Self-Organization and Models--a Conceptual Approach
Cells Tissues Organs (2002). **171**(1): 8-26.

LU, F. Z., M. FUJINO, et al.

Characterization and Gene Transfer in Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Umbilical-Cord Blood
J Lab Clin Med (2005). **146**(5): 271-278.

LU, P., A. BLESCH, et al.

Induction of Bone Marrow Stromal Cells to Neurons: Differentiation, Transdifferentiation, or Artifact?
J Neurosci Res (2004). **77**(2): 174-191.

LYNG, G. D., A. SNYDER-KELLER, et al.

Dopaminergic Development of Prenatal Ventral Mesencephalon and Striatum in Organotypic Co-Cultures
Brain Res (2007). **1133**(1): 1-9.

MACEWAN, D. J.

Tnf Ligands and Receptors--a Matter of Life and Death
Br J Pharmacol (2002a). **135**(4): 855-875.

MACEWAN, D. J.

Tnf Receptor Subtype Signalling: Differences and Cellular Consequences
Cell Signal (2002b). **14**(6): 477-492.

MAEDA, S., M. HAYASHI, et al.

Endogenous Tgf-Beta Signaling Suppresses Maturation of Osteoblastic Mesenchymal Cells
Embo J (2004). **23**(3): 552-563.

MAHMOOD, A., D. LU, et al.

Intravenous Administration of Marrow Stromal Cells (Mscs) Increases the Expression of Growth Factors in Rat Brain after Traumatic Brain Injury
J Neurotrauma (2004). **21**(1): 33-39.

MAHMOOD, A., D. LU, et al.

Human Marrow Stromal Cell Treatment Provides Long-Lasting Benefit after Traumatic Brain Injury in Rats
Neurosurgery (2005). **57**(5): 1026-1031; discussion 1026-1031.

MAHMOOD, A., D. LU, et al.

Long-Term Recovery after Bone Marrow Stromal Cell Treatment of Traumatic Brain Injury in Rats
J Neurosurg (2006). **104**(2): 272-277.

MAINA, F. and R. KLEIN

Hepatocyte Growth Factor, a Versatile Signal for Developing Neurons
Nat Neurosci (1999). **2**(3): 213-217.

MAJUMDAR, M. K., M. KEANE-MOORE, et al.

Characterization and Functionality of Cell Surface Molecules on Human Mesenchymal Stem Cells
J Biomed Sci (2003). **10**(2): 228-241.

MARCHETTI, L., M. KLEIN, et al.

Tumor Necrosis Factor (Tnf)-Mediated Neuroprotection against Glutamate-Induced Excitotoxicity Is Enhanced by N-Methyl-D-Aspartate Receptor Activation. Essential Role of a Tnf Receptor 2-Mediated Phosphatidylinositol 3-Kinase-Dependent Nf-Kappa B Pathway
J Biol Chem (2004). **279**(31): 32869-32881.

MARESCHI, K., M. NOVARA, et al.

Neural Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells: Evidence for Expression of Neural Markers and Eag K⁺ Channel Types
Exp Hematol (2006). **34**(11): 1563-1572.

MARTIN, G. R.

Isolation of a Pluripotent Cell Line from Early Mouse Embryos Cultured in Medium Conditioned by Teratocarcinoma Stem Cells
Proc Natl Acad Sci U S A (1981). **78**(12): 7634-7638.

MARTINEZ, C., T. J. HOFMANN, et al.

Human Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells Express the Neural Ganglioside Gd2: A Novel Surface Marker for the Identification of Mscs
Blood (2007). **109**(10): 4245-4248.

MARTINEZ, G., M. L. CARNAZZA, et al.

Expression of Bone Morphogenetic Protein-6 and Transforming Growth Factor-Beta1 in the Rat Brain after a Mild and Reversible Ischemic Damage
Brain Res (2001). **894**(1): 1-11.

MAZZINI, L., K. MARESCHI, et al.

Stem Cell Treatment in Amyotrophic Lateral Sclerosis
J Neurol Sci (2008). **265**(1-2): 78-83.

MCBEATH, R., D. M. PIRONE, et al.

Cell Shape, Cytoskeletal Tension, and Rhoa Regulate Stem Cell Lineage Commitment
Dev Cell (2004). **6**(4): 483-495.

MCCOY, M. K. and M. G. TANSEY

Tnf Signaling Inhibition in the Cns: Implications for Normal Brain Function and Neurodegenerative Disease
J Neuroinflammation (2008). **5**: 45.

MEIRELLES LDA, S. and N. B. NARDI

Murine Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell: Isolation, in Vitro Expansion, and Characterization
Br J Haematol (2003). **123**(4): 702-711.

MEZEY, E., K. J. CHANDROSS, et al.

Turning Blood into Brain: Cells Bearing Neuronal Antigens Generated in Vivo from Bone Marrow
Science (2000). **290**(5497): 1779-1782.

MEZEY, E., S. KEY, et al.

Transplanted Bone Marrow Generates New Neurons in Human Brains
Proc Natl Acad Sci U S A (2003). **100**(3): 1364-1369.

MINGUELL, J. J., A. ERICES, et al.

Mesenchymal Stem Cells
Exp Biol Med (Maywood) (2001). **226**(6): 507-520.

MITSIADIS, T. A., O. BARRANDON, et al.

Stem Cell Niches in Mammals
Exp Cell Res (2007). **313**(16): 3377-3385.

MIURA, M., X. D. CHEN, et al.

A Crucial Role of Caspase-3 in Osteogenic Differentiation of Bone Marrow Stromal Stem Cells
J Clin Invest (2004). **114**(12): 1704-1713.

MIZOBE, T., K. KIDOGUCHI, et al.

Sca-1 and Thy-1 Accelerate Neuron-Like Differentiation in Bone Marrow Stromal Cells
Kobe J Med Sci (2006). **52**(5): 119-125.

MIZUSEKI, K., T. SAKAMOTO, et al.

Generation of Neural Crest-Derived Peripheral Neurons and Floor Plate Cells from Mouse and Primate Embryonic Stem Cells
Proc Natl Acad Sci U S A (2003). **100**(10): 5828-5833.

MORIKAWA, S., Y. MABUCHI, et al.

Development of Mesenchymal Stem Cells Partially Originate from the Neural Crest
Biochem Biophys Res Commun (2009). **379**(4): 1114-1119.

MORITA, E., Y. WATANABE, et al.

A Novel Cell Transplantation Protocol and Its Application to an Als Mouse Model
Exp Neurol (2008). **213**(2): 431-438.

MORRISON, S. J. and A. C. SPRADLING

Stem Cells and Niches: Mechanisms That Promote Stem Cell Maintenance Throughout Life
Cell (2008). **132**(4): 598-611.

MU, Z., Z. YANG, et al.

Tgfbeta1 and Tgfbeta3 Are Partially Redundant Effectors in Brain Vascular Morphogenesis
Mech Dev (2008). **125**(5-6): 508-516.

MULHOLLAND, P. J., R. L. SELF, et al.

(-)-Nicotine Ameliorates Corticosterone's Potentiation of N-Methyl-D-Aspartate Receptor-Mediated Cornu Ammonis 1 Toxicity
Neuroscience (2004). **125**(3): 671-682.

MURAGLIA, A., R. CANCEDDA, et al.

Clonal Mesenchymal Progenitors from Human Bone Marrow Differentiate in Vitro According to a Hierarchical Model
J Cell Sci (2000). **113** (Pt 7): 1161-1166.

MUSCHLER, G. F., C. NAKAMOTO, et al.

Engineering Principles of Clinical Cell-Based Tissue Engineering
J Bone Joint Surg Am (2004). **86-A**(7): 1541-1558.

NADRI, S. and M. SOLEIMANI

Isolation Murine Mesenchymal Stem Cells by Positive Selection
In Vitro Cell Dev Biol Anim (2007). **43**(8-9): 276-282.

NAEGELE, J. R., X. MAISANO, et al.

Recent Advancements in Stem Cell and Gene Therapies for Neurological Disorders and Intractable Epilepsy
Neuropharmacology (2010). **58**(6): 855-864.

NAGAI, A., W. K. KIM, et al.

Multilineage Potential of Stable Human Mesenchymal Stem Cell Line Derived from Fetal Marrow
PLoS ONE (2007). **2**(12): e1272.

NAGOSHI, N., S. SHIBATA, et al.

Ontogeny and Multipotency of Neural Crest-Derived Stem Cells in Mouse Bone Marrow, Dorsal Root Ganglia, and Whisker Pad
Cell Stem Cell (2008). **2**(4): 392-403.

NAVARATNA, D., S. GUO, et al.

Mechanisms and Targets for Angiogenic Therapy after Stroke
Cell Adh Migr (2009). **3**(2): 216-223.

NEELY, M. D., D. E. SCHMIDT, et al.

Cortical Regulation of Dopamine Depletion-Induced Dendritic Spine Loss in Striatal Medium Spiny Neurons
Neuroscience (2007). **149**(2): 457-464.

NEUHUBER, B., G. GALLO, et al.

Reevaluation of in Vitro Differentiation Protocols for Bone Marrow Stromal Cells: Disruption of Actin Cytoskeleton Induces Rapid Morphological Changes and Mimics Neuronal Phenotype
J Neurosci Res (2004). **77**(2): 192-204.

NICHOLSON, D. W.

Caspase Structure, Proteolytic Substrates, and Function During Apoptotic Cell Death
Cell Death Differ (1999). **6**(11): 1028-1042.

NIWA, H.

Molecular Mechanism to Maintain Stem Cell Renewal of Es Cells
Cell Struct Funct (2001). **26**(3): 137-148.

NOBLE, F., G. BANISADR, et al.

First Discrete Autoradiographic Distribution of Aminopeptidase N in Various Structures of Rat Brain and Spinal Cord Using the Selective Iodinated Inhibitor [¹²⁵I]Rb 129
Neuroscience (2001). **105**(2): 479-488.

NOMURA, T., O. HONMOU, et al.

I.V. Infusion of Brain-Derived Neurotrophic Factor Gene-Modified Human Mesenchymal Stem Cells Protects against Injury in a Cerebral Ischemia Model in Adult Rat
Neuroscience (2005). **136**(1): 161-169.

NONNER, D., E. F. BARRETT, et al.

Bone Morphogenetic Proteins (Bmp6 and Bmp7) Enhance the Protective Effect of Neurotrophins on Cultured Septal Cholinergic Neurons During Hypoglycemia
J Neurochem (2001). **77**(2): 691-699.

NORABERG, J., B. W. KRISTENSEN, et al.

Markers for Neuronal Degeneration in Organotypic Slice Cultures
Brain Res Brain Res Protoc (1999). **3**(3): 278-290.

NORFLUS, F., C. J. TIFFT, et al.

Bone Marrow Transplantation Prolongs Life Span and Ameliorates Neurologic Manifestations in Sandhoff Disease Mice
J Clin Invest (1998). **101**(9): 1881-1888.

NURDEN, P., C. DURRIEU-JAÏS, et al.

Applications Cliniques Actuelles D'une Activation Plaquettaire Par Cytométrie En Flux
Sang Thrombose Vaisseaux (1997). **9**(7): 441-448.

NYGREN, J. M., S. JOVINGE, et al.

Bone Marrow-Derived Hematopoietic Cells Generate Cardiomyocytes at a Low Frequency through Cell Fusion, but Not Transdifferentiation
Nat Med (2004). **10**(5): 494-501.

OELBERG, S. J.

Cellular Plasticity in Vertebrate Regeneration
Anat Rec B New Anat (2005). **287**(1): 25-35.

OELBERG, S. J., A. KOLLHOFF, et al.

Dedifferentiation of Mammalian Myotubes Induced by Msx1
Cell (2000). **103**(7): 1099-1109.

OHTAKI, H., J. H. YLOSTALO, et al.

Stem/Progenitor Cells from Bone Marrow Decrease Neuronal Death in Global Ischemia by Modulation of Inflammatory/Immune Responses
Proc Natl Acad Sci U S A (2008). **105**(38): 14638-14643.

ONDA, T., O. HONMOU, et al.

Therapeutic Benefits by Human Mesenchymal Stem Cells (Hmscs) and Ang-1 Gene-Modified Hmscs after Cerebral Ischemia
J Cereb Blood Flow Metab (2008). **28**(2): 329-340.

ONO, K., K. YOSHIHARA, et al.

Preservation of Hematopoietic Properties in Transplanted Bone Marrow Cells in the Brain
J Neurosci Res (2003). **72**(4): 503-507.

OOBOSHI, H., S. IBAYASHI, et al.

Postischemic Gene Transfer of Interleukin-10 Protects against Both Focal and Global Brain Ischemia
Circulation (2005). **111**(7): 913-919.

ORLACCHIO, A., G. BERNARDI, et al.

Stem Cells: An Overview of the Current Status of Therapies for Central and Peripheral Nervous System Diseases
Curr Med Chem (2010). **17**(7): 595-608.

PARK, D. H., D. J. EVE, et al.

Regenerative Medicine for Neurological Disorders
ScientificWorldJournal (2010). **10**: 470-489.

PARK, H. J., P. H. LEE, et al.

Mesenchymal Stem Cells Therapy Exerts Neuroprotection in a Progressive Animal Model of Parkinson's Disease
J Neurochem (2008). **107**(1): 141-151.

PATEL, S. A., L. SHERMAN, et al.

Immunological Properties of Mesenchymal Stem Cells and Clinical Implications
Arch Immunol Ther Exp (Warsz) (2008). **56**(1): 1-8.

PERL, L., A. WEISSLER, et al.

Cellular Therapy in 2010: Focus on Autoimmune and Cardiac Diseases
Isr Med Assoc J (2010). **12**(2): 110-115.

PETERSEN, B. E., W. C. BOWEN, et al.

Bone Marrow as a Potential Source of Hepatic Oval Cells
Science (1999). **284**(5417): 1168-1170.

PETERZIEL, H., K. UNSICKER, et al.

Tgfbeta Induces Gdnf Responsiveness in Neurons by Recruitment of Gfralpha1 to the Plasma Membrane
J Cell Biol (2002). **159**(1): 157-167.

PFAFFL, M. W.

A New Mathematical Model for Relative Quantification in Real-Time Rt-Pcr
Nucleic Acids Res (2001). **29**(9): e45.

PHINNEY, D. G.

Biochemical Heterogeneity of Mesenchymal Stem Cell Populations: Clues to Their Therapeutic Efficacy
Cell Cycle (2007). **6**(23): 2884-2889.

PHINNEY, D. G., G. KOPEN, et al.

Plastic Adherent Stromal Cells from the Bone Marrow of Commonly Used Strains of Inbred Mice: Variations in Yield, Growth, and Differentiation
J Cell Biochem (1999). **72**(4): 570-585.

PHINNEY, D. G. and D. J. PROCKOP

Concise Review: Mesenchymal Stem/Multipotent Stromal Cells: The State of Transdifferentiation and Modes of Tissue Repair--Current Views
Stem Cells (2007). **25**(11): 2896-2902.

PITTENGER, M. F., A. M. MACKAY, et al.

Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells
Science (1999). **284**(5411): 143-147.

