



Université de Liège
Faculté de Médecine



**Etude *in vivo* de la plasticité phénotypique
nerveuse des cellules souches dérivées de la moelle
osseuse adulte.**

Virginie Neirinckx

Docteur Sabine Wislet-Gendebien

Professeur Bernard Rogister



**Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Master en Sciences Biomédicales
à finalité approfondie en Neurosciences**

Année académique 2010-2011



Université de Liège
Faculté de Médecine



**Etude *in vivo* de la plasticité phénotypique nerveuse
des cellules souches dérivées de la moelle osseuse
adulte.**

Virginie Neirinckx

Docteur Sabine Wislet-Gendebien

Professeur Bernard Rogister



**Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Master en Sciences Biomédicales
à finalité approfondie en Neurosciences**

Année académique 2010-2011

REMERCIEMENTS

Arrivée au terme de la réalisation de ce mémoire, je voudrais tout d'abord remercier le Professeur Bernard Rogister, pour m'avoir fourni l'opportunité de travailler au sein de son équipe, et pour avoir toujours suivi d'un œil avisé le bon déroulement de mon projet.

Je tiens également à remercier ma promotrice, le Docteur Sabine Wislet, qui m'a accordé sa confiance, qui m'a encadrée et recadrée, qui m'a appris à développer un esprit critique et à acquérir de l'expérience au fur et à mesure de mon travail.

Un merci particulier à Alice, dont l'expérience et la présence m'ont été indispensables. Merci pour sa disponibilité, sa bonne humeur à toute épreuve, ses recommandations, son soutien, pour avoir soigné tous mes petits bobos comme une vraie chef, et pour toutes ces heures passées à m'aider, ce même dans des conditions parfois extrêmes !

Merci à Émerence, avec qui c'est un plaisir d'apprendre et de travailler, ainsi qu'à Jessica, Jérôme, Linda, Mélissa, Benoît et Patricia, pour leur aide et leurs conseils en tous domaines, pour la motivation et la bonne entente qui règne au sein de leur équipe. Je remercie également l'ensemble du personnel du GIGA-Neurosciences, toujours disponibles à tout moment.

Merci à Bastien (pour les cinq années passées) et Fabian, ainsi qu'à Coraline et Véro pour les petites pauses discussions, pauses midi et pauses cafés toujours bien agréables. Merci à Laurie, qui m'a énormément aidée et avec qui j'ai réellement passé du bon temps. Je lui souhaite une très bonne continuation, et serai heureuse de la croiser à nouveau dans nos couloirs.

Merci à mes parents, mon frère, mes deux sœurs, ma famille et mes amis, qui ne cessent de me faire avancer dans de bonnes conditions, et à qui je tiens précieusement.

Enfin, et bien qu'un « merci » soit bien peu de choses : Merci très spécial à Niko, pour avoir été le meilleur « buddy » pendant toute cette année, pour m'avoir toujours soutenue d'une main de fer, pour avoir partagé les fous rires tout comme les crises de nerfs. Pour m'impressionner un peu plus tous les jours, et pour sa façon particulière de me pousser plus haut, de me rendre fière de moi et de ce que je réalise. C'est pleine d'assurance que j'entame cette nouvelle année en sa compagnie.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
BHE	Barrière hémato-encéphalique
CSCN	Cellules souches dérivées de crête neurale
CSM	Cellules souches mésenchymateuses
DAB	Diaminobenzidine
DAT	Transporteur de la dopamine
DMSO	Diméthylsulfoxyde
dNTP	désoxyribonucléotides triphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylène-diamine-tétra-acétique
Cellules ES	Cellules souches embryonnaires (<i>Embryonic Stem cells</i>)
FACS	<i>Fluorescence-associated cell sorter</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
GC	Grains cérébelleux
GFAP	<i>Glial fibrillary acid protein</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
i.p.	intrapéritonéale
iPS	<i>induced pluripotent stem cells</i>
L-DOPA	L-dihydroxyphénylalanine
MAO-B	Monoamine oxydase B
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
MPP+	1-méthyl-4-phenylpyridinium
MPTP	1-méthyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PBS-T	PBS-Triton X100
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFA	Paraformaldéhyde
RRX	Rhodamine Red X
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase PCR</i>
SEM	<i>Standard Error of Mean</i>
SNC	Système nerveux central
SNpc	Substantia nigra pars compacta
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris-borate-EDTA
TEM	Transition épithélio-mésenchymateuse
TH	Tyrosine hydroxylase
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranoside

RÉSUMÉ

Chez l'Homme, les lésions du système nerveux central sont caractérisées par une absence quasi totale de régénérescence cellulaire. Dès lors, les thérapies cellulaires basées sur la greffe de cellules immatures au sein ou au voisinage d'une lésion cérébrale ou médullaire suscitent de nombreux espoirs en termes de « réparation nerveuse ». Cependant, dans ce contexte, se pose bien évidemment la question de la source cellulaire à greffer. Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) présentes dans la moelle osseuse adulte pourraient représenter une source cellulaire autologue idéale. Cependant, une caractérisation plus fine des sous-populations des cellules stromales de la moelle osseuse est cruciale. En effet, il a été démontré que seules les CSM exprimant la nestine sont capables d'adopter un destin neuronal, dans certaines conditions spécifiques. En outre, plusieurs études démontrent la présence de cellules souches dérivées de la crête neurale (CSCN) dans les tissus adultes, y compris la moelle osseuse.

Etant donné qu'aucun marqueur membranaire spécifique des CSCN (ni des CSM) n'est connu à ce jour, le premier objectif de ce mémoire a été de comparer des populations clonales issues de cellules stromales médullaires, respectivement dérivées (CSCN) et non dérivées (CSM) de la crête neurale embryonnaire. Cette comparaison s'est faite notamment sur base d'une analyse transcriptomique, réalisée afin d'identifier de nouveaux marqueurs spécifiques permettant une discrimination efficace des deux populations. Cette étude comparative a permis de mettre en évidence plusieurs marqueurs candidats, validés ensuite au niveau du transcrit, et au niveau de la protéine, avant d'être testés dans un protocole de tri cellulaire.

En parallèle, nous avons entamé une caractérisation *in vivo* des cellules de type CSCN via une greffe de ces cellules dans un modèle murin de la maladie de Parkinson (modèle MPTP). Une première série d'analyses a révélé un faible taux de survie des CSCN à 14 jours après la greffe, et une absence totale de survie après 28 jours. Une caractérisation plus détaillée a montré, néanmoins, la présence de cellules dérivées des CSCN et exprimant les marqueurs nestine, Sox2 et β III-tubuline. Enfin, l'éventuelle récupération des performances motrices à la suite de la greffe a été évaluée au moyen de divers tests comportementaux (*Beam test*, *grid test* et *rearing test*). Cependant, bien que les déficits moteurs causés par le MPTP aient effectivement été mis en évidence, aucun effet significatif de la greffe de cellules sur les performances motrices n'a été observé.

En conclusion, ces résultats, bien que préliminaires, révèlent que les CSCN ont à première vue une faible propension à remplacer les neurones perdus, dans le cadre d'un modèle mimant des lésions caractéristiques de la maladie de Parkinson. Une caractérisation plus approfondie devra néanmoins être réalisée, autant que la mise au point de certains protocoles, afin de confirmer ces résultats. D'autre part, il serait intéressant d'analyser l'effet des CSM (non-dérivées de la crête neurale) dans les mêmes conditions.

Mots clés : Cellules souches mésenchymateuses - Cellules souches dérivées de la crête neurale - Thérapie cellulaire - Maladie de Parkinson.

TABLE DES MATIÈRES

I. Introduction	1
1. Introduction générale	1
2. Cellules souches	2
2.1. Cellules souches embryonnaires.....	2
2.2. Cellules souches somatiques fœtales	3
2.3. Cellules souches somatiques adultes.	4
2.4. Cellules souches pluripotentes induites (iPS).....	4
3. La moelle osseuse.	5
3.1. Cellules souches hématopoïétiques	6
3.2. Cellules souches mésenchymateuses	6
4. Le développement embryonnaire et la crête neurale.	7
4.1. La neurulation.....	7
4.1. Cellules souches de la crête neurale.	8
5. Maladie de Parkinson	9
5.1. Généralités	9
5.2. Physiopathologie, symptômes cliniques et diagnostic.....	10
5.3. Modèle expérimental murin de la maladie de Parkinson.....	11
6. Problématique du traitement des maladies neurodégénératives.	13
7. Cellules souches de la moelle osseuse et plasticité phénotypique nerveuse.	14
II. Objectifs et plan	18
III. Matériel et méthodes	19
1. Animaux	19
2. Culture cellulaire.	19
2.1. Origine et culture des populations clonales de CSM et CSCN.	19
2.2. Préparation et culture des grains cérébelleux.	19
2.3. Co-culture des CSM et CSCN avec les grains cérébelleux.	20
3. Analyse transcriptomique.	20
3.1. Extraction d'ARN à partir des cellules.	20
3.2. Analyse transcriptomique par microarray.	21
3.3. Analyse transcriptomique par RT-PCR.	22
3.3.1. Transcription inverse de l'ARN en ADNc.	22
3.3.2. Amplification de l'ADNc par PCR.	22
3.3.3. Electrophorèse sur gel d'agarose.	23
4. Immunomarquages	24
4.1. Immunocytofluorescence.....	24

4.2. Immunohistochimie.....	24
4.3. Cytométrie en flux.....	25
5. Autres marquages et colorations.....	26
5.1. Marquage histochimique de la β -galactosidase.....	26
5.2. Coloration à l'hématoxylline de Carazzi.....	26
6. Modèle MPTP chez la souris.....	26
7. Implantation intracrânienne de cellules souches chez la souris.....	27
8. Tests de coordination motrice.....	28
8.1. Validation des équipements.....	28
8.2. <i>Beam</i> test.....	29
8.3. <i>Grid</i> test.....	29
8.4. <i>Rearing</i> test.....	29
9. Perfusion, fixation, et coupe des cerveaux.....	30
10. Acquisition des images.....	30
11. Analyse statistique des données.....	30
IV. Résultats.....	31
1. Caractérisation des populations clonales de CSM et de CSCN issues de la moelle osseuse.....	31
1.1. Analyse des capacités de différenciation neuronale.....	31
1.2. Analyse comparative des transcriptomes des clones de CSM et des clones de CSCN.....	32
1.3. Confirmation des résultats de l'analyse microarray – Mise en évidence de l'expression des gènes par RT-PCR.....	33
1.4. Mise en évidence de l'expression des protéines codées par les transcrits sélectionnés.....	34
2. Etude in vivo des propriétés des CSCN et analyse de leur impact dans un modèle de maladie de Parkinson.....	35
2.1. Validation sur le plan histologique du modèle murin MPTP de la maladie de Parkinson.....	35
2.2. Expérience de greffe intrastriatale de CSCN dans un modèle murin MPTP de la maladie de Parkinson.....	37
2.2.1. Evaluation de la survie cellulaire après greffe de CSCN.....	37
2.2.2. Caractérisation <i>in vivo</i> des CSCN greffées.....	37
2.2.3. Etude de l'influence de la greffe de CSCN sur le comportement moteur de souris traitées au MPTP.....	38
2.2.3.1. Validation des équipements des <i>beam</i> test et <i>grid</i> test grâce à un protocole d'injection d'éthanol.....	39
2.2.3.2. Analyse comportementale des individus au cours de l'expérience de greffe de cellules.....	41
V. Discussion et perspectives.....	44
VI. Références bibliographiques.....	49

Introduction

I. INTRODUCTION

1. Introduction générale

Dans l'espèce humaine, les lésions du système nerveux central sont caractérisées par une absence quasi totale de régénération cellulaire. La récupération fonctionnelle dépend donc de ce qu'il est actuellement convenu d'appeler la « plasticité cérébrale », qui englobe notamment des mécanismes de synaptogenèse et de croissance neuritique.

Ainsi, chez un patient atteint de la maladie de Parkinson, les lésions neurodégénératives qui apparaissent au cours du temps sont irréversibles, et les symptômes cliniques qui en découlent ne peuvent être contrebalancés que de manière incomplète. A ce jour, plusieurs approches thérapeutiques ont été développées, basées principalement sur des traitements pharmacologiques substitutifs ou modulateurs, ou plus rarement, sur une intervention chirurgicale, ou encore sur l'administration de facteurs neurotrophiques. Cependant, ces différentes approches visent globalement à diminuer l'intensité des symptômes et à améliorer le confort des patients, mais n'ont pas ou peu d'effets sur l'histoire naturelle de la maladie. En effet, à l'heure actuelle, aucun traitement ne semble capable de pallier la perte neuronale mise en place, ni de limiter voire stopper la progression des lésions neurodégénératives.

Les recherches en cours doivent donc viser la mise au point d'une stratégie régénérative, voire neuroprotectrice, qui puisse influencer le décours de la maladie et freiner son évolution. Dans ce contexte, les thérapies cellulaires basées sur la greffe de cellules immatures au sein ou au voisinage d'une lésion cérébrale ou médullaire suscitent de nombreux espoirs en termes de « réparation nerveuse ». Cependant, envisager une thérapie cellulaire pose bien évidemment la question du matériel à greffer.

Dans cette introduction, nous redéfinirons le concept de cellule souche, et passerons en revue les différents types de cellules souches et les options à envisager dans le contexte d'une thérapie cellulaire. Suivra un bref rappel sur la maladie de Parkinson, et sur le modèle que nous utiliserons dans le cadre de ce mémoire. Enfin, nous détaillerons les résultats antérieurement obtenus dans notre laboratoire d'accueil, qui constituent la base de notre hypothèse de travail.

2. Cellules souches

Les cellules souches sont des cellules primitives indifférenciées, qui participent plus ou moins activement (en fonction du type cellulaire) au développement de l'embryon et ensuite, au maintien de l'homéostasie tissulaire tout au long de la vie de l'individu. Elles sont dotées d'une capacité d'auto-renouvellement (chaque cellule mère pouvant se diviser en au moins une cellule fille rigoureusement identique) et de multipotentialité (chaque cellule pouvant générer plusieurs types distincts de cellules différenciées) (Hall and Watt, 1989).

En dehors des cellules germinales, différents types de cellules souches peuvent être identifiés en fonction de leur origine : les cellules souches embryonnaires (ES), les cellules souches somatiques isolées de tissus fœtaux et les cellules souches somatiques isolées de tissus adultes (Figure 1). D'autre part, de récentes avancées technologiques ont permis la reprogrammation de cellules matures (telles que des fibroblastes) en cellules souches pluripotentes, les cellules souches pluripotentes induites (iPS), proches des cellules ES isolées au départ du blastocyste.

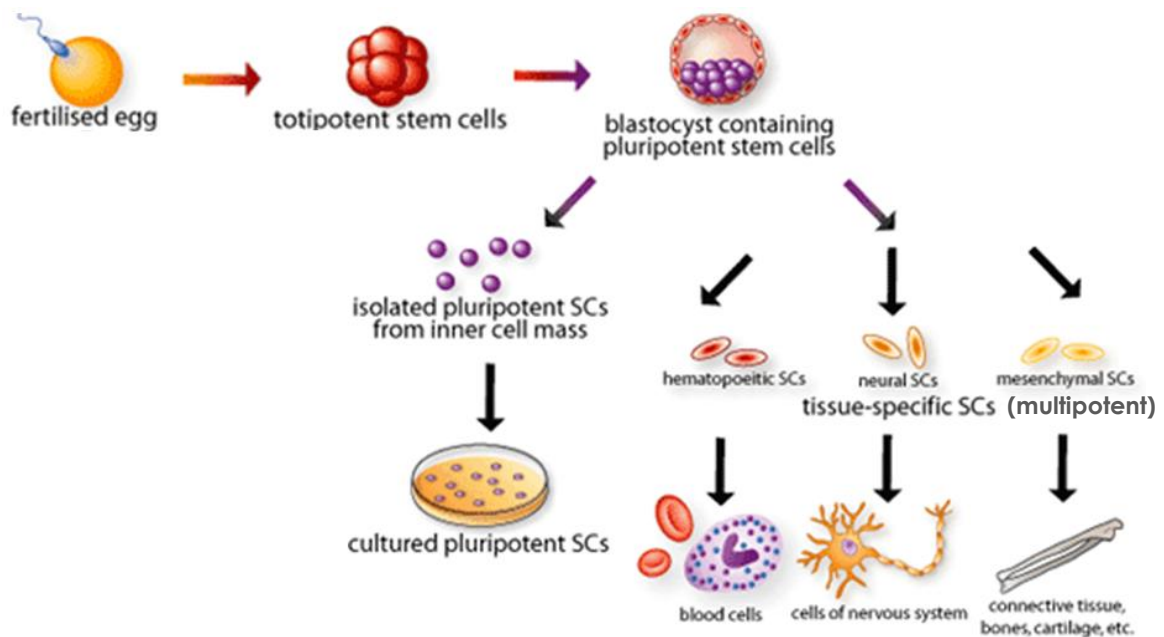


Figure 1 : Origine des différents types de cellules souches, et leurs propriétés de différenciation. (D'après *Stem cells bio-engineering* (Chaudry, 2004) - <http://www.scq.ubc.ca>)

2.1. Cellules souches embryonnaires.

Les cellules souches embryonnaires ou cellules ES (*embryonic stem cells*) qui constituent l'embryon jusqu'au stade 8 cellules sont totipotentes, c'est-à-dire que chaque cellule est

capable de reconstituer un embryon à part entière (Pera et al., 2000). Ces cellules continuent leur division et s'organisent ensuite en blastocyste, qui contient une masse cellulaire interne constituée de cellules ES pluripotentes, c'est-à-dire capables de donner naissance à l'ensemble des lignées cellulaires appartenant aux différents feuilletts (ectoderme, mésoderme et endoderme) qui constituent l'embryon (Pera et al., 2000). Ces cellules individualisées par rapport aux cellules du trophoblaste, possèdent toujours un potentiel d'auto-renouvellement et peuvent être isolées et mises en culture.

L'utilisation des cellules ES dans le cadre de la thérapie cellulaire reste contestable. D'une part, l'acquisition de ces cellules et leur manipulation pose d'importants problèmes éthiques (ces cellules proviennent d'embryons orphelins issus de fécondation *in vitro*). D'autre part, ces cellules ES sont dotées d'un potentiel tumorigène considérable, et donnent naissance à des tératomes (Pera et al., 2000). Enfin, cette source de cellules non-autologue devrait nécessiter un traitement immunosuppresseur chez l'hôte. En effet, bien que les cellules ES n'expriment que faiblement les protéines du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), elles augmentent l'expression des molécules du CMH de classe I au cours de leur différenciation (Drukker et al., 2002; Lui et al., 2008).

2.2. Cellules souches somatiques fœtales

Les cellules souches fœtales sont des cellules primitives retrouvées dans certains tissus fœtaux, tels que la moelle osseuse, le foie, les reins, la moelle épinière ou le cerveau en développement. Elles ont plusieurs caractéristiques propres par rapport à leurs homologues adultes, comme une capacité de différenciation plus importante (moins cependant que les cellules ES), et une tendance plus faible à l'immunogénicité (O'Donoghue and Fisk, 2004). Ces cellules multipotentes sont présentes dans des tissus spécifiques, et peuvent donner naissance à une progéniture présentant les caractéristiques de ce même tissu. Plusieurs auteurs ont étudié leur utilisation dans le cadre de pathologies telles que le diabète (Beattie et al., 1997), ou dans des maladies neurodégénératives (Lindvall and Bjorklund, 2004; Widner et al., 1992), avec à la clé, la démonstration d'une amélioration clinique.

Cependant, l'obstacle principal à leur exploitation en médecine régénérative réside dans les protocoles d'acquisitions de ces cellules, qui sont isolées à partir de fœtus provenant de grossesses interrompues. De plus, des questions restent à résoudre quant à l'âge et au nombre

de fœtus donneurs, à la méthode de dissection, au site de greffe, et à un certain nombre d'autres paramètres (Wakeman et al., 2011).

2.3. Cellules souches somatiques adultes.

Les cellules souches adultes somatiques sont multipotentes : elles sont capables de générer différents types cellulaires appartenant au type de tissu dont elles sont issues. Ces cellules sont localisées à plusieurs endroits de l'organisme, où elles assurent un renouvellement et une réparation des organes dans lesquels elles sont retrouvées.

Leur découverte a suscité de nombreuses hypothèses, selon lesquelles ces cellules somatiques adultes pourraient être utilisées pour des greffes de cellules. En effet, les cellules hématopoïétiques présentes dans la moelle osseuse (voir § 3.) ont démontré leur efficacité dans des protocoles de thérapie cellulaire depuis les années 1960 (Copelan, 2006). Par la suite, la présence de cellules souches chez l'adulte a été mise en évidence dans d'autres organes, tels que la peau, le foie, les reins, et même le cerveau (Young et al., 2004).

Au cours du présent travail, nous nous sommes focalisés sur l'utilisation de cellules souches somatiques issues de la moelle osseuse adulte comme source potentielle de cellules dans le cadre de thérapie cellulaire, afin de traiter différentes maladies neurodégénératives. Le choix de ces cellules sera motivé dans les paragraphes qui suivent.

2.4. Cellules souches pluripotentes induites (iPS)

Les cinq dernières années ont vu l'émergence d'une technologie tout à fait novatrice qu'est l'induction de cellules souches pluripotentes à partir de cellules adultes différenciées. Ces cellules iPS (*induced pluripotent stem cells*) sont générées via la transfection de cellules somatiques (embryonnaires ou adultes), telles que des fibroblastes, par un vecteur lentiviral induisant l'expression de quatre gènes spécifiques codant pour des facteurs de transcription : Oct3/4, c-myc, Sox2 et klf4. L'action intégrée de ces facteurs de transcription permet de lever l'inhibition épigénétique des gènes sous-tendant les propriétés de pluripotentialité (Okita et al., 2007; Takahashi and Yamanaka, 2006) (Figure 3).

Ces cellules iPS sont similaires aux cellules ES, tant au point de vue de leur morphologie que de leurs propriétés de prolifération et de différenciation. Elles représentent une source

autologue de cellules, et assouviennent les problèmes éthiques posés par l'utilisation de tissus embryonnaires ou fœtaux.

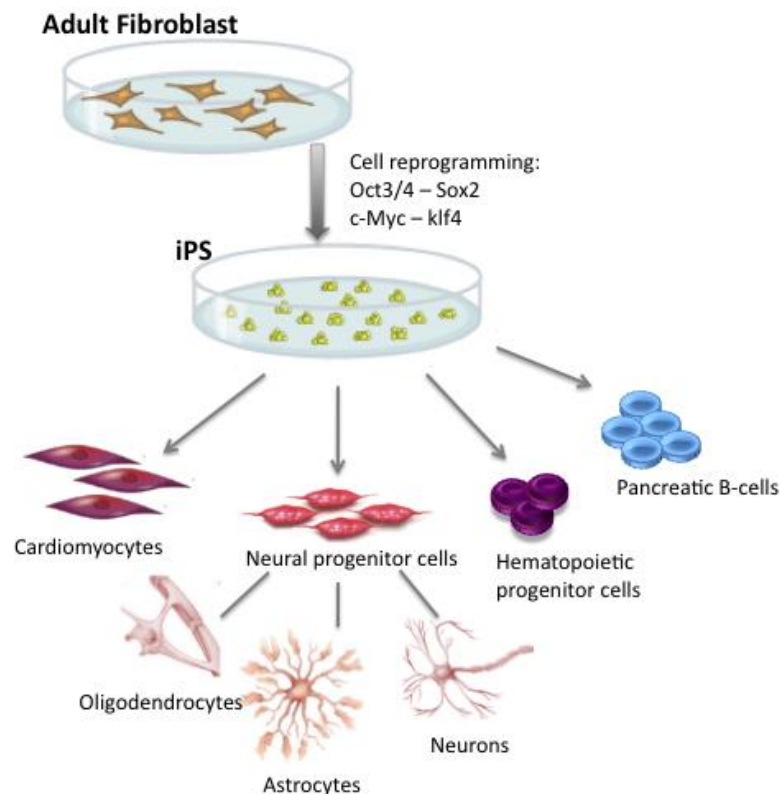


Figure 3 : Génération de cellules pluripotentes induites à partir de cultures de fibroblastes adultes. La reprogrammation des fibroblastes s'effectue par transfection de lentivirus codant pour quatre facteurs de transcription (Oct3/4, Sox2, c-myc et klf4) qui, une fois exprimés par les cellules hôtes, leur confèrent des propriétés pluripotentes.

Malgré ces propriétés considérables, les cellules iPS présentent deux limitations majeures : si elles sont semblables aux cellules ES en termes de capacité de différenciation, elles le sont également en ce qui concerne les potentialités tumorigènes ; de plus, les vecteurs lentiviraux transfectés sont susceptibles d'induire d'importantes altérations du fonctionnement du génome des cellules hôtes (Takahashi and Yamanaka, 2006). Néanmoins, de nouvelles méthodologies voient le jour, axées vers une minimisation du risque de mutations (Woltjen et al., 2009).

3. La moelle osseuse.

La moelle osseuse est un tissu mou, contenu à l'intérieur des os, dont le rôle principal est d'assurer le renouvellement continu des cellules du sang, via la prolifération et la différenciation des cellules souches hématopoïétiques.

La facilité d'acquisition des cellules de la moelle osseuse, que ce soit via une ponction de moelle, ou même par recrutement périphérique, en fait une source attractive pour l'obtention de cellules souches. Cette source autologue minimise les complications immunologiques, et résout également les questions éthiques (Rice and Scolding, 2008).

3.1. Cellules souches hématopoïétiques

Les cellules souches hématopoïétiques donnent naissance aux cellules des lignées lymphoïde et myéloïde, qui acquerront diverses propriétés au cours du processus d'hématopoïèse, et deviendront des cellules sanguines matures capables d'assurer leurs rôles respectifs.

3.2. Cellules souches mésenchymateuses

Outre ces cellules hématopoïétiques, la moelle osseuse est également constituée de tissu indirectement impliqué dans l'hématopoïèse et dont tous les constituants sont regroupés sous le nom de « stroma ». Celui-ci fournit un environnement adéquat aux cellules souches hématopoïétiques, via la sécrétion de facteurs tels que les colony-stimulating factors (CSF) (Rennick et al., 1987). La population stromale contient des cellules différenciées, telles que des adipocytes, des ostéoblastes, des fibroblastes, ou encore des macrophages, mais elle comprend également des cellules plus primitives, que l'on nomme de manière générique les cellules souches mésenchymateuses (CSM).

