

STRATEGIES D'OMOGENEISATION DES POPULATIONS DE PROGENITEURS NERVEUX FOETAUX HUMAINS DANS UNE PERSPECTIVE DE THERAPIE CELLULAIRE DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL

Angéline Serre

▶ **To cite this version:**

Angéline Serre. STRATEGIES D'OMOGENEISATION DES POPULATIONS DE PROGENITEURS NERVEUX FOETAUX HUMAINS DANS UNE PERSPECTIVE DE THERAPIE CELLULAIRE DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2007. Français. NNT : . tel-00184239

HAL Id: tel-00184239

https://theses.hal.science/tel-00184239

Submitted on 30 Oct 2007

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

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

Thèse de Doctorat

de

L'Université Pierre et Marie Curie – Paris VI

Spécialité : Neurosciences

Présentée par

Angéline SERRE

Pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université Pierre et Marie Curie

Stratégies d'homogénéisation des populations de progéniteurs nerveux fœtaux humains dans une perspective de thérapie cellulaire du système nerveux central

Soutenue le 28 juin 2007 devant le jury composé de :

Pr François COURAUD	Président
Dr Minerva GIMENEZ Y RIBOTTA	Rapporteur
Dr Philippe COCHARD	Rapporteur
Dr Pierre-Marie LLEDO	Examinateur
Pr Evan SNYDER	Examinateur
Dr Jacques MALLET	Directeur de thèse

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier le Dr Jacques Mallet, d'avoir consenti à cette incursion auvergnate au sein du LGN et de m'avoir confié l'héritage fascinant mais périlleux des cellules souches nerveuses fœtales humaines.

Je remercie le Pr François Couraud, le Dr Minerva Gimenez y Ribotta, le Dr Philippe Cochard, le Dr Pierre-Marie Lledo et le Pr Evan Snyder d'avoir accepté de juger mes travaux.

Merci au Dr Charles Auffray et à son équipe de m'avoir accueillie à Villejuif avec autant de bienveillance tout au long de la rédaction de ce manuscrit.

Un GRAND merci à Delphine. Sans toi, il n'y aurait pas eu de commencement à ce projet de thèse mais il n'y aurait sûrement pas eu de fin non plus. Ton aide et ton soutien, de la première à la dernière minute, ont souvent eu un effet **drastique** sur ma motivation. Merci de t'être maintes fois levée aux aurores et merci de m'avoir fait confiance dans la poursuite de ce projet qui te tient tant à cœur. J'admire ta passion pour ces précieuses cellules souches.

Je remercie l'ensemble des membres du LGN qui ont tous contribué, à un moment ou à un autre, au bon déroulement de ces quatre années de thèse.
Je pense spécialement à Jeannette et Philippe, il est tellement enrichissant de discuter avec chacun d'entre vous, vos connaissances semblent intarissables ; à Stéphanie, ta bonne humeur, ton enthousiasme et tes conseils sont des stimulants incroyables. Ton petit bout de chou aura vraiment de la chance d'avoir une maman telle que toi ; à Isabelle, le FACS, la laverie, les commandes… j'ai tellement de bonnes raisons d'être reconnaissante ; à Mathilde et Nicole, pour tous ces petits détails qui n'en sont pas vraiment.

Mais je n'oublie surtout pas les rois du traquenard :
Kékile, je t'aurais bien suggéré de te recycler dans la direction d'une agence matrimoniale mais tu es faite pour la recherche, tu es brillante et tu ne dois surtout jamais en douter. En tout état de cause, tu es également douée pour embellir la vie des autres et c'est une véritable chance de t'avoir pour amie.
P'tite Stéph, tu es toujours là où il faut, quand il faut. Ta gentillesse et ta discrétion sont inestimables et ton côté « étourdie » irremplaçable (Chacune de vos aventures, avec José, peut alimenter nos conversations des soirées durant !!)
Mathieu, depuis ton exil à Montpellier, les comparaisons à la « Judith Godrèche » se font rares et finissent par me manquer. Si nous n'avons pas toujours la même vision des choses, il y a au moins un sujet sur lequel nous nous retrouvons… Je n'aurais d'ailleurs qu'un conseil : « Arrête de te poser des questions. Fonce ! ».

N'Olfa, depuis ton départ, le rayon « jus de fruits » du Monoprix ne désemplit pas : à croire, qu'il n'y avait que toi, pour boire du jus pruneau-poireau-comcombre-salsifis-goyave !! Nous concernant, nous restons désormais dans l'ignorance gustative de ces mélanges sophistiqués et… inventifs ! Quel dommage !
Nico, je ne comprends toujours pas ton admiration pour tes compagnons sans pattes, mais tu es tout de même la seule personne à avoir réussi à me faire rester dans la même pièce qu'un serpent en liberté. Impressionnant ! En tout cas, vivement ton pot de thèse qu'on puisse vider les bouteilles bon marché que tu stockes dans ta cave !!
Chamsy, il y aurait tellement de choses à dire sur toutes tes particularités et les raisons qui font que je t'apprécie que ça va être difficile de tout résumer en quelques lignes. Quoiqu'il en soit, tu es vraiment le plus antithétique habitant de Boulogne…

Bon courage à tous les thésards du labo qui sont plus ou moins proches de la délivrance : Caroline, Julie, Dorothée, Cédric et Krystof et bonne chance à tous ceux qui sont déjà passés de l'autre côté : Aline, Hamid et Lahouari.

Merci à Xavier, mon papillon folâtre. Ta patience ne cesse de m'étonner : tu es sans aucun doute la plus belle découverte de ces quatre années de thèse. Prochaine étape : l'absolu !! ☺

Merci tout particulièrement à vous, maman et papa, d'avoir été là, ensemble, dans les bons comme dans les mauvais moments. Malgré la distance, vous avez contribué en grande partie à ce résultat et vous étiez à mes côtés pour mettre le point final.

Merci à toute ma petite famille.
Fred, Nathou, Carole, Nanou, Yoyo et Xavier, vous êtes tous plus que des cousins et cousines. Grâce à vous, je connais les joies d'une « fratrie » et le bonheur de pouvoir compter les uns sur les autres.
Mes tatas, mes tontons, vous seriez capables de décrocher la lune pour me faire plaisir et je ne vous en remercierai jamais assez.
Mémé Aline, Mémé Andrée, Pépé Marcel, vous ne serez probablement pas là physiquement le jour de ma soutenance, mais une chose est sûre : vous serez avec moi, malgré tout, blottis bien au chaud, au fond de mon cœur.

Merci à Anne, Laetitia et Laurie. Chacune à votre manière et depuis des années, vous m'accordez une amitié sans faille. Je n'ai qu'un vœu, la voir perdurer encore longtemps.

Table des matières

Remerciements *3*

Abréviations *9*

Avant-propos *11*

Introduction *15*

I. Cellules souches : généralités **17**
A. Définitions 17
1. Cellules indifférenciées 17
2. Prolifération 17
3. Potentiel de différenciation 18
B. Source d'obtention des cellules souches 20
1. Cellules souches embryonnaires 21
2. Cellules souches fœtales 22
3. Cellules souches adultes 24
4. Précurseurs 25

II. Cellules souches nerveuses fœtales humaines et Thérapie cellulaire du système nerveux central **26**
A. Atouts des cellules souches nerveuses fœtales 27
B. Caractéristiques des cellules souches nerveuses fœtales humaines in vitro et in vivo 29
1. Mise en culture et amplification 29
2. Différenciation 29
3. Greffes de cellules souches nerveuses fœtales humaines 32

III. Homogénéisation des populations cellulaires **35**
A. Orientation de la différenciation des cellules souches en culture 35
1. Justification de la stratégie 35
2. Orientation de la différenciation : les gènes proneuraux 36
a) Historique 36
b) Structure et propriétés biochimiques des gènes proneuraux 39
c) Rôle particulier des gènes Ngn1, Ngn2, Ngn3 et Mash1 41
(1) Patrons d'expression 41
(i) Localisation spatiale chez la souris 42
(ii) Localisation temporelle chez la souris 44
(2) Rôle des gènes proneuraux au cours du développement 45
(i) Rôle dans la neurogenèse 45
(ii) Rôle dans l'arrêt du cycle cellulaire 47
(iii) Rôle dans la différenciation gliale 47
(iv) Autres fonctions des gènes proneuraux 48
d) Mécanisme d'action et régulation : la voie Notch 48
B. Méthode de tri cellulaire 51
1. Justification de la stratégie 51
2. Description des promoteurs 53
3. Principe de la stratégie 54
C. Les vecteurs lentiviraux 54
1. Structure des lentivirus 56
2. Multiplication 57
3. ADN proviral 57
4. Squelette du vecteur lentiviral 58
5. Vecteurs lentiviraux utilisés comme outils pour enrichir les populations 60

Matériel et Méthodes *61*

I. Cultures de cellules souches nerveuses fœtales **62**
A. Fondement légal 62

B. Mise en culture et amplification ... 62

II. Vecteurs lentiviraux ... 63
A. Construction des plasmides de différenciation ... 64
B. Construction des plasmides traceurs ... 65
C. Production ... 66

III. Dot-Blot ... 66

IV. Transduction lentivirale des cellules en culture ... 67
A. Transduction avec les vecteurs de différenciation ... 67
B. Transduction avec les vecteurs traceurs ... 67