PITTENGER, M. F. and B. J. MARTIN

Mesenchymal Stem Cells and Their Potential as Cardiac Therapeutics
Circ Res (2004). **95**(1): 9-20.

PLANAS, A. M., R. GORINA, et al.

Signalling Pathways Mediating Inflammatory Responses in Brain Ischaemia
Biochem Soc Trans (2006). **34**(Pt 6): 1267-1270.

PONTA, H., D. WAINWRIGHT, et al.

The Cd44 Protein Family
Int J Biochem Cell Biol (1998). **30**(3): 299-305.

POTTEN, C. S. and M. LOEFFLER

Stem Cells: Attributes, Cycles, Spirals, Pitfalls and Uncertainties. Lessons for and from the Crypt
Development (1990). **110**(4): 1001-1020.

PRICE, J. and B. P. WILLIAMS

Neural Stem Cells
Curr Opin Neurobiol (2001). **11**(5): 564-567.

PRINGLE, A. K., C. D. BENHAM, et al.

Selective N-Type Calcium Channel Antagonist Omega Conotoxin Mviiia Is Neuroprotective against Hypoxic Neurodegeneration in Organotypic Hippocampal-Slice Cultures
Stroke (1996). **27**(11): 2124-2130.

PRINGLE, A. K., F. IANNOTTI, et al.

Neuroprotection by Both Nmda and Non-Nmda Receptor Antagonists in in Vitro Ischemia
Brain Res (1997). **755**(1): 36-46.

PROCKOP, D. J.

Marrow Stromal Cells as Stem Cells for Nonhematopoietic Tissues
Science (1997). **276**(5309): 71-74.

PRUNET-MARCASSUS, B., B. COUSIN, et al.

From Heterogeneity to Plasticity in Adipose Tissues: Site-Specific Differences
Exp Cell Res (2006). **312**(6): 727-736.

QI, X., T. G. LI, et al.

Bmp4 Supports Self-Renewal of Embryonic Stem Cells by Inhibiting Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways
Proc Natl Acad Sci U S A (2004). **101**(16): 6027-6032.

RAINETEAU, O., L. RIETSCHIN, et al.

Neurogenesis in Hippocampal Slice Cultures
Mol Cell Neurosci (2004). **26**(2): 241-250.

RANDO, T. A.

The Immortal Strand Hypothesis: Segregation and Reconstruction
Cell (2007). **129**(7): 1239-1243.

RATAJCZAK, M. Z., M. KUCIA, et al.

Stem Cell Plasticity Revisited: Cxcr4-Positive Cells Expressing Mrna for Early Muscle, Liver and Neural Cells 'Hide out' in the Bone Marrow
Leukemia (2004). **18**(1): 29-40.

RENNER, U., P. LOHRER, et al.

Transforming Growth Factor-Beta Stimulates Vascular Endothelial Growth Factor Production by Folliculostellate Pituitary Cells
Endocrinology (2002). **143**(10): 3759-3765.

REYES, M., T. LUND, et al.

Purification and Ex Vivo Expansion of Postnatal Human Marrow Mesodermal Progenitor Cells
Blood (2001). **98**(9): 2615-2625.

RIVERA, F. J., W. D. SIERRALTA, et al.

Adult Hippocampus Derived Soluble Factors Induce a Neuronal-Like Phenotype in Mesenchymal Stem Cells
Neurosci Lett (2006). **406**(1-2): 49-54.

ROELEN, B. A. and P. DIJKE

Controlling Mesenchymal Stem Cell Differentiation by Tgfbeta Family Members
J Orthop Sci (2003). **8**(5): 740-748.

ROOBROUCK, V. D., F. ULLOA-MONTOYA, et al.

Self-Renewal and Differentiation Capacity of Young and Aged Stem Cells
Exp Cell Res (2008). **314**(9): 1937-1944.

ROQUES, B. P.

Novel Approaches to Targeting Neuropeptide Systems
Trends Pharmacol Sci (2000). **21**(12): 475-483.

ROUSSA, E., M. WIEHLE, et al.

Transforming Growth Factor Beta Is Required for Differentiation of Mouse Mesencephalic Progenitors into Dopaminergic Neurons in Vitro and in Vivo: Ectopic Induction in Dorsal Mesencephalon
Stem Cells (2006). **24**(9): 2120-2129.

SACCHETTI, B., A. FUNARI, et al.

Self-Renewing Osteoprogenitors in Bone Marrow Sinusoids Can Organize a Hematopoietic Microenvironment
Cell (2007). **131**(2): 324-336.

SANCHEZ-RAMOS, J., S. SONG, et al.

Adult Bone Marrow Stromal Cells Differentiate into Neural Cells in Vitro
Exp Neurol (2000). **164**(2): 247-256.

SARNOWSKA, A., H. BRAUN, et al.

The Neuroprotective Effect of Bone Marrow Stem Cells Is Not Dependent on Direct Cell Contact with Hypoxic Injured Tissue
Exp Neurol (2009). **215**(2): 317-327.

SATO, Y.

Role of Aminopeptidase in Angiogenesis
Biol Pharm Bull (2004). **27**(6): 772-776.

SCHROETER, M. and S. JANDER

T-Cell Cytokines in Injury-Induced Neural Damage and Repair
Neuromolecular Med (2005). **7**(3): 183-195.

SEARS, R., F. NUCKOLLS, et al.

Multiple Ras-Dependent Phosphorylation Pathways Regulate Myc Protein Stability
Genes Dev (2000). **14**(19): 2501-2514.

SEKIYA, I., B. L. LARSON, et al.

Expansion of Human Adult Stem Cells from Bone Marrow Stroma: Conditions That Maximize the Yields of Early Progenitors and Evaluate Their Quality
Stem Cells (2002). **20**(6): 530-541.

SERAFINI, M., S. J. DYLLA, et al.

Hematopoietic Reconstitution by Multipotent Adult Progenitor Cells: Precursors to Long-Term Hematopoietic Stem Cells
J Exp Med (2007). **204**(1): 129-139.

SHEPRO, D. and N. M. MOREL

Pericyte Physiology
Faseb J (1993). **7**(11): 1031-1038.

SHICHINOHE, H., S. KURODA, et al.

In Vivo Tracking of Bone Marrow Stromal Cells Transplanted into Mice Cerebral Infarct by Fluorescence Optical Imaging
Brain Res Brain Res Protoc (2004). **13**(3): 166-175.

SHICHINOHE, H., S. KURODA, et al.

Bone Marrow Stromal Cells Promote Neurite Extension in Organotypic Spinal Cord Slice: Significance for Cell Transplantation Therapy
Neurorehabil Neural Repair (2008). **22**(5): 447-457.

SHIH, C. C., Y. WENG, et al.

Identification of a Candidate Human Neurohematopoietic Stem-Cell Population
Blood (2001). **98**(8): 2412-2422.

SHIOTA, M., T. HEIKE, et al.

Isolation and Characterization of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Progenitor Cells with Myogenic and Neuronal Properties
Exp Cell Res (2007). **313**(5): 1008-1023.

SIMARD, A. R. and S. RIVEST

Bone Marrow Stem Cells Have the Ability to Populate the Entire Central Nervous System into Fully Differentiated Parenchymal Microglia
Faseb J (2004). **18**(9): 998-1000.

SIMARD, A. R., D. SOULET, et al.

Bone Marrow-Derived Microglia Play a Critical Role in Restricting Senile Plaque Formation in Alzheimer's Disease
Neuron (2006). **49**(4): 489-502.

SIMMONS, P. J., B. MASINOVSKY, et al.

Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expressed by Bone Marrow Stromal Cells Mediates the Binding of Hematopoietic Progenitor Cells
Blood (1992). **80**(2): 388-395.

SNYDER, B. R., A. M. CHIU, et al.

Human Multipotent Stromal Cells (Mscs) Increase Neurogenesis and Decrease Atrophy of the Striatum in a Transgenic Mouse Model for Huntington's Disease
PLoS ONE (2010). **5**(2): e9347.

SONG, S. and J. SANCHEZ-RAMOS

Preparation of Neural Progenitors from Bone Marrow and Umbilical Cord Blood
Methods Mol Biol (2008). **438**: 123-134.

SORDELLA, R., W. JIANG, et al.

Modulation of Rho Gtpase Signaling Regulates a Switch between Adipogenesis and Myogenesis
Cell (2003). **113**(2): 147-158.

SOSA, L., S. DUPRAZ, et al.

Igf-1 Receptor Is Essential for the Establishment of Hippocampal Neuronal Polarity
Nat Neurosci (2006). **9**(8): 993-995.

SPERA, P. A., J. A. ELLISON, et al.

Il-10 Reduces Rat Brain Injury Following Focal Stroke
Neurosci Lett (1998). **251**(3): 189-192.

STEVENS, L. C. and C. C. LITTLE

Spontaneous Testicular Teratomas in an Inbred Strain of Mice
Proc Natl Acad Sci U S A (1954). **40**(11): 1080-1087.

STEWART, R., M. STOJKOVIC, et al.

Mechanisms of Self-Renewal in Human Embryonic Stem Cells
Eur J Cancer (2006). **42**(9): 1257-1272.

STEWART, S. (2004). Stem Cells. Stem Cells, Handbook. S. Stewart. Totowa, Humana Press Inc. **1: 1-18.**

STOPPINI, L., P. A. BUCHS, et al.

A Simple Method for Organotypic Cultures of Nervous Tissue
J Neurosci Methods (1991). **37**(2): 173-182.

STRELAU, J., A. SCHOBER, et al.

Growth/Differentiation Factor-15 (Gdf-15), a Novel Member of the Tgf-Beta Superfamily, Promotes Survival of Lesioned Mesencephalic Dopaminergic Neurons in Vitro and in Vivo and Is Induced in Neurons Following Cortical Lesioning
J Neural Transm Suppl (2003). (65): 197-203.

STRELAU, J., A. STRZELCZYK, et al.

Progressive Postnatal Motoneuron Loss in Mice Lacking Gdf-15
J Neurosci (2009). **29**(43): 13640-13648.

STRELAU, J., A. SULLIVAN, et al.

Growth/Differentiation Factor-15/Macrophage Inhibitory Cytokine-1 Is a Novel Trophic Factor for Midbrain Dopaminergic Neurons in Vivo
J Neurosci (2000). **20**(23): 8597-8603.

STUERMER, C. A. and M. BASTMEYER

The Retinal Axon's Pathfinding to the Optic Disk
Prog Neurobiol (2000). **62**(2): 197-214.

SUBRAMANIAM, S., J. STRELAU, et al.

Growth Differentiation Factor-15 Prevents Low Potassium-Induced Cell Death of Cerebellar Granule Neurons by Differential Regulation of Akt and Erk Pathways
J Biol Chem (2003). **278**(11): 8904-8912.

SUNG, J. H., H. M. YANG, et al.

Isolation and Characterization of Mouse Mesenchymal Stem Cells
Transplant Proc (2008). **40**(8): 2649-2654.

SUZUKI, M., J. MCHUGH, et al.

Direct Muscle Delivery of Gdnf with Human Mesenchymal Stem Cells Improves Motor Neuron Survival and Function in a Rat Model of Familial Als
Mol Ther (2008). **16**(12): 2002-2010.

TABATABAI, G., O. BAHR, et al.

Lessons from the Bone Marrow: How Malignant Glioma Cells Attract Adult Haematopoietic Progenitor Cells
Brain (2005). **128**(Pt 9): 2200-2211.

TAHA, M. F. and V. HEDAYATI

Isolation, Identification and Multipotential Differentiation of Mouse Adipose Tissue-Derived Stem Cells
Tissue Cell (2010).

TAJBAKHS, S.

Stem Cell Identity and Template DNA Strand Segregation
Curr Opin Cell Biol (2008). **20**(6): 716-722.

TAKASHIMA, Y., T. ERA, et al.

Neuroepithelial Cells Supply an Initial Transient Wave of Msc Differentiation
Cell (2007). **129**(7): 1377-1388.

TANAKA, E. M.

Cell Differentiation and Cell Fate During Urodele Tail and Limb Regeneration
Curr Opin Genet Dev (2003). **13**(5): 497-501.

TATARD, V. M., G. D'IPPOLITO, et al.

Neurotrophin-Directed Differentiation of Human Adult Marrow Stromal Cells to Dopaminergic-Like Neurons
Bone (2007). **40**(2): 360-373.

TATE, C. C., C. FONCK, et al.

Human Mesenchymal Stromal Cells and Their Derivative, Sb623 Cells, Rescue Neural Cells Via Trophic Support Following in Vitro Ischemia
Cell Transplant (2010).

TERADA, N., T. HAMAZAKI, et al.

Bone Marrow Cells Adopt the Phenotype of Other Cells by Spontaneous Cell Fusion
Nature (2002). **416**(6880): 542-545.

THOMSON, J. A., J. ITS KOVITZ-ELDOR, et al.

Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts
Science (1998). **282**(5391): 1145-1147.

TOMA, J. G., M. AKHAVAN, et al.

Isolation of Multipotent Adult Stem Cells from the Dermis of Mammalian Skin
Nat Cell Biol (2001). **3**(9): 778-784.

TONDREAU, T., M. DEJENEF, et al.

Gene Expression Pattern of Functional Neuronal Cells Derived from Human Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells
BMC Genomics (2008). **9**: 166.

TONDREAU, T., L. LAGNEAUX, et al.

Isolation of Bm Mesenchymal Stem Cells by Plastic Adhesion or Negative Selection: Phenotype, Proliferation Kinetics and Differentiation Potential
Cytotherapy (2004a). **6**(4): 372-379.

TONDREAU, T., L. LAGNEAUX, et al.

Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Already Express Specific Neural Proteins before Any Differentiation
Differentiation (2004b). **72**(7): 319-326.

TORRES-ALEMAN, I.

Toward a Comprehensive Neurobiology of Igf-I
Dev Neurobiol (2010). **70**(5): 384-396.

TRAN, H., H. CHEN, et al.

Influence of Olfactory Epithelium on Mitral/Tufted Cell Dendritic Outgrowth
PLoS ONE (2008). **3**(11): e3816.

TROPEL, P., D. NOEL, et al.

Isolation and Characterisation of Mesenchymal Stem Cells from Adult Mouse Bone Marrow
Exp Cell Res (2004). **295**(2): 395-406.

TROPEL, P., N. PLATET, et al.

Functional Neuronal Differentiation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells
Stem Cells (2006). **24**(12): 2868-2876.

TROUNSON, A.

New Perspectives in Human Stem Cell Therapeutic Research
BMC Med (2009). **7**: 29.

TRZASKA, K. A., C. C. KING, et al.

Brain-Derived Neurotrophic Factor Facilitates Maturation of Mesenchymal Stem Cell-Derived Dopamine Progenitors to Functional Neurons
J Neurochem (2009). **110**(3): 1058-1069.

TRZASKA, K. A., E. V. KUZHIKANDATHIL, et al.

Specification of a Dopaminergic Phenotype from Adult Human Mesenchymal Stem Cells
Stem Cells (2007a). **25**(11): 2797-2808.

TRZASKA, K. A. and P. RAMESHWAR

Current Advances in the Treatment of Parkinson's Disease with Stem Cells
Curr Neurovasc Res (2007b). **4**(2): 99-109.