Ces CSM peuvent ainsi être isolées à partir du stroma de la moelle osseuse, mais également à partir du tissu graisseux et du sang de cordon ombilical (Liang et al., 2009; Riordan et al., 2009). Initialement, ces cellules dérivent du mésoderme embryonnaire, et présentent des caractéristiques similaires à des fibroblastes, telles qu'une importante capacité d'adhérence par exemple (Friedenstein et al., 1974; Horwitz et al., 2005). *In vitro* et *in vivo*, ces CSM se différencient en cellules de type mésenchymateux que sont les ostéocytes, chondrocytes, fibroblastes et adipocytes (Bianco et al., 2001; Caplan and Correa, 2011) (Figure 2).

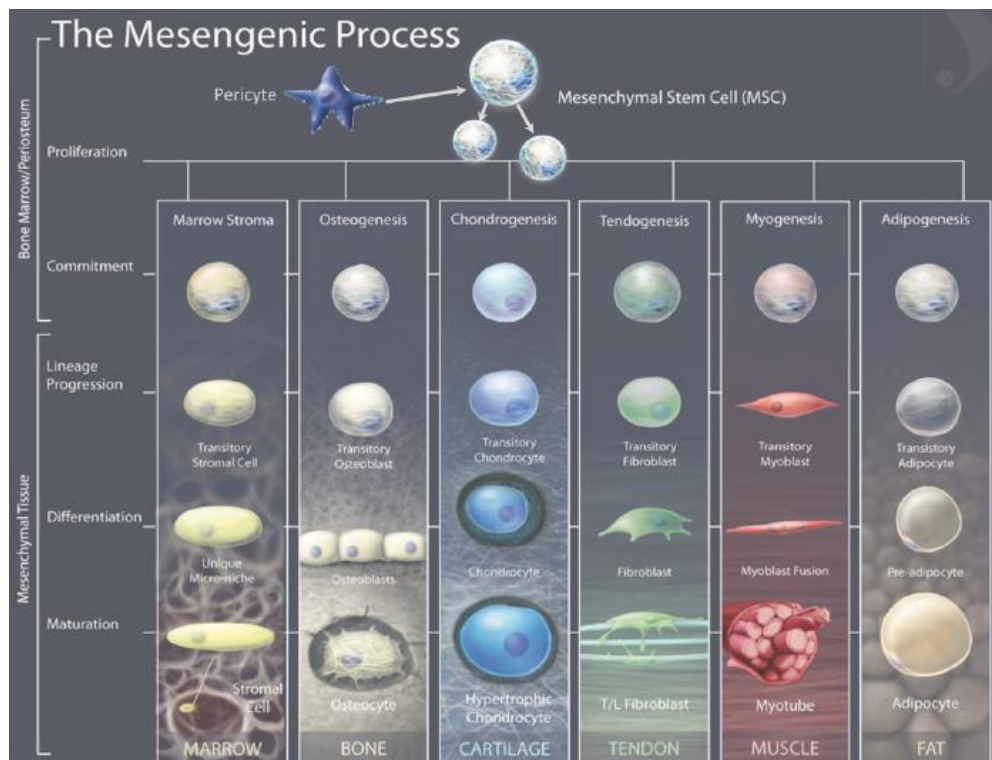


Figure 2 : Multipotentialité des cellules souches mésenchymateuses. Les CSM présentes dans la moelle osseuse sont capables de s’auto-renouveler et de se différencier en un ou plusieurs types de cellules de la lignée mésodermique (D’après Caplan et Correa, 2011).

Différentes études ont démontré que, dans certaines conditions, ces CSM peuvent exhiber un phénotype neuronal (Brazelton et al., 2000; Padovan et al., 2003; Sanchez-Ramos et al., 2000; Sanchez-Ramos, 2002). Cependant, l’expression de marqueurs neuronaux n’en fait pas forcément des cellules neuronales en tant que telles. En effet, plusieurs critères sont à remplir pour qualifier une cellule de « neuronale » : ces cellules doivent être post-mitotiques, polarisées (comportant un axone et plusieurs dendrites), capables de déclencher des potentiels d’action, et enfin de communiquer avec des cellules voisines au travers de synapses (Wislet-Gendebien et al., 2005a).

4. Le développement embryonnaire et la crête neurale.

4.1. La neurulation.

Après fécondation, l’embryon en développement subit plusieurs divisions cellulaires et réarrangements tissulaires, qui vont donner naissance à différents feuilletts embryonnaires, à l’origine des organes et tissus. La formation du tube neural (neurulation) s’effectue par une invagination de la plaque neurale, issue de l’ectoderme. Le tube neural donnera naissance au système nerveux central, c’est-à-dire à l’encéphale et la moelle épinière. Les cellules situées à

la jonction entre le neuroectoderme et l'ectoderme subissent une transition vers un phénotype mésenchymateux, et se « délaminent » pour constituer les crêtes neurales (Figure 4). Cette transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) est induite sous l'influence de différents facteurs de signalisation, tels que les facteurs Wnts, FGFs, BMPs, c-Myb, et msh homeobox 1 (Msx-1) (Liem et al., 2000; Villanueva et al., 2002).

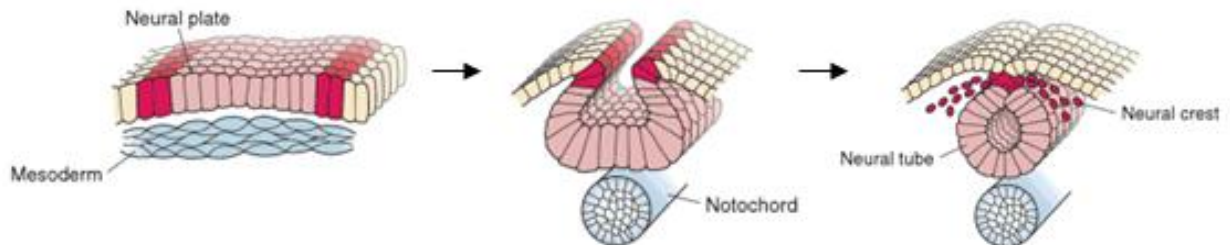


Figure 4 : Développement embryonnaire du système nerveux. Sous l'action du mésoderme sous-jacent qui se condense et forme la notochorde, la plaque neurale se sépare du reste de l'ectoderme et s'invagine pour former le tube neural. Au niveau dorsal, les cellules fusionnent, et permettent la délamination et la migration des cellules des crêtes neurales, naissant au niveau de ce point de fusion. (D'après Sanes, *Development of the Nervous System.*)

4.1. Cellules souches de la crête neurale.

Par la suite, ces cellules entament une migration vers diverses régions de l'embryon. Elles présentent à ce moment l'expression de facteurs spécifiques tels que le facteur de transcription Sox10, ou le récepteur de faible affinité aux neurotrophines p^{75NTR} (Kim et al., 2003; Lee et al., 2004). Au début de cette migration, les cellules souches de la crête neurale (CSCN) constituent une population pluripotente, caractérisée par un potentiel de prolifération et d'auto-renouvellement très important. Ces capacités d'auto-renouvellement et de pluripotentialité sont régulées par plusieurs facteurs. Le BMP2 (*Bone morphogenic protein 2*) induit un développement neuronal (Shah et al., 1996). De même, l'adoption d'un destin glial est contrôlée via l'activation de Notch 1 (Morrison et al., 2000), ou via l'intervention de la neuréguline 1 (Shah et al., 1994). Enfin, il a été démontré que les facteurs Wnt1 et BMP2 tiennent un rôle important dans la maintenance et la prolifération des CSCN (Kleber et al., 2005).

Les cellules post-migratoires voient peu à peu leur destin se définir plus étroitement, et deviennent unipotentes : après avoir atteint différentes localisations de l'organisme, elles se différencient en cellules matures, telles que des neurones ou des cellules gliales (constituant ainsi le système nerveux périphérique), des cellules musculaires lisses des vaisseaux sanguins,

des cellules osseuses et cartilagineuses de la face, ou encore des mélanocytes (Le Douarin & Kalcheim, 1999).

Au cours des dernières années, plusieurs études chez le rongeur ont démontré la persistance de ces CSCN dans des tissus embryonnaires et adultes, tels que le tube digestif embryonnaire (Kruger et al., 2002), le cœur (Tomita et al., 2005), la cornée (Yoshida et al., 2006), ou la peau, ainsi que dans la moelle osseuse (Nagoshi et al., 2008).

Une caractérisation plus profonde de ces CSCN pourrait offrir de nouvelles promesses thérapeutiques dans le cadre de la médecine régénérative, aussi bien dans l'optique d'une réparation nerveuse, que dans le cadre d'une lésion mésenchymateuse (osseuse, par exemple). Jusqu'à présent, les seules expériences de thérapie cellulaire impliquant les CSCN (issues de follicules pileux) ont été réalisées dans le cadre de lésions médullaires chez le rat (Sieber-Blum et al., 2006). Après transplantation au voisinage de la lésion, certaines des CSCN greffées ont entamé une différenciation neuronale, et une amélioration fonctionnelle a été observée.

Dans le cadre de ce mémoire, nous avons étudié l'utilité des CSCN dans l'optique d'une thérapie cellulaire de la maladie de Parkinson. Ainsi, nous allons brièvement en décrire certains aspects.

5. Maladie de Parkinson

5.1. Généralités

La maladie de Parkinson est la seconde maladie neurodégénérative la plus répandue, après la maladie d'Alzheimer. Elle atteint environ 0,3% de la population totale des pays industrialisés, ce qui correspond à une incidence de 8 à 18 par 100.000 personnes par an. Au-delà de 60 ans, la prévalence atteint 1% de la population (de Lau and Breteler, 2006; Nussbaum and Ellis, 2003).

Cette maladie neurodégénérative est principalement caractérisée par une dysfonction du système nerveux dopaminergique, associée à une perte de cellules et de tissu (Sadan et al., 2009) sous-tendue par plusieurs mécanismes, localisée à différents endroits du système nerveux, et menant à l'expression de divers tableaux cliniques.

5.2. Physiopathologie, symptômes cliniques et diagnostic

Les neurones dopaminergiques du faisceau nigrostrié constituent la cible préférentielle des processus neurodégénératifs chez un sujet atteint de la maladie de Parkinson. Ce faisceau connecte la substance noire *pars compacta* (SNpc) située au niveau du mésencéphale, au striatum (composé du noyau caudé et du putamen). Les mécanismes par lesquels ces neurones dopaminergiques sont perdus sont encore mal connus. Il semblerait que différents phénomènes entrent en jeu, tels qu'une dysfonction mitochondriale et un stress oxydatif, conduisant à la mort cellulaire par apoptose (Tatton et al., 2003). Au niveau anatomopathologique, on note également la présence d'inclusions intracellulaires d'alpha-synucléine et d'ubiquitine, que l'on appelle Corps de Lewy (Jellinger, 1991). Ceux-ci ne sont pas spécifiques à la maladie de Parkinson ni au système nigrostrié, et peuvent être retrouvés dans d'autres pathologies, telles que certains types de démences, regroupées sous le terme de synucléopathies.

Les lésions du faisceau nigrostrié entraînent une déficience de régulation motrice au niveau des noyaux gris centraux. En effet, chez le patient parkinsonien, la substance noire exerce une moindre modulation de la boucle cortico-striato-thalamo-corticale (Figure 5), ce qui entraîne une diminution de l'initiation et de l'harmonie des mouvements. Le sujet atteint de la maladie de Parkinson présente donc des symptômes moteurs spécifiques, tels qu'une bradykinésie (lenteur d'initiation et d'exécution des mouvements), des tremblements au repos (qui disparaissent lorsque le sujet est en activité), une rigidité motrice, une perte de la capacité à effectuer des mouvements fins, et des troubles de démarche et d'équilibre postural (Hornykiewicz, 1998). Des symptômes non moteurs sont également observés, tels que des troubles du sommeil ou de l'humeur, ou un déficit d'autonomie (Chaudhuri et al., 2006). Ceux-ci ne sont pas en relation directe avec la lésion de la SNpc, mais avec d'autres faisceaux nerveux. Au point de vue du diagnostic, les symptômes moteurs n'apparaissent que tardivement, lorsque plus de 50% des neurones dopaminergiques de la SNpc sont perdus, ce qui entraîne une diminution de 80% du niveau de dopamine au niveau du striatum (Fearnley and Lees, 1991). Cette situation particulière (lenteur d'apparition du tableau clinique par rapport au début de l'atteinte physiopathologique) constitue le principal problème de la mise au point d'un traitement efficace. Il est en effet fondamental d'obtenir de meilleurs outils et de meilleurs indices diagnostiques, afin de tenter d'empêcher l'installation d'une neurodégénérescence.

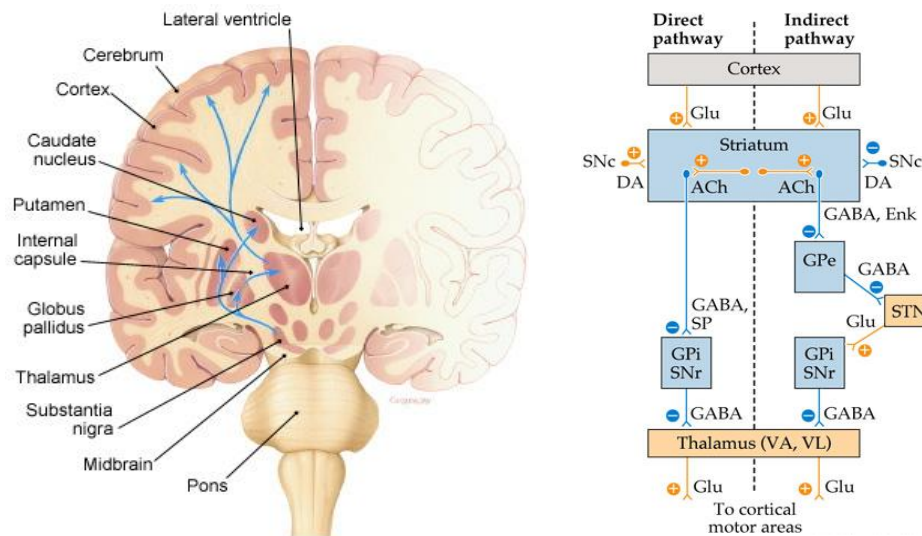


Figure 5 : Représentations schématiques de la boucle motrice cortico-striato-thalamo-corticale. La stimulation des fibres striatales est fortement diminuée chez le sujet parkinsonien, ce qui entraîne une dysfonction de cette boucle motrice de rétro-contrôle permettant l'initiation du mouvement.

(D'après <http://www.aafp.org> et Netter, *Atlas of human anatomy*)

Plusieurs modèles expérimentaux de la maladie de Parkinson ont été développés et permettent d'étudier les mécanismes sous-tendant la physiopathologie de la maladie. Ces modèles peuvent être basés sur une induction génétique, ou une induction neurotoxique (Emborg, 2004). Dans le cadre de nos travaux, nous avons utilisé un modèle toxique : le modèle induit par la neurotoxine MPTP.

5.3. Modèle expérimental murin de la maladie de Parkinson.

Dans les années 1980, de jeunes Américains ont développé des symptômes et des lésions irréversibles correspondant étroitement au tableau clinique caractéristique de la maladie Parkinson. Ils avaient consommé une drogue frelatée, le composé 1-méthyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), accidentellement produit lors de la synthèse de 1-méthyl-4-phenyl-4-piropionoxy-pepirdine (MPPP), composé analogue de la mépéridine (un analgésique opioïde) (Langston et al., 1983). Le MPTP est une neurotoxine hautement liposoluble qui, après avoir rapidement franchi la barrière hémato-encéphalique (BHE), est converti en son métabolite toxique, le 1-méthyl-4-phenylpyridinium (MPP^+), par l'enzyme monoamine oxydase B (MAO-B) présente dans les cellules gliales (Figure 6). Ce composé toxique touche spécifiquement les neurones dopaminergiques, via sa liaison au transporteur spécifique de la dopamine (DAT). S'ensuit alors une destruction massive des neurones dopaminergiques de la SNpc et, consécutivement, une nette diminution des taux de dopamine

libérés dans le striatum. Les mécanismes d'action du MPP^+ impliquent principalement une dysfonction mitochondriale par inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire, ce qui provoque un important stress oxydatif, menant finalement à la mort des neurones (Przedborski and Jackson-Lewis, 1998; Przedborski et al., 2000; Przedborski and Vila, 2003). Les lésions et les symptômes sont variables en fonction du protocole d'administration de la toxine. En effet, plusieurs modèles MPTP peuvent être établis chez la souris (Schober, 2004), mimant différents stades de la maladie. Dans le cadre de nos travaux, nous utilisons un modèle d'induction immédiate de la maladie de Parkinson (Jackson-Lewis et al., 1995), ce qui induit une dégénérescence rapide des neurones dopaminergiques. Les lésions miment correctement les lésions observées chez l'homme atteint de Parkinson dans les stades tardifs de la maladie, ce qui permet l'étude de thérapies réparatrices.

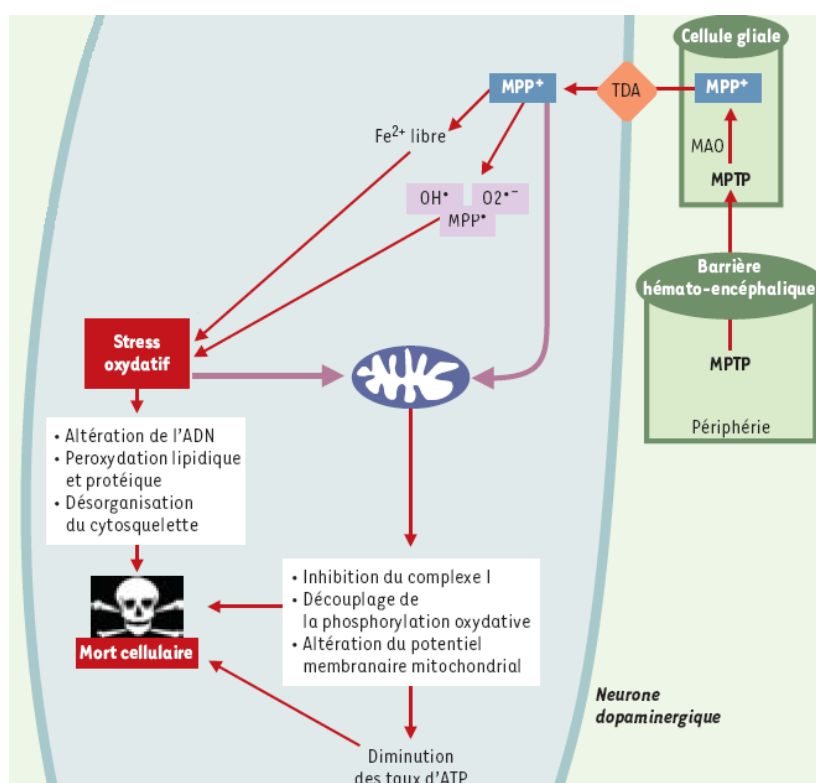


Figure 6 : Représentation schématique du métabolisme du MPTP. Après injection systémique, le MPTP franchit la BHE et est converti en $MPDP^+$ par l'enzyme MAO-B des cellules gliales, puis en MPP^+ par un mécanisme non connu. Ensuite, le MPP^+ est relâché (par un mécanisme également non connu) dans l'espace extracellulaire. Il est ensuite incorporé dans les neurones dopaminergiques par le DAT. (D'après Lambeng et al., 2002)

Dans l'établissement d'un modèle murin de la maladie de Parkinson, le MPTP peut être administré par différentes voies (injection stéréotaxique, ingestion orale), mais les lésions les plus fiables et reproductibles sont réalisées par injection systémique (intrapéritonéale (i.p.), intramusculaire, intra-artérielle ou sous-cutanée) (Emborg, 2004). La susceptibilité des sujets

au MPTP dépend de l'activité enzymatique de la MAO-B, qui diffère significativement entre les espèces et même entre les différentes souches au sein d'une même espèce. En effet, les rats sont relativement résistants au MPTP, tandis que les souris y sont davantage sensibles (Terzioglu and Galter, 2008), moins toutefois que les primates et les humains.

Aucun modèle expérimental ne mime à lui seul toutes les caractéristiques de la maladie de Parkinson idiopathique, c'est-à-dire (1) la perte des neurones dopaminergiques, (2) les symptômes de déficience motrice, (3) et enfin la formation de corps de Lewy. Le syndrome parkinsonien induit par le MPTP diffère de la pathologie idiopathique de par son caractère aigu, et par l'absence de développement de corps de Lewy qui reflète une évolution lentement progressive (Hirsch et al., 2003). Néanmoins, à ce jour, le MPTP constitue le meilleur modèle expérimental de la maladie de Parkinson et le plus utilisé dans ce domaine de recherche.

6. Problématique du traitement des maladies neuro-dégénératives.

Le manque de régénérescence au sein des tissus nerveux complique la mise en place de stratégies thérapeutiques. Pourtant, au cours des années 1960, deux zones « neurogéniques » (Altman and Das, 1965) ont été suggérées : la zone sous-ventriculaire, et la zone sous-granulaire du gyrus dentelé de l'hippocampe, qui ont ensuite été mises en évidence chez l'homme (Eriksson et al., 1998; Zhao et al., 2008). Celles-ci contiennent des cellules en division, capables de se différencier en cellules nerveuses. La découverte de ces cellules a suscité de grands espoirs en ce qui concerne la réparation d'une lésion du système nerveux central. En conditions physiologiques, ces cellules souches neurales peuvent se différencier en différents types de cellules nerveuses. Cependant, bien que certaines affections (en particulier l'accident vasculaire cérébral) puissent induire un phénomène de neurogenèse, le potentiel régénératif de ces cellules est considéré comme faible. De plus, ces cellules ne semblent pas intervenir lors d'une lésion ou d'une perte neuronale induite par une pathologie neurodégénérative.

Chez l'Homme, les seules études cliniques de thérapie cellulaire réalisées jusqu'à présent dans le cadre des maladies neurodégénératives ont été effectuées sur base de neuroblastes dopaminergiques immatures, prélevés à partir d'embryons humains normaux (obtenus suite à des avortements pour convenance personnelle) et greffés chez des patients atteints de la maladie de Parkinson (Lindvall et al., 1990; Widner et al., 1992). Malgré des résultats

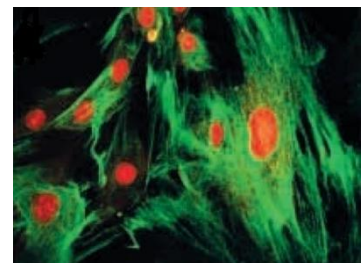
prometteurs, cette approche a mis en évidence des problèmes techniques et immunologiques, et suscite un lourd questionnement éthique (Lane et al., 2008). Par conséquent, des alternatives à l'utilisation de ce type de cellules doivent être formellement envisagées. Ces premières études cliniques ont donc relancé l'intérêt pour les cellules souches somatiques isolées au départ de tissus adultes.

7. Cellules souches de la moelle osseuse et plasticité phénotypique nerveuse.

Etant donné l'intérêt grandissant des cellules souches somatiques adultes dans le cadre de thérapie cellulaires, les travaux de notre laboratoire d'accueil se sont particulièrement focalisés au cours des dernières années sur les cellules souches de la moelle osseuse, et sur leurs possibilités de plasticité phénotypique nerveuse.

Les études antérieurement réalisées dans notre laboratoire d'accueil ont démontré que des CSM (extraites de moelle osseuse de souris ou rats adultes) mises en culture peuvent exprimer la nestine (Figure 7), une protéine de filaments intermédiaires notamment exprimée par les cellules nerveuses immatures, dans certaines conditions précises de culture (Wislet-Gendebien et al., 2003). Trois conditions sont ainsi requises afin d'induire l'expression de la nestine par les CSM : 1) elles doivent subir une maturation *in vitro*, dans un milieu de culture dépourvu de sérum ; 2) un minimum de 25 doublements de population est nécessaire afin d'obtenir une expression stable de la nestine par environ 75% des cellules en culture en l'absence de sérum ; 3) une densité cellulaire inférieure à 50.000 cellules/cm² est également indispensable (Wautier et al., 2007).

Figure 7 : Expression de la nestine par les CSM mises en culture dans différents milieux sans sérum. En absence de sérum, et au-delà de 25 passages, les CSM expriment la nestine de façon stable. Les cultures sont marquées à l'aide d'un anticorps anti-nestine (vert), et les noyaux sont marqués au bromure d'éthidium (rouge). En présence de sérum, le marquage anti-nestine disparaît. (D'après Wislet-Gendebien et al., 2003)



Une caractérisation fonctionnelle de ces CSM nestine-positives placées en conditions adéquates de différenciation neuronale a démontré qu'outre l'expression de marqueurs neuronaux tels que la β III-tubuline (spécifiquement exprimée par les neurones) et NeuN

(Neuronal nuclei, protéine nucléaire spécifique aux neurones), ces cellules étaient capables de développer une certaine sensibilité à différents neurotransmetteurs et d'établir des potentiels d'action (Wislet-Gendebien et al., 2005b).

Ces CSM nestine-positives pourraient donc fournir une source robuste de cellules souches dans le contexte des thérapies cellulaires, bien que d'autres études expérimentales soient requises pour affirmer l'efficacité et la sécurité d'une greffe de CSM. Etant donné que seules les CSM nestine-positives étaient capables de se différencier en neurones fonctionnels, une série de comparaisons transcriptomiques et protéomiques a été effectuée afin de déterminer les différences principales entre les CSM nestine-positives et nestine-négatives. Dans ces études, on a observé une différence d'expression de plusieurs marqueurs, tels que certains facteurs de transcription Sox et Pax, certains récepteurs Frizzled (éléments de la voie de signalisation Wnt), ou encore les récepteurs ErbB aux neurégulines. Les différences les plus remarquables résidaient dans la surexpression du facteur de transcription Sox10, du récepteur aux neurégulines ErbB3, et du récepteur p75^{NTR} au NGF, tous trois caractéristiques des cellules de la crête neurale. De ces informations est donc née l'hypothèse selon laquelle les CSM nestine-positives pourraient être dérivées de la crête neurale. Peu de temps après, Nagoshi et al. (2008) confirmaient la présence de cellules dérivées de la crête neurale dans la moelle osseuse adulte.