V. Immunocytochimie ... 68

VI. Analyse par cytométrie en flux ... 69

VII. Statistiques ... 69

***Résultats* ... 71**

I. Effet des gènes proneuraux ... 72
A. Efficacité de transduction des vecteurs de différenciation ... 73
B. Caractérisation de la population initiale ... 74
1. Phénotype initial de TFH7 ... 78
2. Phénotype initial de TFH6 ... 81
C. Effet de la surexpression des gènes proneuraux ... 81
1. Effet de la surexpression des gènes proneuraux sur la prolifération cellulaire ... 82
2. Effet des gènes proneuraux sur la différenciation cellulaire ... 83
a) Effet de la surexpression du gène Ngn1 ... 83
b) Effet de la surexpression du gène Ngn2 ... 86
c) Effet de la surexpression du gène Ngn3 ... 88
d) Effet de la surexpression du gène Mash1 ... 90
e) Différenciation terminale ... 93
D. Rôle du bFGF ... 97
1. Effet du bFGF sur le phénotype de la population TFH7 non transduite ... 98
2. Influence du bFGF après transduction des cellules avec le vecteur contrôle ... 99
3. Effet de la surexpression des gènes proneuraux en absence de bFGF ... 100
a) Effet sur la prolifération ... 101
b) Effet sur la différenciation ... 102

II. Spécificité des promoteurs des différents lignages ... 106
A. Capacité des vecteurs traceurs à transduire des cellules en culture ... 106
B. Analyse de la spécificité d'expression induite par les promoteurs ... 108
1. Spécificité d'expression des différents promoteurs à une dose de 50 ng p24/puits ... 109
a) Phénotype de la population globale ... 110
b) Phénotype des cellules fluorescentes ... 110
2. Rôle de la dose de vecteur sur la spécificité d'expression ... 113

***Discussion* ... 117**

I. Première stratégie : orientation de la différenciation des progéniteurs nerveux humains par surexpression de gènes proneuraux ... 118
A. Effets comparés des gènes Ngn1, Ngn2, Ngn3 et Mash1 ... 118
1. Effet sur la prolifération des cellules ... 118
2. Effet sur la différenciation des cellules ... 119
3. Phénotype terminal des cellules ... 120
4. Influence du bFGF sur l'effet des gènes proneuraux ... 121
B. Pathologies ciblées ... 122
C. Limites de la technique ... 123
1. Durée de la surexpression des gènes proneuraux ... 123
2. Choix du vecteur viral ... 123
3. Phénotype *in vivo* difficilement prévisible ... 124

II. Seconde stratégie : tri des cellules d'intérêt par expression d'une protéine rapportrice sous le contrôle d'un promoteur choisi 125
A. Justification de la non-spécificité 125
B. Brèche dans la spécificité du promoteur Nestine 126
C. Solutions pour améliorer l'efficacité du tri cellulaire 128
D. Conclusion 129

III. Avenir de la thérapie cellulaire dans le SNC 131
A. Choix des cellules 131
1. Avantages des cellules foetales 131
2. Limites des cellules foetales 132
a) Effets de l'amplification *in vitro* 132
b) Matériel difficilement accessible 133
B. Choix de la stratégie thérapeutique 134
1. Greffe de cellules dans le système nerveux central 134
a) Caractéristiques des cellules à greffer 134
b) Limites de la stratégie de greffe de cellules 136
2. Stratégie des « cellules souches intelligentes » 136
3. Stratégie de stimulation des cellules souches endogènes 137

Conclusion 139

Lexique 141

Annexes 149

Références bibliographiques 163

Liste
des
Abréviations

AAV	adeno-associated virus
ADNc	ADN complémentaire
ARNm	ARN messager
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BHE	Barrière Hémato-Encéphalique
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
Cellules ES	cellules souches embryonnaires
Cellules EG	cellules souches germinales embryonnaires
CMV	CytoMégaloVirus
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
env	enveloppe
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
gag	group specific antigens
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GFP	Green Fluorescent Protein
HBS	Hepes Buffered Saline
HES	Hairy and Enhancer of Split
hsp 68	Heat Shock Protein 68
kb	kilobase
Id	Inhibiteur de la différenciation
IVG	Interruption Volontaire de Grossesse
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
LTR	Long Terminal Repeat
MACS	Magnetic-Activated Cell Sorting
Map	Protéine associée aux microtubules
MIF	Moyenne d'Intensité de Fluorescence
nef	negative regulatory factor
Ngn	Neurogénine
NSE	Enolase Spécifique des Neurones
pb	paires de base
PCR	Polymerase Chain Reaction
pol	Polymérase
PGC	Cellules Germinales Primitives
PGK	PhosphoGlycerate Kinase
RBPjκ	Recombining Binding Protein suppressor of hairless
rev	regulation of expression of viral proteins
RRE	Rev Responsive Element
SD	Site Donneur
Shh	Sonic hedgehog
SNC	Système Nerveux Central
SNP	Système Nerveux Périphérique
tat	transactivateur
vif	virion infectivity factor
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
vpr	viral protein r
VSV	Virus de la Stomatite Vésiculaire
ZSV	Zone Sous-Ventriculaire

L'étoile placée en indice de certains mots (*) renvoie à un lexique situé en fin de manuscrit.

Avant-propos

Les cellules souches apparaissent de plus en plus comme « l'outil du futur » pour le traitement d'un grand nombre de maladies, aussi bien en thérapie cellulaire pour remplacer les cellules lésées de l'organisme, qu'en thérapie génique *ex vivo* pour exprimer des molécules d'intérêt à un site donné. Parmi les différents types de cellules souches connus à ce jour (cellules souches embryonnaires, cellules souches fœtales, cellules souches du liquide amniotique, cellules souches germinales et cellules souches adultes), les cellules souches nerveuses fœtales, ou cellules neuroépithéliales, sont les cellules candidates les plus appropriées pour le traitement d'un grand nombre de pathologies du système nerveux central (SNC).

Les expériences de transplantation réalisées chez l'animal à l'aide de ces cellules ont montré leurs grandes capacités de survie, de migration et de différenciation, ainsi que leur aptitude à réparer certains types de lésion. Cependant, la plupart du temps, les populations cellulaires greffées sont hétérogènes et les effets respectifs de chaque type cellulaire sont difficiles à déterminer. Certaines études montrent, par ailleurs, que les greffes réalisées avec des populations homogènes s'avèrent plus efficaces (Hofstetter et al., 2005; Lepore et al., 2004; Windrem et al., 2004). Par conséquent, l'obtention *in vitro* de populations cellulaires présentant un phénotype ciblé et choisi en fonction du type de pathologie à traiter apparaît de plus en plus capitale. Au cours de ma thèse, deux stratégies ont donc été expérimentées afin d'homogénéiser des populations de cellules souches et progénitrices nerveuses fœtales humaines en culture.

La première consiste à restreindre le potentiel de différenciation des cellules nerveuses fœtales en surexprimant des gènes proneuraux à motif bHLH, connus pour leur rôle primordial dans le devenir neuronal versus glial des cellules nerveuses. Quatre de ces gènes ont particulièrement attiré notre attention : Ngn1, Ngn2, Ngn3 et Mash1. La comparaison de leurs effets sur les cellules souches nerveuses en culture profite aussi bien à la compréhension de leur mécanisme d'action, qu'au ciblage préférentiel de certaines pathologies lors des greffes cellulaires.

La seconde consiste à sélectionner et à purifier des cellules d'intérêt grâce à l'expression de protéines fluorescentes (protéines rapportrices) sous le contrôle de promoteurs spécifiques des différents lignages cellulaires. Pour exploiter ce système de manière efficace, la vérification de la spécificité d'expression est un pré-requis indispensable. C'est le travail que nous avons effectué afin d'homologuer cette stratégie. Les promoteurs choisis correspondent à trois grands types cellulaires présents dans le système nerveux central : i) le promoteur de la

nestine pour les cellules immatures ; ii) le promoteur de la synapsine humaine pour le lignage neuronal ; iii) le promoteur de la GFAP humaine pour le lignage astrocytaire.

Le présent manuscrit est divisé en trois parties :

1- Une introduction bibliographique présentant brièvement les **cellules souches**, leur intérêt pour la thérapie cellulaire et justifiant la nécessité d'homogénéiser les populations cellulaires avant greffe. Cette partie décrit également les **gènes proneuraux** auxquels nous nous sommes intéressés pour orienter la différenciation des progéniteurs nerveux, les **promoteurs** choisis dans la méthode de tri cellulaire, ainsi que les **vecteurs lentiviraux** qui ont constitué notre outil de choix pour chacune des deux stratégies.

2- Une partie exposant les résultats obtenus pour chaque stratégie : différenciation vers un lignage donné par surexpression de gènes proneuraux, et vérification de la spécificité d'expression d'une protéine rapportrice sous le contrôle d'un promoteur donné, en vue du tri d'une population cellulaire choisie.

3- Une partie dans laquelle sont discutées la validité de chacune des stratégies et leur utilisation potentielle en thérapie cellulaire du systèmes nerveux central.

« Tout développement nouveau d'une science s'appuie nécessairement sur ce qui existe déjà. Or, ce qui existe déjà ne s'arrête pas toujours à des limites fort précises. Entre le connu et le non connu, il y a, non pas une ligne définie, mais une bordure estompée. Avant d'atteindre la région où il peut trouver le sol ferme pour asseoir ses fondations, le savant doit revenir assez loin en arrière pour sortir de la zone mal assurée dont il vient d'être question. Si on veut étendre un peu largement le domaine scientifique auquel on se consacre, il faut, pour assurer ses perspectives, remonter jusque dans l'histoire pour trouver une base. »

Charles Singer, Histoire de la Biologie, 1934

Introduction

La notion de cellule souche remonte au XIXe siècle. En effet, c'est en 1839 que Theodor Schwann est le premier à élaborer **la théorie cellulaire** selon laquelle tout organisme vivant est composé en totalité et uniquement de cellules, la cellule étant tenue pour l'élément vital porteur de tous les caractères de la vie. Cette théorie est complétée par l'allemand Rudolf Virchow, qui affirme, en 1858 dans Die Cellularpathologie, que toute cellule est produite à partir d'une autre cellule : « *omnis cellula e cellula* ».