TSAI, R. Y., R. KITTAPPA, et al.

Plasticity, Niches, and the Use of Stem Cells
Dev Cell (2002). **2**(6): 707-712.

UCCELLI, A., V. PISTOIA, et al.

Mesenchymal Stem Cells: A New Strategy for Immunosuppression?
Trends Immunol (2007). **28**(5): 219-226.

VALLIERES, L. and P. E. SAWCHENKO

Bone Marrow-Derived Cells That Populate the Adult Mouse Brain Preserve Their Hematopoietic Identity
J Neurosci (2003). **23**(12): 5197-5207.

VALORANI, M. G., A. GERMANI, et al.

Hypoxia Increases Sca-1/Cd44 Co-Expression in Murine Mesenchymal Stem Cells and Enhances Their Adipogenic Differentiation Potential
Cell Tissue Res (2010).

VASSILOPOULOS, G., P. R. WANG, et al.

Transplanted Bone Marrow Regenerates Liver by Cell Fusion
Nature (2003). **422**(6934): 901-904.

VENKATARAMANA, N. K., S. K. KUMAR, et al.

Open-Labeled Study of Unilateral Autologous Bone-Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Parkinson's Disease
Transl Res (2010). **155**(2): 62-70.

VERCELLI, A., O. M. MEREUTA, et al.

Human Mesenchymal Stem Cell Transplantation Extends Survival, Improves Motor Performance and Decreases Neuroinflammation in Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis
Neurobiol Dis (2008). **31**(3): 395-405.

VERFAILLIE, C.

Pluripotent Stem Cells
Transfus Clin Biol (2009). **16**(2): 65-69.

VERFAILLIE, C. M.

Adult Stem Cells: Assessing the Case for Pluripotency
Trends Cell Biol (2002). **12**(11): 502-508.

WAGNER, W., P. HORN, et al.

Replicative Senescence of Mesenchymal Stem Cells: A Continuous and Organized Process
PLoS ONE (2008). **3**(5): e2213.

WAKABAYASHI, K., A. NAGAI, et al.

Transplantation of Human Mesenchymal Stem Cells Promotes Functional Improvement and Increased Expression of Neurotrophic Factors in a Rat Focal Cerebral Ischemia Model
J Neurosci Res (2010). **88**(5): 1017-1025.

WANG, L., Y. LI, et al.

Ischemic Cerebral Tissue and Mep-1 Enhance Rat Bone Marrow Stromal Cell Migration in Interface Culture
Exp Hematol (2002). **30**(7): 831-836.

WANG, L. and R. C. ZHAO

Mesenchymal Stem Cells Targeting the Gvhd
Sci China C Life Sci (2009a). **52**(7): 603-609.

WANG, X., H. HISHA, et al.

Characterization of Mesenchymal Stem Cells Isolated from Mouse Fetal Bone Marrow
Stem Cells (2006). **24**(3): 482-493.

WANG, X., H. WILLENBRING, et al.

Cell Fusion Is the Principal Source of Bone-Marrow-Derived Hepatocytes
Nature (2003). **422**(6934): 897-901.

WANG, Y., C. F. CHANG, et al.

Bone Morphogenetic Protein-6 Reduces Ischemia-Induced Brain Damage in Rats
Stroke (2001). **32**(9): 2170-2178.

WANG, Y., Y. DENG, et al.

Sdf-1alpha/Cxcr4-Mediated Migration of Systemically Transplanted Bone Marrow Stromal Cells Towards Ischemic Brain Lesion in a Rat Model
Brain Res (2008). **1195**: 104-112.

WANG, Y., E. KILIC, et al.

Vegf Overexpression Induces Post-Ischaemic Neuroprotection, but Facilitates Haemodynamic Steal Phenomena
Brain (2005). **128**(Pt 1): 52-63.

WANG, Y. Q., H. R. CUI, et al.

Vegf Enhance Cortical Newborn Neurons and Their Neurite Development in Adult Rat Brain after Cerebral Ischemia
Neurochem Int (2009b). **55**(7): 629-636.

WATABE, T. and K. MIYAZONO

Roles of Tgf-Beta Family Signaling in Stem Cell Renewal and Differentiation
Cell Res (2009). **19**(1): 103-115.

WEHNER, T., M. BONTERT, et al.

Bone Marrow-Derived Cells Expressing Green Fluorescent Protein under the Control of the Glial Fibrillary Acidic Protein Promoter Do Not Differentiate into Astrocytes in Vitro and in Vivo
J Neurosci (2003). **23**(12): 5004-5011.

WEISSMAN, I. L.

Stem Cells: Units of Development, Units of Regeneration, and Units in Evolution
Cell (2000). **100**(1): 157-168.

WHITNEY, M. J., A. LEE, et al.

Leukemia Inhibitory Factor Secretion Is a Predictor and Indicator of Early Progenitor Status in Adult Bone Marrow Stromal Cells
Tissue Eng Part A (2009). **15**(1): 33-44.

WIJESEKERA, L. C. and P. N. LEIGH

Amyotrophic Lateral Sclerosis
Orphanet J Rare Dis (2009). **4**: 3.

WISLET-GENDEBIEN, S., G. HANS, et al.

Plasticity of Cultured Mesenchymal Stem Cells: Switch from Nestin-Positive to Excitable Neuron-Like Phenotype
Stem Cells (2005). **23**(3): 392-402.

WISLET-GENDEBIEN, S., P. LEPRINCE, et al.

Regulation of Neural Markers Nestin and Gfap Expression by Cultivated Bone Marrow Stromal Cells
J Cell Sci (2003). **116**(Pt 16): 3295-3302.

WOODBURY, D., K. REYNOLDS, et al.

Adult Bone Marrow Stromal Stem Cells Express Germline, Ectodermal, Endodermal, and Mesodermal Genes Prior to Neurogenesis
J Neurosci Res (2002). **69**(6): 908-917.

WOODBURY, D., E. J. SCHWARZ, et al.

Adult Rat and Human Bone Marrow Stromal Cells Differentiate into Neurons
J Neurosci Res (2000). **61**(4): 364-370.

YAMANAKA, S.

Pluripotency and Nuclear Reprogramming
Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci (2008). **363**(1500): 2079-2087.

YANG, H., X. P. CHENG, et al.

De-Differentiation Response of Cultured Astrocytes to Injury Induced by Scratch or Conditioned Culture Medium of Scratch-Insulted Astrocytes
Cell Mol Neurobiol (2009). **29**(4): 455-473.

YANG, Q., J. MU, et al.

A Simple and Efficient Method for Deriving Neurospheres from Bone Marrow Stromal Cells
Biochem Biophys Res Commun (2008). **372**(4): 520-524.

YE, M., X. J. WANG, et al.

Therapeutic Effects of Differentiated Bone Marrow Stromal Cell Transplantation on Rat Models of Parkinson's Disease
Parkinsonism Relat Disord (2007). **13**(1): 44-49.

YING, Q. L., J. NICHOLS, et al.

Bmp Induction of Id Proteins Suppresses Differentiation and Sustains Embryonic Stem Cell Self-Renewal in Collaboration with Stat3
Cell (2003). **115**(3): 281-292.

YING, Q. L., J. NICHOLS, et al.

Changing Potency by Spontaneous Fusion
Nature (2002). **416**(6880): 545-548.

YOO, S. W., S. S. KIM, et al.

Mesenchymal Stem Cells Promote Proliferation of Endogenous Neural Stem Cells and Survival of Newborn Cells in a Rat Stroke Model
Exp Mol Med (2008). **40**(4): 387-397.

YOUNG, H. E., C. DUPLAA, et al.

Adult Reserve Stem Cells and Their Potential for Tissue Engineering
Cell Biochem Biophys (2004). **40**(1): 1-80.

YU, J. and J. A. THOMSON

Pluripotent Stem Cell Lines
Genes Dev (2008). **22**(15): 1987-1997.

ZAMORANO, P. L., V. B. MAHESH, et al.

Quantitative Rt-Per for Neuroendocrine Studies. A Minireview
Neuroendocrinology (1996). **63**(5): 397-407.

ZENG, X.

Human Embryonic Stem Cells: Mechanisms to Escape Replicative Senescence?
Stem Cell Rev (2007). **3**(4): 270-279.

ZHANG, H. and Z. Z. WANG

Mechanisms That Mediate Stem Cell Self-Renewal and Differentiation
J Cell Biochem (2008a). **103**(3): 709-718.

ZHANG, Z., K. TRAUTMANN, et al.

Bone Morphogenetic Protein-6 Is Expressed Early by Activated Astrocytes in Lesions of Rat Traumatic Brain Injury
Neuroscience (2006). **138**(1): 47-53.

ZHANG, Z., X. WANG, et al.

Isolation and Characterization of Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow of Patients with Parkinson's Disease
In Vitro Cell Dev Biol Anim (2008b). **44**(5-6): 169-177.

ZHAO, L., J. HUANG, et al.

Smurf1 Inhibits Mesenchymal Stem Cell Proliferation and Differentiation into Osteoblasts through Junb Degradation
J Bone Miner Res (2010). **25**(6): 1246-1256.

ZHAO, L. R., W. M. DUAN, et al.

Human Bone Marrow Stem Cells Exhibit Neural Phenotypes and Ameliorate Neurological Deficits after Grafting into the Ischemic Brain of Rats
Exp Neurol (2002). **174**(1): 11-20.

ZHAO, M., M. QIAO, et al.

E3 Ubiquitin Ligase Smurf1 Mediates Core-Binding Factor Alpha1/Runx2 Degradation and Plays a Specific Role in Osteoblast Differentiation
J Biol Chem (2003). **278**(30): 27939-27944.

ZHONG, C., Z. QIN, et al.

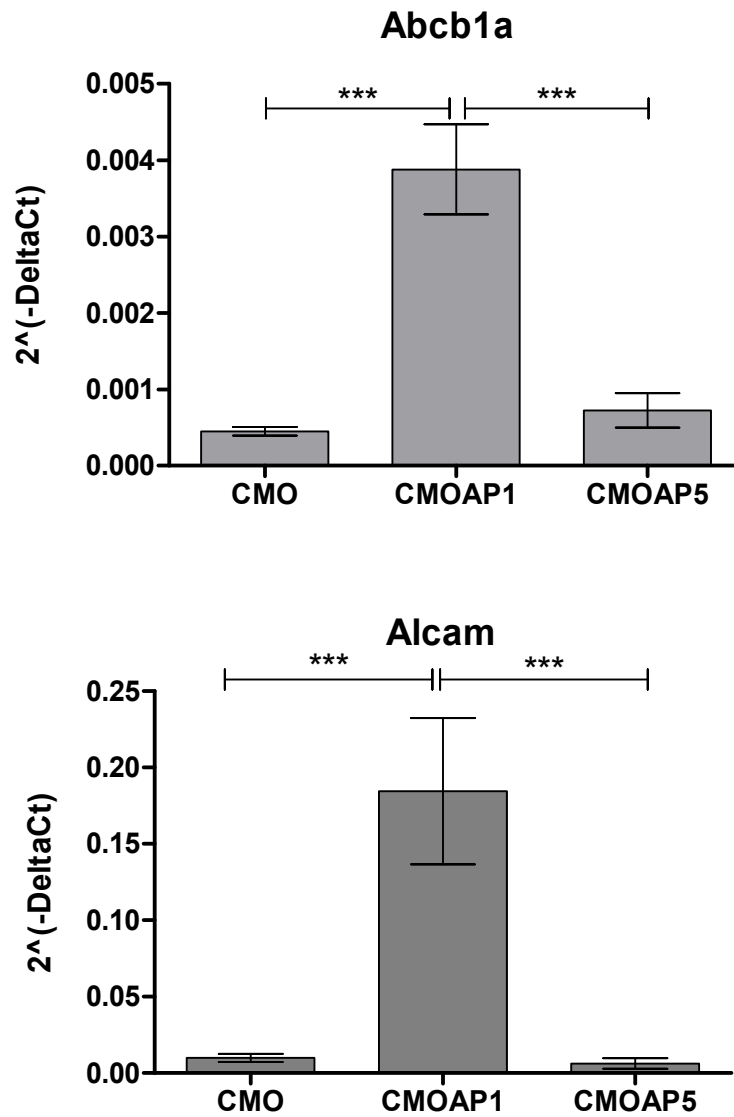
Neuroprotective Effects of Bone Marrow Stromal Cells on Rat Organotypic Hippocampal Slice Culture Model of Cerebral Ischemia
Neurosci Lett (2003). **342**(1-2): 93-96.

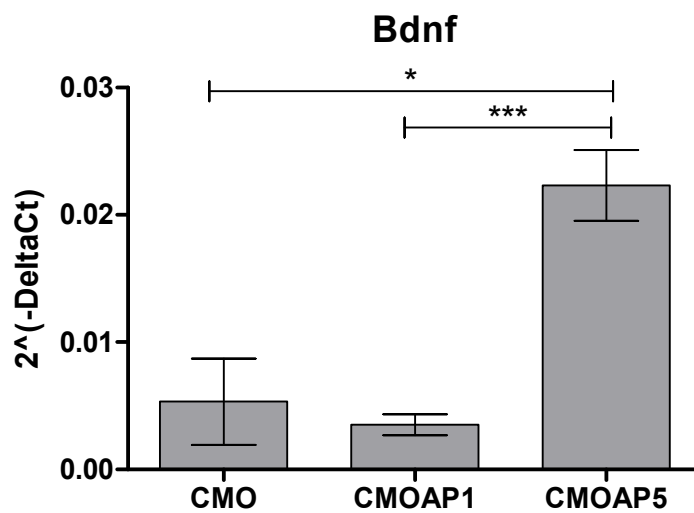
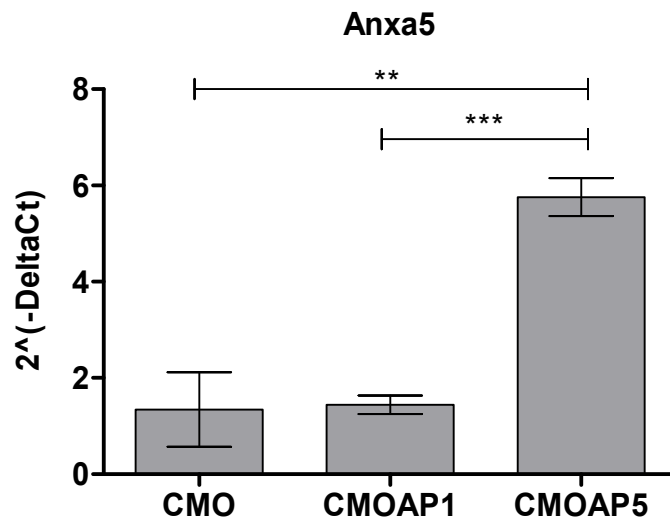
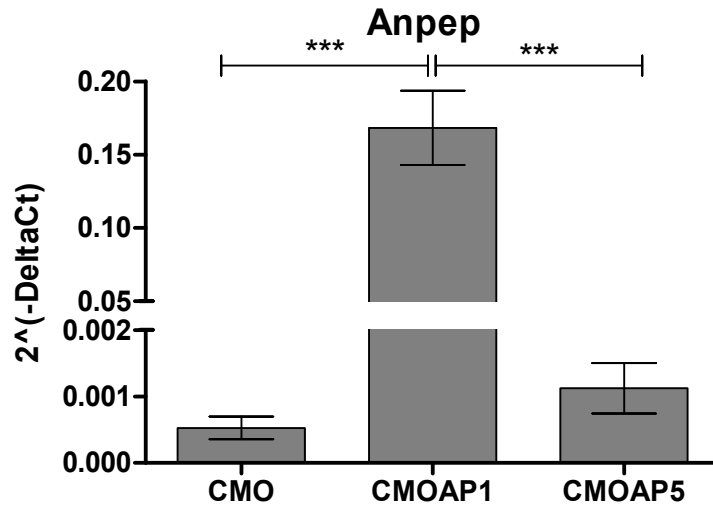
ZHOU, S., J. S. GREENBERGER, et al.