Ainsi, la présence de CSCN dans la moelle osseuse adulte a été mise en évidence (Nagoshi et al., 2008) par un traçage basé sur l'activité d'un promoteur de certains gènes exprimés dans la crête neurale, tels que Wnt1 ou P0 (Dupin et al., 2010). Dans le cadre de nos travaux, nous avons utilisé une souris double transgénique (Jiang et al., 2000) (Figure 8), dans laquelle les cellules de la crête neurale expriment la β -galactosidase (codée par le gène LacZ) sous le contrôle du promoteur Wnt1 (signal activé lors de la TEM dans les CSCN) (Kleber et al., 2005; Lee et al., 2004) afin de confirmer la présence de cellules de la crête neurale dans la moelle osseuse adulte.

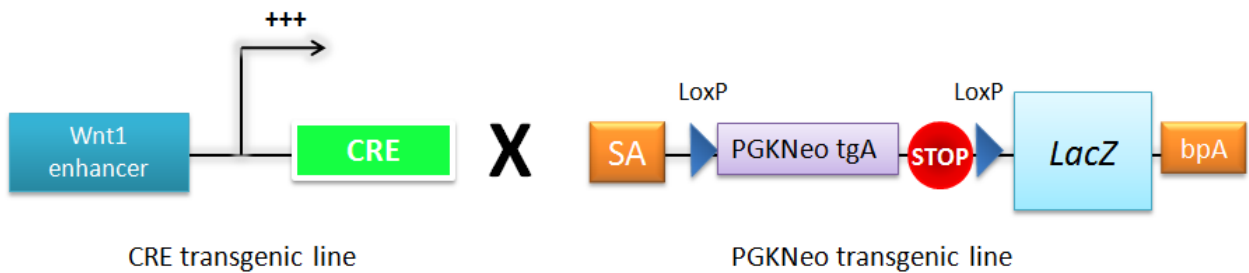


Figure 8 : Souris double transgénique Wnt1-Cre/R26R-LacZ. Cette souris est obtenue par croisement d'une souris exprimant la CRE recombinase (sous le contrôle du promoteur Wnt1) et d'une souris possédant le gène LacZ. Lorsque le promoteur est activé sous l'effet de Wnt1, la Cre recombinase est exprimée et permet l'expression du gène LacZ codant pour la β -galactosidase après excision d'une cassette floxée et comportant un codon stop.

Les travaux effectués dans notre laboratoire ont confirmé qu'une partie des cellules souches retrouvées dans la population stromale de la moelle osseuse sont effectivement dérivées de la crête neurale (CSCN) (Figure 9). Nous nous sommes ensuite attelés à une caractérisation de ces deux types cellulaires, et à l'analyse de leur multipotentialité respective. Pour ce faire, des populations clonales dérivées de la crête neurale et mésenchymateuses ont été obtenues à partir d'une culture de cellules stromales de la moelle osseuse issues d'une souris Wnt1-Cre/R26R/LacZ.

La première étape de la caractérisation des deux populations cellulaires a été de mettre en évidence l'expression des marqueurs classiques caractéristiques de cellules de la crête neurale, tels que la nestine, le récepteur $p75^{\text{NTR}}$ au NGF, ou encore le facteur de transcription Sox10. Notre laboratoire d'accueil a récemment démontré que tous les clones de type CSCN sont positifs pour ces trois marqueurs (Figure 9, A-C). Au contraire, les clones de type CSM n'expriment que très faiblement le récepteur $p75^{\text{NTR}}$, et sont SOX10-négatifs. En outre, seule une faible proportion de CSM est nestine-positif (20,2 % \pm 10,8%), là où 100% des CSCN sont nestine-positives (Figure 9, D-F). Les capacités de différenciation des clones de chacune des populations (CSM et CSCN) en cellules de type mésenchymateux ont ensuite été analysées. Les clones de type CSM sont capables de se différencier en chondrocytes (Figure 9, K), en adipocytes (Figure 9, L), en muscles lisses (Figure 9, M) en mélanocytes (Figure 9, N) et en ostéocytes (Figure 9, O). Dans les mêmes conditions de culture, les clones de type CSCN se différencient en chondrocytes (Figure 9, H) et en mélanocytes (Figure 9, J), mais sont incapables de se différencier en adipocytes (Figure 9, G), en muscles lisses (Figure 9, I) ou en ostéocytes (Figure 9, O).

Au vu des différences établies entre les CSM et les CSCN extraites de la moelle osseuse en termes de différenciation en cellules de types mésenchymateux, il semble opportun de tester par la suite les capacités de différenciation neuronale propres à chacune des populations, tout d'abord via un protocole de différenciation *in vitro*. Ensuite, ces capacités de différenciation neuronale seront évaluées *in vivo*, dans un modèle de maladie neurodégénérative qu'est le modèle murin MPTP de la maladie de Parkinson.

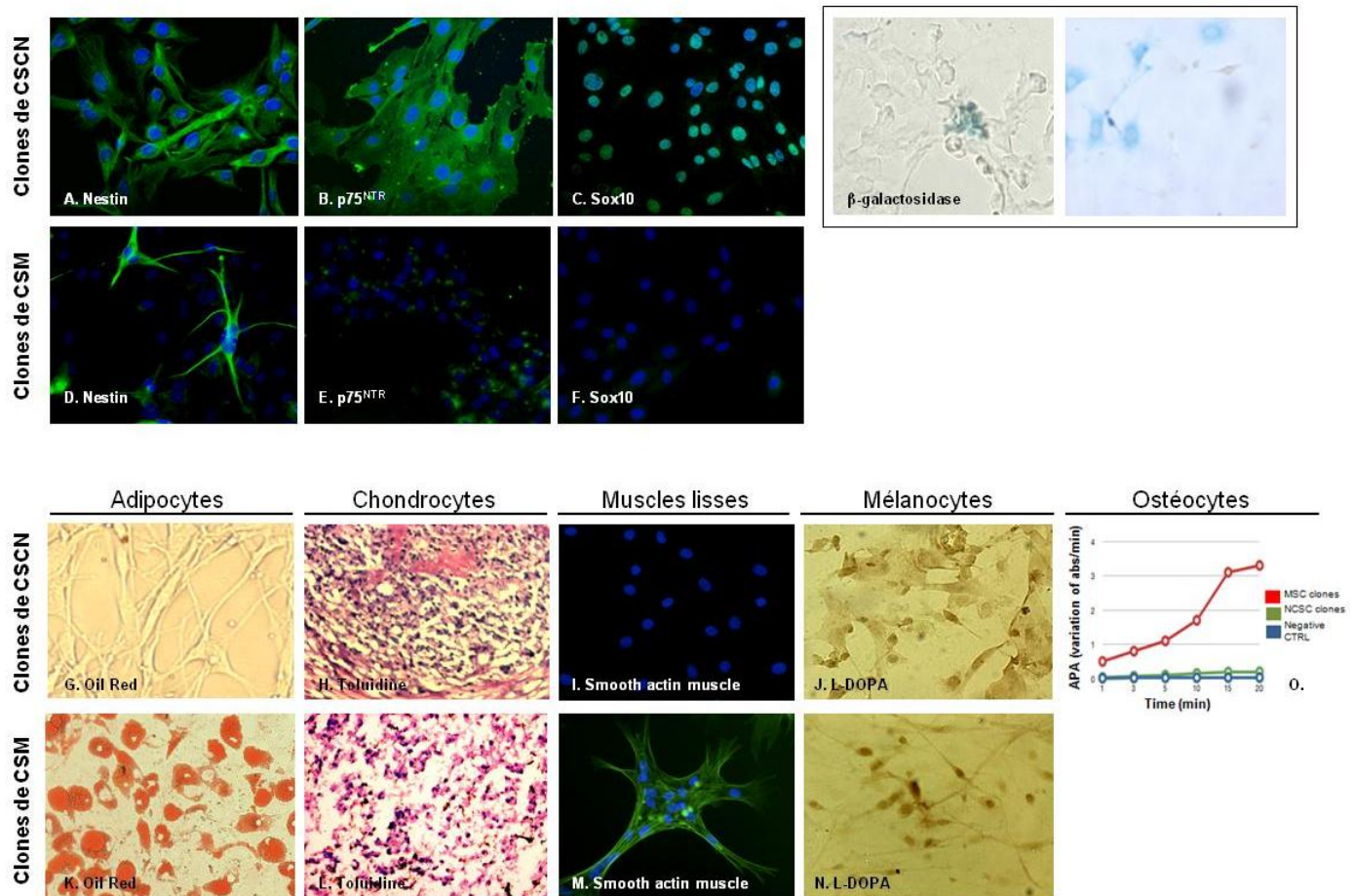


Figure 9 : Analyse de l'expression de marqueurs spécifiques de la crête neurale dans des populations de clones de CSCN et de clones de CSM, et étude de leurs capacités de différenciation. En encadré : Mise en évidence des CSCN par un marquage de la β -galactosidase (bleu), sur un frottis de moelle osseuse (gauche), et sur des cellules en culture (droite). Les CSCN sont reconnues par des anticorps (marquage vert) dirigés contre la nestine (A), le p75^{NTR} (B) et Sox10 (C). Une faible proportion de CSM exprime la nestine (D vert). En outre on observe une faible expression de p75^{NTR} (E, vert), n'expriment pas Sox10 (F). Les noyaux des cellules sont marqués de manière aspécifique par le DAPI (bleu). Les clones de type CSM sont capables de se différencier en chondrocytes (K), en adipocytes (L), en muscles lisses (M) en mélanocytes (N) et en ostéocytes (O). Les clones de type CSCN se différencient en chondrocytes (H) et en mélanocytes (J), mais sont incapables de se différencier en adipocytes (G), en muscles lisses (I) ou en ostéocytes (O).

Objectifs du travail

II. OBJECTIFS ET PLAN

Les cellules souches somatiques présentes dans les tissus adultes tels que la moelle osseuse représentent une source potentielle de cellules exploitables dans un contexte de thérapie cellulaire des maladies neurodégénératives. Cependant, avant d'envisager l'utilisation de ces cellules dans de tels protocoles, un certain nombre de points doivent être précisés. Dans le cadre de ce projet, nous analyserons particulièrement les cellules souches mésenchymateuses (CSM) et les cellules souches dérivées de la crête neurale (CSCN) issues de la moelle osseuse adulte. Brièvement, nous évaluerons l'impact de leur origine embryonnaire sur leurs possibilités de plasticité phénotypique.

Dans la première partie de ce mémoire, nous détaillerons une étude *in vitro* de tentative de caractérisation cellulaire et moléculaire des CSM (non dérivées de crête neurale) et des CSCN (dérivées de la crête neurale), les deux populations cellulaires étant isolées au départ de la moelle osseuse de souris adultes Wnt1-Cre/R26R-LacZ. Au cours de cette caractérisation, nous aborderons brièvement la capacité de différenciation nerveuse de chacun des types cellulaires. Nous poursuivrons ensuite par une comparaison des transcriptomes, afin notamment, d'identifier des marqueurs membranaires potentiels qui permettront d'isoler les deux types cellulaires de façon spécifique et indépendante de l'utilisation de souris transgéniques.

Dans la seconde partie de ce mémoire, nous étudierons la plasticité *in vivo* des CSCN, via la mise au point d'une greffe cellulaire dans un modèle murin de maladie de Parkinson. Nous examinerons l'impact de cette transplantation sur les lésions présentes dans le modèle, et tenterons de caractériser les divers phénomènes de plasticité et de différenciation éventuellement mis en place. De même, nous étudierons l'impact de la greffe de CSCN sur une amélioration des scores comportementaux au moyen de différents tests, tels que le *grid* test, le *beam* test et le *rearing* test.

Matériel et méthodes

III. MATERIEL ET METHODES

1. Animaux.

Les animaux utilisés pour le modèle MPTP de la maladie de Parkinson et la greffe de cellules souches sont des souris C57Bl/6. Au jour 0 de l'expérience, jour auquel est réalisée l'injection de MPTP, les souris sont âgées d'environ 16 semaines.

Les animaux sont hébergés conformément à la déclaration d'Helsinki et selon les directives du ministère belge de l'agriculture, en accord avec la directive de la Commission Européenne (CE) relative à la protection des animaux utilisés à des fins expérimentales et d'autres fins scientifiques (86/609/CEE, Journal officiel de la CE n°L358, 18 décembre 1986). De même, cette étude a été approuvée par le comité d'éthique animale de l'université de Liège (dossier 1038).

2. Culture cellulaire.

2.1. Origine et culture des populations clonales de CSM et CSCN.

Les différents clones de CSM et de CSCN ont été mis en culture à partir de la moelle osseuse fémorale de souris double-transgéniques Wnt1-Cre/R26R-LacZ. Les cellules stromales de cette moelle osseuse sont cultivées en présence de milieu permettant la prolifération des cellules mésenchymateuses (MesenCult[®], Stem Cells Technologies, Grenoble, France). Après 7 passages, les cellules ont été placées à dilution clonale (1 cellule par puits) en conditions adhérentes, et 11 clones ont été obtenus. Les cultures cellulaires sont maintenues dans un incubateur à 37°C, dont l'atmosphère saturée en eau est composée de 5% de CO₂ et de 95% d'air.

2.2. Préparation et culture des grains cérébelleux.

Les cultures de grains cérébelleux (GC) sont préparées à partir de souris C57Bl/6J âgées de 3 jours, GFP (*Green fluorescent protein*) ou sauvage (*wild-type*) (Jackson ImmunoResearch Laboratories[®], Suffolk, Royaume-Uni) (Wislet-Gendebien et al., 2005). Les souris vertes expriment la GFP sous le contrôle du promoteur de la β -actine (Wislet-Gendebien et al., 2005). Les GC *wild-type* sont utilisés pour les co-cultures avec les clones de

CSCN, étant donné que ces cellules expriment la β -galactosidase, laquelle permet de discriminer les types cellulaires. Brièvement, les cervelets sont extraits et libérés des méninges. Ils sont ensuite découpés à l'aide de microciseaux en minuscules fragments, et incubés à 37°C dans 0,25% de trypsine et 0,01% de DNase (volume/volume, dans une solution cation-free), durant 25 minutes. Ensuite, les fragments sont lavés avec du milieu MEM (*Minimum Essential Medium*) (GIBCO[®], Invitrogen, Merelbeke, Belgique) additionné de glucose 6 g/L, d'insuline 5 μ g/mL (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO, Etats-Unis), et de sodium-pyruvate 1 mM (Sigma-Aldrich[®]). La concentration en potassium est amenée à 25 mM, alors que la concentration en sodium est diminuée à 96 mM pour atteindre une situation d'équimolarité (MEM-25HS). La dissociation des cellules est achevée mécaniquement, via des aspirations up-and-down dans une pipette. La suspension cellulaire est filtrée sur une membrane de nylon, dont le diamètre des pores est de 15 μ m. Les cellules sont ensuite comptées, et diluées pour obtenir une concentration finale de $2,5 \times 10^6$ cellules/mL. Enfin, les cellules sont ensemencées sur des lamelles préalablement recouvertes d'une couche de polyornithine (0,1 mg/mL), et maintenues en culture pendant 24 heures.

2.3. Co-culture des CSM et CSCN avec les grains cérébelleux.

Par la suite, les CSM ou CSCN cultivées en conditions adhérentes sont dissociées à 37°C à l'aide de trypsine (0,05%)-acide éthylène-diamine-tétra-acétique (EDTA). Après avoir été resuspendues dans du milieu, les cellules sont finalement mises en présence des GC, et les co-cultures sont maintenues 5 jours dans du milieu des GC (précité) en absence de sérum.

3. Analyse transcriptomique.

3.1. Extraction d'ARN à partir des cellules.

Au départ d'une boîte T25 confluente, les cellules sont récoltées et centrifugées afin de former un culot. Ce culot cellulaire est resuspendu dans un tampon de lyse RLT/ β -mercaptoéthanol. Ensuite, les cellules lysées sont adsorbées, sur une membrane composée de silica-gel (RNeasy minikit, Qiagen[®]), qui retient spécifiquement l'ARN. Enfin, l'élution sera réalisée en utilisant un tampon de faible force ionique pour récolter l'ARN. Cet ARN est ensuite dosé à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDrop 3300[®] (NanoDrop[®], Thermo Scientific, Waltham, MA, Etats-Unis).

3.2. Analyse transcriptomique par microarray.

Pour les besoins de l'analyse microarray des échantillons de cellules, les clones sont poolés en deux groupes (CSCN et CSM), contenant chacun une quantité équivalente d'ARN de chaque clone. La qualité de l'ARN est tout d'abord confirmée par un système d'électrophorèse capillaire Experion, en utilisant le kit d'analyse RNA StdSens (Bio-Rad®, Nazareth, Belgium). 1 µg d'ARN total sont marqués à l'aide du kit GeneChip Expression 3'-Amplification One-Cycle Target Labeling Kit (Affymetrix®, Santa Clara, CA, Etats-Unis), selon le protocole proposé par le fournisseur. L'ARNc est hybridé aux puces GeneChip Mouse Genome 430 2.0 (Affymetrix®), selon le protocole du fournisseur. L'analyse est réalisée en triplicat.

Brièvement, l'ADNc est synthétisé à partir d'1 µg d'ARN total, grâce à une amorce oligonucléotidique poly-(dT)-T7 hybridée sur les extrémités poly-A des ARNm. L'ADNc subit une rétrotranscription *in vitro*, en présence d'ARN polymérase T7 et de nucléotides marqués à la biotine, pendant 16 heures à 37°C. L'ARNc biotinylé est purifié et fragmenté (35-200 nucléotides) simultanément aux contrôles, et hybridé sur les puces pendant 16 heures à 45°C. A l'aide du kit Fluidics Station (Affymetrix), les ARNc hybrides sont révélés via des réactions successives avec une molécule conjuguée de streptavidine-R-phycoérythrine, un anticorps biotinylé anti-streptavidine, et à nouveau un conjugué streptavidine-R-phycoérythrine. Les microarrays sont finalement scannés grâce au scanner Affymetrix/Hewlett-Packard GeneChip Scanner 3000 7G. Les données sont générées via un algorithme PLIER, inclus dans le logiciel Affymetrix GeneChip Command Console Software (AGCC) and Expression Console.

Les *probe sets* (sets de sondes spécifiques à une séquence d'ARN) sont filtrés selon un algorithme de *signal log ratio* (qui mesure l'intensité et la direction de la variation d'expression des transcrits) [supérieur à 0,6 pour une sur-régulation, et inférieur à -0,6 pour une sous-régulation], et sur une *p*-value associée à la variation d'expression [inférieure à 0.001 pour les probe sets sur-régulés et, et supérieur à 0.999 pour les probe sets sous-régulés]. Les analyses des transcriptomes sont effectuées à l'aide du logiciel Ingenuity Pathway Analysis software (IPA 6.0, Ingenuity Systems, Redwood City, CA, Etats-Unis).

3.3. Analyse transcriptomique par RT-PCR.

3.3.1. Transcription inverse de l'ARN en ADNc.

Les échantillons d'1 µg ARN sont mis en présence de DNase (Promega[®], Madison, WI, Etats-Unis) à une concentration d'1 unité enzymatique par réaction, dans un tampon de réaction contenant du Tris-HCl 40 mM, pH 7,9 ; du NaCl 10 mM ; du MgCl₂ 6 mM et du CaCl₂ 10 mM ; pendant 15 minutes à température ambiante, ce qui va permettre de digérer toute trace éventuelle d'ADN génomique persistant dans l'échantillon. Pour arrêter cette digestion, une solution STOP (Promega[®]) contenant de l'éthylène-glycol-tétra-acétique (EGTA) 20 mM (pH 8.0) est ajoutée au mélange. La synthèse de d'ADNc est ensuite réalisée au départ d'enzyme M-MLV (Promega[®]) en accord avec les recommandations du fournisseur. Brièvement, des *random primers* hexamériques (Promega[®]) sont ajoutés à l'ARN préalablement traité à la DNase : ils serviront d'amorce pour la synthèse d'ADNc. Le mélange est placé 5 minutes à 70°C, dans un thermocycleur PTC-200 (MJ Research, St. Bruno, Canada). Enfin, la transcription inverse est effectuée après l'ajout d'une solution contenant des désoxyribonucléotides triphosphate (dNTP) 10mM (Promega[®]), de l'enzyme M-MLV RT (*Reverse transcriptase*) (Promega[®]) à une concentration de 200 unités enzymatiques par réaction (le contrôle négatif contient le volume équivalent en eau milliQ), ceci dans un tampon de réaction contenant du Tris-HCl 50 mM à pH 8.3, du KCl 75 mM, du MgCl₂ 3 mM et du dithiothréitol (DTT) 10 mM. La réaction se fait à 37°C pendant 60 minutes.

Une amplification par PCR de l'ADNc codant pour l'actine est alors réalisée sur ces échantillons, afin de confirmer à la fois l'efficacité de la transcription inverse et l'absence d'ADN génomique contaminant (lorsque la celle-ci a été réalisée avec de l'eau milliQ et non avec la M-MLV RT).

3.3.2. Amplification de l'ADNc par PCR.

Afin d'être amplifié, chaque échantillon d'ADNc est incubé en présence des amorces sens et antisens spécifiques au gène d'intérêt (Tableau 1), en présence de dNTP 10 mM (Promega[®]), d'eau, de Taq polymérase ADN dépendante (Promega[®]), à une concentration de 2,5 unités enzymatiques par réaction. Cette polymérase débutera la synthèse d'un brin complémentaire en aval d'une amorce qui se sera hybridée spécifiquement sur les séquences de l'ADNc situées de part et d'autre de la région à amplifier. Tout d'abord, les échantillons

sont portés à 94°C pendant 4 min, afin de dénaturer les brins d'ADNc. Ensuite, l'amplification de ces brins comprend 40 cycles de trois étapes : 30 secondes de dénaturation à 94°C, (le fait de chauffer le mélange réactionnel permet aux molécules d'ADN double brin nouvellement formées d'être dénaturées), 30 secondes d'hybridation (à une température qui autorise l'hybridation spécifique des amorces sur les séquences complémentaires présentes dans la molécule d'ADN) et 30 secondes d'élongation à 72°C (température optimale pour le fonctionnement de la Taq polymérase). Les brins synthétisés au cours d'un cycle servent de matrice au cours du cycle suivant et ainsi de suite.

Tableau 1 : Description et séquence des amorces utilisées pour les différentes amplifications.

Amorce	Séquence	Dilution	Firme
Actine forward	AT-CTT-GAT-CTT-CAT-GGT-GCT-AGG	1/30	Eurogentec®
Actine reverse	TG-TTA-CCA-ACT-GGG-ACG-ACA-TGG	1/30	Eurogentec®
CXCR7 forward	GGT-CAG-TCT-CGT-GCA-GCA-TA	1/30	Eurogentec®
CXCR7 reverse	GTG-CCG-GTG-AAG-TAG-GTG-AT	1/30	Eurogentec®
ABCA1 forward	CCA-GAC-AGT-TGT-GGA-TGT-GG	1/30	Eurogentec®
ABCA1 reverse	GGC-GGT-TTT-CAC-AAA-AGT-GT	1/30	Eurogentec®
GNG2 forward	GAA-GCC-AAC-ATC-GAC-AGG-AT	1/30	Eurogentec®
GNG2 reverse	CTT-AAA-GGA-TGG-CGC-AGA-AG	1/30	Eurogentec®
NrCAM forward	ACA-TTG-TTT-CTG-GCA-CAC-CA	1/30	Eurogentec®
NrCAM reverse	TCT-GCC-AGC-GTA-CTG-TTC-AC	1/30	Eurogentec®
S1PR3 forward	GTG-TGT-TCA-TTG-CCT-GTT-GG	1/30	Eurogentec®
S1PR3 reverse	TTG-ACT-AGA-CAG-CCG-CAC-AC	1/30	Eurogentec®
SFRP2 forward	ACG-ACA-ACG-ACA-TCA-TGG-AA	1/30	Eurogentec®
SFRP2 reverse	ACG-CCG-TTC-AGC-TTG-TAA-AT	1/30	Eurogentec®
CD141 forward	CTT-GTG-CAA-TAG-GAG-CAC-GA	1/30	Eurogentec®
CD141 reverse	GAC-ACA-AAA-ATG-CTC-GCA-GA	1/30	Eurogentec®
FGFR2 forward	CAC-CGA-GAA-GAT-GGA-GAA-GC	1/30	Eurogentec®
FGFR2 reverse	GTC-TGA-CGG-GAC-CAC-ACT-TT	1/30	Eurogentec®
CD106 forward	GTG-GTG-CTG-TGA-CAA-TGA-CC	1/30	Eurogentec®
CD106 reverse	ACG-TCA-GAA-CAA-CCG-AAT-CC	1/30	Eurogentec®
CD56 forward	ACG-TCC-GGT-TCA-TAG-TCC-TG	1/30	Eurogentec®
CD56 reverse	CTA-TGG-GTT-CCC-CAT-CCT-TT	1/30	Eurogentec®

3.3.3. Electrophorèse sur gel d'agarose.

Une fois amplifiés, les fragments d'ADNc sont séparés selon leur taille par électrophorèse sur gel d'agarose. Le gel est constitué d'agarose (Nippon Genetics®, Dueren, Allemagne) dissout dans du tampon Tris-Borate-EDTA (Tris-HCl 89 mM, pH 7,4), à une concentration dépendant de la taille des pores requise, en fonction de la taille des fragments d'ADN à faire migrer. Après l'ajout de Midori Green® (LabGene Scientific®, Châtel St. Denis, Suisse), agent

intercalant concentré à 0,007%, le mélange est porté à ébullition et légèrement refroidi avant d'être coulé dans un support. Une fois le gel polymérisé, les échantillons sont chargés à raison de 10 µL par puits. 5 µL de marqueur de poids moléculaire sont également chargés dans un puits qui servira de référence. Les échantillons d'ADNc migrent à travers le gel sous un voltage d'environ 100 à 120 volts, selon la taille du gel. Après migration, le gel est scanné à l'aide de l'appareil ImageQuant 350 (GE Healthcare[®], Diegem, Belgique).

4. Immunomarquages.

4.1. Immunocytofluorescence.

Les cellules sont déposées sur lamelles recouvertes de polyornithine, et replacées à 37°C pendant 48 heures. Ensuite, elles sont fixées avec une solution de paraformaldéhyde (PFA) 4% pendant 15 minutes, et rincées trois fois 5' avec une solution de *phosphate-buffered saline* (PBS). Pour le blocage des sites aspécifiques, les cellules sont incubées dans une solution de PBS + Triton X-100 (PBS-T) 0,3%, contenant 5% de sérum, pendant 30 minutes. Ensuite, les coupes sont placées à 4°C pendant une nuit avec l'anticorps primaire (Tableau 2), dilué dans la même solution de PBS-T 0,3% + 5% de sérum. Le lendemain, les lames sont rincées trois fois 5 minutes au PBS, avant d'être incubées à température ambiante avec un anticorps secondaire spécifique, couplé à un fluorochrome (Tableau 2). Après trois rinçages de 5 minutes au PBS, les coupes sont séchées, et montées grâce à un milieu Vectashield/DAPI (Vector Laboratories[®], Burlingame, CA, Etats-Unis).