La théorie cellulaire est alors rapidement admise et l'étude de la cellule devient une science à part entière, **la cytologie**, distincte de ce que l'on appelait l'histologie, la science des tissus. Les recherches s'étendent à de nombreux domaines et en 1874, Claude Bernard qui étudie les phénomènes de nutrition communs aux animaux et aux végétaux, écrit (Revue Scientifique, 26 septembre 1874) : « Dans l'analyse intime d'un phénomène physiologique, on aboutit toujours au même point, on arrive au même agent élémentaire, irréductible, l'élément organisé, la cellule. ».

Les premières manipulations expérimentales en embryologie sont celles de Wilhem Roux. En 1885, il montre que des cellules embryonnaires de poulet peuvent être maintenues en vie dans une solution saline hors du corps de l'animal. Cependant, il faudra attendre 1920 pour que l'existence de cellules précurseurs à l'origine de TOUTES les cellules sanguines soit suggérée chez le poulet (Sabin, 1920) et que le terme « **cellule souche** » prenne toute sa signification.

Quarante ans plus tard, Becker, Till et McCulloch démontrent que les « colonies spléniques » obtenues chez des souris, après injection de moelle irradiée et de moelle intacte, proviennent de cellules uniques aux propriétés « multipotentes* » (Becker et al., 1963). La science des cellules souches vient de naître.

I. Cellules souches : généralités

A. *Définitions*

Les cellules souches se distinguent de toutes les autres cellules de l'organisme par leurs propriétés originales. Ce sont des cellules **indifférenciées** qui ont la capacité de **se diviser** pendant de longues périodes, de **s'auto-renouveler** et de donner naissance **aux cellules spécialisées** des différents tissus.

1. Cellules indifférenciées

Contrairement à la plupart des cellules de l'organisme dites « différenciées », telles que les cellules musculaires ou les cellules de la peau, les cellules souches n'exercent pas de fonction définie. Elles sont considérées comme **immatures** et sont maintenues dans cet état stationnaire, jusqu'à ce que des signaux leur indiquent la voie de différenciation à emprunter.

2. Prolifération

Afin de maintenir le pool de cellules immatures et d'approvisionner les tissus en cellules pouvant se différencier, les cellules souches se divisent régulièrement. Leur faculté de multiplication est obtenue grâce à deux particularités :

***une prolifération quasi-infinie** due à l'expression et à la forte activité de la télomérase* (Kim et al., 1994; Morrison et al., 1996).

l'auto-renouvellement** qui, lors de la division de la cellule souche, donne naissance à au moins une cellule identique à elle-même. Le processus recourt soit à une ***division symétrique, fournissant deux cellules identiques à la cellule mère, soit à une ***division asymétrique***, produisant deux cellules différentes, dont une identique à la cellule mère (Figure I-1). La deuxième cellule, dite cellule progénitrice (ou progéniteur) reste une cellule non spécialisée mais présente un degré de maturité supérieur à celui de la cellule souche.

i) ii)

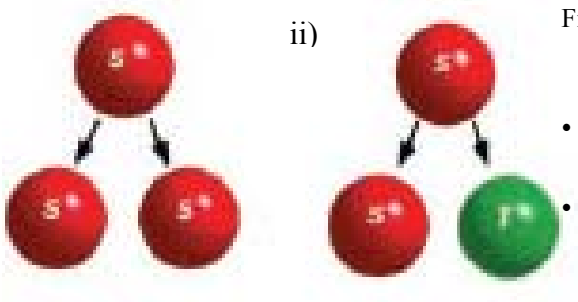


Figure I-1 : Représentation schématique de la division symétrique et asymétrique des cellules souches

- Division symétrique : Obtention de 2 cellules souches (rouge)
- Division asymétrique : Naissance d'une cellule souche (rouge) et d'une cellule progénitrice (verte)

3. Potentiel de différenciation

Bien que présentant des caractéristiques générales communes, toutes les cellules souches ne sont pas identiques. Au fil de l'évolution embryonnaire (Figure I-2), elles sont canalisées vers des voies spécifiques et perdent peu à peu leur potentiel de différenciation.

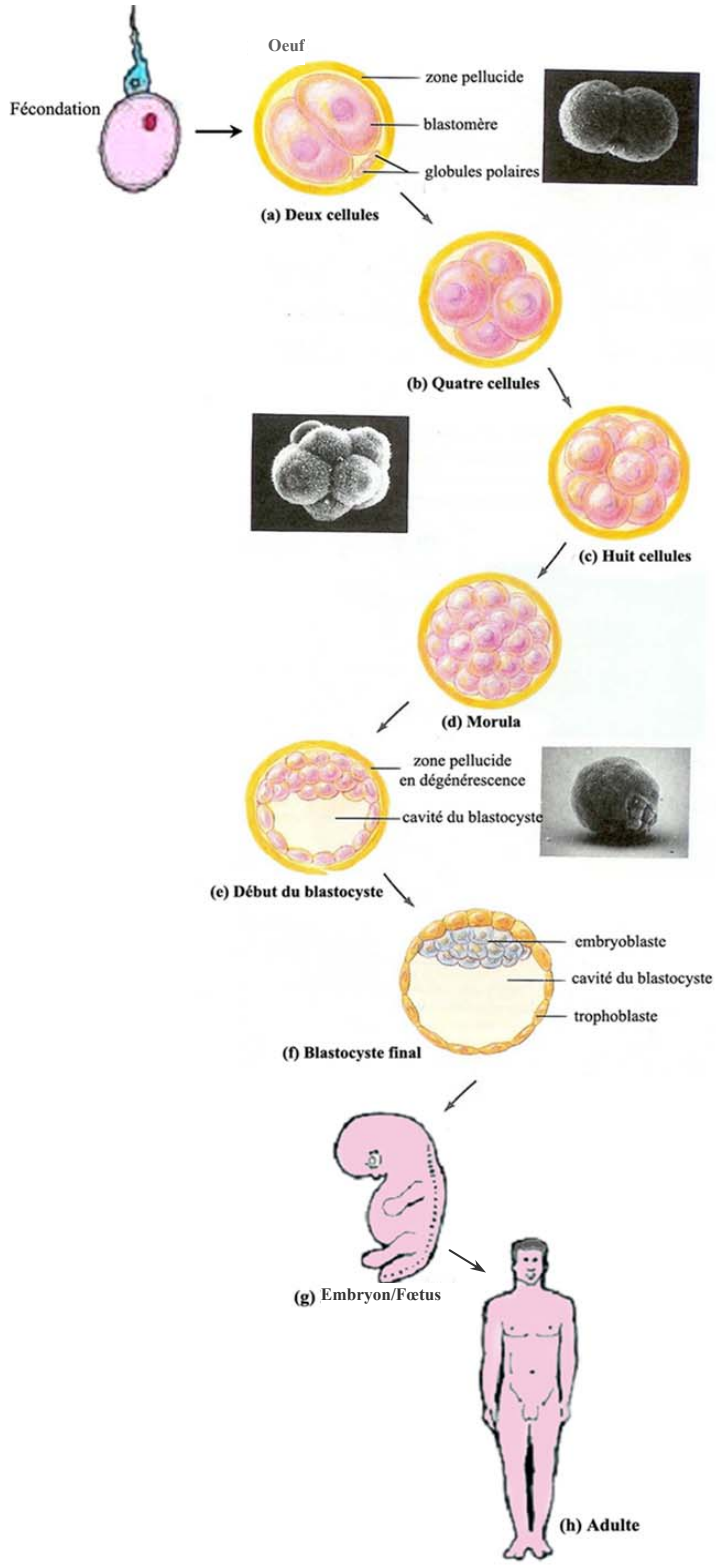


Figure I-2 : Développement embryonnaire

L'origine du développement est la fécondation, rencontre d'un spermatozoïde et d'un ovocyte pour former un ovule fécondé ou zygote. La première division du zygote nécessite 24 heures. Au quatrième jour, l'œuf atteint le stade morula (16 cellules) et parvient à l'utérus. Les divisions se poursuivent, l'œuf est transformé et accède au stade blastocyste, contenant un bouton embryonnaire (ou masse interne) à partir duquel se développera l'embryon. Le blastocyste s'implante alors dans la muqueuse utérine. Les deux premiers mois de grossesse correspondent à la période embryonnaire, pendant laquelle les différentes structures apparaissent. A 2 mois, l'embryon pèse environ un gramme et son cœur est entièrement formé ; on le nomme alors fœtus. Passés 6 mois, le fœtus est viable et au neuvième mois, la parturition ou accouchement est le point culminant de la grossesse qui permet d'obtenir un nouveau-né. Ce dernier va évoluer à son tour pour aboutir à un Homme adulte.

Selon la nature et la variété des cellules qu'elles peuvent engendrer lors de la spécialisation, on peut distinguer :

les cellules souches totipotentes : elles ont la capacité de donner naissance à tous les types cellulaires présents dans l'organisme (Figure I-3), y compris ceux de la lignée germinale et des annexes embryonnaires (trophoblaste* puis placenta). Placées dans un environnement permissif (utérus), ces cellules vont conduire à la formation d'un organisme dans sa totalité. La totipotence n'est observée que pour les 8 premières cellules du développement, c'est-à-dire jusqu'à 3 subdivisions cellulaires (Figure I-2).