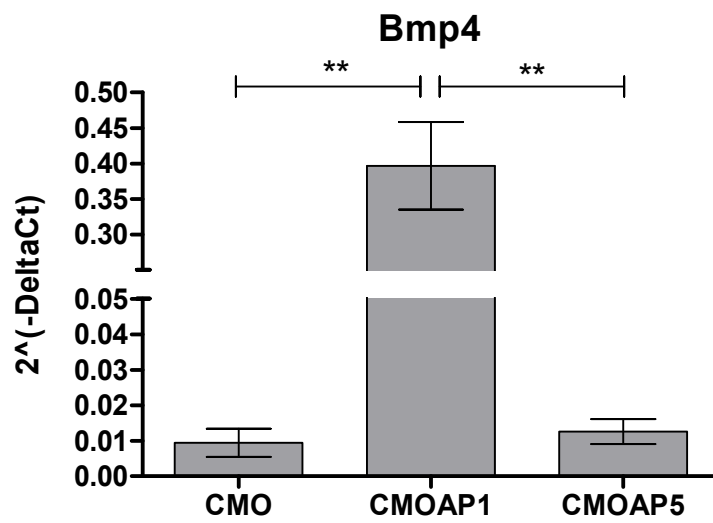
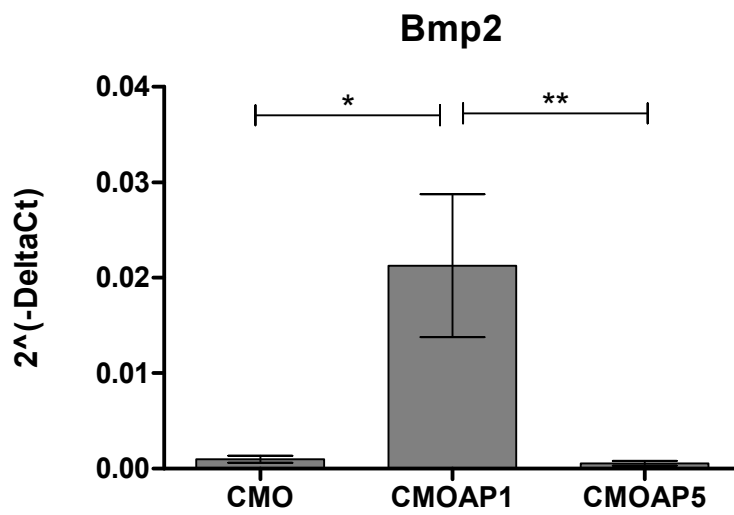
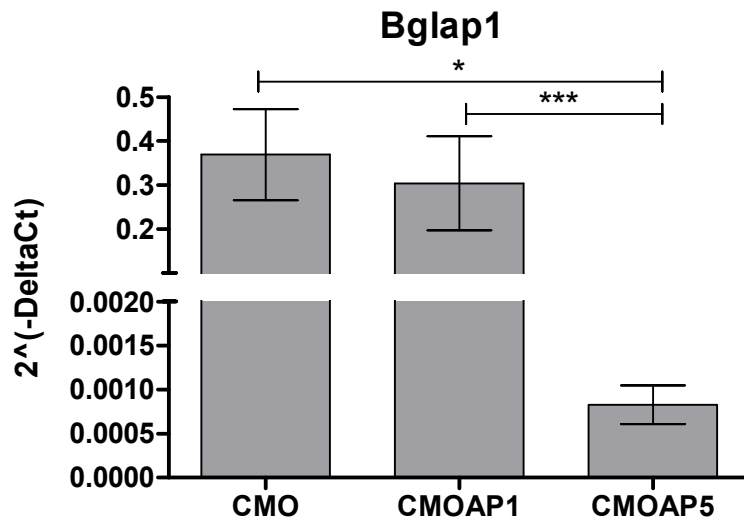
Age-Related Intrinsic Changes in Human Bone-Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Their Differentiation to Osteoblasts
Aging Cell (2008). **7**(3): 335-343.

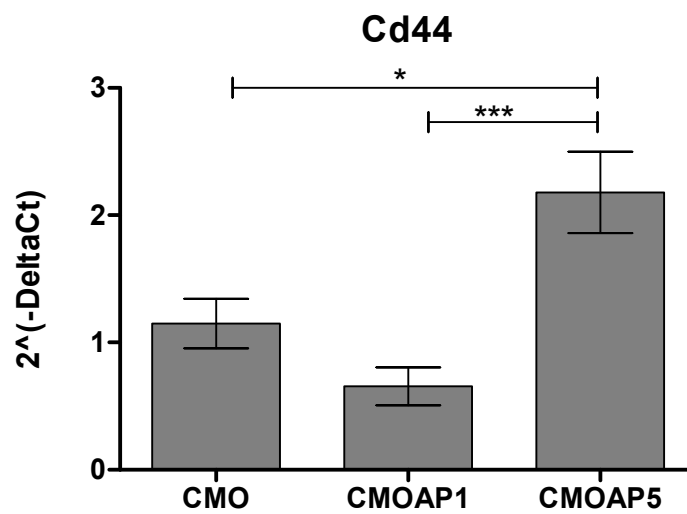
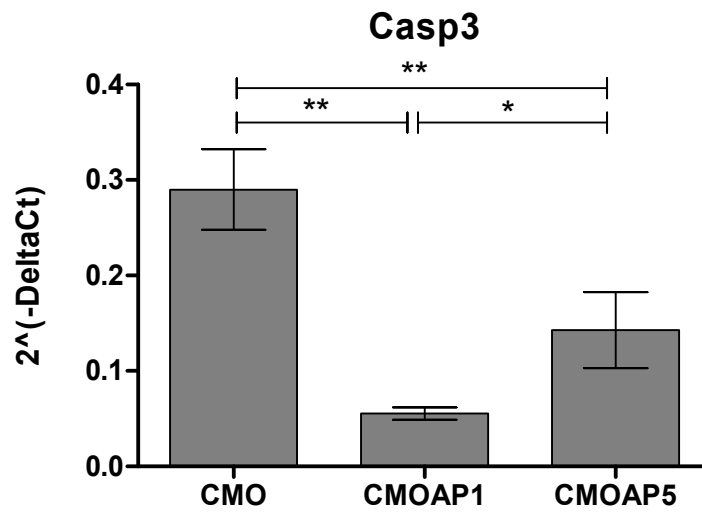
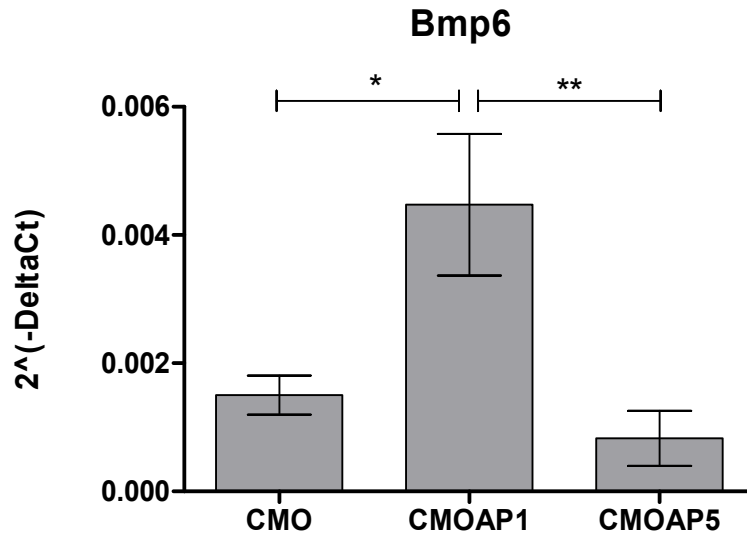
ANNEXES

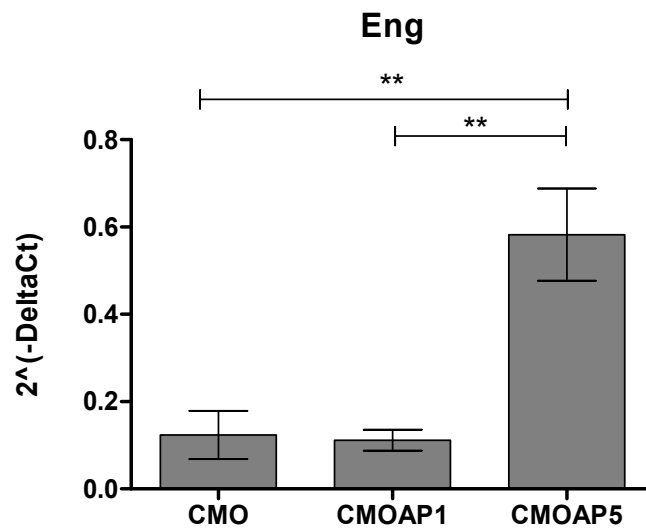
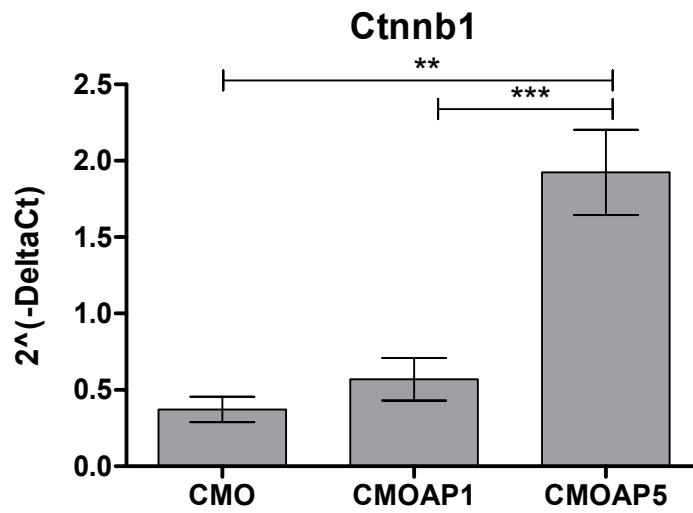
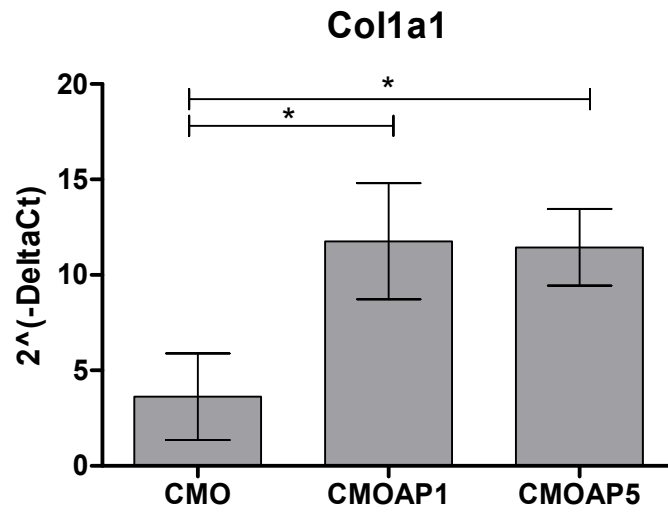
Annexe 1 : Variation d'expression des niveaux d'ARNm étudiés par PCR array.