4.2. Immunohistochimie.

Les coupes de cerveau sont rincées trois fois 5 minutes au PBS, puis incubées 20 minutes dans une solution d' H_2O_2 0,6% (afin de saturer les peroxydases endogènes). Après un nouveau rinçage de 5 minutes au PBS, un blocage des sites aspécifiques est effectué en incubant les coupes dans une solution de PBS-T 0,3%, contenant 10% de sérum, ceci pendant 30 minutes. Ensuite, les coupes sont placées à 4°C pendant une nuit avec l'anticorps primaire (Tableau 2) dilué dans du PBS-T 0,3% + 10% de sérum. Le lendemain, les lames sont rincées trois fois 5 minutes au PBS, avant d'être incubées à température ambiante avec un anticorps secondaire biotinylé (Tableau 2), spécifique à l'espèce de laquelle est issu l'anticorps primaire. Après trois rinçages de 5 minutes au PBS, le marquage est amplifié grâce à un complexe avidine (1%)-biotine (1%) VectaStain ABC kit (Vector Laboratories[®]), pendant 1

heure à température ambiante. Les coupes sont lavées trois fois 5 minutes au PBS. Enfin, le marquage est révélé grâce à une solution de diaminobenzidine 0,04%, contenant également de l' H_2O_2 0,012%. Les lames sont rincées au PBS et à l'eau milliQ et séchées.

4.3. Cytométrie en flux.

Les cellules adhérentes sont détachées à l'aide d'un tampon de dissociation chélatant (GIBCO®), et sont ensuite resuspendues dans du PBS contenant 10% de sérum. Après une étape de centrifugation de 5 min à 400 g, les cellules sont filtrées au travers d'un filtre dont les pores ont un diamètre de 40 μ m (BD Biosciences®, San Jose, CA, Etats-Unis), et resuspendues dans du PBS contenant 2% de sérum. Ensuite, un marquage immunocytochimique des cellules est alors réalisé. Ces dernières sont incubées 30 min en présence de l'anticorps primaire (Table 1) durant 30 minutes. Deux rinçages au PBS sont ensuite réalisés avant l'incubation des cellules avec l'anticorps secondaire (Table 1). Les cellules sont rincées au PBS, et le marquage est mis en évidence à l'aide du cytomètre BD FACS Aria II Flow Cytometer et le programme BD CellQuest software (BD Biosciences®). Enfin, les données obtenues sont traitées par le programme FlowJo software (Tree Star®, Ashland, OR, Etats-Unis). Des cellules incubées avec l'anticorps secondaire seul sont utilisées en tant que contrôle négatif. Les cellules mortes et les doublets sont exclus par délimitation du scatter.

Tableau 2 : Anticorps utilisés pour les différents immunomarquages.

Anticorps primaire	Espèce	Dilution	Firme
Anti-nectine	Poulet	1/400	Novus Biologicals®
Anti-Sox2	Chèvre	1/250	Santa Cruz®
Anti-Tuj1	Souris	1/1000	Covance®
Anti-GFAP	Lapin	1/1000	Dako®
Anti-TH	Lapin	1/250	Abcam®
Anti-NrCAM	Lapin	1/300	Abcam®
Anticorps secondaire	Couplage	Dilution	Firme
Anti-lapin	RRX ou FITC	1/500	Jackson Immunoresearch Laboratories®
	Peroxydase	1/500	Dako®
Anti-chèvre	RRX ou FITC	1/500	Jackson Immunoresearch Laboratories®
	Peroxydase	1/500	Dako®
Anti-poulet	RRX ou FITC	1/500	Jackson Immunoresearch Laboratories®
	Peroxydase	1/500	Dako®
Anti-souris	RRX ou FITC	1/500	Jackson Immunoresearch Laboratories®
	Peroxydase	1/500	Dako®

5. Autres marquages et colorations.

5.1. Marquage histochimique de la β -galactosidase.

Afin de tracer les CSCN greffées au niveau du striatum, les coupes de cerveau sont traitées avec du X-gal, un substrat spécifique de la β -galactosidase. La métabolisation de ce composé jaune par l'enzyme produit une coloration bleue. La solution de marquage est préparée extemporanément, et est constituée de 80,5% eau milliQ, 10% de PBS 10x, 2% de Tris 1M, 0,2% de $MgCl_2$ 1M, 0,2% de NP40 10%, 0,1% de désoxycholate de Na, 1% de K_3Fe 0,5 M, 1% de K_4Fe 0,5 M, et 5% de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranoside (X-Gal) (Sigma-Aldrich[®]) dilué dans du diméthylsulfoxyde (DMSO), afin d'atteindre une concentration finale de 5 mg/mL.

Les lames sont placées à 37°C pendant 2 à 48 heures (selon l'intensité du marquage, vérifiée à plusieurs intervalles). Afin d'arrêter la réaction, les lames sont rincées trois fois 5 min au PBS, ainsi qu'à l'eau milliQ.

5.2. Coloration à l'hématoxylline de Carazzi

Tout d'abord, les coupes sont déshydratées par un bain chauffé d'alcool dénaturé, pendant 4 minutes 30. Les coupes sont trempées dans trois bains d'eau milliQ, avant d'être incubées dans une solution d'hématoxylline de Carazzi (Merck[®], Damstadt, Allemagne) pendant une dizaine de minutes. Une fois colorées, les coupes sont rincées dans trois bains d'eau milliQ, et dans un bain d'eau de ville pendant 5 à 10 minutes. Enfin, trois lavages à l'eau milliRo sont effectués, les coupes sont à nouveau déshydratées par des bains successifs d'alcool de plus en plus concentré, et montées au Safemount[®] (Labonord[®], Templemars, France).

6. Modèle MPTP chez la souris.

Le MPTP (Sigma-Aldrich[®], Saint-Louis, MO, Etats-Unis) est remis en suspension dans 2 mL de solution saline, soit une concentration de 5 mg/mL. Les souris reçoivent une dose aiguë de 20 mg/kg, injectée par voie i.p. (4 injections, à 2 heures d'intervalle), soit environ 100 à 120 μ L par injection (pour des souris de 25 à 30 g). L'injection se fait sous hotte stérile. Les manipulateurs sont équipés de deux paires de gants en nitrile, d'un tablier jetable, et d'un

masque jetable N95 (Sigma-Aldrich[®], Saint-Louis, MO, Etats-Unis). Après la dernière injection, tout le matériel utilisé (seringues, masques, tablier jetable, gants) sont directement évacués et l'espace de travail est nettoyé avec une solution d'eau de Javel 1%.

Pendant les 4 jours qui suivent l'injection de MPTP, les souris sont placées sous couvercle filtrant, sans aucune intervention des expérimentateurs, afin d'éviter toute contamination de l'espace environnant ou des manipulateurs. Une fois ce délai post-injection passé, les litières sont changées, les cages sont nettoyées et les animaux peuvent être manipulés tout à fait normalement

7. Implantation intracrânienne de cellules souches chez la souris.

Les animaux sont anesthésiés par injection i.p. (en conditions stériles) de 0,05 mL d'une solution volume/volume de Rompun[®] (Sedativum 2%, Bayer[®], Belgique) et de Ketalar[®] (Ketamine 50mg/mL, Pfizer[®], Ixelles, Belgique). Les réflexes cornéens ainsi que la sensibilité des pattes sont testés pour évaluer cliniquement la profondeur de l'anesthésie. De la pommade (Fucithalamic[®], Leo Pharma, Buckinghamshire, Royaume-Uni) est appliquée sur les yeux de l'animal (pour éviter qu'ils ne sèchent). Le crâne est épilé pour faciliter l'incision qui est réalisée à l'aide de la pointe de petits ciseaux. L'animal est fixé au support stéréotaxique (Benchmark[®], MyNeuroLab.com), et correctement maintenu au niveau du nez et des oreilles à l'aide d'un cadre stéréotaxique. Un petit trou est foré dans la boîte crânienne pour permettre le passage de l'aiguille. Via la seringue (Hamilton[®]) fixée au support stéréotaxique, la suspension cellulaire est injectée dans le cerveau de la souris, au niveau du striatum droit, en utilisant l'intersection des sutures coronale et sagittale (bregma) comme référence (*Coordonnées stéréotaxiques : Bregma +0,5 mm en avant, 2 mm à droite, 3 mm de profondeur*) (Figure 10).

La suspension cellulaire contient 5×10^4 cellules dans 2 μ L de PBS stérile (GIBCO[®]). Ce mélange contient un nombre équivalent de cellules de chaque clone dérivé de CSCN. Dans le cas des souris contrôles, 2 μ L de solution saline sont injectés. L'animal est recousu, et placé sous une lampe chauffante, jusqu'à son réveil complet.

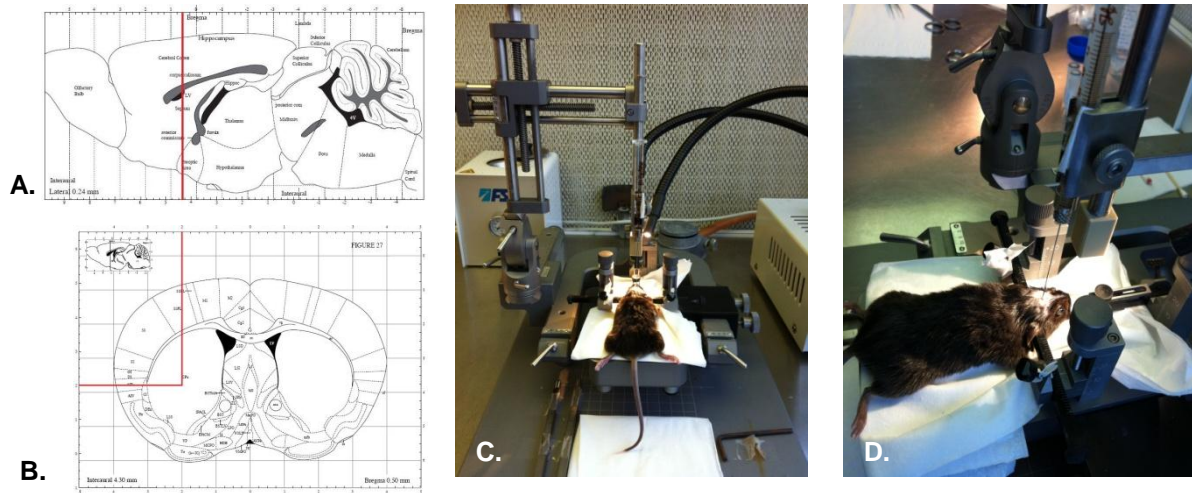


Figure 10 : Injection stéréotaxique des CSM, CSCN, ou de solution saline dans le striatum droit des souris. A gauche, coordonnées stéréotaxiques en coupe longitudinale (A) et coronale (B) sur un atlas stéréotaxique chez la souris. A droite, vues de l'arrière (C) et de profil (D) de l'animal placé dans le cadre. A l'avant-plan de l'image D, on peut observer l'aiguille servant à l'injection des cellules.

8. Tests de coordination motrice

Pendant la semaine précédant le début de l'expérience, les souris subissent un entraînement pour chacun des tests. Les tests comportementaux sont réalisés au jour précédant l'injection de MPTP, au jour précédant l'implantation intracérébrale des cellules souches, et ensuite aux jours 5, 15 et 25 post-greffe. Les mesures sont prises en direct et vérifiées grâce aux séquences vidéos.

8.1. Validation des équipements.

Afin de mettre au point et de valider les équipements que nous avons construits, nous avons suivi un protocole expérimental utilisé dans l'étude de la sensibilité à l'éthanol (plus facilement disponible que le MPTP) (Crabbe et al., 2003). Les souris subissent préalablement un entraînement aux deux tests comportementaux, avant d'être enregistrées dans les conditions contrôles (pré-injection). Ensuite, les souris reçoivent trois injections i.p. d'éthanol 20% (mélange volume/volume dans solution saline), à une dose de 1,5 g/kg, et à 3 minutes d'intervalle. Les souris contrôles reçoivent de la solution saline. Après injection, les souris sont replacées dans leur cage pendant une durée de 10 minutes, pour permettre d'atteindre une concentration maximale d'éthanol dans le cerveau. Après ces 10 minutes, les souris sont à nouveau enregistrées.

8.2. *Beam test*

Ce test consiste à évaluer l'équilibre de l'animal lorsqu'il parcourt une poutre ronde. Dans le cadre de ce travail, deux poutres de 2,5 cm et 0,5 cm de diamètre sont utilisées, mesurant toutes deux 1 m de long. Ces poutres sont recouvertes de papier collant chirurgical afin de permettre à l'animal de s'agripper de manière optimale. Lors du test, la poutre est placée à 25 cm du sol, au dessus d'un tapis qui puisse protéger la souris en cas de chute (Figure 11, A). Le nombre total de pas effectués par la souris est comptabilisé (sur une distance d'un mètre, et en 1 minute 30 au maximum). Les chutes des pattes dues à des erreurs de placement sont également recensées, et normalisées par rapport au nombre total de pas.

8.3. *Grid test*

La souris est placée sur une grille en acier de 13,75 x 30 cm, avec un quadrillage de 1,25 cm de côté (Figure 11, B). La coordination motrice de l'animal est évaluée pendant une durée de 3 minutes. Le nombre de fois que les pattes arrière traversent complètement le grillage est comptabilisé, et ce nombre est normalisé par rapport au nombre total de pas effectués.

8.4. *Rearing test*

Lorsqu'elle est placée dans un cylindre de verre (d'un diamètre de 13 cm), la souris se dresse sur ses pattes arrière (« *rearing* »), soit en appuyant ses membres antérieurs sur paroi du cylindre, soit sans aucune aide de la paroi. Dans le cadre de ce travail, ces deux phénomènes sont conjointement comptabilisés. Un *rearing* valide est effectué avec une extension complète des pattes arrière (Figure 11, C).

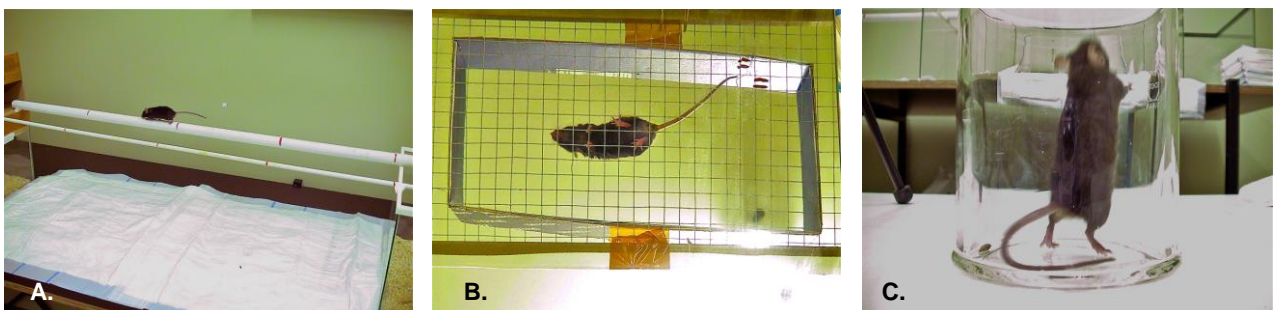


Figure 11 : Equipements des tests comportementaux. *Beam test* (A), *grid test* (B) et *rearing test* (C).

9. Perfusion, fixation, et coupe des cerveaux.

Après un délai de 14 et 28 jours post-greffe (selon le groupe), les souris sont perfusées et fixées au PFA 4% (Sigma-Aldrich[®]). Les cerveaux prélevés sont ensuite post-fixés pendant 2 heures dans du PFA 4%, et puis conservés dans une solution de sucrose 20% durant une nuit minimum. Enfin, les cerveaux sont congelés à -50°C dans de l'isopentane, et conservés à -20°C. Les cerveaux sont coupés en sections de 14 microns, sur l'entièreté du striatum (*de +3 mm à -3 mm par rapport au bregma*) et du mésencéphale (*de -3 mm à -5 mm par rapport au bregma*).

10. Acquisition des images

La prise d'images et l'analyse des sections ou des cellules immunomarquées sont effectuées à l'aide d'un microscope à épifluorescence Zeiss AxioImager Z1[®] (Zeiss[®], Zaventem, Belgique) couplé au software FluoView[®] (Olympus[®], Artselaar, Belgique), et d'un microscope Olympus AX-70 (Olympus[®]) couplé au software AnalySIS (Olympus[®]). Les figures sont réalisées à l'aide d'ImageJ (logiciel de traitement et d'analyse d'images Java[®], auteur : Wayne Rasband, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, États-Unis).

11. Analyse statistique des données

Les tests statistiques sont réalisés en fixant l'intervalle de confiance à 95 % ($\alpha = 0,05$). Pour les comptages cellulaires, une analyse ANOVA à un facteur est réalisée. Pour les résultats obtenus aux tests comportementaux, les tests statistiques sont réalisés par une ANOVA à mesures répétées, suivie des tests *post-hoc* de comparaisons multiples de Newman-Keuls et de Duncan. Tous les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm *Standard Error of Mean* (SEM).

Résultats

IV. RESULTATS

1. Caractérisation des populations clonales de CSM et de CSCN issues de la moelle osseuse

Rappelons que de précédents travaux réalisés dans laboratoire d'accueil ont démontré que les cellules souches mésenchymateuses (CSM) isolées de la moelle osseuse de souris ou de rats adultes étaient capables de se différencier en neurones fonctionnels, dans certaines conditions de culture spécifiques (Wislet-Gendebien et al., 2005).

Etant donné que seules les CSM nestine-positives étaient capables de se différencier en cellules neuronales, une première comparaison entre les cellules nestine-positives et cellules nestine-négatives a permis de formuler l'hypothèse que les cellules nestine-positives pourraient être dérivées de la crête neurale. L'utilisation d'une souris double transgénique (Wnt1-Cre/R26R-LacZ) a permis par la suite de confirmer la présence de cellules dérivées de la crête neurale dans la moelle osseuse adulte.

L'utilisation de cette souris double-transgène permet une discrimination simple, sur base de l'expression de la β -galactosidase, des cellules souches de type mésenchymateux (CSM, non dérivées de la crête neurale, qui sont β -galactosidase-négatives) et des cellules souches dérivées de la crête neurale (CSCN, qui sont β -galactosidase-positives). A partir de cultures de moelle osseuse d'animaux adultes transgéniques Wnt1-CRE/R26R-LacZ, et ainsi sur base de l'expression de la β -galactosidase, notre laboratoire d'accueil a sélectionné cinq clones de type CSCN et six clones de type CSM. Ces onze clones constitueront la base du présent travail.

1.1. Analyse des capacités de différenciation neuronale.

Suite à l'analyse des capacités de différenciation en différents types cellulaires mésenchymateux (*Voir chapitre I. Introduction*), les capacités de différenciation neuronale des clones de type CSM et de type CSCN ont été testées en plaçant ceux-ci en co-culture avec des GC exprimant la GFP. Dans ces conditions, $12,7 \% \pm 3,4 \%$ des clones de type CSCN (Figure 12, A) et $8,3 \% \pm 2,9 \%$ des clones de type CSM (Figure 12, B) donnent naissance à des cellules Tuj1-positives (exprimant la β III-tubuline, un marqueur de différenciation neuronale).

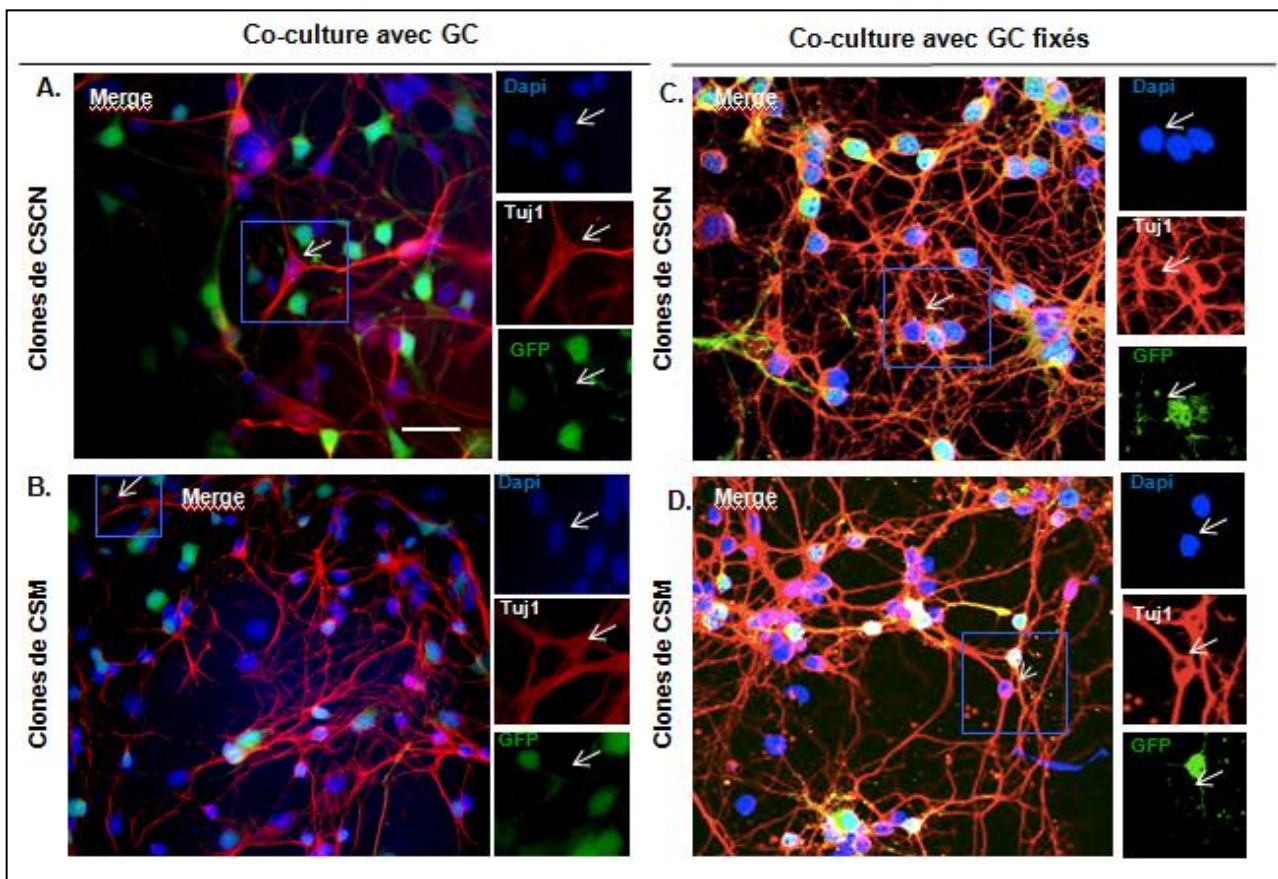


Figure 12 : Capacités de différenciation neuronale des clones de CSM et CSCN. En conditions de co-culture avec des GC exprimant la GFP (marquage vert), les clones de CSCN (A) et de CSM (B) peuvent donner naissance à des cellules exprimant la β III-tubuline et donc reconnues par l'anticorps monoclonal Tuj1 (marquage rouge). Les noyaux des cellules sont marqués de manière aspécifique à l'aide de DAPI (bleu). Les mêmes observations sont réalisées lorsque les GC sont préalablement fixés à l'aide d'une solution de paraformaldéhyde (C, D), ce qui confirme l'existence d'un phénomène de différenciation (Barre d'échelle = 30 μ m)

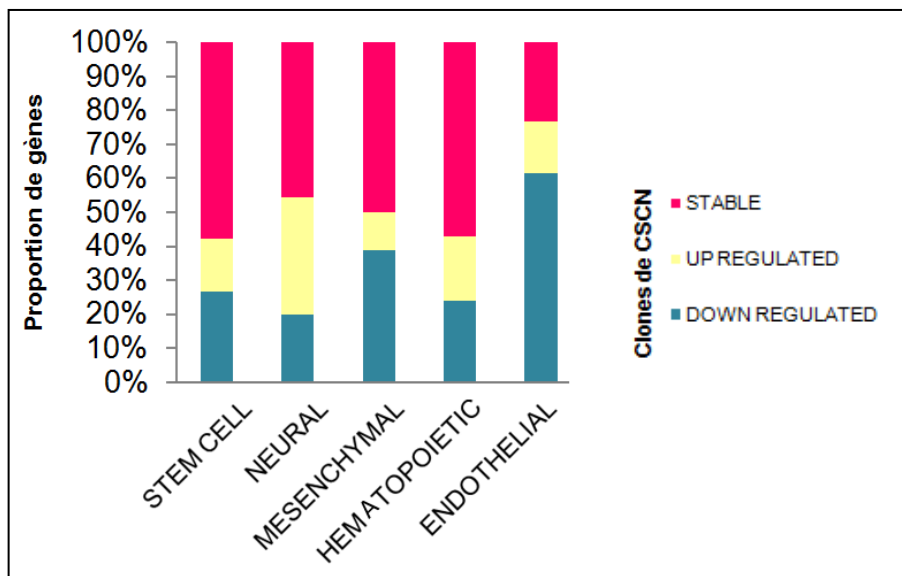


Figure 13 : Proportions de gènes surexprimés, stables ou sous-exprimés dans les clones de CSCN par rapport aux clones de CSM, et rangés dans cinq classes selon leur fréquence et leur amplitude d'expression habituelle. Par rapport aux clones CSM, les clones de CSCN présentent une surexpression des gènes « neuraux », au détriment des gènes « mésenchymateux » et « endothéliaux ». On constate que la proportion de gènes exprimés de manière identique ou surexprimés dans les clones CSCN par rapport aux clones CSM est plus importante dans la catégorie « neurale » et en revanche, les gènes de exprimés de manière identique ou sous-exprimés dans les clones CSCN par rapport aux clones CSM sont moins nombreux dans les catégories « mésenchymateuse » et « endothéliale ».