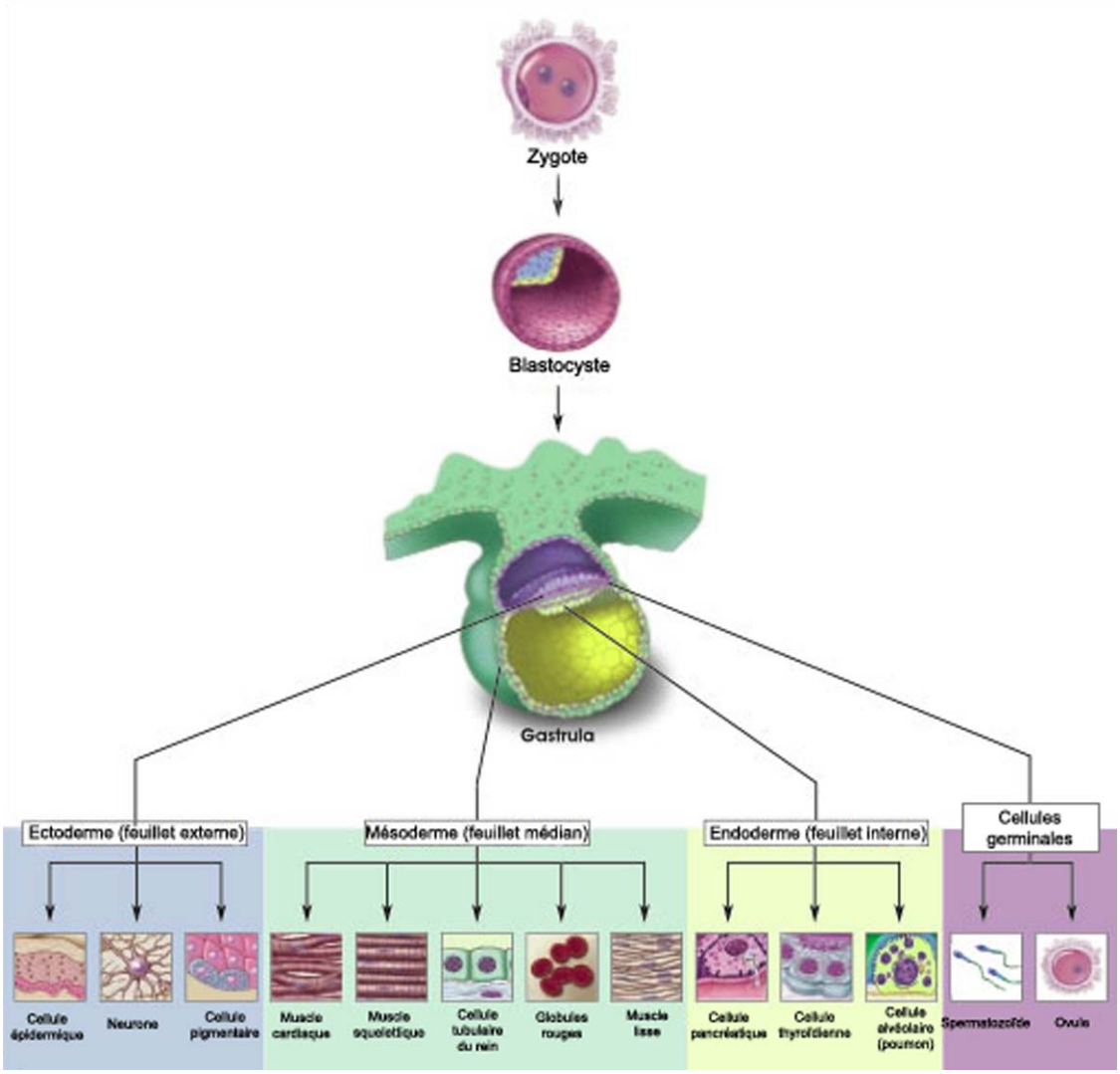


Figure I-3 : Différenciation à partir des feuillets embryonnaires primitifs.

Chez l'homme, à partir du 17e jour d'embryogenèse, les cellules vont subir une réorganisation qui va permettre la mise en place des tissus : c'est la gastrulation. Les cellules alors peu différenciées se structurent en feuillets concentriques. Le feuillet le plus interne est l'endoderme, le feuillet le plus externe est l'ectoderme et le feuillet central est le mésoderme. Par la suite, ces feuillets évoluent pour donner les différents tissus de l'organisme. Les principaux tissus qui vont se différencier à partir des feuillets embryonnaires sont schématisés sur la figure ci-dessus. Les cellules germinales présentes au niveau des crêtes gonadiques sont destinées à former les gamètes (mâles ou femelles).

les cellules souches pluripotentes : elles sont capables de donner naissance à n'importe quelle cellule spécialisée dérivant des 3 feuillets embryonnaires* primitifs (mésoderme, endoderme et ectoderme) (Figure I-3). Néanmoins, elles ne peuvent plus produire un être vivant entier (lorsqu'elles sont réimplantées dans un utérus).

les cellules souches multipotentes : elles permettent d'engendrer l'ensemble des cellules composant un tissu ou un organe donné. Les cellules obtenues peuvent présenter des morphologies et des fonctions très différentes mais elles font généralement partie d'un même compartiment tissulaire. C'est le cas par exemple des cellules souches hématopoïétiques qui produisent toutes les cellules sanguines (globules rouges, globules blancs et lymphocytes) et des cellules souches nerveuses qui produisent aussi bien les neurones que les astrocytes et les oligodendrocytes.

les cellules souches unipotentes : elles ne peuvent se différencier qu'en une seule sorte de cellules. Les cellules souches de l'épiderme, par exemple, ne fournissent que des kératinocytes.

Ces différences au sein des cellules souches permettent donc d'établir une classification fondée sur leur potentiel de différenciation. Cependant, cette répartition ne tient pas compte de leur berceau tissulaire. Or selon leur emplacement d'origine, les cellules souches développent des propriétés particulières.

B. Source d'obtention des cellules souches

Actuellement chez l'animal, trois grandes catégories de cellules souches peuvent être identifiées (Figure I-4) :

-les **cellules souches embryonnaires**

-les **cellules souches fœtales**, parmi lesquelles on peut distinguer des cellules souches somatiques et des cellules germinales

-les **cellules souches adultes**

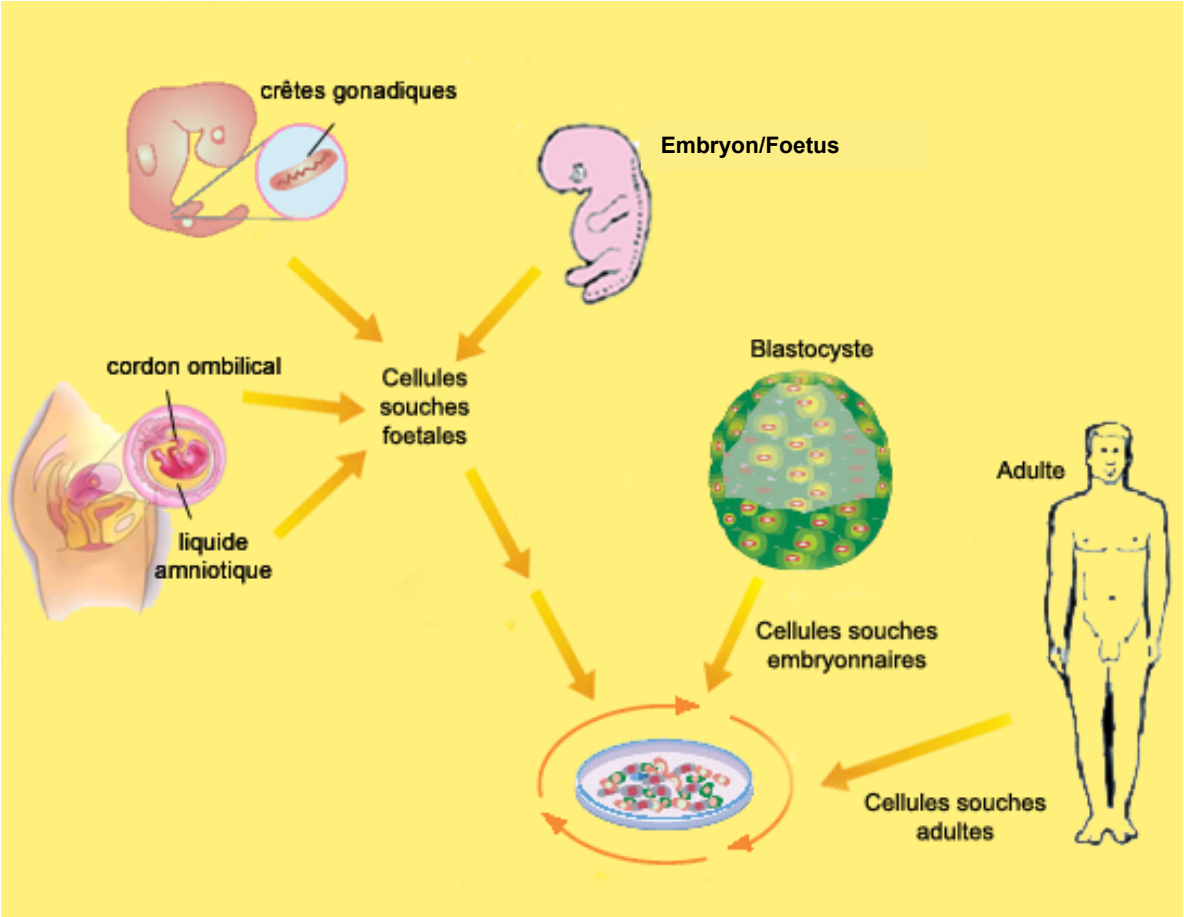


Figure I-4 : Source d'obtention des cellules souches

Des cellules souches ont été mises en évidence aux différents stades du développement humain.
(a) Au stade embryonnaire (blastocyste) : on les appelle cellules souches embryonnaires (ou cellules ES).
(b) Au stade fœtal. Il existe 4 types de cellules souches :
-les cellules souches fœtales multipotentes extraites directement des différents tissus fœtaux
-les cellules souches germinales dérivant des cellules reproductrices primitives du fœtus (crêtes gonadiques)
-les cellules souches provenant du cordon ombilical
-les cellules souches provenant du liquide amniotique
(c) Au stade adulte. Des cellules souches adultes ont été identifiées dans un grand nombre de tissus de l'organisme (peau, muscle, pancréas, foie, système nerveux central…)

(D'après D'Amour and Gage, 2000)

1. Cellules souches embryonnaires

Les cellules souches embryonnaires, également appelées *embryonic stem cells* (ou cellules ES), sont extraites de la masse interne du blastocyste, une structure de 16 à 40 cellules issues des divisions de l'ovocyte fécondé (Figure I-5). A ce stade du développement embryonnaire, chaque cellule est **pluripotente*** : elle peut donc se différencier en des cellules spécialisées correspondant à tous les tissus de l'organisme (cœur, sang, muscle…) ainsi qu'en cellules germinales (Thomson et al., 1998).