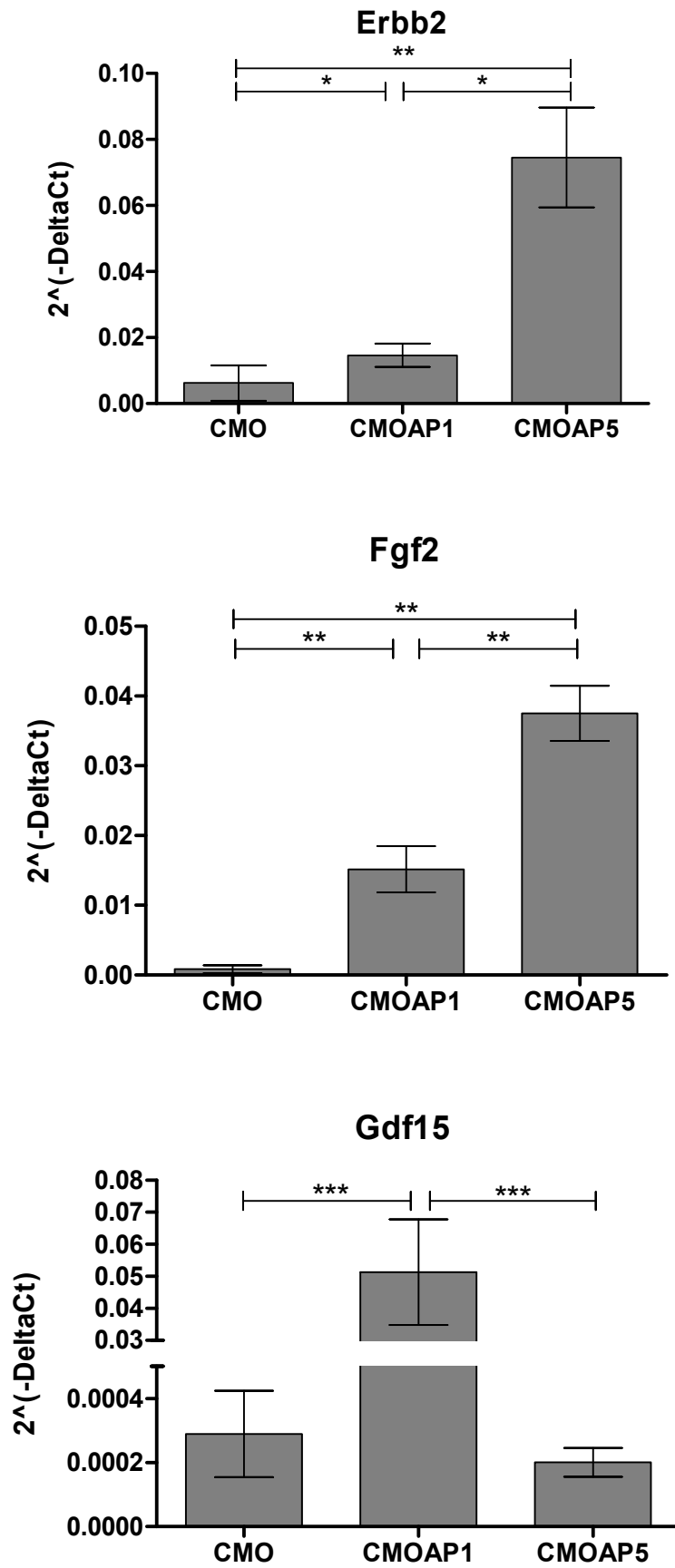


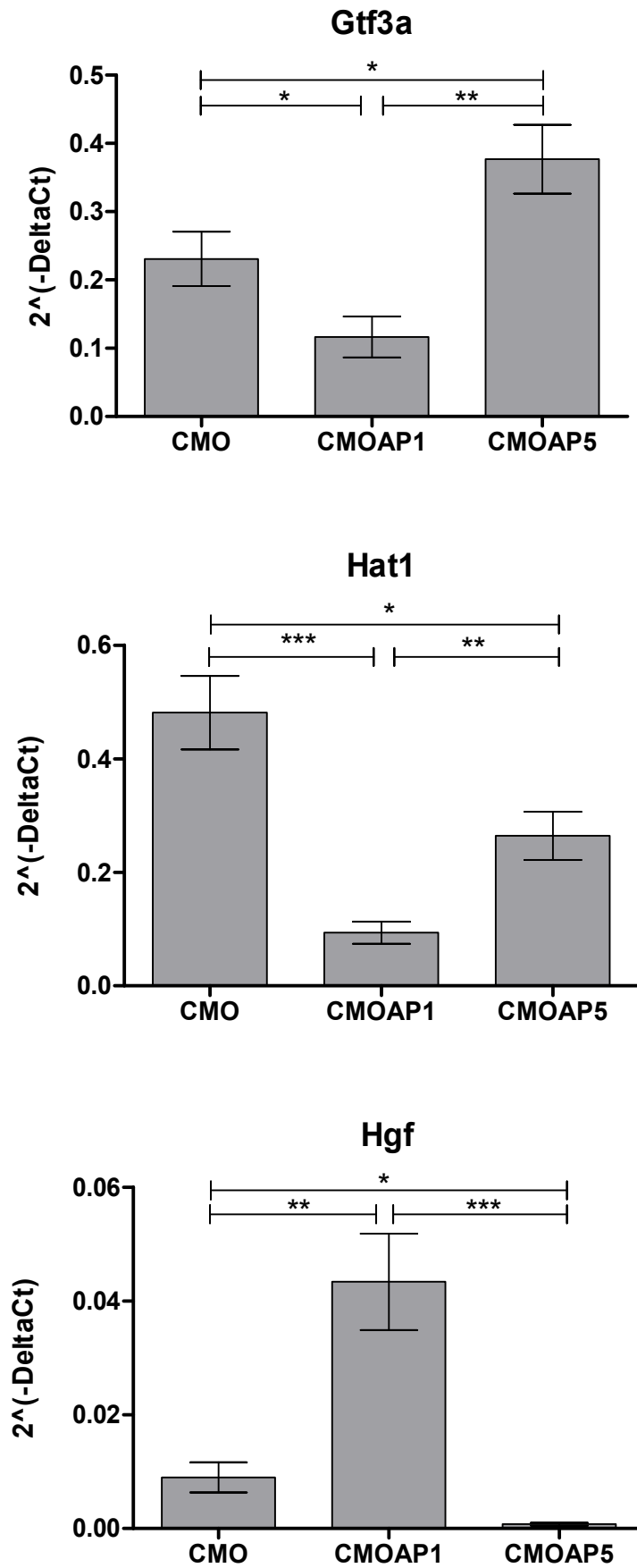


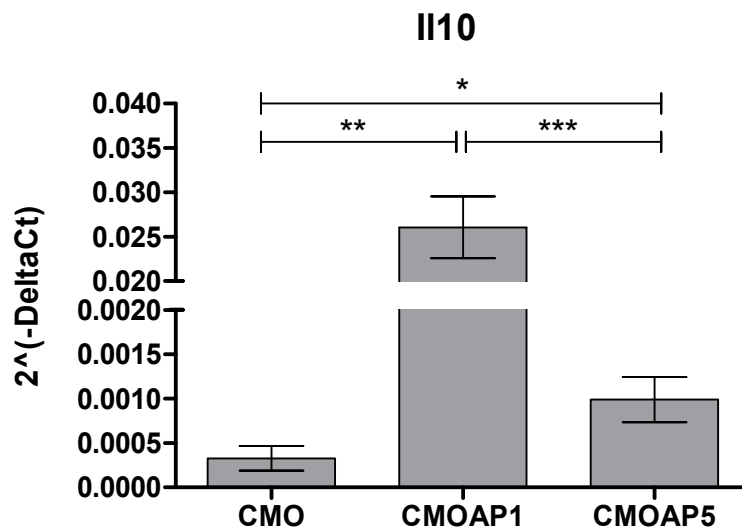
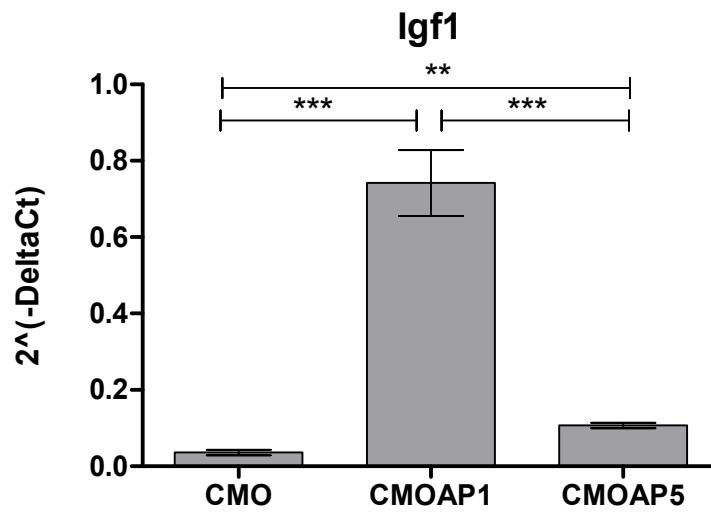
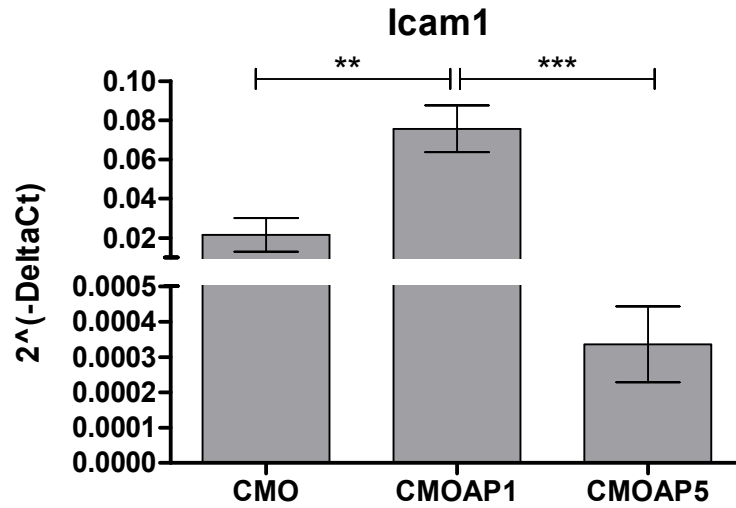


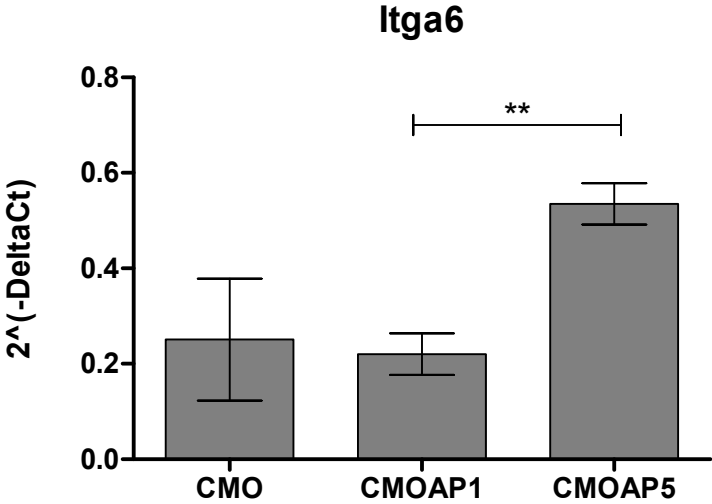
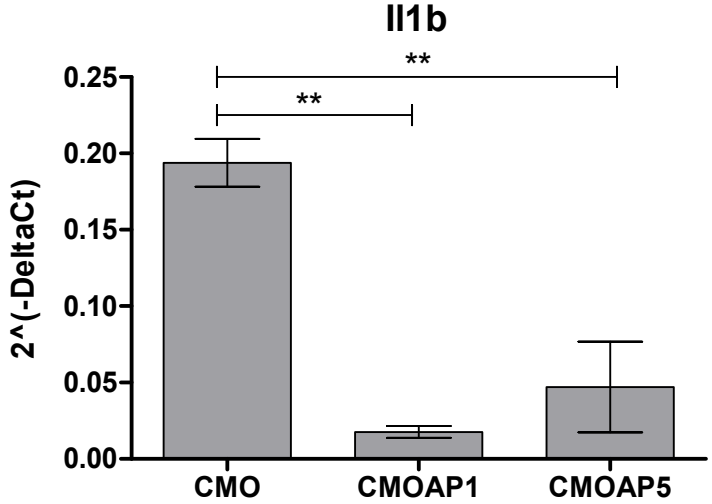


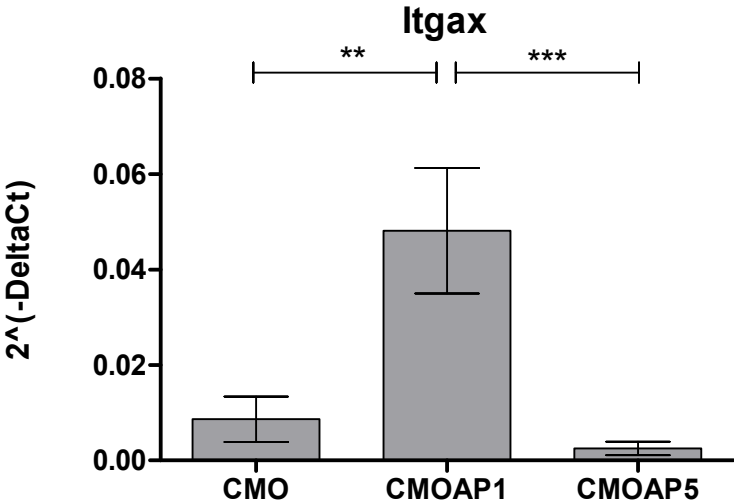
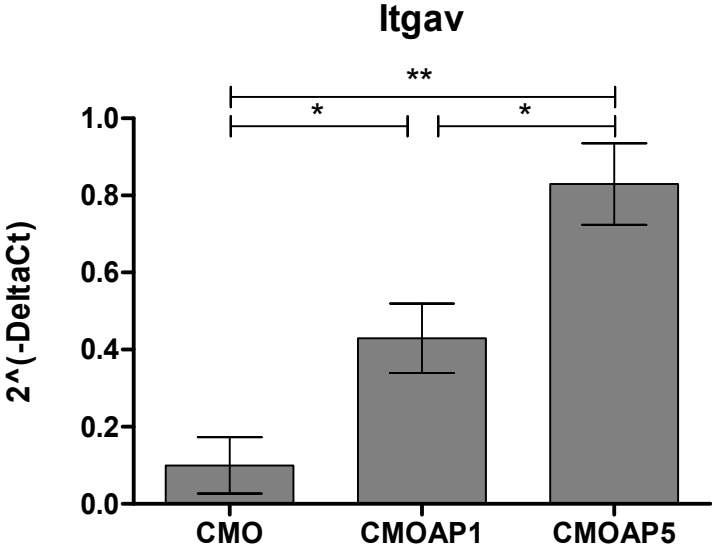