A l'heure actuelle, les mécanismes qui sous-tendent cette différenciation neuronale restent mal déterminés : en effet, il a été démontré que des cellules stromales de la moelle osseuse pourraient fusionner avec des neurones matures, acquérant ainsi leurs caractéristiques (Alvarez-Dolado et al., 2003). L'obtention de cellules Tuj1-positives à partir des clones pourrait donc résulter d'une fusion avec les GC, et non d'une différenciation à proprement parler. Afin de tester cette hypothèse, nous avons placé les clones de type CSM et de type CSCN en co-culture avec des GC fixés à l'aide d'une solution de PFA 4%. La co-culture est maintenue pendant 5 jours dans du milieu de culture préalablement conditionné par les GC. Dans ces conditions, nous observons également l'apparition de cellules Tuj1-positives dérivées des CSCN (Figure 12, C) et des CSM (Figure 12, D). Cette expérience permet de conclure l'existence d'un réel phénomène de différenciation puisqu'il est impossible qu'une cellule vivante puisse fusionner avec une cellule morte après fixation. En revanche, par cette approche, nous ne pouvons toutefois pas exclure la possibilité de phénomènes de fusion concomitants dans les co-cultures décrites à la figure 12.

1.2. Analyse comparative des transcriptomes des clones de CSM et des clones de CSCN.

A ce stade de notre étude, il apparaît que les CSM et les CSCN présentent des caractéristiques de différenciation propres à chaque type cellulaire. Ces spécificités présentent différents avantages qui pourraient notamment être exploités dans le cadre de thérapie cellulaire pour diverses maladies, telle que la maladie de Parkinson. Cependant, dans une perspective de tri cellulaire, aucun marqueur membranaire spécifique de chacun des types cellulaires n'est connu à ce jour, ce qui rend leur discrimination formelle impossible sans l'utilisation de souris transgéniques telles que la souris Wnt1-Cre/R26R-LacZ. Par conséquent, afin de sélectionner des facteurs qui permettraient d'identifier *in vivo* les deux types cellulaires à partir d'une aspiration médullaire, nous avons réalisé une analyse transcriptomique par microarray de deux mélanges de clones, dérivés de CSM et de CSCN. L'analyse a révélé l'expression d'environ 20 000 gènes, dont 3169 d'entre eux sont surexprimés ou sous-exprimés de manière significative dans une des deux populations. Leur classement dans différentes familles de gènes nous a permis de confirmer la surexpression de gènes de type « neuraux » et la sous-expression de gènes de type « mésenchymateux » et « endothéliaux » chez les clones dérivés de CSCN (Figure 13), comparativement aux clones de type CSM.

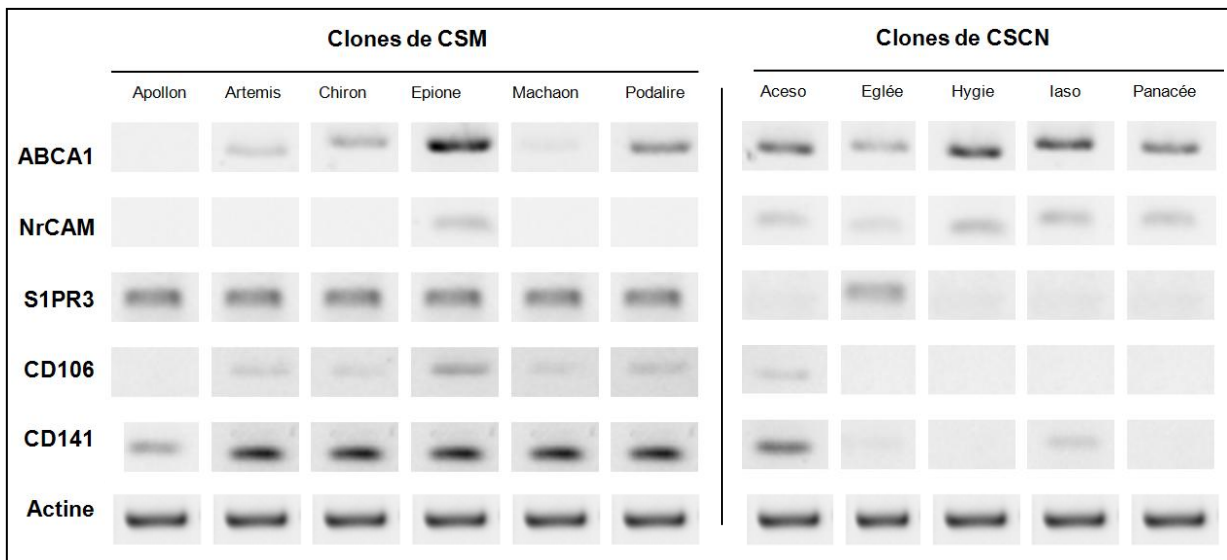


Figure 14 : Confirmation de l'expression par RT-PCR au niveau de chaque clone des gènes codant pour des protéines membranaires sélectionnés par l'analyse transcriptomique.

Le transcrite ABCA1 est exprimé par tous les clones de CSCN. Cependant, quatre clones de CSM l'expriment également. Chacun des clones dérivés de CSCN expriment NrCAM alors qu'on observe un signal pour ce transcrite pour un seul clone de CSM (Epione).

Les transcrits correspondant aux protéines S1PR3, CD106 et CD141 sont tous exprimés de manière plus ou moins intense par chacun des clones dérivés de CSM, à l'inverse des clones dérivés de CSCN.

L'expression de l'actine confirme l'efficacité de la transcription inverse.

L'analyse microarray a également révélé des variations d'expression de nombreuses protéines membranaires entre les deux populations. L'identification de marqueurs membranaires permettrait, si ces résultats sont confirmés, d'isoler l'un ou l'autre de ces types cellulaires parmi la population stromale de la moelle osseuse, sans l'utilisation de souris transgénique (Table 3).

Table 3 : Gènes codant pour des protéines membranaires et sélectionnés en vue d'une discrimination des CSCN et des CSM. Les chiffres situés dans les deux colonnes de droite correspondent aux moyennes géométriques de l'expression normalisée de chacun des gènes dans les deux groupes de clones lors de l'analyse transcriptomique.

		CSCN	CSM
PLP1	Proteolipid protein 1	8861,91	7,92
L1CAM	L1 cell adhesion molecule	11959,11	42,85
ABCA1	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1	5550,11	66,92
NrCAM	neuron-glia-CAM-related cell adhesion molecule	1761,88	4,36
S1PR3	Sphingosine-1-phosphate receptor 3	6053,44	4,36
CD141	(THBD) Thrombomodulin	5,6	2996,24
CD106	(VCAM1) vascular cell adhesion molecule 1	5,36	152,79

1.3. Confirmation des résultats de l'analyse microarray – Mise en évidence de l'expression des gènes par RT-PCR.

Les différents transcrits sélectionnés sur base des résultats de l'analyse transcriptomique ont ensuite été mis en évidence par RT-PCR pour chaque clone de manière individuelle (Figure 14), permettant ainsi de vérifier si l'expression quantifiée par microarray correspondait bien à une expression homogène parmi les différents clones, et non pas au résultat d'une expression aberrante de ce gène par une minorité de clones, ce qui aurait induit un biais au niveau des résultats obtenus à partir des pools de clones.

Le transcrit codant pour la protéine ABCA1 est effectivement exprimé par tous les clones dérivés de CSCN. Cependant, quatre clones de CSM l'expriment également, dont l'un d'eux à un taux particulièrement élevé. Nous ne retiendrons donc pas ce gène dans l'optique d'une discrimination des deux populations.

La mise en évidence du transcrit codant pour la protéine NrCAM a fourni de meilleurs résultats : chacun des clones dérivés de CSCN expriment NrCAM, alors qu'un seul clone de

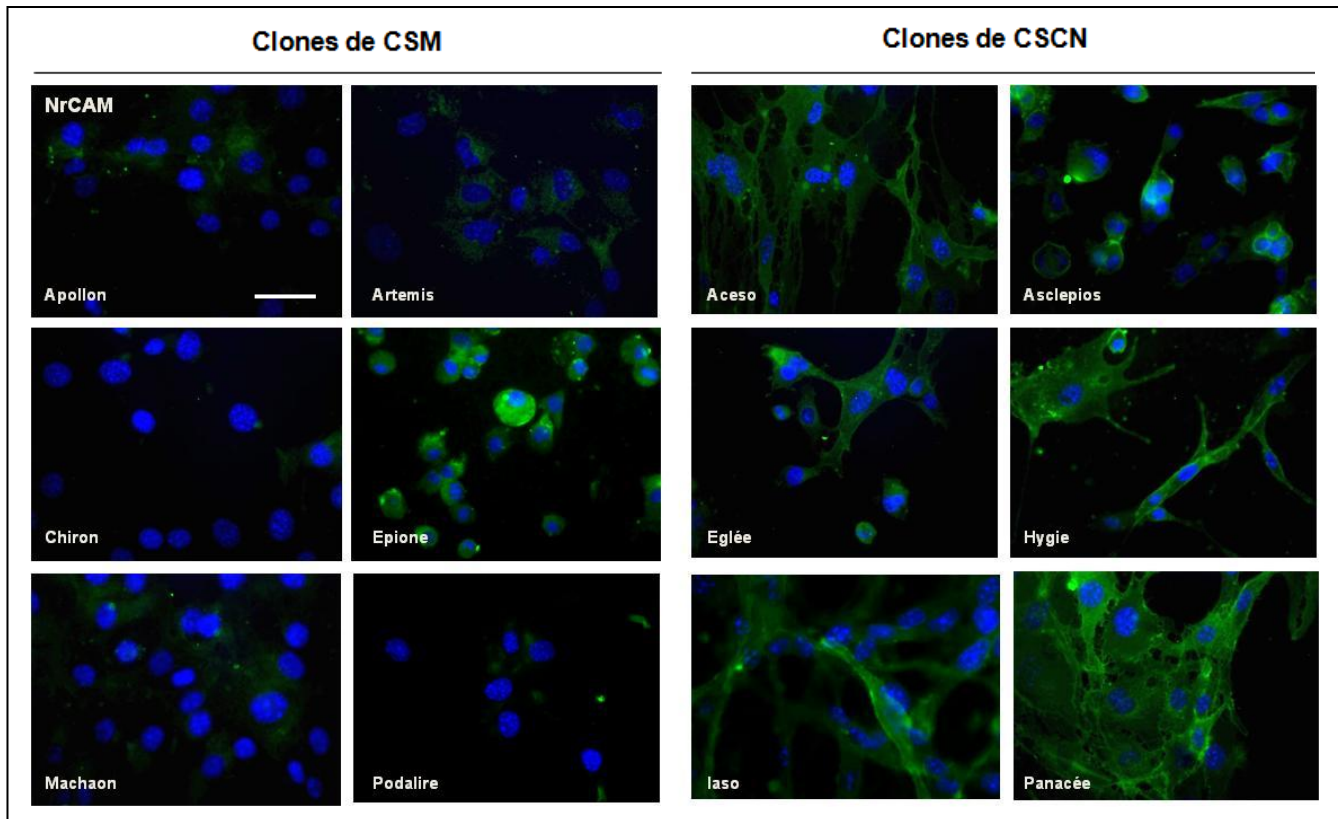


Figure 15 : Mise en évidence de la protéine NrCAM par immunocytofluorescence dans des cultures de clones de CSM et de CSCN. Seul un des clones de CSM (Epione) exprime NrCAM. Ces résultats confirment les résultats obtenus en RT-PCR. Au contraire, tous les clones de CSCN l'expriment de manière significative. Le marquage NrCAM apparaît ici en vert et les noyaux ont été marqués de manière aspécifique à l'aide de DAPI (couleur bleue) (Barre d'échelle = 20 μ m)

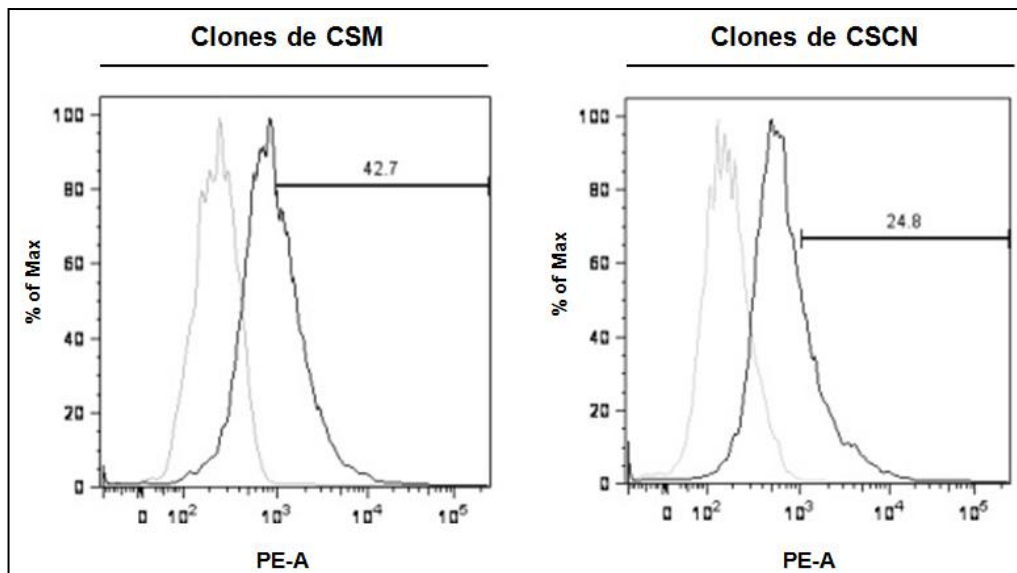


Figure 16 : Mise en évidence de la protéine NrCAM dans les clones de CSM et de CSCN par FACS. Environ 42,7 % des cellules de type CSM sont positives pour NrCAM, tandis qu'une proportion de 24,8 % des cellules de type CSCN présentent un marquage positif.

CSM montre une expression de ce gène. NrCAM pourrait donc se révéler être un marqueur quasi-exclusif des CSCN, potentiellement utilisable dans un processus de caractérisation. Enfin, les transcrits correspondant aux protéines S1PR3, CD106 et CD141 sont tous exprimés de manière plus ou moins intense par chacun des clones dérivés de CSM, à l'inverse des clones dérivés de CSCN. Ces trois marqueurs semblent donc être de relativement bons candidats pour une éventuelle sélection des CSM.

1.4. Mise en évidence de l'expression des protéines codées par les transcrits sélectionnés.

On sait que l'expression au niveau de l'ARNm ne correspond pas toujours à une expression de la protéine. Différents mécanismes de régulation interviennent, tant au niveau de la maturation du gène qu'au niveau de l'expression de la protéine. De même, le temps de demi-vie de la protéine intervient également. Il convenait dès lors de vérifier au niveau protéique ces résultats obtenus en analyse transcriptomique et vérifiés par RT-PCR. Nous avons donc réalisé une mise en évidence par immunomarquage des protéines codées par ces mêmes transcrits, ce qui constituait à nos yeux la dernière étape avant une sélection à proprement dite via la mise au point d'un protocole de tri cellulaire.

Nous avons cependant été freinés dans cette partie de notre travail, en raison de l'indisponibilité de certains anticorps dirigés spécifiquement contre les protéines sélectionnées : ces anticorps devaient pouvoir être utilisables tant en immunocytomarquage qu'en FACS. Jusqu'à présent, seule la protéine NrCAM a pu être mise en évidence par immunocytofluorescence chez chacun des clones de CSCN et de CSM (Les anticorps ciblant PLP1, CD106 et CD141 n'ont pas fourni des marquages satisfaisants. En effet, l'intensité du marquage était équivalente à celle du marquage du témoin négatif. En outre, aucun anticorps dirigé contre S1PR3 ni L1CAM répondant à nos exigences n'est disponible).

Les résultats obtenus pour NrCAM corroborent les données obtenues par RT-PCR, à savoir que tous les clones dérivés de CSCN expriment cette protéine membranaire, et qu'un seul des clones de CSM (Epione) l'exprime de manière relativement importante (Figure 15). Malheureusement, bien que la protéine NrCAM soit exprimée de façon significativement différente entre les populations clonales dérivées de CSCN et de CSM, l'anticorps utilisé pour l'immunocytofluorescence n'a pas généré une ségrégation optimale des deux populations de clones (CSM et CSCN) via le FACS (*Fluorescent-associated cell sorter*) (Figure 16). En

effet, environ 42,7 % des cellules de type CSM présentent un signal positif pour NrCAM, tandis que seulement 24,8 % des cellules de type CSCN sont positives.

2. Etude *in vivo* des propriétés des CSCN et analyse de leur impact dans un modèle de maladie de Parkinson.

Rappelons que le but ultime dans lequel s'inscrit ce présent mémoire est l'utilisation de cellules souches médullaires comme source cellulaire pour des thérapies de remplacement dans des maladies neurologiques. En marge de la caractérisation moléculaire et cellulaire des CSM et des CSCN, et puisque ces deux types cellulaires sont capables de se différencier en cellules de type neuronal, nous avons voulu caractériser, dans un premier temps, les CSCN dans un modèle *in vivo* de maladie neurodégénérative. Le modèle choisi dans le cadre de ce travail est un modèle caractéristique de la maladie de Parkinson, induit par injection de la neurotoxine MPTP.

Différents marquages immunohistochimiques ont permis de valider la survie cellulaire après une greffe de clones de type CSCN chez ce modèle murin MPTP, et d'évaluer leur capacité à se différencier *in vivo*, et éventuellement à rétablir les connexions neuronales initialement perdues. De même, les capacités des CSCN à rétablir les facultés motrices de l'individu ont été analysées par le biais de différents tests comportementaux (*beam test – grid test – rearing test*).

2.1. Validation sur le plan histologique du modèle murin MPTP de la maladie de Parkinson.

Afin de vérifier l'effet du MPTP sur les structures classiquement atteintes dans la maladie de Parkinson, et ainsi de valider la mise au point de ce modèle expérimental, une quantification des neurones dopaminergiques dans les structures du système nigrostrié a été effectuée par immunomarquage de la tyrosine hydroxylase (TH), enzyme impliquée dans la synthèse de L-DOPA (L-3,4-Dihydroxyphénylalanine) à partir de tyrosine (la DOPA sera ensuite convertie en dopamine par une réaction de décarboxylation), et spécifique des neurones dopaminergiques.

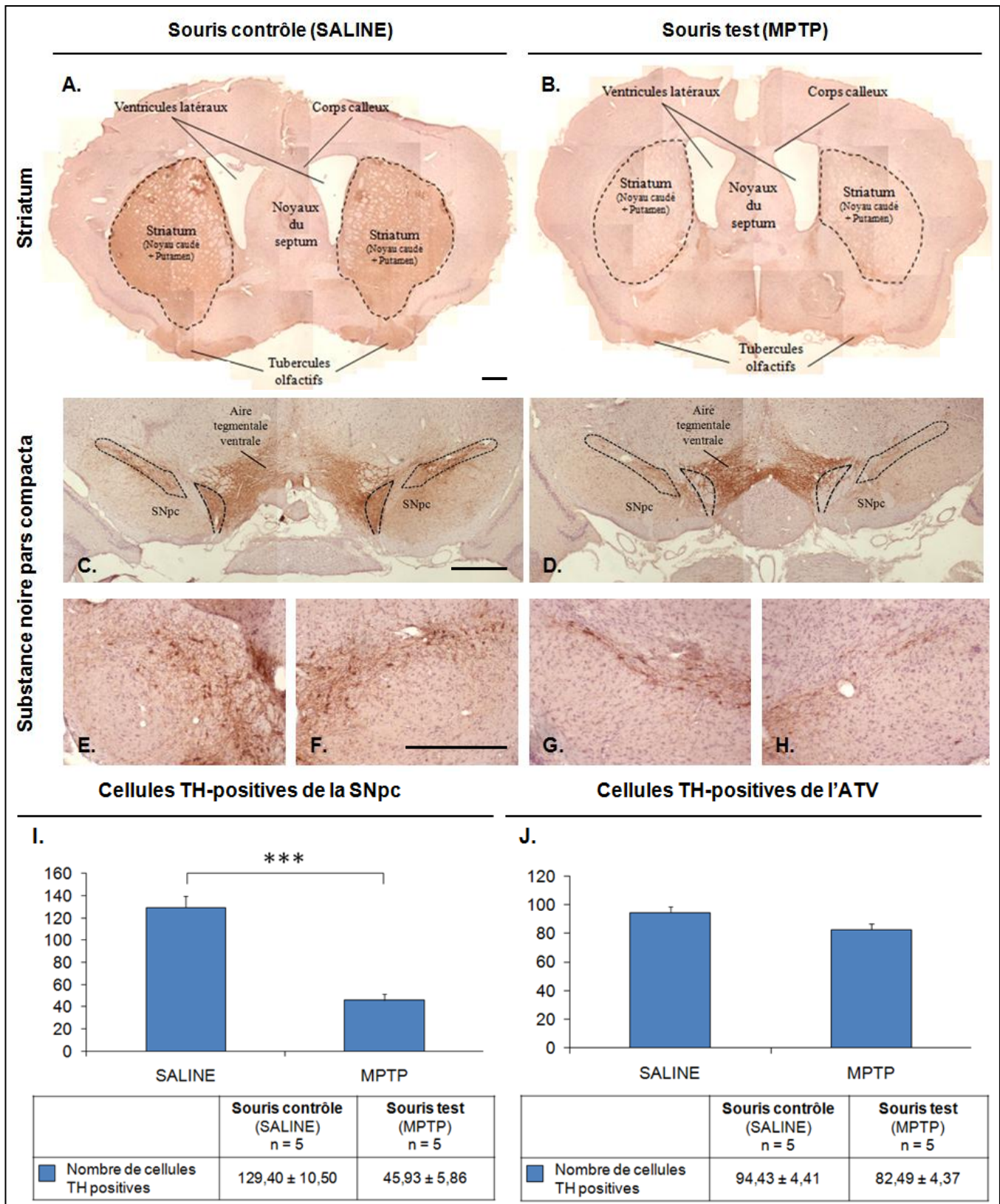


Figure 17 : Mise en évidence de la diminution des neurones dopaminergiques dans le striatum et la SNpc chez les souris traitées au MPTP. Une diminution évidente du marquage anti-TH est remarquée dans le striatum des souris traitées au MPTP (B) par rapport aux souris contrôle (A). Au niveau de la substance noire pars compacta (SNpc), les neurones dopaminergiques sont plus nombreux chez les souris contrôles (C-E-F) que chez les souris MPTP (D-G-H). Les comptages sont exprimés en moyenne ± SEM : au niveau de la SNpc, le nombre de neurones TH-positifs est significativement diminué chez les souris traitées au MPTP par rapport aux animaux contrôle, ($F_{(1,8)} = 48,12$; $p = 0,0001$) (I). Au niveau de l'aire tegmentale ventrale (ATV), la différence du nombre de cellules dopaminergiques entre les souris contrôle et les souris MPTP reste non significative ($F_{(1,8)} = 3,68$; $p = 0,09$) (J). (Barre d'échelle = 500 μ m)

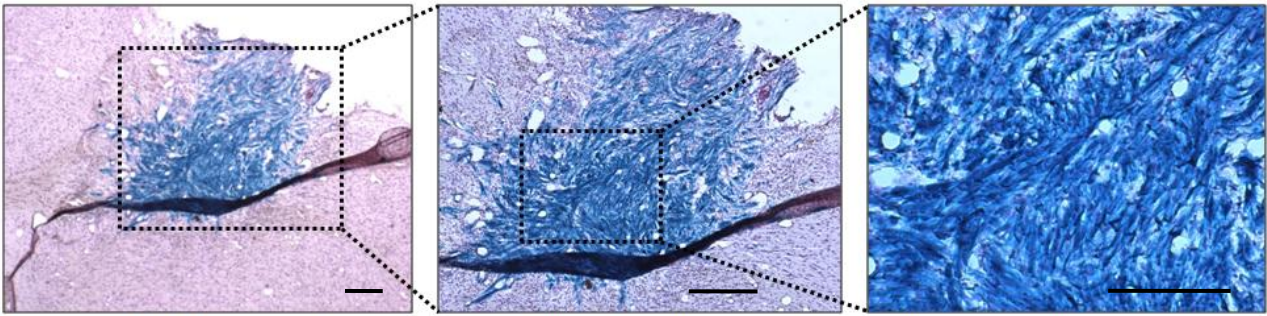
Le nombre de neurones TH-positifs dans le striatum est difficilement appréciable. En effet, cette structure comprend les prolongements axonaux des neurones dont le corps cellulaire est présent dans la SNpc, et un marquage cytoplasmique de la TH ne permet pas d'individualiser facilement ces fibres nerveuses à des fins de comptage. Cependant, une diminution drastique du marquage anti-TH est clairement perceptible chez les souris traitées au MPTP (Figure 17, B) par rapport aux souris contrôle, et est évaluée à environ 90% (Figure 17, A). Il est également possible d'observer une légère diminution des neurones dopaminergiques dans les tubercules olfactifs. Ceci peut en partie expliquer les phénomènes d'anosmie observés chez les patients atteints de maladie de Parkinson puisque, pour rappel, celle-ci est caractérisée par une dégénérescence de tous les neurones dopaminergiques (Morley and Duda, 2010).

Au niveau de la SNpc, la diminution de cellules TH-positives est plus facilement quantifiable. Les neurones dopaminergiques présents dans la SNpc sont plus nombreux chez les souris contrôles (Figure 17, C-E-F) que chez les souris MPTP (Figure 17, D-G-H). Cette réduction est évaluée à environ 60% (Jackson-Lewis et al., 1995). L'aire tegmentale ventrale (ATV) fournit une zone contrôle pour les deux groupes d'individus. En effet, les neurones de l'ATV sont relativement moins atteints par le MPTP (Phani et al., 2010).

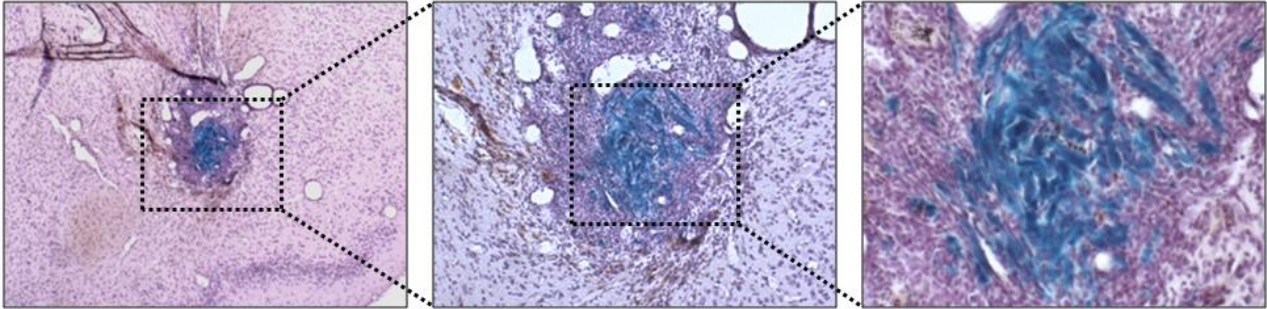
Les comptages de ces cellules ont été effectués sur cinq individus par groupe ($n = 5$), et la quantité de cellules présentes dans la zone d'intérêt est exprimée par le nombre de cellules par coupe représentative de mésencéphale (moyenne \pm SEM). Une ANOVA à un facteur est réalisée sur les données, avec la variable CELLULES (nombre de cellules TH-positives par coupe) comme variable dépendante, et la variable GROUPE (contrôle ou test) comme variable catégorielle.