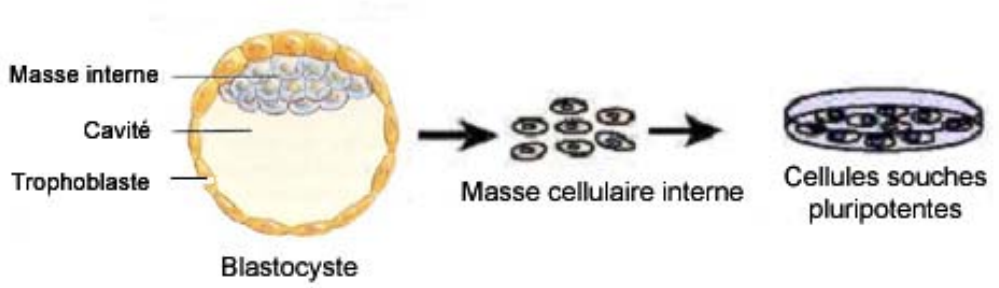


Figure I-5 : Les cellules ES proviennent de la masse interne du blastocyste.

Le blastocyste est une structure obtenue après 5 jours de division post-fécondation. Il est composé de 2 parties : la masse interne (ou embryoblaste) qui permettra la formation de l'embryon et le trophoblaste qui avec les cellules de l'utérus constituera le placenta. Les cellules pluripotentes de la masse interne sont disséquées et mises en culture afin d'obtenir des cellules souches embryonnaires *in vitro*.

2. Cellules souches fœtales

Les cellules souches fœtales sont isolées à partir de tissus foetaux à un stade beaucoup plus tardif que le stade de blastocyste embryonnaire. Elles sont le plus souvent issues de fœtus obtenus après Interruption Volontaire de Grossesse (IVG). En France, l'avortement est autorisé par la loi Veil depuis le 17 janvier 1975 et en 2001, le délai au delà duquel il n'est plus possible de pratiquer une IVG a été porté de 10 à 12 semaines de développement. Les cellules qui dérivent de ces prélèvements, sont donc généralement âgées de 5 à 12 semaines embryonnaires. Chez l'Homme, dans la nomenclature conventionnelle, le zygote en développement est appelé embryon jusqu'à 8 semaines et fœtus au-delà de cette limite. Les cellules extraites de ces tissus doivent logiquement suivre une nomenclature similaire. Cependant, par souci de clarté, l'ensemble des cellules âgées de plus de 5 semaines porte, dans ce manuscrit, le nom de cellules souches fœtales. Parmi elles, on peut distinguer:

* **les cellules souches tissulaires**

Extraites des tissus partiellement différenciés du fœtus en développement, ces cellules ont la particularité d'être déjà orientées vers une catégorie tissulaire spécifique : ce sont des cellules **multipotentes***. Parmi elles, on rencontre notamment les cellules souches nerveuses foetales extraites des vésicules télencéphaliques : ces cellules font l'objet d'une description détaillée dans la deuxième partie de cette introduction intitulée « Cellules souches nerveuses fœtales humaines et Thérapie cellulaire du système nerveux central ».

* **les cellules souches germinales**

Les cellules souches germinales ou *embryonic germ cells* (cellules EG) sont obtenues à partir des cellules reproductrices (dites cellules germinales*) primitives (PGCs) de fœtus. Les crêtes gonadiques* peuvent être isolées des tissus fœtaux âgés de 5 à 12 semaines et les PGCs nullipotentes* qui résultent de leur dissociation sont alors mises en culture (Figure I-6).

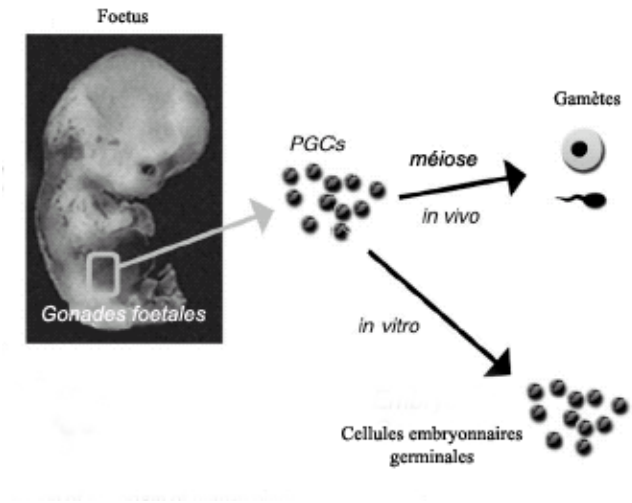


Figure I-6 : Les cellules souches germinales sont extraites des crêtes gonadiques de foetus âgés de 5 à 12 semaines embryonnaires.

Les cellules germinales primordiales (PGC) colonisent la crête génitale à partir de la cinquième semaine du développement embryonnaire. A ce stade, ce sont des cellules indifférenciées. Leur spécialisation en cellules reproductrices (gamètes) mâles ou femelles ne débute qu'à la septième semaine chez les fœtus humains de sexe masculin et à la huitième semaine chez les fœtus humains de sexe féminin. Ces PGCs peuvent donc être isolés et mis en culture pour donner naissance aux cellules souches germinales pluripotentes.

(D'après Turnpenny et al, 2005)

En présence des facteurs appropriés (bFGF, forskoline ou LIF) et sur une couche nourricière de fibroblastes embryonnaires, ces PGCs vont dériver et devenir des cellules souches germinales **pluripotentes** (Shamblott et al., 1998; Turnpenny et al., 2003). A la différence des cellules souches extraites des autres tissus fœtaux, ces cellules EG peuvent, en effet, donner naissance à l'ensemble des cellules émanant des 3 feuillets embryonnaires*.

* **les cellules du cordon ombilical**

Pendant la grossesse, la majeure partie des cellules souches hématopoïétiques se retrouve dans la circulation et par conséquent dans le cordon ombilical et le placenta. C'est seulement après l'accouchement qu'elles vont migrer au niveau de la moelle osseuse. Par conséquent, une partie de ces cellules persiste dans le sang du cordon ombilical et constitue ainsi une source de cellules souches **multipotentes** aisément accessible (Broxmeyer et al., 1992; Piacibello et al., 1998).

* **les cellules du liquide amniotique**

Le liquide amniotique contient un grand nombre de cellules provenant du fœtus en développement (Polgar et al., 1989; Priest et al., 1978). Au sein de cette population

hétérogène, certaines cellules fœtales ont la propriété de donner naissance à des cellules différenciées appartenant à des lignages aussi variés que le lignage musculaire, le lignage osseux ou le lignage neuronal (In 't Anker et al., 2003; Prusa et al., 2004; Tsai et al., 2004). Une étude récente a confirmé la **pluripotentialité** des cellules souches du liquide amniotique, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives thérapeutiques ((De Coppi et al., 2007); Annexe #1).

3. Cellules souches adultes

La plupart voire tous les tissus de l'organisme sont renouvelés pendant la vie (homéostase). Les études menées afin de comprendre les mécanismes favorisant cette régénération des cellules vieillissantes ou lésées, ont révélé la présence de cellules souches au sein des tissus adultes et ce de manière beaucoup plus étendue que ce qui était initialement pressenti (Figure I-7).