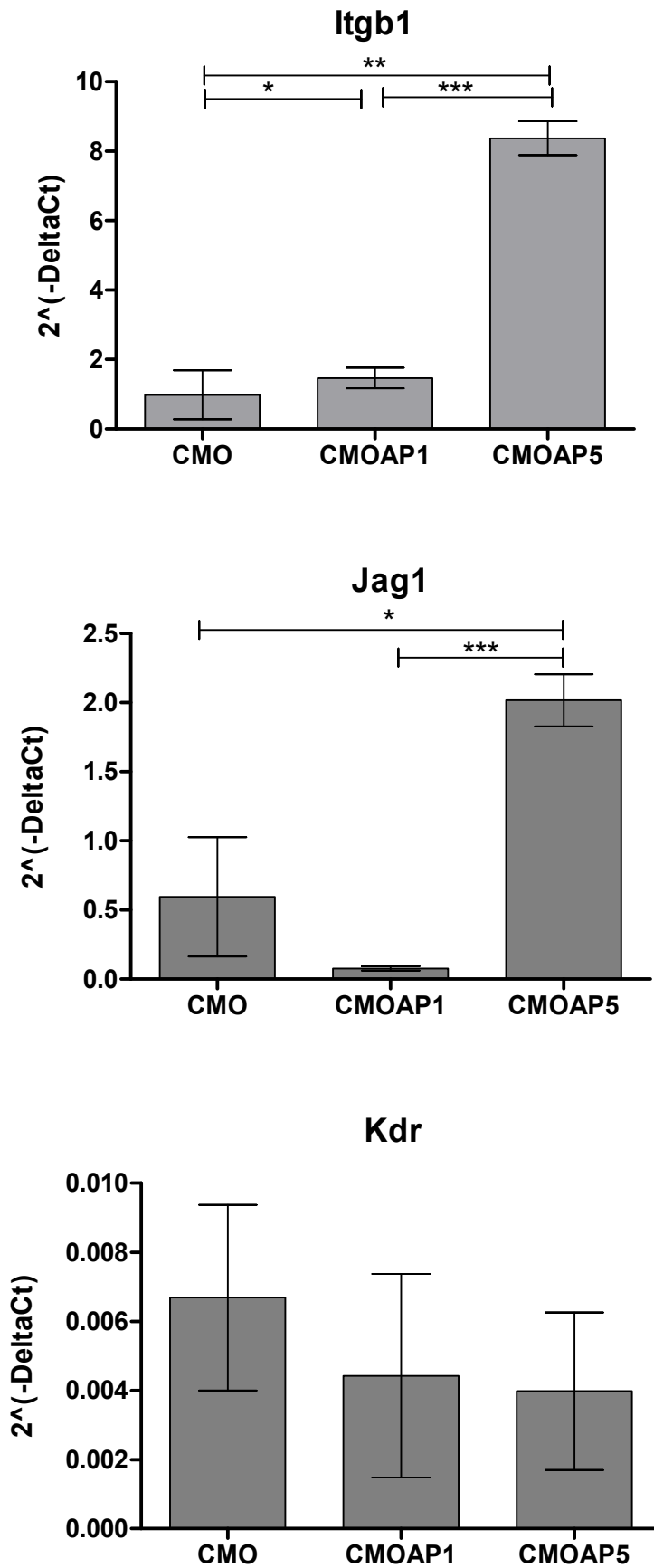


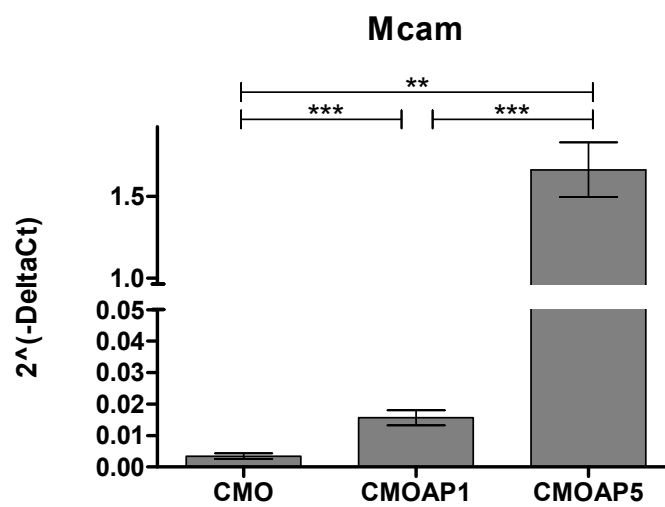
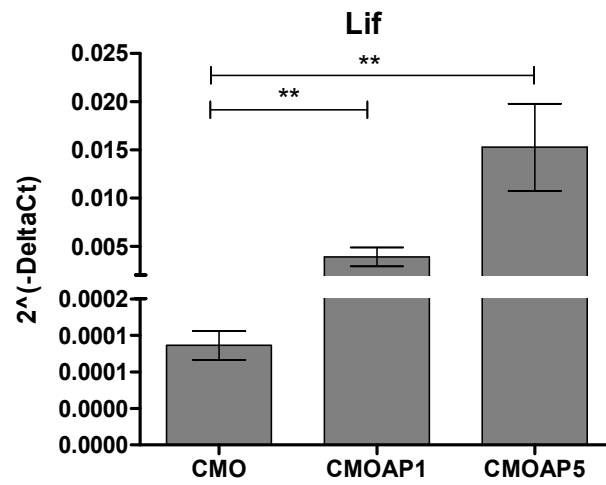
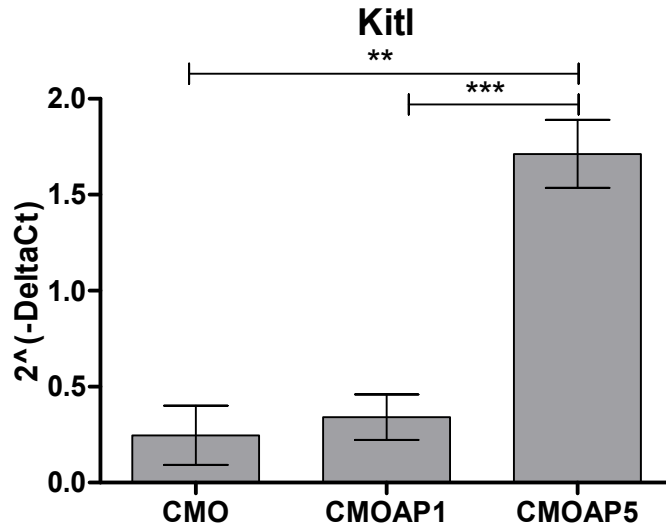


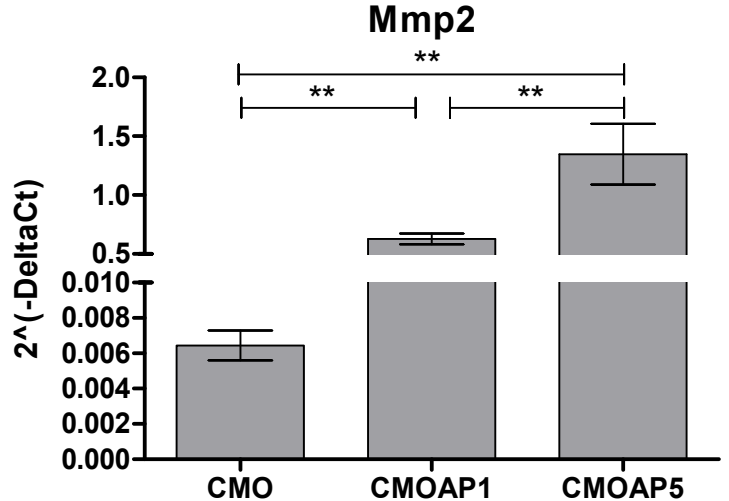
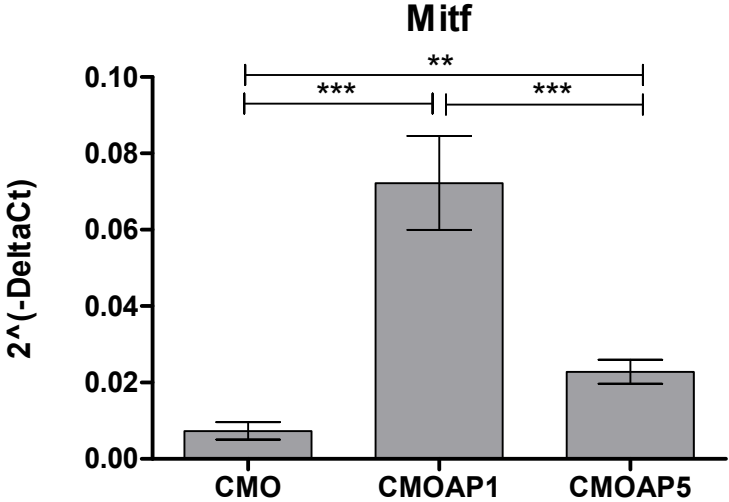


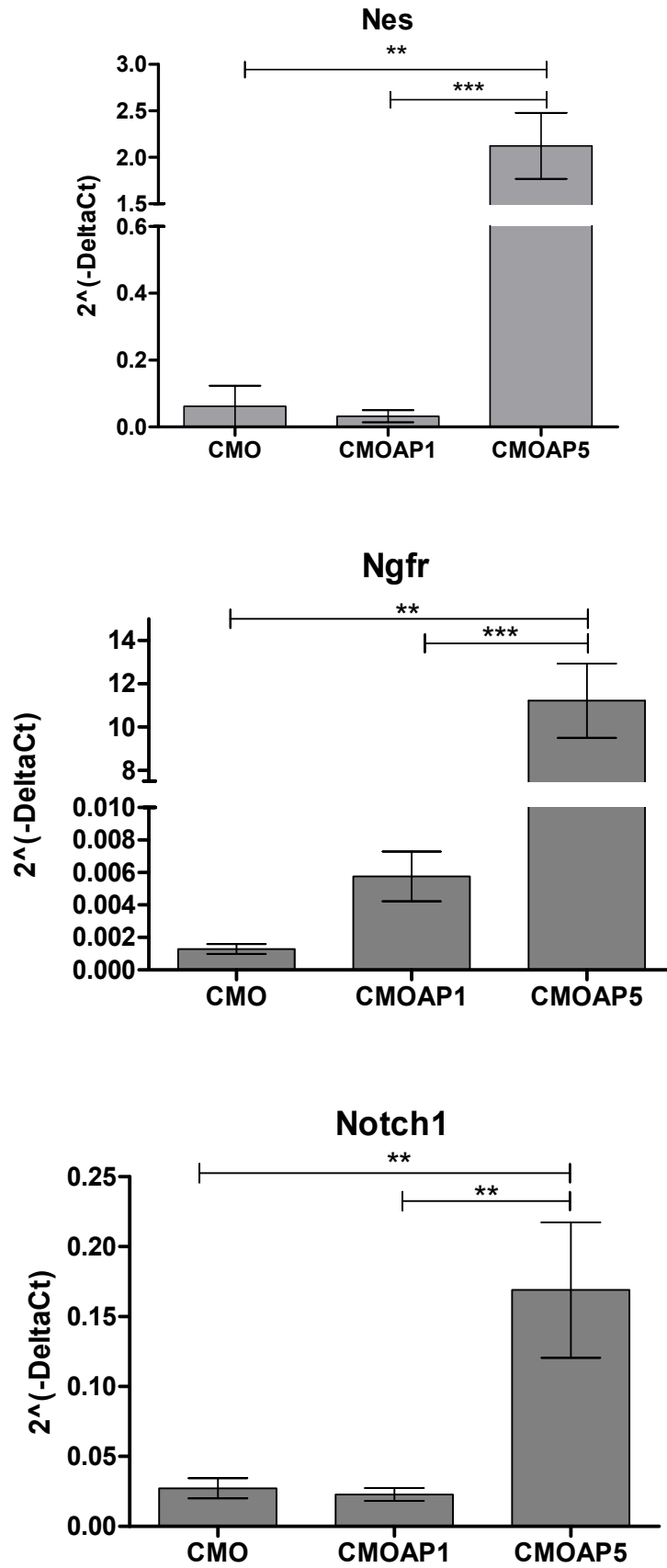


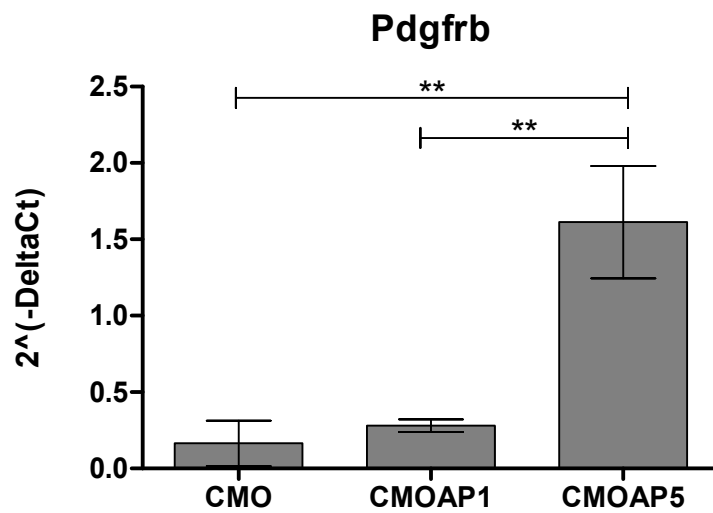
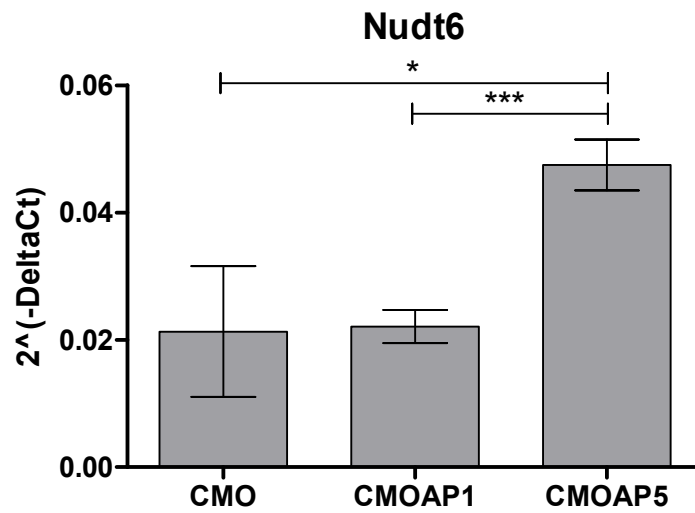
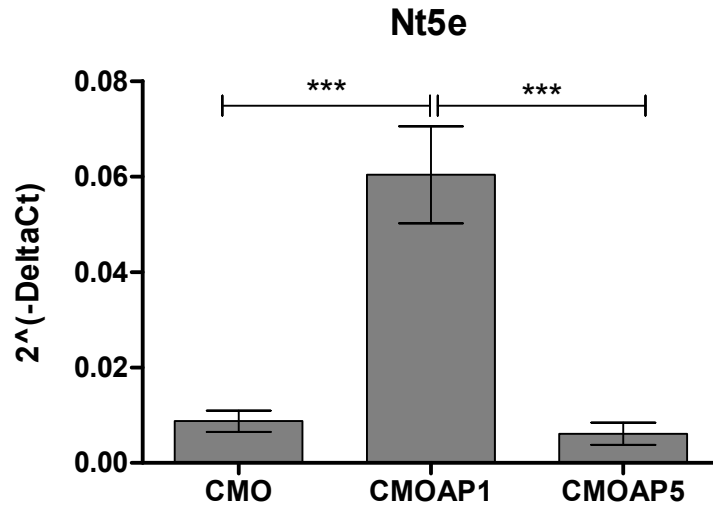


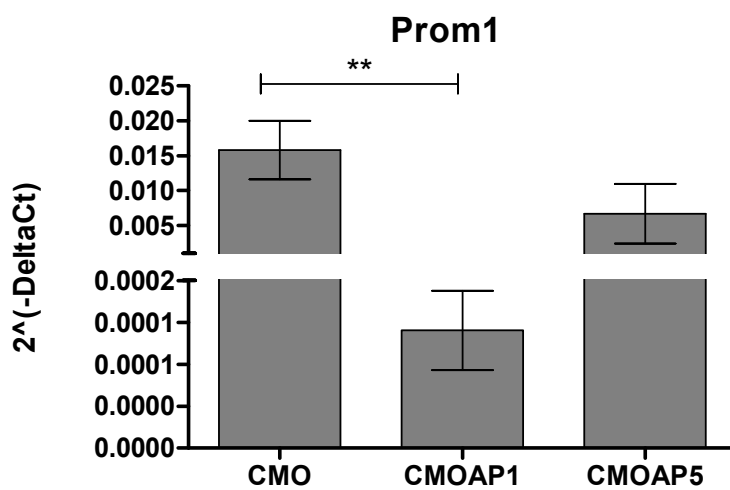
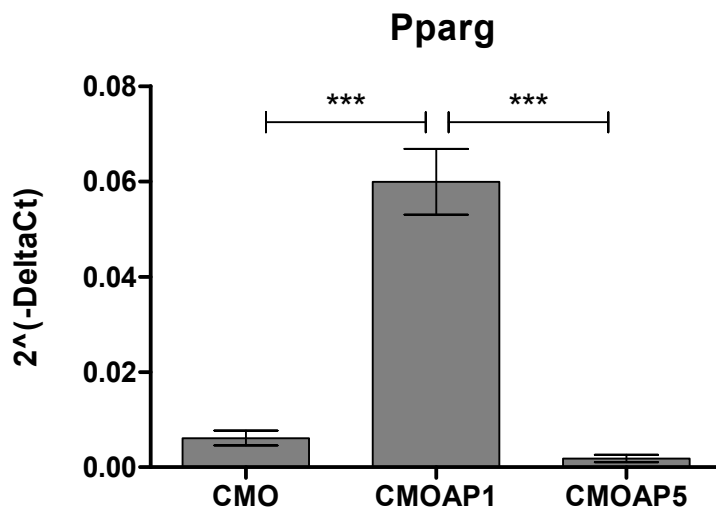
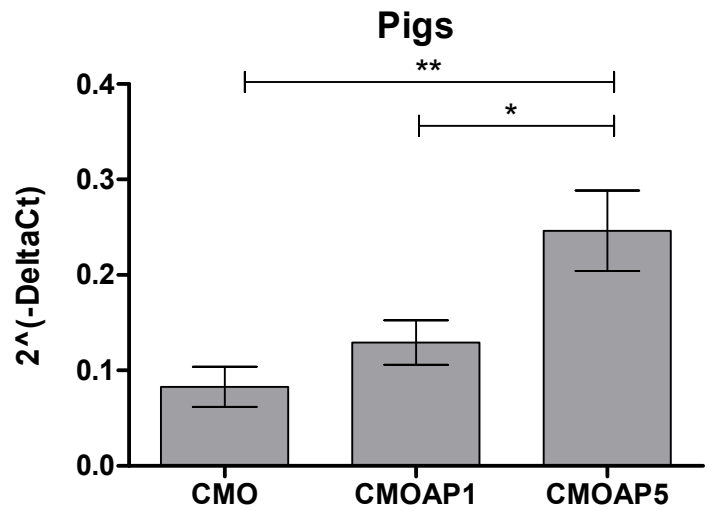