Au niveau de la SNpc, le nombre de neurones TH-positifs est diminué de façon extrêmement significative chez les souris traitées au MPTP ($45,93 \pm 5,86$) par rapport aux animaux contrôle ($129,40 \pm 10,50$) ($F_{(1,8)} = 48,12$; $p = 0,0001$) (Figure 17, I).

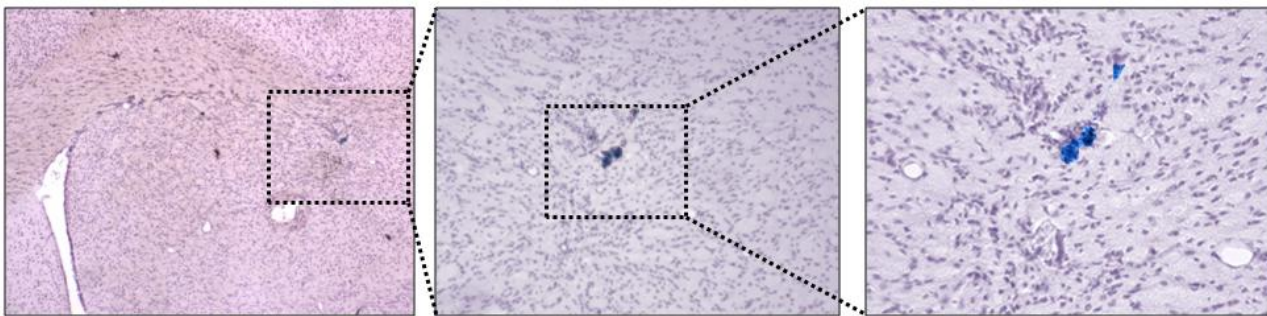
Bien qu'une très légère diminution du nombre de neurones TH-positifs dans l'aire tegmentale ventrale soit observée, la différence du nombre de cellules dopaminergiques entre les souris contrôle et les souris MPTP au niveau de cette zone reste non significative ($F_{(1,8)} = 3,68$; $p = 0,09$) (Figure 17, J).



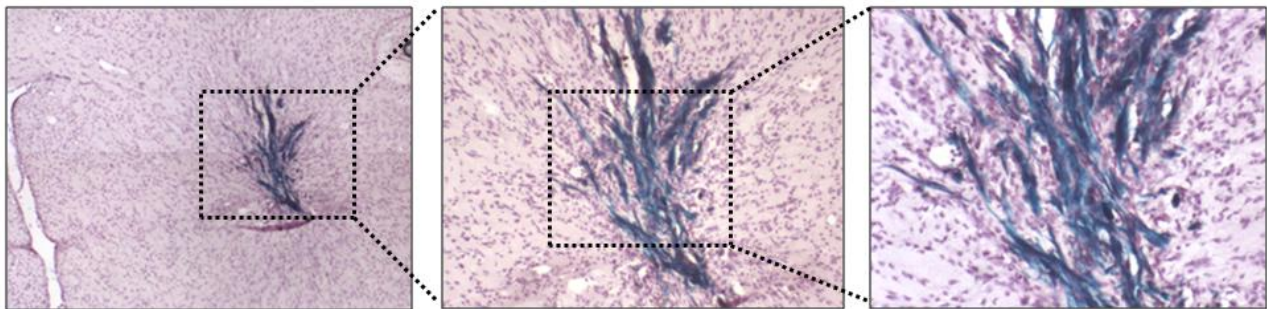
Cerveau A (14 jours post-greffe). ⚠ Cellules localisées au-dessus du corps calleux.



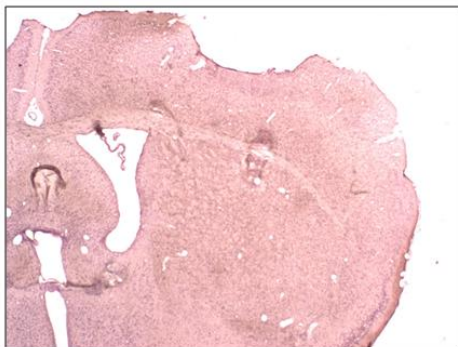
Cerveau B (14 jours post-greffe).



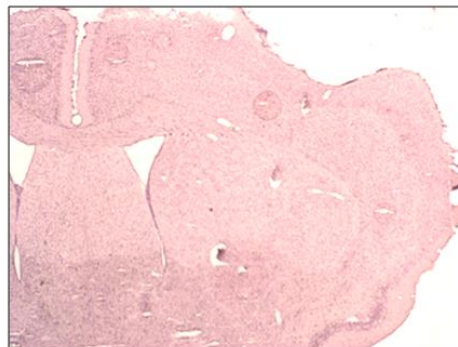
Cerveau C (14 jours post-greffe).



Cerveau D (14 jours post-greffe).



Cerveau E (14 jours post-greffe).



Cerveaux F-G-H-I (28 jours post-greffe).

Figure 18 : Localisation des clones de CSCN greffés dans le striatum des souris. Les CSCN implantées par stéréotaxie dans le striatum des souris sont retrouvées par mise en évidence de l'activité enzymatique de la β -galactosidase. (Barre d'échelle = 250 μ m)

2.2. Expérience de greffe intrastriatale de CSCN dans un modèle murin MPTP de la maladie de Parkinson.

2.2.1. Evaluation de la survie cellulaire après greffe de CSCN.

Les CSCN implantées par stéréotaxie dans le striatum des souris sont détectées par mise en évidence de l'activité enzymatique de la β -galactosidase, exprimée dans les cellules de la crête neurale des souris double-transgéniques Wnt1-Cre/R26R-LacZ, desquelles sont issus les clones de type CSCN.

Le marquage de la β -galactosidase est cytoplasmique, et ne permet malheureusement pas un comptage fiable du nombre de cellules ayant survécu dans le cerveau des souris. Cependant, l'analyse qualitative des sections révèle que le nombre de cellules ayant survécu est faible (Figure 18) Après 14 jours, quelques cellules sont retrouvées dans la plupart des cerveaux analysés (excepté dans le cerveau E où aucune cellule n'a été retrouvée). Par ailleurs, elles restent confinées à l'endroit auquel elles ont été greffées, et aucune cellule ne semble avoir entamé de migration, que ce soit chez les souris contrôle ou chez les souris traitées au MPTP. En outre, aucune cellule β -galactosidase-positif n'est retrouvée dans la substance noire.

28 jours après la greffe, aucune cellule n'est retrouvée dans les cerveaux analysés, et cela même au niveau du site d'injection.

2.2.2. Caractérisation *in vivo* des CSCN greffées.

Nous avons ensuite amorcé une caractérisation *in situ* des CSCN greffées, ceci afin d'étudier leurs éventuelles capacités de différenciation dans ces conditions. Plusieurs difficultés techniques ont été rencontrées : en effet, le marquage de la β -galactosidase est, techniquement difficilement conciliable avec un autre marquage par immunohistofluorescence. Par conséquent, nous avons opté pour un marquage par immunohistochimie révélée en lumière visible, ce qui fournit cependant une image moins sensible et moins précise. De plus, le marquage bleu de la β -galactosidase apparaît diffus et flou, et les cellules greffées sont très condensées. *In vitro*, les clones dérivés de CSCN expriment la nestine (Figure 19, A) et le facteur de transcription Sox2 (Figure 19, B) (des marqueurs caractéristiques de cellules de type « souche »). En outre, ces cellules expriment de

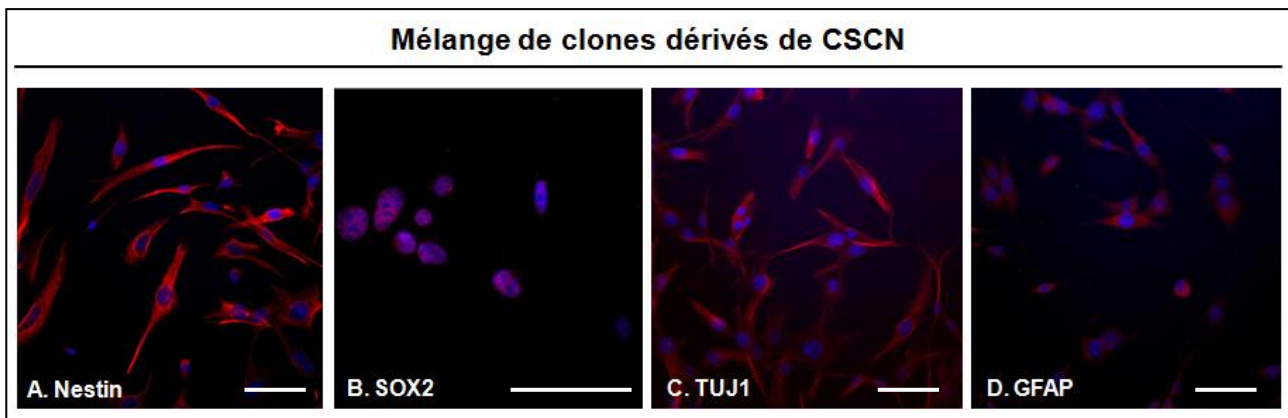


Figure 19 : Expression *in vitro* de différents marqueurs par le mélange de clones dérivés de CSCN avant la greffe. Dans les quatre panneaux, les noyaux ont été marqués de manière aspécifique à l'aide de DAPI (bleu). Les cellules expriment la nestine (A, marquage rouge) et le facteur de transcription Sox2 (B, marquage rouge nucléaire donnant un aspect violacé). Elles expriment faiblement la β III-tubuline de façon basale, mais le marquage ne correspond pas à un marquage spécifique de cellule neuronale différenciée (C, marquage rouge). Enfin, elles n'expriment très faiblement la GFAP (D, marquage rouge). (Barre d'échelle = 30 μ m)

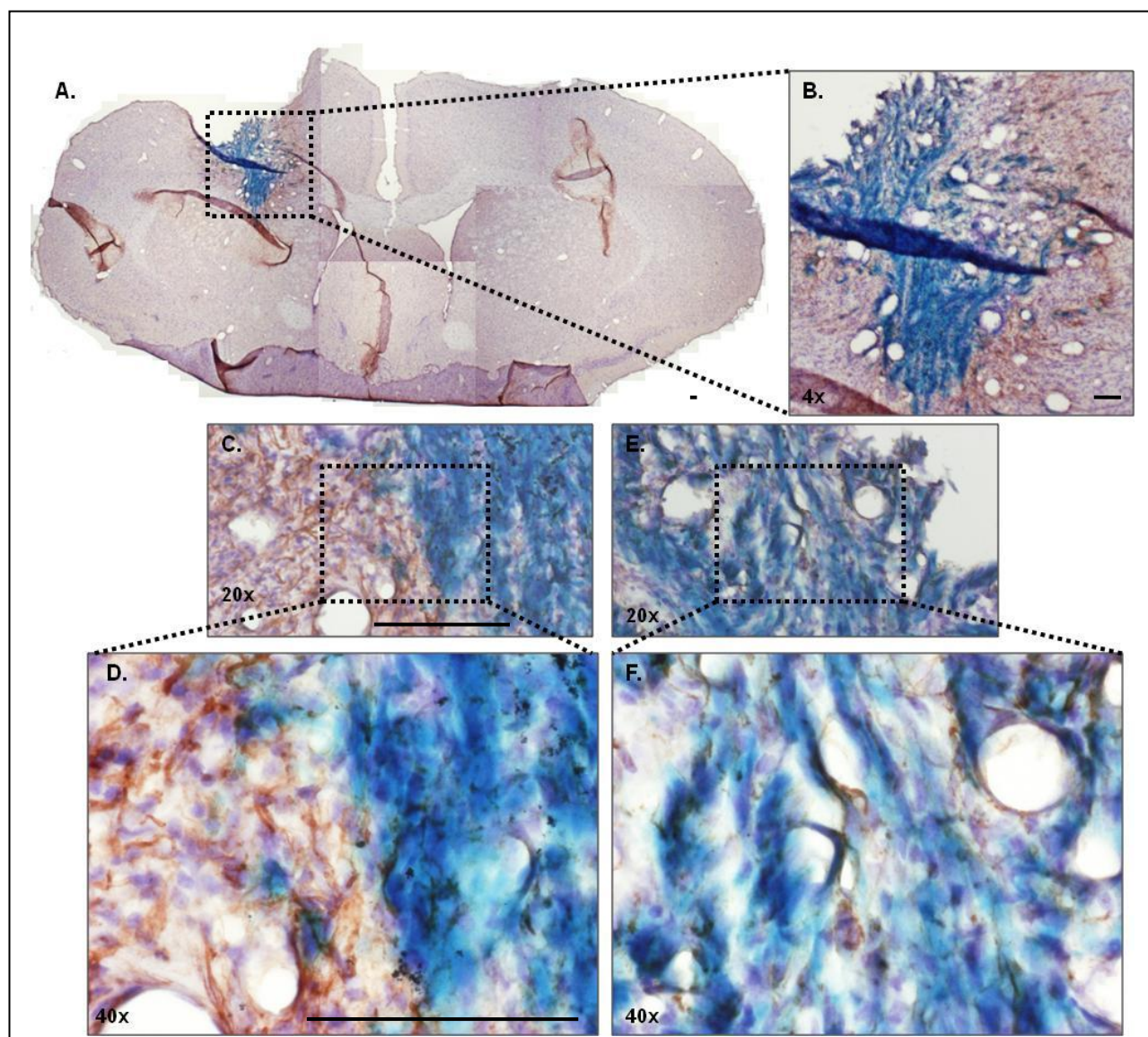


Figure 20: Mise en évidence de l'expression de nestine par les CSCN greffées. Bien que certaines cellules puissent sembler nestine-positives (E,F, marquage brun foncé), la plupart du marquage est retrouvé aux abords de la zone des cellules greffées (B, C et D). Les cellules greffées sont repérées par un marquage immunohistochimique (bleu) mettant en évidence l'activité β -galactosidase. (Barre d'échelle = 100 μ m).

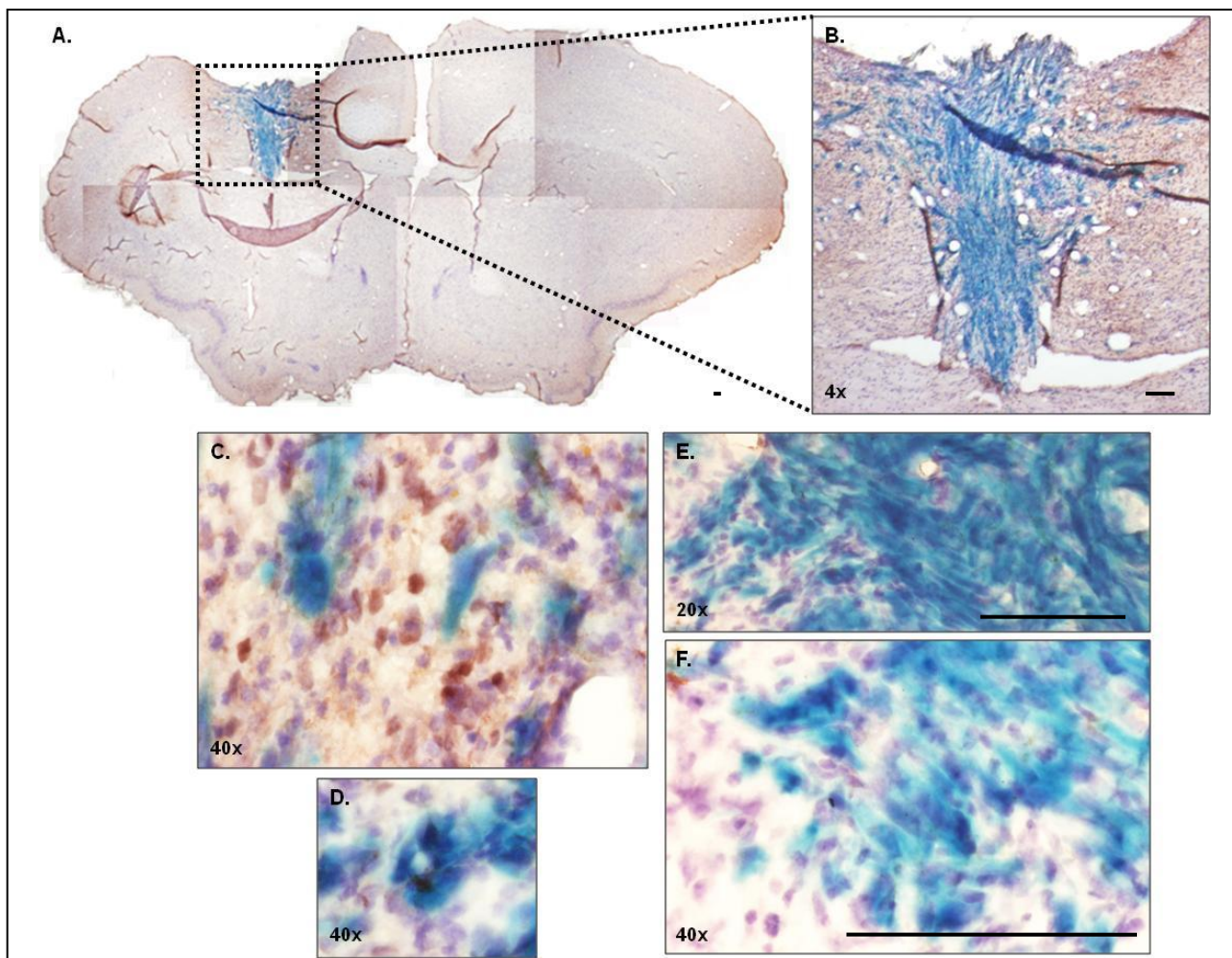


Figure 21 : Mise en évidence de l'expression de Sox2 par les CSCN greffées. Très peu de cellules expriment Sox2 de manière spécifique (D, E, F, marquage brun foncé). La plupart du marquage est retrouvé aux abords de la zone des cellules greffées (B,C). Les cellules greffées sont repérées par un marquage immunohistochimique (bleu) mettant en évidence l'activité β -galactosidase. (Barre d'échelle = 100 μ m)

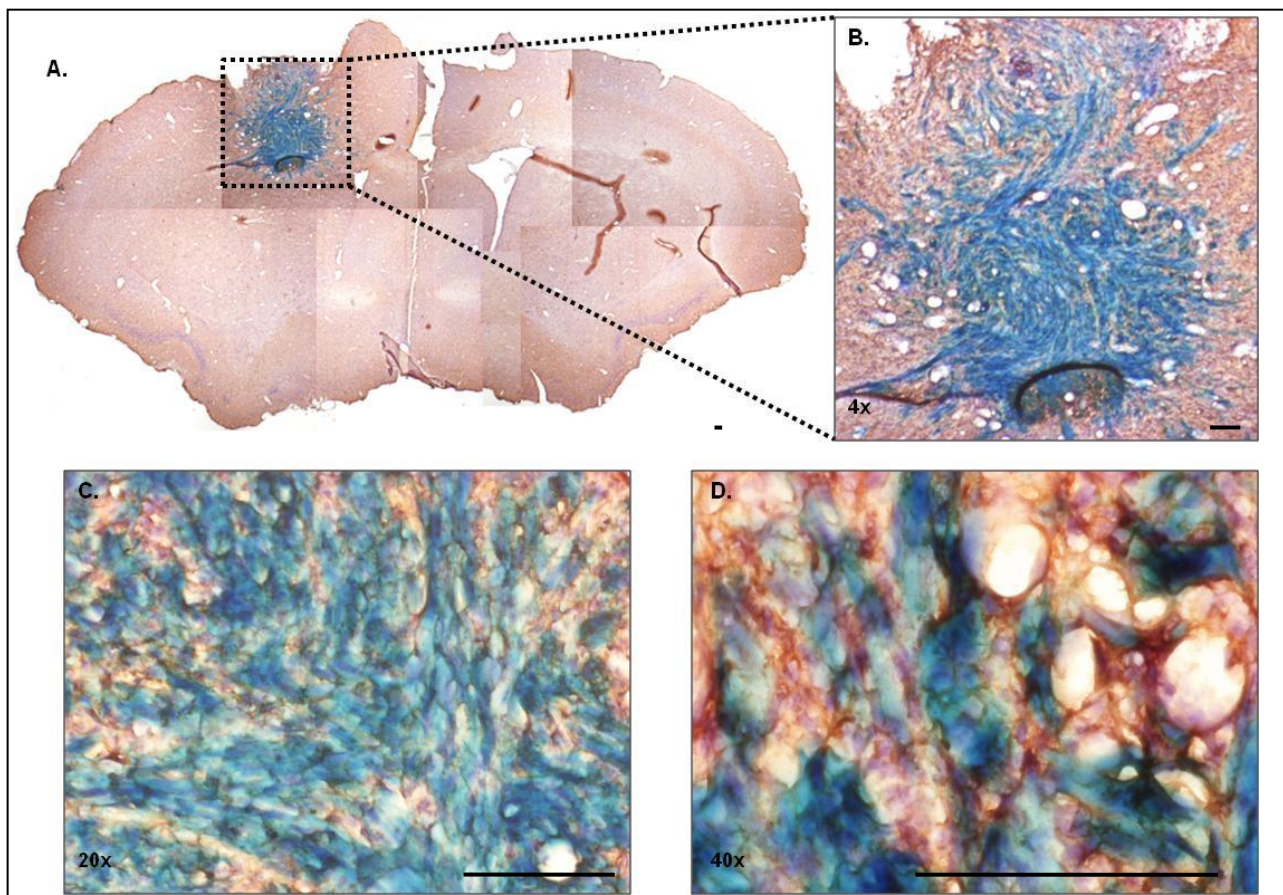


Figure 22 : Mise en évidence de l'expression de β III-tubuline par les CSCN greffées. Le marquage observé à l'aide de l'anticorps Tuj1 semble co-localiser parfois de manière évidente (D) avec le marquage mettant en évidence la β -galactosidase. (Barre d'échelle = 100 μ m)

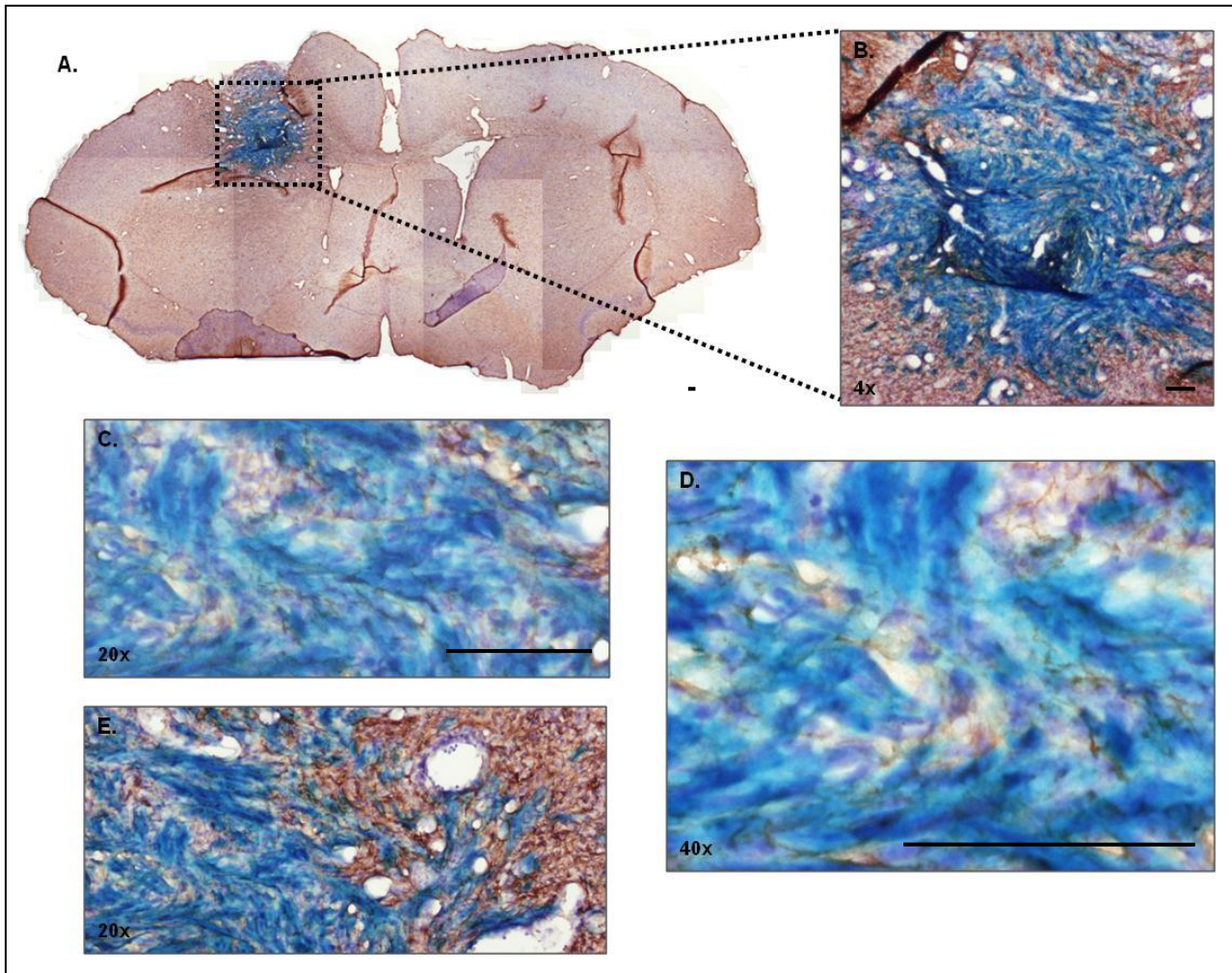


Figure 23 : Mise en évidence de l'expression de GFAP par les CSCN greffées. Les cellules CSCN greffées n'expriment pas la GFAP. En revanche, le marquage observé à l'aide des anticorps anti-GFAP est beaucoup plus intense aux abords et pourtour de la zone des cellules greffées (B et E). (Barre d'échelle = 100 μ m)

très faibles quantités de β III-tubuline (marqueur de différenciation neuronale reconnu spécifiquement par l'anticorps monoclonal Tuj1) (Figure 19, C) et de GFAP (marqueur astroglial) (Figure 19, D). Afin d'observer si les cellules ayant survécu dans le cerveau des souris 14 jours après la greffe s'engagent éventuellement vers un destin neuronal ou astroglial, les mêmes marqueurs sont mis en évidence sur les différentes sections de cerveau. Etant donné la faible résolution des images obtenues dans la zone des cellules β -galactosidase-positives, les résultats sont à interpréter avec précaution.