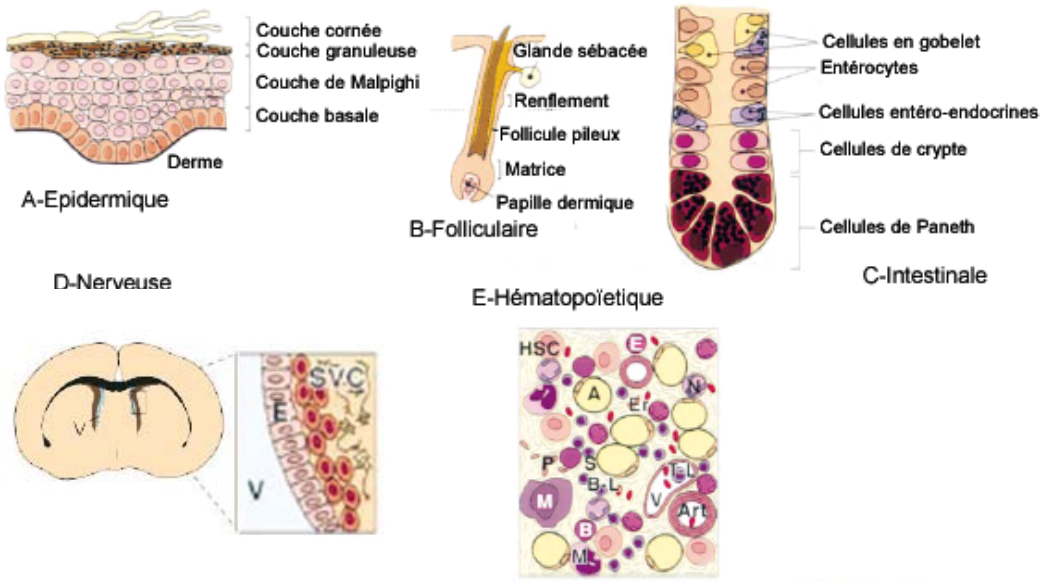


Figure I-7 : Exemples de niches de cellules souches adultes

Chez l'adulte, les cellules souches se regroupent dans des zones précises d'un tissu donné. Elles constituent ainsi des niches caractéristiques des cellules qu'elles contiennent. De telles niches ont été mises en évidence au niveau de :

(A) L'épiderme, dans la couche basale.
(B) Du renflement des follicules pileux
(C) De l'intestin (cellules de crypte)
(D) De la zone sous-ventriculaire du système nerveux central
(E) De la moelle osseuse du système hématopoïétique

Abbréviations : V, zone ventriculaire ; E, cellules épendymaires ; SVC, zone sous-ventriculaire ; HSC, cellules souches hématopoïétiques ; A, adipocytes ; M, mégacaryocyte ; T-L, lymphocyte T ; B-L, lymphocyte B ; B, basophile ; E, éosinophile ; N, neutrophile ; Er, érythrocytes ; S, cellules stromales ; V, veine ; Art, artère.

(D'après Fuchs and Segre, 2000)

Jusqu'à présent, chez l'homme, des cellules souches **nerveuses** (Eriksson et al., 1998; Kirschenbaum et al., 1994), **hématopoïétiques** (Kuznetsov et al., 2001; Morrison et al., 1995), **épidermiques** (Rochat et al., 1994), **intestinales** (Potten and Loeffler, 1990; Potten and Morris, 1988; Slack, 2000), **osseuses** (Owen, 1988; Pittenger et al., 1999), **musculaires** (Cossu et al., 1985; Mouly et al., 1993), **pancréatiques** et **hépatobiliaires** (Sell, 1990; Thorgeirsson, 1993) ont déjà pu être identifiées.

4. Précurseurs

Ne pouvant pas être considérés comme des cellules souches au sens strict du terme, il convient néanmoins de mentionner les **cellules progénitrices** ou **précurseurs.** Elles sont issues de la division asymétrique des cellules souches (Figure I-1) et ont déjà acquis un certain degré de spécialisation : leur potentiel de prolifération et de différenciation est donc moins important que celui des cellules souches. Cependant, elles vont encore subir un certain nombre de divisions avant de se différencier définitivement (modifications génétiques et épigénétiques*) en cellules spécialisées. Ces intermédiaires sont physiologiquement fonctionnels et peuvent dans certains cas, être utilisés pour pallier un déficit transitoire d'un organe ou d'un tissu. Les cellules musculaires (dites satellites), les cellules hématopoïétiques, les hépatocytes fœtaux ou certains neuroblastes appartiennent à cette catégorie.

Les cellules souches apparaissent de plus en plus comme « l'outil du futur » pour le traitement d'un grand nombre de maladies. Leurs propriétés offrent de nouveaux espoirs, aussi bien en thérapie cellulaire pour remplacer les cellules lésées de l'organisme, qu'en thérapie génique *ex vivo* pour exprimer des molécules d'intérêt à un site donné.
En particulier, les promesses apportées par les cellules souches nerveuses dans les applications thérapeutiques ((Dunnett and Bjorklund, 1999)), associées à l'attrait scientifique inhérent aux cellules multipotentes (Le Belle and Svendsen, 2002; Ostenfeld and Svendsen, 2003), ont fait des cellules souches nerveuses foetales le coeur de l'intérêt croissant porté aux cellules souches.

II. Cellules souches nerveuses fœtales humaines et Thérapie cellulaire du système nerveux central

La thérapie cellulaire consiste à réparer un organe ou un tissu lésé en y implantant des cellules capables de pallier partiellement ou totalement le dysfonctionnement. Cette stratégie est une alternative aux greffes d'organe et est directement liée aux avancées touchant les cellules souches. Ainsi, dès les années 70, les cellules souches hématopoïétiques permettaient de traiter, chez l'homme, des affections du sang telles que les leucémies.

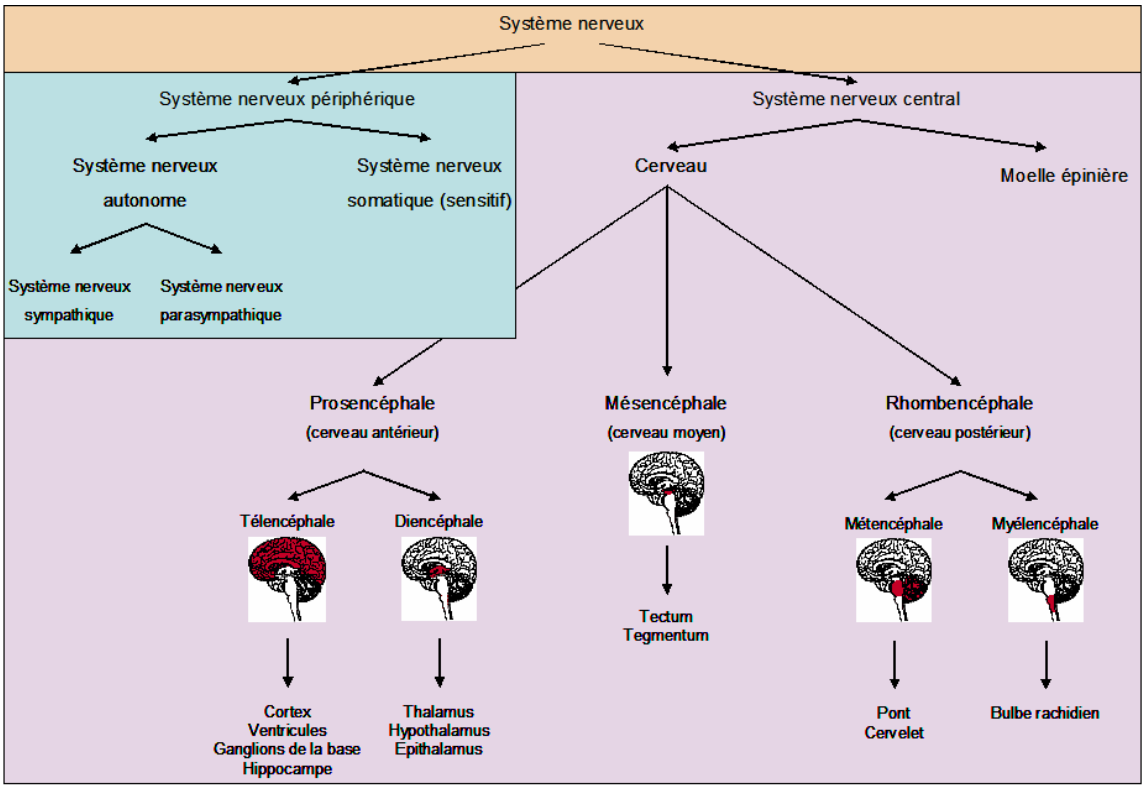


Figure I-8 : Structure du système nerveux

Aujourd'hui, ces transplantations se sont largement développées aux autres tissus et un certain nombre a déjà fait ses preuves en usage clinique : greffe de cellules de peau pour le traitement des grands brûlés (Berthod and Damour, 1997), greffe de cellules neuronales d'origine fœtale dans le cas de la maladie de Parkinson (Lindvall et al., 1989) ou dans le cas de la maladie de Huntington (Bachoud-Levi et al., 2000), greffe d'îlots de Langerhans* chez un patient diabétique (Shapiro et al., 2000), greffe de cellules souches musculaires chez un patient insuffisant cardiaque (Menasche et al., 2001)... Les résultats obtenus récemment dans les modèles animaux laissent encore présager un élargissement du champ thérapeutique. Les

perspectives les plus prometteuses concernent notamment le système nerveux central (SNC ; Figure I-8), en particulier pour les lésions de la moelle épinière et les maladies neurodégénératives (maladie d'Alzheimer, maladie de Huntington, sclérose en plaque, épilepsie…).

Connaître les cellules souches les plus adaptées au traitement des pathologies et savoir cultiver, amplifier, différencier et greffer ces cellules est donc devenu une étape indispensable pour accentuer l'essor avéré de la médecine régénératrice.

A. Atouts des cellules souches nerveuses fœtales

Les différentes catégories de cellules souches connues à ce jour et énumérées dans la partie « Source d'obtention des cellules souches » présentent chacune des propriétés originales et caractéristiques qui font d'elles des cellules candidates plus ou moins appropriées pour le traitement des lésions du SNC et des maladies neurodégénératives.