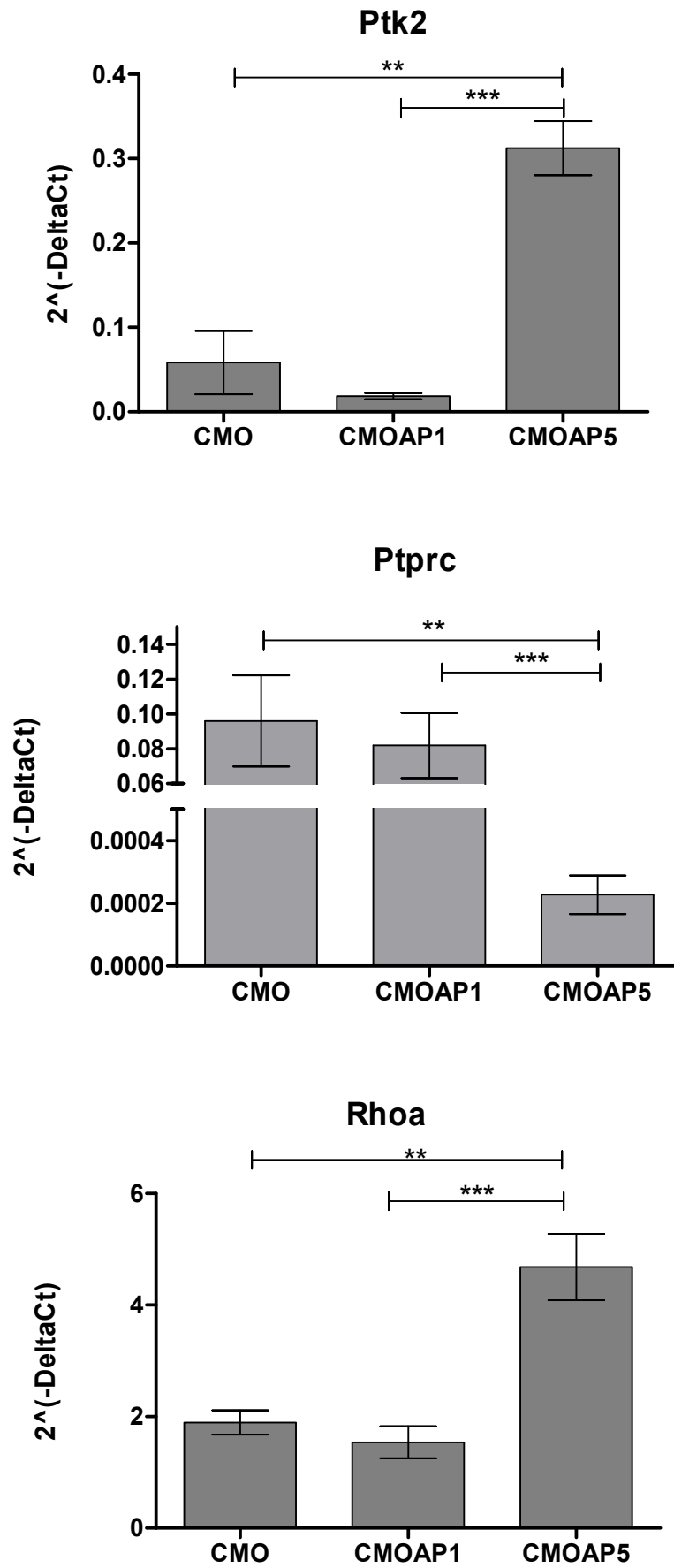


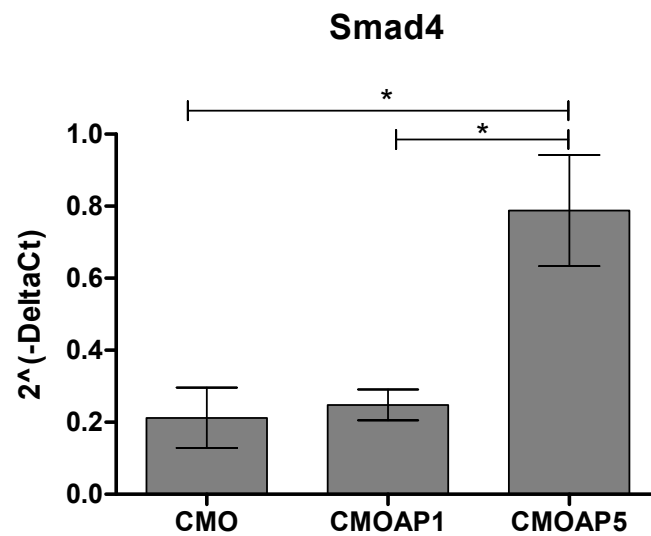
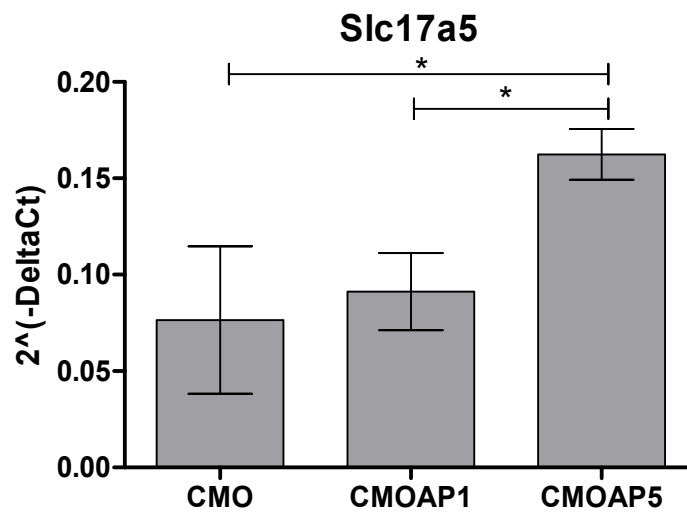
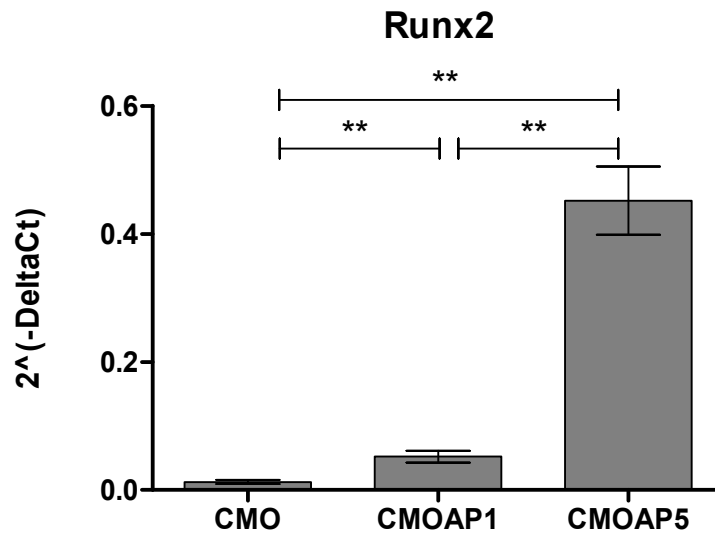


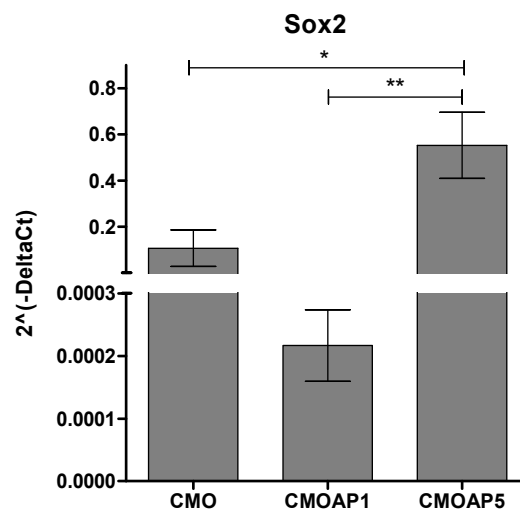
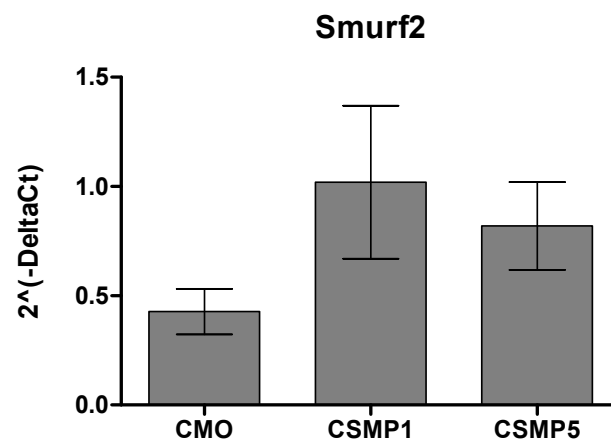
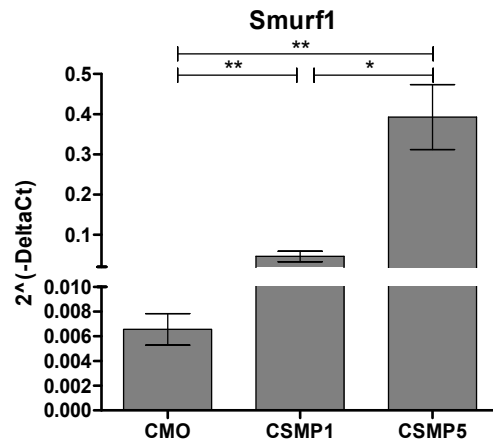


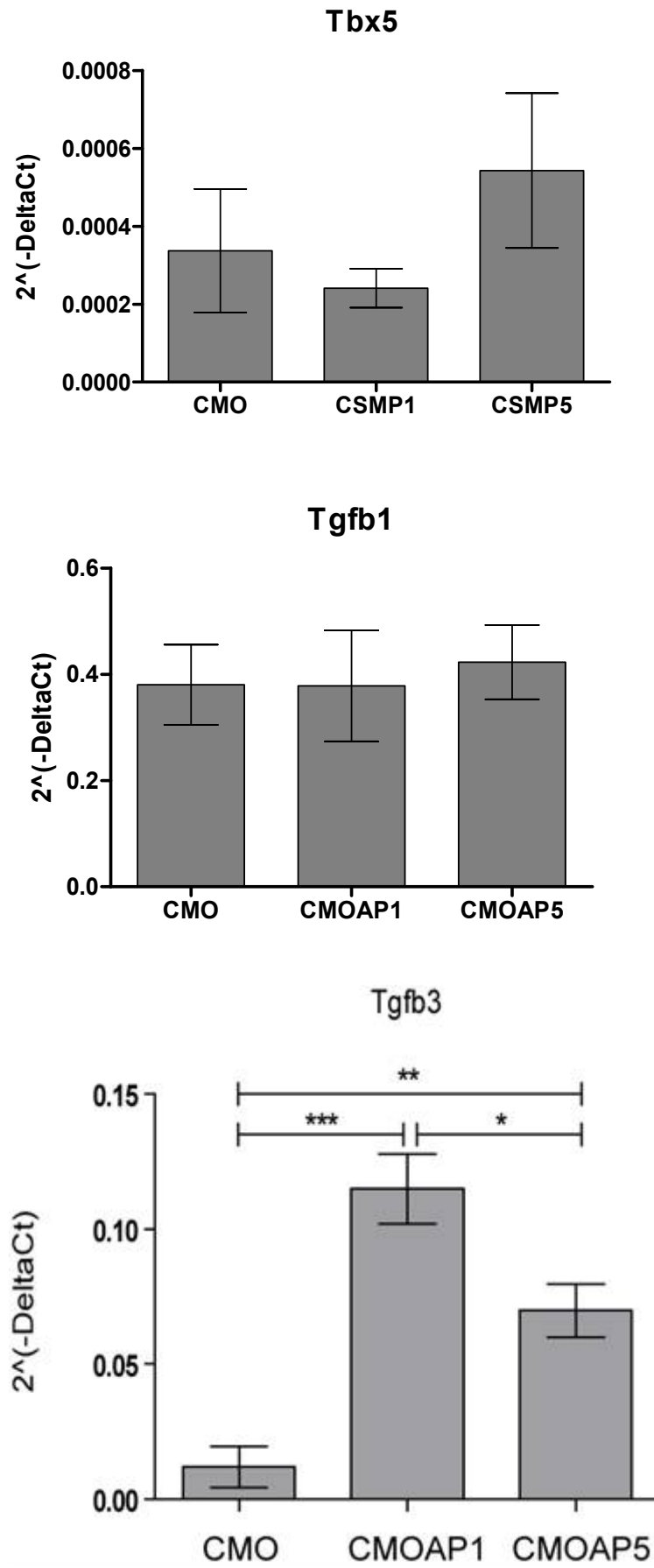


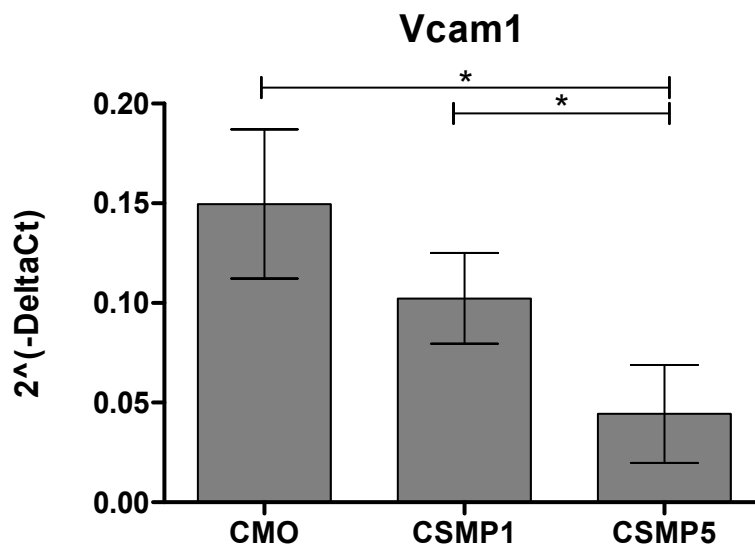
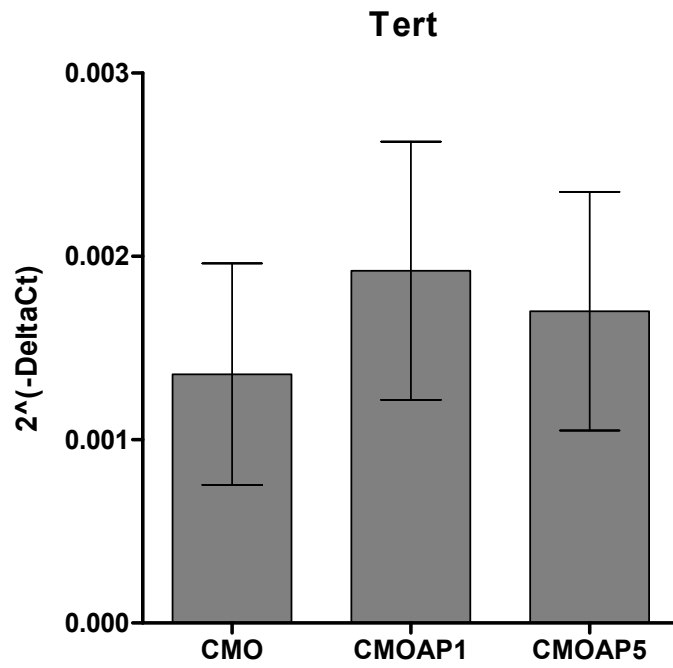