La plupart des cellules ne semblent plus exprimer la nestine de manière spécifique. En effet, la majorité du marquage est retrouvée aux abords directs de la zone contenant les CSCN, et peu d'entre elles semblent marquées (Figure 20). En outre, très peu de cellules β -galactosidase-positives expriment le facteur de transcription Sox2 (Figure 21). En revanche, plusieurs cellules marquées à l'aide de l'anticorps Sox2 sont à nouveau retrouvées en périphérie directe des cellules greffées.

Les marquages de la β III-tubuline et de la GFAP sont évidemment plus difficiles à apprécier, étant donné la superposition des clones de CSCN greffés avec des neurones et astrocytes matures situés dans le cerveau. Néanmoins, le marquage Tuj1 β III-tubuline suit relativement bien l'orientation des cellules β -galactosidase-positives, et une co-localisation plutôt satisfaisante est observée dans le cas de certaines cellules (Figure 22). Par contre, presque aucune cellule greffée ne semble exprimer constitutivement la GFAP. Le marquage est en effet majoritairement localisé hors de la zone d'injection des cellules (Figure 23).

Toutefois, des marquages d'une meilleure résolution sont nécessaires afin de pouvoir affirmer que les CSCN ayant survécu à la greffe voient leurs propriétés « souches » s'atrophier au profit de propriétés spécifiques à des cellules nerveuses différenciées.

2.2.3. Etude de l'influence de la greffe de CSCN sur le comportement moteur de souris traitées au MPTP.

Une analyse comportementale a été réalisée sur les individus tout au long de l'expérience (jusqu'à 28 jours post-greffe), afin d'examiner l'influence de la greffe de cellules sur les capacités motrices et sur la récupération de celles-ci après l'injection de MPTP. Cette analyse a été réalisée à plusieurs intervalles de temps, au travers de plusieurs tests moteurs comportementaux que sont le *beam* test, le *grid* test, et le *rearing* test (ce dernier a été ajouté en cours d'expérience).

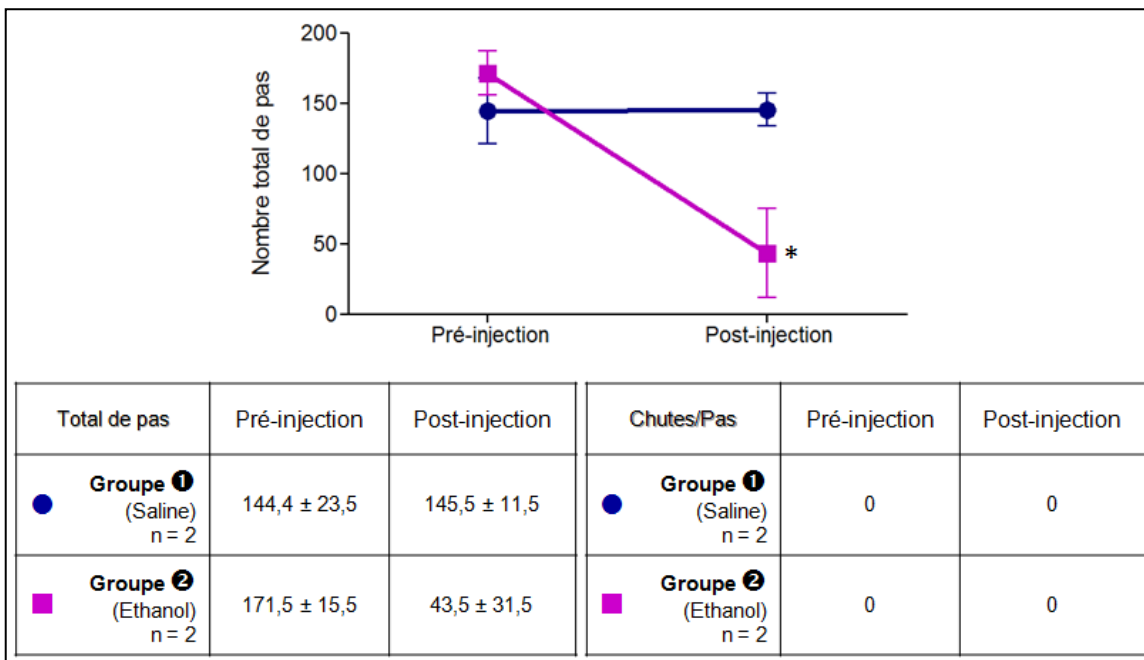


Figure 24 : Validation du *grid* test au cours d'un protocole expérimental d'injection d'éthanol. Les données sont exprimées en moyenne ± SEM. La variable MOMENT est significative ($F_{(1,2)}=40,32$; $p=0,023$), indiquant que le nombre de pas total est significativement différent avant et après l'injection. Aucun effet de GROUPE n'est observé ($F_{(1,2)}=1,63$; $p=0,329$). Il existe une interaction significative entre les variables GROUPE et MOMENT ($F_{(1,2)}=41,60$; $p=0,023$), ce qui suggère que l'effet moment est différent chez les animaux contrôles et injectés à l'éthanol. Au niveau du rapport du nombre de chutes sur le nombre total des pas, ni la variable GROUPE ($F_{(1,2)}= 1$; $p=0,422$) ni la variable MOMENT ($F_{(1,2)}= 1$; $p=0,422$) ne sont statistiquement différentes de manière significative, du fait de la diminution importante du nombre total de pas. Par ailleurs, le faible nombre d'animaux dans chaque groupe ne permet pas non d'atteindre aisément un seuil de signification sur le plan statistique.

2.2.3.1. Validation des équipements des *beam* test et *grid* test grâce à un protocole d'injection d'éthanol.

Les équipements constituant les *beam* test et *grid* test ont été mis au point pour la première fois dans notre laboratoire d'accueil au cours de notre travail. Il convenait dès lors de valider ces tests en utilisant un protocole classique d'injection d'éthanol (Crabbe et al., 2003) afin de confirmer leur déroulement correct, et d'optimiser la prise de données.

Cette validation a été réalisée sur deux groupes comparatifs (Tableau 4). Les analyses statistiques présentées dans le cadre de cette validation ne le sont qu'à titre d'information sur les méthodes qui seront ensuite utilisées pour traiter les données acquises dans le cadre du modèle MPTP.

Tableau 4 : Groupes comparatifs utilisés pour la validation du *beam* test et du *grid* test.

Injection (Variable « GROUPE »)	Saline ①	Ethanol ②
	n = 2	n = 2
Tests réalisés <i>pré-injection</i> et <i>post-injection</i> (Variable « MOMENT »).		

Afin d'évaluer l'impact du traitement à l'éthanol sur les performances motrices des souris, une analyse ANOVA par mesures répétées est réalisée, avec la variable MOMENT (pré ou post-injection) en tant que variable dépendante, et la variable GROUPE (saline ① ou éthanol ②) comme variable catégorielle.

Pour rappel, les données recensées au *grid* test et *beam* test sont le nombre total des pas effectués (respectivement sur la grille ou sur les poutres), ainsi que le nombre de chutes, normalisé par rapport au total des pas.

★ **Grid test**

Aucune variable ne montre de différence significative du rapport du nombre chutes sur le nombre total de pas (Variable GROUPE : $F_{(1,2)} = 1$; $p = 0,422$. Variable MOMENT : $F_{(1,2)} = 1$; $p = 0,422$), bien qu'une augmentation du nombre de chutes soit observée chez les souris traitées à l'éthanol. Ceci peut cependant s'expliquer par la diminution du nombre de pas total effectué par les souris après l'injection d'éthanol, ce qui réduit forcément la probabilité d'une chute (Figure 24).

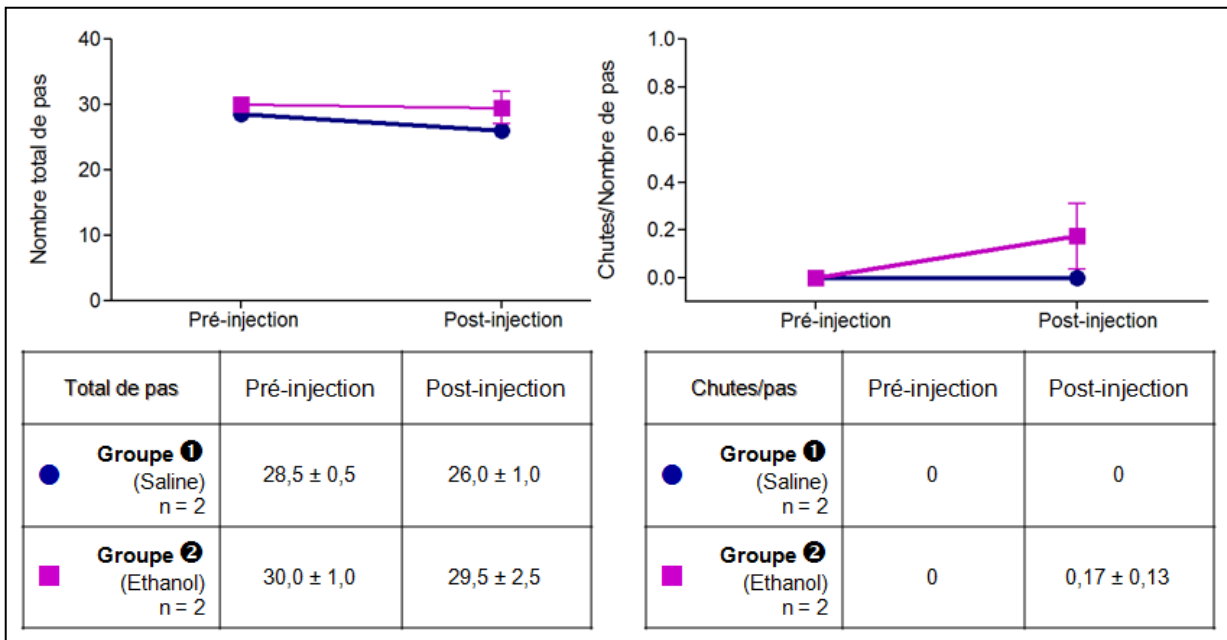


Figure 25 : Validation du *beam* test (diamètre 2,5 cm) au cours d'un protocole expérimental d'injection d'éthanol. Les données sont exprimées en moyenne ± SEM. La variable GROUPE ($F_{(1,2)} = 2$; $p=0,293$) tout comme la variable MOMENT ($F_{(1,2)} = 2$; $p=0,293$) ne sont pas différentes de manière statistiquement significative en ce qui concerne le nombre de pas effectués. La différence du rapport du nombre de chutes sur le nombre total des pas observée après injection d'éthanol chez les souris traitées n'est pas non plus statistiquement significative. Ceci est aussi valable au niveau de la variable GROUPE ($F_{(1,2)} = 1,61$; $p=0,332$) et au niveau de la variable MOMENT ($F_{(1,2)} = 1,61$; $p=0,332$).

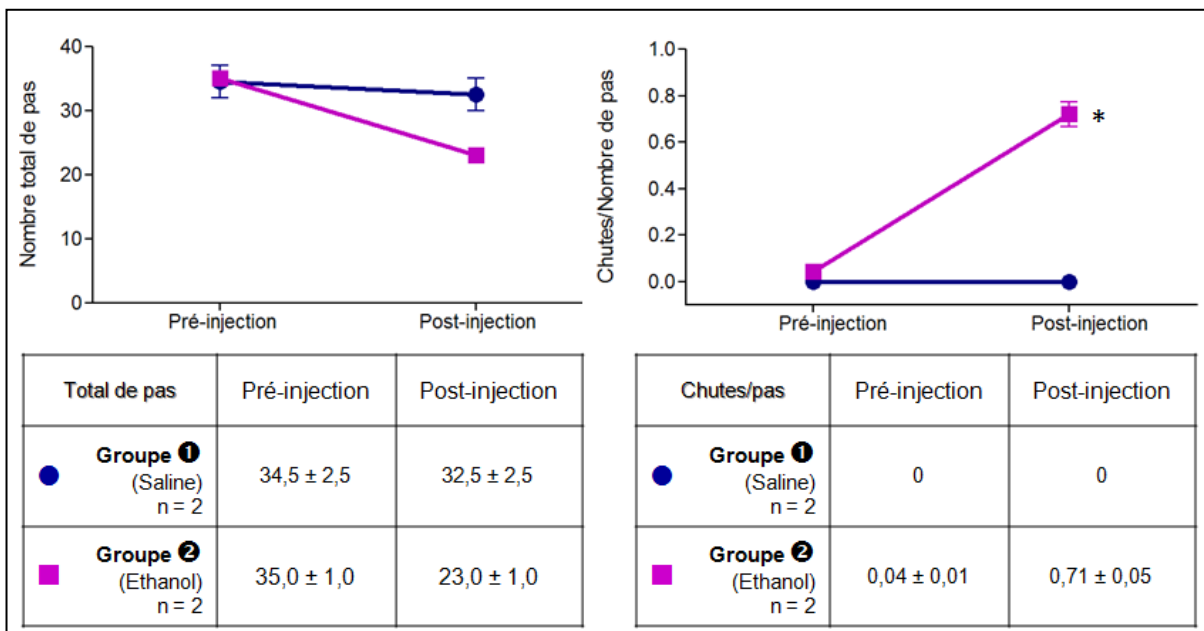


Figure 26 : Validation du *beam* test (diamètre 0,5 cm) au cours d'un protocole expérimental d'injection d'éthanol. Les données sont exprimées en moyenne ± SEM. Le nombre total des pas effectués reste relativement constant dans les deux groupes (GROUPE : $F_{(1,2)} = 1$; $p=0,422$), avant et après injection d'éthanol (MOMENT : $F_{(1,2)} = 1$; $p=0,422$). L'effet de GROUPE ($F_{(1,2)} = 132,9$; $p=0,007$) est statistiquement significatif en ce qui concerne le rapport du nombre de chutes sur le nombre total de pas, ce qui indique que celui-ci est significativement différent dans les deux groupes d'individus. De même, l'effet de MOMENT ($F_{(1,2)} = 287,2$; $p=0,003$) est important, indiquant que le rapport est significativement plus élevé après injection. Cette différence est plus conséquente chez le groupe de souris injectées à l'éthanol : en effet, on observe une interaction statistiquement significative entre les variables GROUPE et MOMENT ($F_{(1,2)} = 287,2$; $p=0,003$).

En effet, les résultats obtenus démontrent que le nombre de pas total est significativement différent avant et après l'injection (Variable MOMENT : $F_{(1,2)}=40,32$; $p=0,023$). Etant donné le faible nombre d'individus traités dans cette validation, aucun effet de groupe n'est observé (Variable GROUPE : $F_{(1,2)}=1,63$; $p=0,329$). Les résultats suggèrent néanmoins que l'effet moment est différent chez les animaux injectés à la solution saline et injectés à l'éthanol (Variable GROUPE*MOMENT : $F_{(1,2)}=41,60$; $p=0,023$).

★ **Beam test (diamètre 2,5 cm)**

Les résultats au *beam test* (2,5 cm) démontrent que la différence inter-groupes du rapport du nombre de chutes sur le nombre total de pas observée après injection d'éthanol n'est pas significative (Variable GROUPE : $F_{(1,2)}= 1,61$; $p=0,332$. Variable MOMENT ($F_{(1,2)}= 1,61$; $p=0,332$). Ceci s'explique cependant par le fait qu'un des deux animaux constituant le groupe n'a presque pas effectué de chutes, ce qui réduit la moyenne des chutes à l'intérieur du groupe injecté à l'éthanol (et se reflète par une SEM élevée) (Figure 25). En augmentant le nombre d'individus dans les groupes, l'effet devrait être plus prononcé. Au contraire du *grid test* où la souris parcourt la grille librement, les souris doivent effectuer un nombre total de pas quasi constant pour parcourir une distance d'un mètre sur la poutre (qu'elles soient traitées à l'éthanol ou non), et donc, aucune différence significative du total de pas effectués n'est donc notée (Variable GROUPE : $F_{(1,2)}= 2$; $p=0,293$. Variable MOMENT : $F_{(1,2)}= 2$; $p=0,293$).

★ **Beam test (diamètre 0,5 cm)**

Le rapport du nombre de chutes sur le nombre total de pas est significativement différent dans les deux groupes d'individus (Variable GROUPE : $F_{(1,2)}= 132,9$; $p=0,007$). Ce rapport est significativement plus élevé après injection (Variable MOMENT : $F_{(1,2)}= 287,2$; $p=0,003$). Par ailleurs, cet effet du « moment » est singulièrement plus conséquent dans le groupe de souris injectées à l'éthanol (Variables GROUPE*MOMENT : $F_{(1,2)}= 287,2$; $p=0,003$) (Figure 26).

A nouveau, le nombre total des pas effectués reste relativement constant chez les deux groupes (Variable GROUPE : $F_{(1,2)}= 1$; $p=0,422$), avant et après injection (Variable MOMENT : $F_{(1,2)}= 1$; $p=0,422$).

En définitive, nous cherchions ici à acquérir de l'expérience dans des tests comportementaux qui ont été mis au point dans le laboratoire d'accueil au cours de notre travail. Le faible nombre d'individus dans les groupes expérimentaux n'a pas permis dans

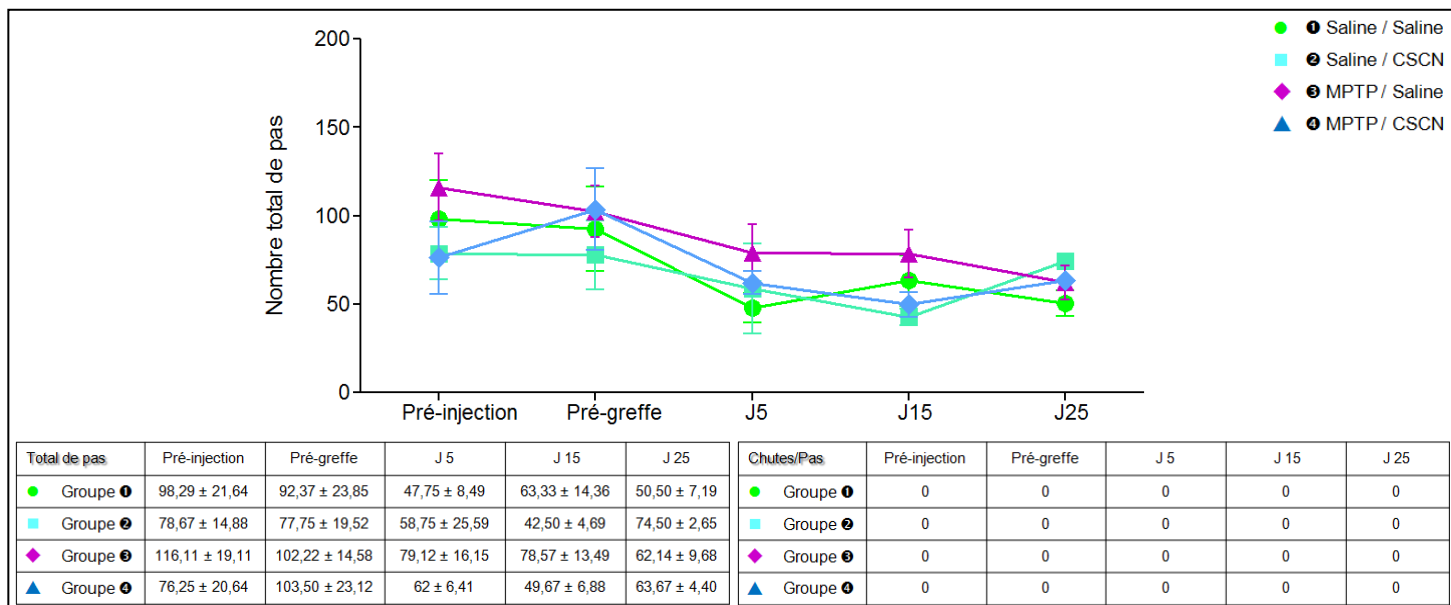


Figure 27 : Analyse de l'effet de la greffe de CSCN sur le comportement moteur évalué par *grid* test chez des souris traitées ou non par du MPTP. Les données sont exprimées en moyenne ± SEM. Les graphes représentent les données enregistrées pour les groupe 1 (injection saline-greffe saline) (A), groupe 2 (injection saline-greffe CSCN) (B), groupe 3 (injection MPTP-greffe saline) (C), et groupe 4 (injection MPTP-greffe CSCN) (D). Aucune chute n'est recensée. Ni la variable GROUPE ($F_{(1,21)} = 0,75 ; p=0,394$) ni la variable CELLULES ($F_{(4,84)} = 0,68 ; p=0,418$) ne sont différentes de manière statistiquement significative. Bien que la variable MOMENT soit différente de manière statistiquement significative ($F_{(4,84)} = 5,93 ; p=0,0003$), les différences induites par cette variable sont aléatoires. Notons, cependant une tendance à la diminution du nombre total de pas dans chacun des groupes (E).

Discussion et perspectives

V. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'ensemble des observations décrivant les possibilités de différenciation nerveuse des cellules souches mésenchymateuses (CSM) issues de la moelle osseuse suscitent de nombreux espoirs en termes de thérapie cellulaire, en particulier dans le contexte des maladies neurodégénératives. Néanmoins, avant la mise au point d'un protocole de thérapie cellulaire, une meilleure caractérisation des CSM est essentielle afin d'isoler spécifiquement les cellules potentiellement exploitables. En effet, les cellules du stroma médullaire regroupées sous le terme de CSM constituent en réalité une population hétérogène, dans laquelle les cellules sont à divers stades de différenciation, et dérivent de lignées embryonnaires différentes (Nagoshi et al., 2008; Takashima et al., 2007). Le fait que seules les CSM nestine-positives soient capables d'adopter un phénotype neuronal a fait naître l'hypothèse que celles-ci pourraient en réalité être dérivées de la crête neurale, et pourraient, dès lors, présenter des propriétés intéressantes par rapport aux autres cellules stromales de la moelle osseuse de par leur origine neuroectodermique.

Dans ce contexte, le premier objectif de notre travail a été de comparer des populations clonales de type CSM et de type CSCN, afin de permettre une caractérisation plus fine de ces cellules et, à terme, de mettre sur pied une méthode de sélection optimale de ces populations (CSM et CSCN) à partir d'une population initiale de cellules stromales de la moelle osseuse. Dans cet objectif, une analyse transcriptomique a été réalisée, et a permis d'établir une liste de gènes candidats permettant la discrimination des deux types cellulaires. Après une mise en évidence par RT-PCR, les marqueurs permettant d'envisager une ségrégation correcte des deux populations ont ensuite été testés au niveau immunocytologique. Cette mise en évidence des protéines sélectionnées s'est heurtée à certaines contraintes, telles que l'indisponibilité des anticorps ou l'incompatibilité de ceux-ci avec les techniques d'immunocytochimie ou de FACS. Seul l'anticorps NrCAM a fourni un marquage satisfaisant en immunocytofluorescence, mais le marquage fluorescent observé en cytométrie de flux n'était pas optimal. En effet, aucune différence entre notre condition contrôle (marquage sans anticorps primaire) et le marquage sélectif n'a pu être observée, ce qui suggère une absence de spécificité du marquage. Néanmoins, cet anticorps n'était effectivement pas conçu pour un marquage *in vivo* dans le cadre d'un protocole de FACS. Ceci peut être expliqué par le fait que la conformation des épitopes peut être légèrement différente dans le cas de cellules

vivantes par rapport à des cellules fixées. Par ailleurs, plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour expliquer le marquage relativement intense (mais non spécifique) observé lors des expériences de FACS. Premièrement, cet anticorps n'était pas directement couplé à un fluorochrome, et un marquage par anticorps secondaire a donc dû être réalisé. Or, un marquage « indirect » entraîne toujours une diminution de la spécificité du signal. La seconde explication réside dans la faible survie cellulaire des clones de CSM lors de l'expérience (38,8% de cellules vivantes) : les cellules en souffrance pourraient induire un accroissement du marquage aspécifique, ce qui justifierait le pourcentage relativement élevé de cellules marquées. Toutefois, la survie cellulaire des clones de CSCN (77% de cellules vivantes) est pour sa part tout à fait satisfaisant. Par conséquent, la faible proportion de cellules de type CSCN positives pour NrCAM résulte probablement de l'absence de reconnaissance de l'épitope. Actuellement, la sélection de nouveaux marqueurs potentiels est poursuivie.

La seconde partie de ce mémoire est consacrée à l'étude de la plasticité *in vivo* des cellules de type CSCN, via un protocole de greffe cellulaire dans un modèle de souris MPTP, présentant des lésions caractéristiques de la maladie de Parkinson. La validation de ce modèle est basée sur un comptage cellulaire, et fournit des résultats similaires au protocole expérimental initialement suivi (Jackson-Lewis et al., 1995), soit une diminution de plus de 60% du nombre de neurones dopaminergiques présents dans la substance noire. Une fois validé, ce modèle expérimental constituait un outil adéquat pour un protocole de thérapie cellulaire. Les premières observations recueillies suite à la greffe d'un mélange de clones de CSCN ont révélé un faible taux de survie cellulaire après 14 jours. Ce résultat devra néanmoins être confirmé par un comptage strict du nombre de cellules survivantes identifiées sur base d'un marquage fluorescent. En effet, ce type de marquage nous permettra de mieux discriminer les cellules greffées. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer la faible survie cellulaire des CSCN (à 14 jours post-greffe). Premièrement, il est nécessaire de rappeler que les CSCN ne sont pas isolées à partir de la moelle osseuse de l'animal dans lequel elles sont greffées. Ainsi, malgré que le fond génétique des souris soit identique, cette greffe isogénique garde un caractère « allogénique ». D'autre part, les différentes études réalisées jusqu'à présent, décrivant une greffe de cellules stromales de la moelle osseuse dans des modèles de maladie neurodégénératives (ou autres pathologies) démontrent en général un effet « *touch and go* » (Uccelli et al., 2008) de ces cellules. Cela signifie que l'effet positif des cellules greffées sur leur environnement existe, ceci sans que les cellules injectées ne se différencient

et remplacent les cellules initialement perdues. Il est néanmoins indispensable de souligner que les cellules greffées dans le cadre de ces études sont généralement des cellules stromales médullaires cultivées depuis peu, ne contenant par conséquent qu'une minorité de cellules dérivées de la crête neurale (en effet, le nombre de CSCN présentes dans une culture de cellules stromales de moelle osseuse est augmenté au fur et à mesure des passages).