Les **cellules ES** prolifèrent de manière intensive et ont la capacité d'engendrer des cellules dérivant des trois feuillets embryonnaires* primitifs (Itskovitz-Eldor et al., 2000; Reubinoff et al., 2000). Cependant, leur différenciation *in vitro* désorganisée et variable au sein d'une même culture (Itskovitz-Eldor et al., 2000), associée à la formation fréquente de tumeurs lors de greffes dans le SNC (Molcayni et al., 2007) limitent leurs applications médicales. De plus, la technologie des cellules ES est nettement moins bien maîtrisée chez l'homme qu'elle ne l'est chez la souris (Amit et al., 2000; Odorico et al., 2001), attendu que des questions éthiques fondamentales telles que le clonage thérapeutique ou le problème des embryons surnuméraires, sont au centre de débats internationaux qui ralentissent les avancées potentielles et sont encore loin d'être résolus.

Les **cellules EG** sont équivalentes d'un point de vue fonctionnel aux cellules ES (Matsui et al., 1992), à l'exception de la formation de tératomes*. Cependant, les résultats obtenus avec ces cellules sont très variables selon l'âge et l'état du fœtus, et leur prolifération à long terme est compromise par l'instabilité de leur génome (Liu et al., 2004a; Turnpenny et al., 2003). Leur potentiel en thérapie cellulaire est donc très restreint.

Les **cellules nerveuses extraites de tissus adultes** semblent avoir une plus grande plasticité cellulaire qu'initialement pressenti (Bjornson et al., 1999; Clarke et al., 2000; Galli et al., 2000a). Cependant, leur présence dans l'organisme en faible quantité, leur accès difficile (stratégie de récolte invasive) (Fuchs and Segre, 2000) et leur amplification incertaine constituent des obstacles à leur utilisation *in vivo*.

Comparativement aux autres cellules souches, les **cellules nerveuses extraites de tissus fœtaux,** ou cellules neuroépithéliales fœtales, présentent un certain nombre d'avantages non négligeables pour le traitement des maladies neurodégénératives. Elles ont la particularité, comme chez le rongeur, d'être déjà partiellement orientées dans la voie de différenciation nerveuse (Davis and Temple, 1994; Williams et al., 1991). *In vitro*, elles peuvent être amplifiées, différenciées dans les trois lignages cellulaires principaux du SNC (neurones, astrocytes et oligodendrocytes) (Buc-Caron, 1995; Carpenter et al., 1999) et transduites avec différents types de vecteurs* tels que les AAV (Wu et al., 2002), les vecteurs adénoviraux (Corti et al., 1999; Sabate et al., 1995), rétroviraux (Flax et al., 1998), lentiviraux (Buchet et al., 2002b; Englund et al., 2000; Tamaki et al., 2002), ou baculoviraux (Sarkis et al., 2000). *In vivo*, un grand nombre d'expériences ont révélé le potentiel de ces cellules à survivre, migrer et se différencier après greffe chez l'animal (Buchet et al., 2002a; Flax et al., 1998; Fricker et al., 1999; Sabate et al., 1995). Elles apparaissent désormais comme un moyen efficace de remplacer des tissus nerveux lésés ou de transporter des gènes d'intérêt dans le SNC. D'autre part, l'utilisation de cellules fœtales humaines est moins soumise à controverse que celle des cellules ES humaines. Cette « tolérance » émane vraisemblablement du fait que les fœtus sont obtenus après IVG et qu'ils étaient considérés, encore récemment, comme des déchets post-opératoires.

Les cellules souches nerveuses fœtales humaines apparaissent donc comme l'outil approprié pour étudier, anticiper et optimiser le comportement des cellules lors de transplantations dans le SNC.

B. Caractéristiques des cellules souches nerveuses fœtales humaines in vitro et in vivo

1. Mise en culture et amplification

La méthode de mise en culture la plus couramment utilisée consiste à disséquer les vésicules télencéphaliques fœtales et à dissocier les cellules qui les constituent. Les précurseurs multipotents ainsi isolés sont ensuite amplifiés dans un milieu standard (DMEM/F12) en présence d'agents mitogènes (en général bFGF, EGF et/ou LIF) qui vont stimuler leur prolifération et leur maintien à l'état indifférencié (Buc-Caron, 1995). Les cultures peuvent être initiées sur substrat adhérent (Buc-Caron, 1995; Flax et al., 1998; Villa et al., 2000) ou en suspension sous forme de neurosphères* (Carpenter et al., 1999; Svendsen et al., 1998; Vescovi et al., 1999). Sur substrat adhérent, les cellules sont en général maintenues dans un état indifférencié, alors qu'en suspension, les neurosphères sont composées de types cellulaires hétérogènes allant des plus immatures (cellules souches) aux plus différenciées (neurones, astrocytes et oligodendrocytes).

2. Différenciation

La différenciation *in vitro* des cellules souches nerveuses fœtales humaines peut être induite par retrait des **agents mitogènes** du milieu (Carpenter et al., 1999; Vescovi et al., 1999; Villa et al., 2000), par ajout de **sérum** (Buc-Caron, 1995), par exposition à des **facteurs** mimant le développement nerveux *in vivo* (différenciation « épigénétique* ») (Figure I-9) et engageant la différenciation vers un lignage particulier (Caldwell et al., 2001; Galli et al., 2000b), ou plus récemment, par surexpression de **gènes de différenciation** (Cao et al., 2006; Liste et al., 2004). Cette dernière méthode est de plus en plus développée car elle permet un contrôle plus efficace, plus précis et plus reproductible de la différenciation.

Facteurs solubles	*Rôle dans la biologie des cellules souches nerveuses foetales*	*Référence*
Facteurs régulateurs des cellules souches		
Bone Morphogenic Protein 4 (BMP4)	Différenciation gliale (astrocytes)	Finley et al, 1999
Notch1	Différenciation gliale (astrocytes)	Tanigaki et al, 2001, Stidworthy et al, 2004
Noggin	Devenir neuronal	Lim et al, 2000, Liem et al, 2000, Pluchino et al, 2005
Sonic Hedgehog (Shh)	Prolifération et maintien au niveau des niches Identité cellulaire et spécification (neuronale et oligodendrogliale)	Seifert et al, 2005, Liem et al, 2000, Rowitch et al, 1999, Lai et al, 2003, Machold et al, 2003
Médiateurs de l'inflammation		
CCL5	Prolifération	Krathwohl and Kaiser, 2004, Owens et al, 2005
CXCL12	Chimiotaxie	Reiss et al, 2002, Imitola et al, 2004, Krumbholz et al, 2006
CX_3CL1	Prolifération	Krathwohl and Kaiser, 2004, Owens et al, 2005
Interleukine-1β (IL-1β)	Devenir neuronal (neurones dopaminergiques)	Aloisi et al, 2000, Storch et al, 2001, Riaz et al, 2004
Interleukine-6 (IL-6), famille des cytokines neurotrophiques (LIF, CNTF, CT-1)	Différenciation gliale (astrocytes)	Aloisi et al, 2000, Barnabe-Heider et al, 2005
Facteurs de croissance		
Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF)	Survie et différenciation (progéniteurs neuronaux)	Ahmed et al, 1995, Stadelmann et al, 2002
Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF)	Survie et différenciation (progéniteurs neuronaux)	Emsley and Hagg, 2003, Albrecht et al, 2003
Erythropoïétine	Différenciation (précurseurs neuronaux)	Shingo et al, 2001, Wang et al, 2004
Glial-Derived Neurotrophic Factor (GDNF)	Survie et différenciation (neurones dopaminergiques et précurseurs neuronaux)	Roussa and Krielgstein, 2004, Vargas-Leal et al, 2005
Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)	Prolifération (neurones et précurseurs oligodendrocytaires) et chimiotaxis	Forsberg-Nilsson et al, 1998, Kondo and Raff, 2000, Erlandsson et al, 2001
Transforming Growth Factor-β (TGF-β)	Spécification du devenir cellulaire (neuronal)	Kiefer et al, 1996, Galter et al, 1999
Vascular-Endothelial Growth Factor-α (VEGF-α)	Prolifération et chimiotaxis	Schanzer et al, 2004, Zhang et al, 2003

Figure I-9 : Exemples de facteurs solubles impliqués dans la biologie des cellules souches nerveuses.

Abbréviations : CCL/CXCL/CX_3C, ligand des chimiokines ; LIF, Leukemia Inhibitory Factor ; CT-1, Cardiotrophine-1