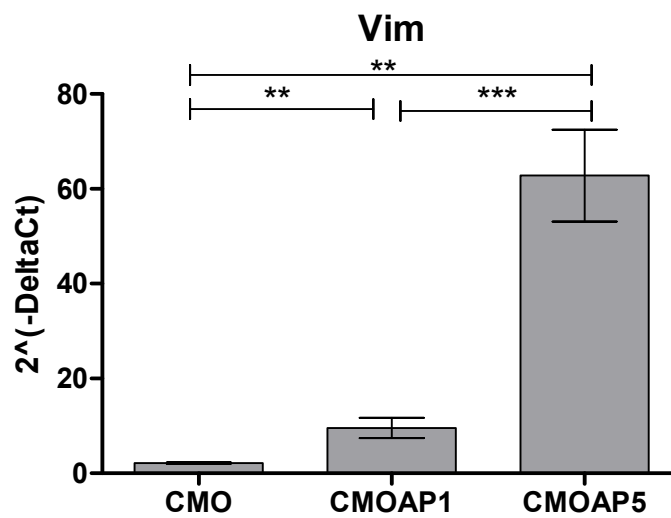
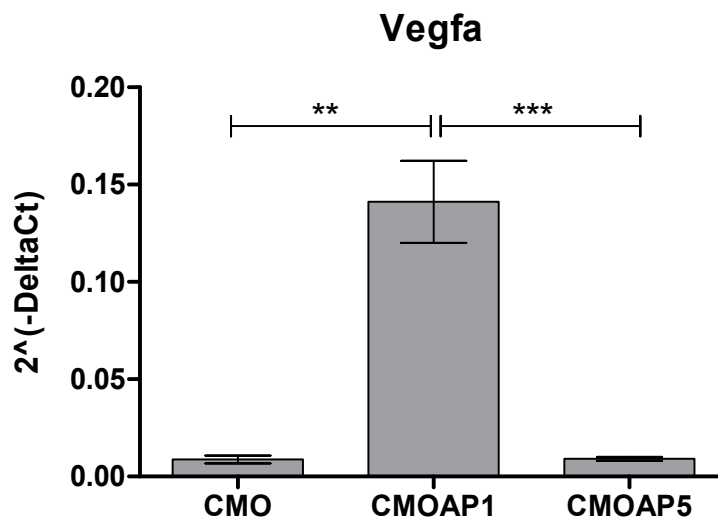
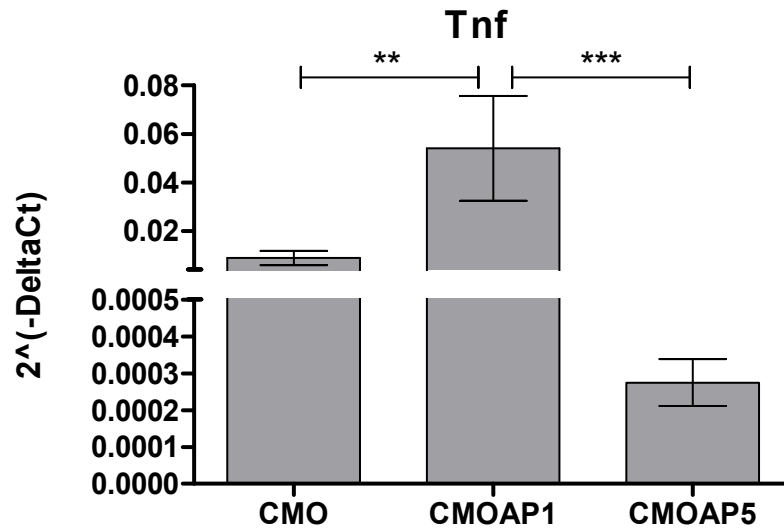


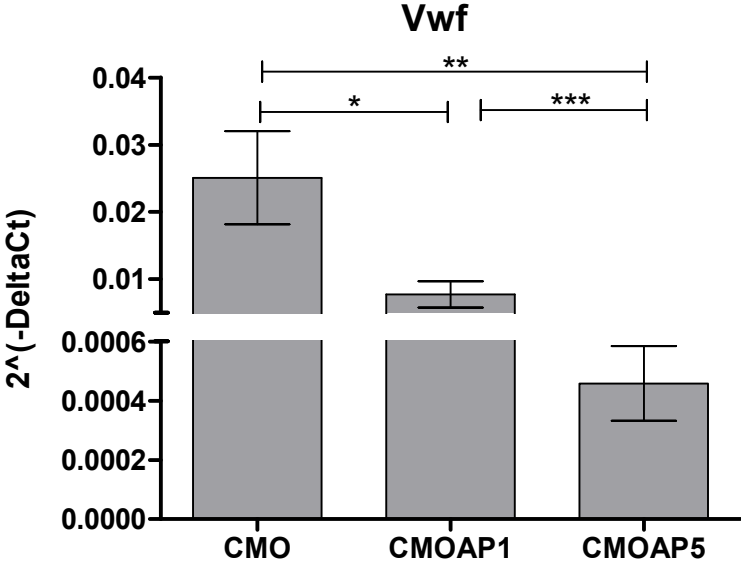












Annexe 2 : Communications orales et affichées

Communications orales :

- Décembre 2009 :** Société de biologie de Besançon – *Besançon*
Interactions in vitro entre des cellules souches mésenchymateuses et des tranches d'hippocampe en culture
- Juin 2007 :** Forum des jeunes chercheurs de Besançon et de Dijon – *Dijon*
Evaluation de la différenciation de cellules souches de moelle osseuse dans un modèle de culture organotypique de cerveau de souris. (Prix communication orale)
- Septembre 2006 :** Journée de l'Institut Fédératif de Recherche 133 – *Besançon*
Thérapie cellulaire du système nerveux central : évaluation de la greffe de cellules souches périphériques
- Mai 2006 :** Journée scientifique Université Louis Pasteur – *Strasbourg*
Intégration et différenciation de cellules de moelle osseuse dans le système nerveux central de souris : résultats préliminaires
- Mars 2006 :** Onzièmes journées du collège des histologistes, embryologistes, cytologistes et cytogénéticiens – *Tours*
Thérapie cellulaire du système nerveux central : évaluation de la greffe de cellules souches périphériques
- Décembre 2005 :** Société de biologie de Besançon – *Besançon*
Intégration et différenciation de cellules de moelle osseuse dans le système nerveux central de souris : résultats préliminaires

Communications affichées

- Juillet 2008 :** Congrès de la Fédération européenne des neurosciences (FENS) – *Genève*
Bone marrow mesenchymal stromal cells effects on hippocampal slice cultures
- Juin 2006 :** Forum des jeunes chercheurs de Besançon et de Dijon - *Besançon*
Evaluation de la greffe de cellules souches périphériques. (Prix poster)

Annexe 3 : Publication

In vitro interactions between bone marrow stromal cells and hippocampal slice cultures.

Karine Charrière, Pierre-Yves Risold, Dominique Fellmann.

C R Biol. 2010 Aug;333(8):582-90.

Differentiation of bone marrow stromal cells (BMSCs) into various cell types including brain cells is well documented. Several groups have demonstrated that BMSCs grafts improve neurological scores and recovery of motor functions in experimental models of human diseases (Parkinson's disease, stroke, spinal cord injury). Enhanced proliferation of endogenous neural stem cells and suppression of newly generated cell death were also reported. In that very promising context, our contribution concerned a detailed analysis of marrow cell behaviors during their phenotypic transformations after transplantation *in vivo* and *in vitro*.

In a first series of experiments, we grafted bone marrow cells in irradiated animals to investigate their capacity to invade and differentiate in central nervous system. To facilitate their recognition and analysed their location in recipient animals, they were harvested from genetically modified animals expressing the Green Fluorescent Protein (GFP). After injecting in the lateral tail vein, many of them migrated into the brain, and, among those a few acquired neuronal or glial phenotypes.

Then, we used an "*in vitro* graft model" which consisted of a coculture of GFP-expressing BMSCs and hippocampal organotypic slice cultures. Total marrow cells (MCs) or bone marrow stromal cells (BMSCs) at one (BMSC^{1P}) or five passages (BMSC^{5P}) were transplanted onto hippocampal slices. In other experiments, slices were co-cultured with, but not in contact with BMSC^{1P} or BMSC^{5P}. Moreover, the establishment of a reliable tool to apprehend a non-debatable neuronal differentiation seemed indispensable. MSC derived from animals modified to express GFP (Green Fluorescent Proteins) under the control of the promoter NFH (neurofilament high molecular weight) were then used.

We observed that MCs and BMSC^{1P} migrated toward the tissue and that their total number remained constant. On the contrary, the number of BMSC^{5P} decreased over the 10 days of the experiment, and no migration could be detected. Using immunohistochemistry, we observed that the hippocampal slices induced the expression of neural genes in very few BMSCs moreover tissue that received a MCs or BMSC^{1P} graft showed a slower degradation compared to control tissue slices. Similar experiments with BMSC^{5P} did not produce any significant changes. These morphological results were confirmed by RT-PCR studies with neuronal and glial markers (NeuN, NF, GFAP and CNPase).

Finally a PCR array strategy was implemented for a transcriptomic analysis of MCs, BMSC^{1P} and BMSC^{5P}. We found that these cells differentially expressed many genes involved in angiogenesis, neurogenesis and cell death that may explain responses that they induce in the nervous tissue.

As a conclusion, cellular amplification of BMSCs affects their capacity to slower degradation of organotypic hippocampal slices. This work provides a first glimpse of mechanisms implicated in the role of BMSCs in establishing microenvironment more favorable for tissue repair. It also gives essential information on the conditions of selection and induction required for future use in cell therapy as well as their true therapeutic potential.

La différenciation des cellules souches mésenchymateuses (CSM) en divers types cellulaires, y compris en cellules neurales, est aujourd'hui bien documentée. De nombreuses équipes ont montré que les greffes de CSM dans des modèles animaux de pathologies humaines (maladie de Parkinson, accidents vasculaires cérébraux, lésions de la moelle épinière) conduisaient à une amélioration fonctionnelle, motrice et/ou cognitive. Bien que les mécanismes à l'origine de ces effets ne soient pas encore totalement élucidés, de la prolifération des cellules souches neurales endogènes et l'inhibition de la mort cellulaire des cellules nouvellement générées sont très probablement impliqués. Dans ce contexte très prometteur, notre contribution concerne une analyse détaillée des comportements de cellules issues de la moelle osseuse (CMO) après transplantation *in vivo* et *in vitro*.

Dans un premier temps, nous avons cherché à valider divers protocoles de suivi des CMO dans l'encéphale de souris femelles Balb/c greffées par des CMO de souris mâles FvB, grâce au chimérisme du complexe majeur d'histocompatibilité et sexuel crée lors de la greffe entre deux souches de souris différentes et de sexe opposé. Ce modèle a permis de détecter la présence des CMO dans l'encéphale des receveuses jusqu'à 6 mois après greffe. Afin de faciliter le repérage et le suivi phénotypique des cellules implantées, nous avons mis en place un modèle pour lequel les CMO étaient issues de souris exprimant la GFP de façon constitutive. Après injection dans la veine latérale de la queue, de nombreuses cellules ont migré dans l'encéphale et certaines ont acquis un phénotype neuronal ou glial.

Nous avons ensuite développé un modèle *in vitro* de cultures organotypiques d'hippocampe « greffées » par des cellules de moelle osseuse. Nous avons utilisé des CMO ou des CSM sélectionnées après un (CMOAP1) ou cinq (CMOAP5) passages en culture. Ces cellules ont été greffées directement sur les tranches ou utilisées en co-culture avec celles-ci, mais sans contact direct. De plus, l'utilisation d'un outil plus spécifique pour l'étude de phénomènes de transdifférenciation des CMO/CSM en neurones nous est apparu indispensable, c'est pourquoi nous avons choisi l'utilisation de souris donneuses modifiées pour exprimer la GFP sous le contrôle du promoteur neurofilament.

Nous avons observé un phénomène de migration des CMO et des CMOAP1 sur le tissu sans diminution de leur nombre alors que les CMOAP5 ne migrent pas et disparaissent progressivement au cours des 10 jours de l'expérience. Par immunodétection, nous avons observé l'induction de caractères neuronaux dans un nombre faible de CSM. Par contre les tranches ayant reçu un apport de CMO ou de CMOAP1 se dégradent moins vite que les contrôles. La greffe de CMOAP5 ne reproduit pas cet effet favorable. Ces résultats morphologiques ont ensuite été confirmés par RT-PCR semi-quantitatives avec différents marqueurs neuraux (NeuN, NF, GFAP et CNPase).

Finalement, nous avons analysé le transcriptome des trois populations cellulaires mises en œuvre dans nos expériences et avons trouvé que l'expression de nombreux gènes impliqués dans l'angiogenèse, la neurogenèse et la mort cellulaire variaient selon les fractions cellulaires. Ces variations peuvent expliquer les différentes réponses induites dans le tissu nerveux.

L'ensemble de nos résultats suggère que l'amplification cellulaire des cellules issues de la moelle osseuse affecte leur capacité à protéger les tranches d'hippocampe en culture. Ce travail permet d'avoir un aperçu des mécanismes impliqués dans l'établissement d'un microenvironnement favorable à la réparation tissulaire et donne des informations essentielles sur les conditions de sélection et d'amplification indispensable à une future utilisation thérapeutique.