D'autre part, malgré leur disparition après 3 à 15 jours, il a été démontré que des CSM greffées exerçaient un effet positif sur des lésions striatales notamment, en stimulant la prolifération des cellules souches nerveuses endogènes de la zone sous-ventriculaire (Bantubungi et al., 2008; Snyder et al., 2010). Dès lors, il pourrait être envisagé de réaliser prochainement une quantification de la prolifération des cellules souches neurales de l'hôte par injection et mise en évidence de BrdU après greffe de CSCN, ou non.

Par ailleurs, la seule étude décrivant actuellement l'utilisation de CSCN (isolées à partir de follicules pileux) dans un cadre thérapeutique a été réalisée à l'aide d'un modèle de lésion médullaire chez le rat (Sieber-Blum et al., 2006). Dans cette expérience, les CSCN greffées au voisinage de la lésion survivaient et établissaient des connexions avec les neurites de l'hôte, mais ne proliféraient pas ni n'entamaient de migration. Par contre, certaines de ces CSCN exprimaient des marqueurs caractéristiques de cellules engagés dans un processus de différenciation neuronale, tels que la β III-tubuline par exemple.

Dans le cadre de nos travaux, nous avons pu identifier des cellules greffées présentant un marquage de la β III-tubuline, attestant de la capacité de certaines CSCN à se différencier. Ces résultats permettent dès lors de penser que nous nous situons sans doute au-delà d'un cas de figure « *touch and go* », puisque nous avons observé une réelle capacité de différenciation de certaines cellules. Cependant les conditions de marquage actuelles (marquage visible) n'ont pas permis une quantification rigoureuse du nombre de cellules présentant les différents marqueurs précédemment cités. A nouveau, une optimisation des protocoles d'immunofluorescence apparaît indispensable pour une quantification exacte des cellules ayant survécu et entamé une différenciation.

La présence de cellules GFAP, Sox2 et nestine-positives aux abords directs de la zone de cellules greffées illustre une réaction cellulaire locale, impliquant éventuellement une prolifération de cellules progénitrices. Ce phénomène pourrait résulter d'une réaction inflammatoire : en effet, l'effet antiphlogistique important des CSM a été formellement décrit (Iyer and Rojas, 2008 ; Nauta et al., 2006). Néanmoins, aucune donnée n'existe à ce sujet à

propos des CSCN. Cette inflammation hypothétique pourrait avoir plusieurs origines : le traitement au MPTP lui-même, dont l'effet sur la prolifération microgliale a déjà été montrée dans de nombreux travaux (Chen et al., 2002; Miller et al., 2011) ou encore le traumatisme causé par l'aiguille lors de la greffe. Ces constatations devront être confirmées via la mise en évidence de marqueurs inflammatoires (tels que Iba1, CD11b, ou les protéines du CMH de type II), après une comparaison avec les coupes de cerveaux des souris ayant été greffées avec une solution saline, ou n'ayant pas subi de traitement MPTP.

L'impact de la greffe de CSCN a ensuite été évalué au point de vue des performances motrices des souris. En effet, le MPTP provoque chez les animaux une perte de coordination motrice, pouvant être évaluée par divers tests comportementaux (Rotarod, *open field*, *grid*, *beam*, *rearing*, etc). Pour des raisons de disponibilité des équipements, seuls les *grid* test, *rearing* test, et *beam* test ont été envisagés dans le cadre de cette étude. Quatre groupes comparatifs ont été analysés afin de déterminer l'effet des CSCN greffées sur la récupération motrices des souris traitées : 1) Saline/Saline ; 2) Saline/CSCN ; 3) MPTP/Saline ; et 4) MPTP/CSCN.

Le *grid* test tel qu'utilisé dans notre expérience n'a pas permis la mise en évidence de déficit moteur provoqué par le MPTP, étant donné qu'aucune chute n'a pu être observée. De plus, les souris ont effectué moins de pas sur la grille au fur et à mesure des enregistrements, ce qui est sans doute dû à une habitude au test (avec une diminution du comportement exploratoire du rongeur). De tels résultats concordent avec certaines études réalisées également sur des modèles MPTP (Meredith and Kang, 2006). Cependant, certaines adaptations peuvent être envisagées telles que décrites par Kim et ses collaborateurs, où la grille pourrait être placée de façon verticale ou horizontale inversée, rendant ainsi l'exercice plus difficile et les différences de performance plus perceptibles ((Kim et al., 2010).

Le *beam* test a initialement été décrit par Carter et ses collaborateurs (Carter et al., 1999). Dans le cadre des modèles MPTP, de nombreuses variantes existent en termes de diamètre de poutre, allant de 0,5 à 3 cm. Dans le cadre de cette étude, nous avons effectué les enregistrements sur des poutres de diamètre de 0,5 et 2,5 cm. Il est très vite apparu que la poutre mesurant 2,5 cm de diamètre ne permettait visiblement pas de distinguer les souris MPTP des souris contrôle. En effet, toutes traversaient la poutre avec aisance et rapidité. Au contraire, la poutre mesurant 0,5 cm de diamètre était sans doute trop étroite, et entraînait des chutes même au sein des groupes contrôles. L'utilisation d'une poutre de diamètre intermédiaire pourrait nous permettre de mieux distinguer l'effet des CSCN sur le modèle

MPTP. D'autre part, il faut également prendre en considération que les groupes contrôles ont également subi une injection intrastriatale, entraînant une lésion de l'aire motrice M1. Afin de déterminer si cette lésion serait responsable de l'augmentation du nombre de chutes dans le groupe de souris contrôles, il semblerait que l'utilisation d'un groupe contrôle supplémentaire (sans injection stéréotaxique) soit nécessaire. D'autre part, afin d'éviter un traumatisme cérébral lié à l'injection intrastriatale des cellules, une solution alternative au mode de greffe des CSCN pourrait également être envisagée. En effet, il a été démontré que les CSM étaient capables de passer la barrière hémato-encéphalique (Gogel et al., 2011). Il serait par conséquent intéressant de tester la capacité des CSCN à migrer dans le striatum après injection de ces dernières dans la circulation sanguine.

Enfin, le *rearing* test a permis de mettre en évidence de manière significative la perte de coordination motrice induite par le MPTP. Cependant, de façon assez surprenante, la greffe de CSCN diminue davantage la capacité des souris à effectuer des *rearings* en comparaison aux souris MPTP greffées avec la solution saline. A l'heure actuelle, il est encore prématuré de donner d'éventuelles explications quant à l'effet observé. Cependant, il serait intéressant de déterminer si les CSM, greffées dans les mêmes conditions, donneraient les mêmes performances paradoxales au *rearing* test. Si oui, il serait alors indispensable de réexaminer les conditions de greffe. Si au contraire, les résultats sont opposés, alors il serait intéressant d'analyser les facteurs libérés par les CSCN en comparaison aux CSM, ce qui pourrait permettre d'expliquer un effet toxique sur l'environnement de la greffe.

En conclusion, l'analyse des résultats obtenus pour l'ensemble des tests comportementaux nous impose de nombreuses adaptations afin d'évaluer au mieux les effets des cellules greffées sur les performances motrices des souris. D'autres tests, tels que le Rotarod ou l'*open field* devront également être envisagés. Sur le plan technique, une adaptation des protocoles est nécessaire afin de permettre un marquage fluorescent, ce qui autorisera notamment des co-marquages et une quantification précise. Enfin, nous suggérons d'entamer une comparaison des performances motrices après greffe de CSCN (mélange de clones) avec les performances faisant suite à l'injection de CSM (mélange de clones). En effet, l'effet des CSM est plus clairement démontré dans la littérature, et une amélioration comportementale est en général observée (Levy et al., 2008). Cette comparaison permettra d'évaluer l'utilité des CSCN par rapport aux CSM dans le cadre d'une lésion neurodégénérative, et ainsi, de savoir si ces CSCN constitueraient un outil adéquat de thérapie cellulaire.

Références bibliographiques

VI. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Alvarez-Dolado, M., Pardal, R., Garcia-Verdugo, J.M., Fike, J.R., Lee, H.O., Pfeffer, K., Lois, C., Morrison, S.J., and Alvarez-Buylla, A. (2003). Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* *425*, 968-973.
- Bantubungi, K., Blum, D., Cuvelier, L., Wislet-Gendebien, S., Rogister, B., Brouillet, E., and Schiffmann, S.N. (2008). Stem cell factor and mesenchymal and neural stem cell transplantation in a rat model of Huntington's disease. *Mol Cell Neurosci* *37*, 454-470.
- Beattie, G.M., Otonkoski, T., Lopez, A.D., and Hayek, A. (1997). Functional beta-cell mass after transplantation of human fetal pancreatic cells: differentiation or proliferation? *Diabetes* *46*, 244-248.
- Bianco, P., Riminucci, M., Gronthos, S., and Robey, P.G. (2001). Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* *19*, 180-192.
- Brazelton, T.R., Rossi, F.M., Keshet, G.I., and Blau, H.M. (2000). From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* *290*, 1775-1779.
- Caplan, A.I., and Correa, D. (2011). The MSC: An Injury Drugstore. *Cell Stem Cell* *9*, 11-15.
- Carter, R.J., Lione, L.A., Humby, T., Mangiarini, L., Mahal, A., Bates, G.P., Dunnett, S.B., and Morton, A.J. (1999). Characterization of progressive motor deficits in mice transgenic for the human Huntington's disease mutation. *J Neurosci* *19*, 3248-3257.
- Chaudhuri, K.R., Healy, D.G., and Schapira, A.H. (2006). Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *Lancet Neurol* *5*, 235-245.
- Chen, L.W., Wei, L.C., Qiu, Y., Liu, H.L., Rao, Z.R., Ju, G., and Chan, Y.S. (2002). Significant up-regulation of nestin protein in the neostriatum of MPTP-treated mice. Are the striatal astrocytes regionally activated after systemic MPTP administration? *Brain Res* *925*, 9-17.
- Copelan, E.A. (2006). Hematopoietic stem-cell transplantation. *N Engl J Med* *354*, 1813-1826.
- de Lau, L.M., and Breteler, M.M. (2006). Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* *5*, 525-535.
- Drukker, M., Katz, G., Urbach, A., Schuldiner, M., Markel, G., Itskovitz-Eldor, J., Reubinoff, B., Mandelboim, O., and Benvenisty, N. (2002). Characterization of the expression of MHC proteins in human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 9864-9869.
- Dupin, E., Calloni, G.W., and Le Douarin, N.M. (2010). The cephalic neural crest of amniote vertebrates is composed of a large majority of precursors endowed with neural, melanocytic, chondrogenic and osteogenic potentialities. *Cell Cycle* *9*, 238-249.
- Emborg, M.E. (2004). Evaluation of animal models of Parkinson's disease for neuroprotective strategies. *J Neurosci Methods* *139*, 121-143.
- Fearnley, J.M., and Lees, A.J. (1991). Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain* *114* (Pt 5), 2283-2301.
- Friedenstein, A.J., Chailakhyan, R.K., Latsinik, N.V., Panasyuk, A.F., and Keiliss-Borok, I.V. (1974). Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation* *17*, 331-340.
- Gogel, S., Gubernator, M., and Minger, S.L. (2011). Progress and prospects: stem cells and neurological diseases. *Gene Ther* *18*, 1-6.
- Hall, P.A., and Watt, F.M. (1989). Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. *Development* *106*, 619-633.
- Hirsch, E.C., Hoglinger, G., Rousselet, E., Breidert, T., Parain, K., Feger, J., Ruberg, M., Prigent, A., Cohen-Salmon, C., and Launay, J.M. (2003). Animal models of Parkinson's disease in rodents induced by toxins: an update. *J Neural Transm Suppl*, 89-100.
- Hornykiewicz, O. (1998). Biochemical aspects of Parkinson's disease. *Neurology* *51*, S2-9.

- Horwitz, E.M., Le Blanc, K., Dominici, M., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Deans, R.J., Krause, D.S., and Keating, A. (2005). Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 7, 393-395.
- Iyer, S.S., and Rojas, M. (2008). Anti-inflammatory effects of mesenchymal stem cells: novel concept for future therapies. *Expert Opin Biol Ther* 8, 569-581.
- Jackson-Lewis, V., Jakowec, M., Burke, R.E., and Przedborski, S. (1995). Time course and morphology of dopaminergic neuronal death caused by the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Neurodegeneration* 4, 257-269.
- Jellinger, K.A. (1991). Pathology of Parkinson's disease. Changes other than the nigrostriatal pathway. *Mol Chem Neuropathol* 14, 153-197.
- Jiang, X., Rowitch, D.H., Soriano, P., McMahon, A.P., and Sucov, H.M. (2000). Fate of the mammalian cardiac neural crest. *Development* 127, 1607-1616.
- Kim, J., Lo, L., Dormand, E., and Anderson, D.J. (2003). SOX10 maintains multipotency and inhibits neuronal differentiation of neural crest stem cells. *Neuron* 38, 17-31.
- Kim, S.T., Son, H.J., Choi, J.H., Ji, I.J., and Hwang, O. (2010). Vertical grid test and modified horizontal grid test are sensitive methods for evaluating motor dysfunctions in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Brain Res* 1306, 176-183.
- Kleber, M., Lee, H.Y., Wurdak, H., Buchstaller, J., Riccomagno, M.M., Ittner, L.M., Suter, U., Epstein, D.J., and Sommer, L. (2005). Neural crest stem cell maintenance by combinatorial Wnt and BMP signaling. *J Cell Biol* 169, 309-320.
- Kruger, G.M., Mosher, J.T., Bixby, S., Joseph, N., Iwashita, T., and Morrison, S.J. (2002). Neural crest stem cells persist in the adult gut but undergo changes in self-renewal, neuronal subtype potential, and factor responsiveness. *Neuron* 35, 657-669.
- Lane, E.L., Handley, O.J., Rosser, A.E., and Dunnett, S.B. (2008). Potential cellular and regenerative approaches for the treatment of Parkinson's disease. *Neuropsychiatr Dis Treat* 4, 835-845.
- Langston, J.W., Ballard, P., Tetrud, J.W., and Irwin, I. (1983). Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 219, 979-980.
- Le Douarin N.M., Kalcheim C., *The Neural Crest*, edition 2, Cambridge University Press, Cambridge 1999, 445
- Lee, H.Y., Kleber, M., Hari, L., Brault, V., Suter, U., Taketo, M.M., Kemler, R., and Sommer, L. (2004). Instructive role of Wnt/beta-catenin in sensory fate specification in neural crest stem cells. *Science* 303, 1020-1023.
- Levy, Y.S., Bahat-Stroomza, M., Barzilay, R., Burshtein, A., Bulvik, S., Barhum, Y., Panet, H., Melamed, E., and Offen, D. (2008). Regenerative effect of neural-induced human mesenchymal stromal cells in rat models of Parkinson's disease. *Cytotherapy* 10, 340-352.
- Liang, J., Zhang, H., Hua, B., Wang, H., Wang, J., Han, Z., and Sun, L. (2009). Allogeneic mesenchymal stem cells transplantation in treatment of multiple sclerosis. *Mult Scler* 15, 644-646.
- Liem, K.F., Jr., Jessell, T.M., and Briscoe, J. (2000). Regulation of the neural patterning activity of sonic hedgehog by secreted BMP inhibitors expressed by notochord and somites. *Development* 127, 4855-4866.
- Lindvall, O., and Bjorklund, A. (2004). Cell therapy in Parkinson's disease. *NeuroRx* 1, 382-393.
- Lindvall, O., Brundin, P., Widner, H., Rehnström, S., Gustavii, B., Frackowiak, R., Leenders, K.L., Sawle, G., Rothwell, J.C., Marsden, C.D., *et al.* (1990). Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease. *Science* 247, 574-577.
- Lui, K.O., Fairchild, P.J., and Waldmann, H. (2008). Prospects for ensuring acceptance of ES cell-derived tissues.
- Meredith, G.E., and Kang, U.J. (2006). Behavioral models of Parkinson's disease in rodents: a new look at an old problem. *Mov Disord* 21, 1595-1606.
- Miller, J.A., Trout, B.R., Sullivan, K.A., Bialecki, R.A., Roberts, R.A., and Tjalkens, R.B. (2011). Low-dose 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine causes inflammatory activation of astrocytes in nuclear factor-kappaB reporter mice prior to loss of dopaminergic neurons. *J Neurosci Res* 89, 406-417.

- Morley, J.F., and Duda, J.E. (2010). Olfaction as a biomarker in Parkinson's disease. *Biomark Med* 4, 661-670.
- Morrison, S.J., Perez, S.E., Qiao, Z., Verdi, J.M., Hicks, C., Weinmaster, G., and Anderson, D.J. (2000). Transient Notch activation initiates an irreversible switch from neurogenesis to gliogenesis by neural crest stem cells. *Cell* 101, 499-510.
- Nagoshi, N., Shibata, S., Kubota, Y., Nakamura, M., Nagai, Y., Satoh, E., Morikawa, S., Okada, Y., Mabuchi, Y., Katoh, H., *et al.* (2008). Ontogeny and multipotency of neural crest-derived stem cells in mouse bone marrow, dorsal root ganglia, and whisker pad. *Cell Stem Cell* 2, 392-403.
- Nauta, A.J., Kruisselbrink, A.B., Lurvink, E., Willemze, R., and Fibbe, W.E. (2006). Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 177, 2080-2087.
- Netter F.H. Atlas of human anatomy, Elsevier Sanders, Philadelphie, 2006, 503.
- Nussbaum, R.L., and Ellis, C.E. (2003). Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *N Engl J Med* 348, 1356-1364.
- O'Donoghue, K., and Fisk, N.M. (2004). Fetal stem cells. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 18, 853-875.
- Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448, 313-317.
- Padovan, C.S., Jahn, K., Birnbaum, T., Reich, P., Sostak, P., Strupp, M., and Straube, A. (2003). Expression of neuronal markers in differentiated marrow stromal cells and CD133+ stem-like cells. *Cell Transplant* 12, 839-848.
- Pera, M.F., Reubinoff, B., and Trounson, A. (2000). Human embryonic stem cells. *J Cell Sci* 113 (Pt 1), 5-10.
- Phani, S., Gonye, G., and Iacovitti, L. (2010). VTA neurons show a potentially protective transcriptional response to MPTP. *Brain Res* 1343, 1-13.
- Przedborski, S., and Jackson-Lewis, V. (1998). Mechanisms of MPTP toxicity. *Mov Disord* 13 Suppl 1, 35-38.
- Przedborski, S., Jackson-Lewis, V., Djaldetti, R., Liberatore, G., Vila, M., Vukosavic, S., and Almer, G. (2000). The parkinsonian toxin MPTP: action and mechanism. *Restor Neurol Neurosci* 16, 135-142.
- Przedborski, S., and Vila, M. (2003). The 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model: a tool to explore the pathogenesis of Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 991, 189-198.
- Rennick, D., Yang, G., Gemmell, L., and Lee, F. (1987). Control of hemopoiesis by a bone marrow stromal cell clone: lipopolysaccharide- and interleukin-1-inducible production of colony-stimulating factors. *Blood* 69, 682-691.
- Rice, C.M., and Scolding, N.J. (2008). Autologous bone marrow stem cells--properties and advantages. *J Neurol Sci* 265, 59-62.
- Riordan, N.H., Ichim, T.E., Min, W.P., Wang, H., Solano, F., Lara, F., Alfaro, M., Rodriguez, J.P., Harman, R.J., Patel, A.N., *et al.* (2009). Non-expanded adipose stromal vascular fraction cell therapy for multiple sclerosis. *J Transl Med* 7, 29.
- Sadan, O., Melamed, E., and Offen, D. (2009). Bone-marrow-derived mesenchymal stem cell therapy for neurodegenerative diseases. *Expert Opin Biol Ther* 9, 1487-1497.
- Sanchez-Ramos, J., Song, S., Cardozo-Pelaez, F., Hazzi, C., Stedeford, T., Willing, A., Freeman, T.B., Saporta, S., Janssen, W., Patel, N., *et al.* (2000). Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol* 164, 247-256.
- Sanchez-Ramos, J.R. (2002). Neural cells derived from adult bone marrow and umbilical cord blood. *J Neurosci Res* 69, 880-893.
- Sanes D.H., Rey T.A., Harris W.A., Development of the Nervous System, Academic Press, San Diego, 2000, 500.
- Schober, A. (2004). Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res* 318, 215-224.
- Shah, N.M., Groves, A.K., and Anderson, D.J. (1996). Alternative neural crest cell fates are instructively promoted by TGFbeta superfamily members. *Cell* 85, 331-343.

- Shah, N.M., Marchionni, M.A., Isaacs, I., Stroobant, P., and Anderson, D.J. (1994). Glial growth factor restricts mammalian neural crest stem cells to a glial fate. *Cell* 77, 349-360.
- Sieber-Blum, M., Schnell, L., Grim, M., Hu, Y.F., Schneider, R., and Schwab, M.E. (2006). Characterization of epidermal neural crest stem cell (EPI-NCSC) grafts in the lesioned spinal cord. *Mol Cell Neurosci* 32, 67-81.
- Snyder, B.R., Chiu, A.M., Prockop, D.J., and Chan, A.W. (2010). Human multipotent stromal cells (MSCs) increase neurogenesis and decrease atrophy of the striatum in a transgenic mouse model for Huntington's disease. *PLoS One* 5, e9347.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676.
- Takashima, Y., Era, T., Nakao, K., Kondo, S., Kasuga, M., Smith, A.G., and Nishikawa, S. (2007). Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation. *Cell* 129, 1377-1388.
- Tatton, W.G., Chalmers-Redman, R., Brown, D., and Tatton, N. (2003). Apoptosis in Parkinson's disease: signals for neuronal degradation. *Ann Neurol* 53 Suppl 3, S61-70; discussion S70-62.
- Terzioglu, M., and Galter, D. (2008). Parkinson's disease: genetic versus toxin-induced rodent models. *FEBS J* 275, 1384-1391.
- Tomita, Y., Matsumura, K., Wakamatsu, Y., Matsuzaki, Y., Shibuya, I., Kawaguchi, H., Ieda, M., Kanakubo, S., Shimazaki, T., Ogawa, S., *et al.* (2005). Cardiac neural crest cells contribute to the dormant multipotent stem cell in the mammalian heart. *J Cell Biol* 170, 1135-1146.
- Uccelli, A., Moretta, L., and Pistoia, V. (2008). Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* 8, 726-736.
- Villanueva, S., Glavic, A., Ruiz, P., and Mayor, R. (2002). Posteriorization by FGF, Wnt, and retinoic acid is required for neural crest induction. *Dev Biol* 241, 289-301.
- Wakeman, D.R., Dodiya, H.B., and Kordower, J.H. (2011). Cell transplantation and gene therapy in Parkinson's disease. *Mt Sinai J Med* 78, 126-158.
- Wautier, F., Wislet-Gendebien, S., Chanas, G., Rogister, B., and Leprince, P. (2007). Regulation of nestin expression by thrombin and cell density in cultures of bone mesenchymal stem cells and radial glial cells. *BMC Neurosci* 8, 104.
- Widner, H., Tetrud, J., Rehncrona, S., Snow, B., Brundin, P., Gustavii, B., Bjorklund, A., Lindvall, O., and Langston, J.W. (1992). Bilateral fetal mesencephalic grafting in two patients with parkinsonism induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *N Engl J Med* 327, 1556-1563.
- Wislet-Gendebien, S., Hans, G., Leprince, P., Rigo, J.M., Moonen, G., and Rogister, B. (2005a). Plasticity of cultured mesenchymal stem cells: switch from nestin-positive to excitable neuron-like phenotype. *Stem Cells* 23, 392-402.
- Wislet-Gendebien, S., Leprince, P., Moonen, G., and Rogister, B. (2003). Regulation of neural markers nestin and GFAP expression by cultivated bone marrow stromal cells. *J Cell Sci* 116, 3295-3302.
- Wislet-Gendebien, S., Wautier, F., Leprince, P., and Rogister, B. (2005b). Astrocytic and neuronal fate of mesenchymal stem cells expressing nestin. *Brain Res Bull* 68, 95-102.
- Woltjen, K., Michael, I.P., Mohseni, P., Desai, R., Mileikovsky, M., Hamalainen, R., Cowling, R., Wang, W., Liu, P., Gertsenstein, M., *et al.* (2009). piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* 458, 766-770.
- Yoshida, S., Shimmura, S., Nagoshi, N., Fukuda, K., Matsuzaki, Y., Okano, H., and Tsubota, K. (2006). Isolation of multipotent neural crest-derived stem cells from the adult mouse cornea. *Stem Cells* 24, 2714-2722.
- Young, H.E., Duplaa, C., Romero-Ramos, M., Chesselet, M.F., Vourc'h, P., Yost, M.J., Ericson, K., Terracio, L., Asahara, T., Masuda, H., *et al.* (2004). Adult reserve stem cells and their potential for tissue engineering. *Cell Biochem Biophys* 40, 1-80.

Etude *in vivo* de la plasticité phénotypique nerveuse des cellules souches dérivées de la moelle osseuse adulte.

Virginie Neirinckx

Erratum

1. Page 33, table 3 : Inversion de valeurs d'expression du gène codant pour S1PR3.

Table 3 : Gènes codant pour des protéines membranaires et sélectionnés en vue d'une discrimination des CSCN et des CSM. Les chiffres situés dans les deux colonnes de droite correspondent aux moyennes géométriques de l'expression normalisée de chacun des gènes dans les deux groupes de clones lors de l'analyse transcriptomique.

		CSCN	CSM
PLP1	Proteolipid protein 1	8861,91	7,92
L1CAM	L1 cell adhesion molecule	11959,11	42,85
ABCA1	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1	5550,11	66,92
NrCAM	neuron-glia-CAM-related cell adhesion molecule	1761,88	4,36
S1PR3	Sphingosine-1-phosphate receptor 3	4,36	6053,44
CD141	(THBD) Thrombomodulin	5,6	2996,24
CD106	(VCAM1) vascular cell adhesion molecule 1	5,36	152,79

2. Figure 27 à 30 : Inversion de symboles des groupes 3 et 4 dans la légende et les tables.

(Couleurs correctes, mais symboles inversés).

Incorrect :

◆ ③ MPTP / Saline

▲ ④ MPTP / CSCN

Correct :

▲ ③ MPTP / Saline

◆ ④ MPTP / CSCN