D'après Martino and Pluchino, 2006

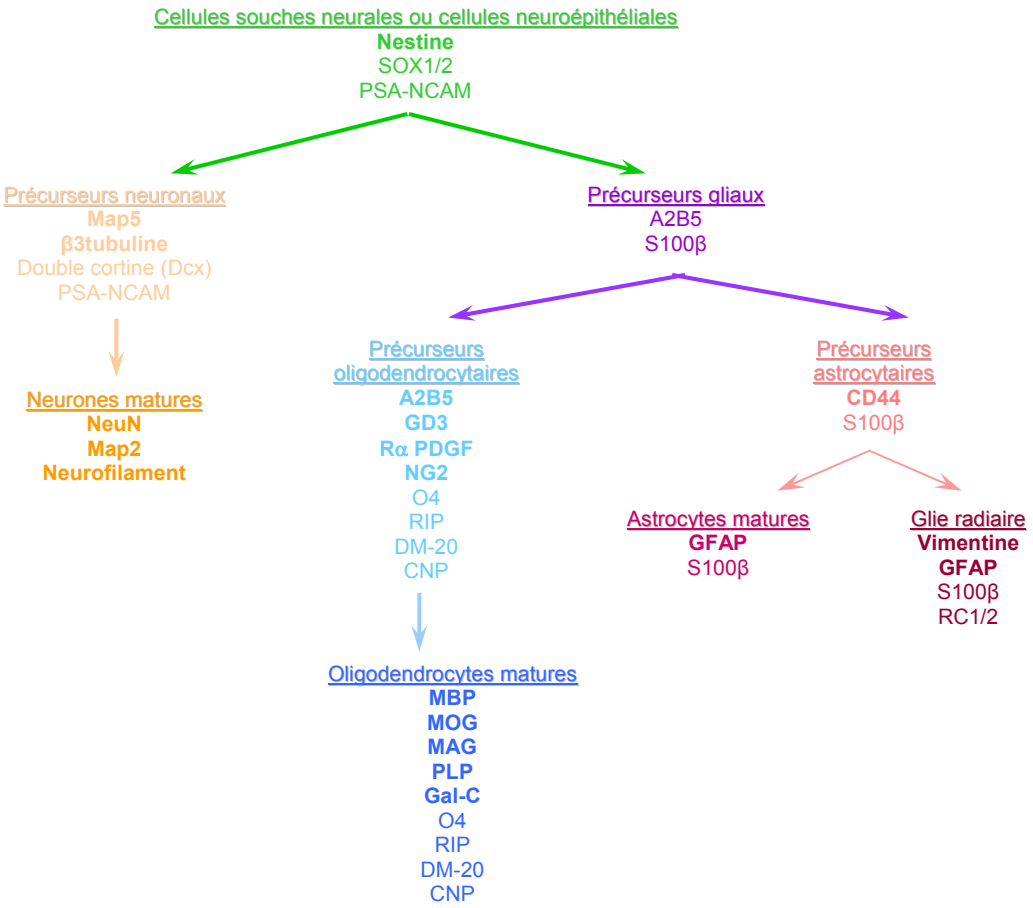


Figure I-10 : Marqueurs cellulaires des différents lignages du SNC

Abbréviations : PSA-NCAM, Polysialylated-Neural Cell Adhesion Molecule ; O4, glycolipide ; GD3, GD3, ganglioside ; Rα PDGF, récepteur α du facteur de croissance dérivé des plaquettes ; NG2, protéoglycane de la chondroïtine sulfate ; CNP, phosphodiestérase des nucléotides cycliques ; MBP, protéine basique myélinique ; MOG, glycoprotéine des oligodendrocytes myélinisants ; MAG, glycoprotéine associée à la myéline ; PLP, protéine protéolipidique ; Gal-C, galactocérébroside ; GFAP, protéine acide fibrillaire gliale.

Le suivi de la différenciation des cellules souches en culture est fondé sur l'expression de protéines définissant un type cellulaire précis et apportant des informations sur le stade de développement des cellules. Le phénotype* cellulaire est donc analysé par immunocytochimie à l'aide d'anticorps dirigés contre ces différents marqueurs. Par exemple, l'expression de la protéine de filament intermédiaire* **nestine*** caractérise les cellules souches neuroépithéliales isolées à partir de tissus fœtaux (Cattaneo and McKay, 1990). De la même manière, l'expression de la protéine associée aux microtubules de type V (**Map5**) (Huber and Matus, 1984b; Ohyu et al., 1997; Riederer et al., 1986) ou de la β-tubuline de type III (**β3tubuline**) (Menezes and Luskin, 1994) caractérise le lignage neuronal précoce, tandis que l'expression de la protéine associée aux microtubules de type II (**Map2**) (Huber and Matus, 1984a) caractérise le lignage neuronal plus mature. L'expression de la protéine

fibrillaire gliale acide (**GFAP***) caractérise le plus souvent le lignage astrocytaire (Eng et al., 2000; Reske-Nielsen et al., 1987). Enfin, l'expression de gangliosides mis en évidence par l'anticorps anti-**A2B5** (Raff et al., 1983) ou de galactolipides mis en évidence par l'anticorps anti-**O4** (Sommer and Schachner, 1981) caractérise majoritairement le lignage oligodendrocytaire précoce, tandis que l'expression de l'enzyme **CNPase** (Sprinkle et al., 1987) caractérise les oligodendrocytes terminaux. Cette liste de marqueurs n'est évidemment pas exhaustive (Figure I-10) et un grand nombre de marqueurs font double emploi en désignant les mêmes populations. Cependant, le manque de fiabilité d'un certain nombre de molécules, qui ne sont pas entièrement spécifiques d'un lignage et d'un stade donnés, peut conduire à une mauvaise interprétation de la caractérisation des cellules et de l'orientation de leur différenciation (Hayman et al., 2006). Il est donc indispensable de rester prudent dans l'analyse des résultats.

Les populations nerveuses en culture primaire qui sont capables d'engendrer à la fois des neurones et des cellules gliales après de longues périodes *in vitro* ont également été explorées en tant que source potentielle de tissu nerveux pour les transplantations dans le SNC.

3. Greffes de cellules souches nerveuses fœtales humaines

Des greffes de cellules souches nerveuses fœtales humaines ont été réalisées dans le cerveau sain de rongeur (rat et/ou souris) au stade embryonnaire (Brustle et al., 1998), post-natal (Englund et al., 2002; Flax et al., 1998; Rosser et al., 2000) et adulte (Buchet et al., 2002a; Fricker et al., 1999). Quel que soit le stade de développement, les cellules migrent à travers l'ensemble du cerveau, s'intègrent sans perturber l'organisation cellulaire et se différencient en fonction de leur site d'intégration. Chez l'adulte, les cellules acquièrent un phénotype préférentiellement neuronal dans les zones de neurogenèse* et préférentiellement astrocytaire dans les zones non neurogéniques (Fricker et al., 1999). Ainsi, les cellules souches nerveuses fœtales humaines présentent les caractéristiques nécessaires pour mener à bien une stratégie de greffe efficace, à savoir une survie à long-terme et une intégration au sein des tissus de l'hôte.

L'étape suivante, consistant à évaluer leur capacité à remplacer des cellules endommagées, se place dans une perspective de médecine régénérative. Ainsi, des transplantations de cellules souches nerveuses fœtales humaines dans le SNC lésé de rongeur ou de primate non humain ont montré des améliorations significatives dans des modèles de maladies telles que l'attaque vasculaire cérébrale (Chu et al., 2004c; Kelly et al., 2004; Roitberg et al., 2006), la maladie

de Parkinson (Liker et al., 2003; Rafuse et al., 2005; Svendsen et al., 1996), la maladie de Huntington (Armstrong et al., 2000; Lee et al., 2005; McBride et al., 2004), les lésions de la moelle épinière (Cummings et al., 2005; Iwanami et al., 2005; Tarasenko et al., 2007) ou l'épilepsie (Chu et al., 2004b). Globalement, les cellules survivent de façon prolongée, migrent spécifiquement en direction des régions ciblées par la lésion, se différencient et établissent des connexions permettant une récupération fonctionnelle partielle (Figure I-11). Ces résultats encourageants sont l'étape initiale conduisant à de potentielles applications cliniques futures. Cependant, ils doivent être nuancés.

Maladie	Modèle animal	Remplacement des cellules lésées	Intrégation/ Etablissement de connections	Récupération fonctionnelle	Référence
Attaque Vasculaire Cérébrale	Occlusion de l'artère cérébrale médiane	+	+	Non testée	Kelly et al, 2004
Maladie de Parkinson	Induite par le MPTP	-	Non testé	Non testée	Liker et al, 2003
Maladie de Parkinson	Induite par la 6-OHDA	+	Non testé	Amélioration	Svendsen et al, 1997
Maladie de Parkinson	Induite par la 6-OHDA	-	+	Amélioration	Rafuse et al, 2005
Maladie de Huntington	Induite par l'acide quinolinique	+/-	+	Amélioration	McBride et al, 2004
Lésion de la moelle épinière	Contusion	+	Non testé	Amélioration	Cummings et al, 2005
Lésion de la moelle épinière	Contusion	+	Non testé	Amélioration	Hofstetter et al, 2005
Epilepsie	Induite par injection de chlorure de lithium et de pilocarpine	+	Non testé	Amélioration	Chu et al, 2004

Figure I-11 : Etudes de transplantation de cellules souches nerveuses fœtales dans des modèles de lésion du SNC

Abbréviations : MPTP, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine ; 6-OHDA, 6-hydroxydopamine.

D'après Martino et Pluchino, 2006

Un grand nombre de paramètres semblent influencer la survie, la migration et/ou la différenciation des cellules lors des transplantations. Parmi ces paramètres, on peut citer l'âge du fœtus, la nature et la durée d'exposition des cellules aux agents mitogènes, la durée d'amplification *in vitro* (Zietlow et al., 2005), le statut des cellules greffées (dissociées ou en neurosphères), le nombre de cellules utilisées pour la greffe, le site d'injection (l'environnement joue un rôle primordial), le modèle expérimental considéré, le délai entre l'initiation de la lésion et la greffe… Cette liste n'est pas exhaustive mais, au sein de celle-ci, l'hétérogénéité cellulaire apparaît clairement comme l'une des causes principales de variabilité.

Dans la majorité des travaux cités ci-dessus, les cellules utilisées sont des cultures primaires de cerveau fœtal humain amplifiées *in vitro* pendant un temps plus ou moins long et greffées sans modifications préalables. Les populations sont donc constituées d'un mélange hétérogène et variable de cellules immatures, de cellules partiellement engagées dans une voie de différenciation et de cellules matures de lignages différents et/ou de sous-types cellulaires différents. Cet ensemble hétéroclite répond de manière inégale aux signaux environnementaux du SNC lors des transplantations. Non seulement la discrimination de l'effet de tel ou tel type cellulaire comparativement à tel autre est impossible, mais la reproductibilité de l'expérience est également compromise. L'utilisation clinique potentielle des cellules nécessite donc une standardisation des protocoles, c'est-à-dire la mise au point de méthodes systématiques pour enrichir les populations en un type cellulaire d'intérêt.

Homogénéiser les cellules à greffer permet, dans certains cas, de réduire la variabilité, mais aussi et surtout de contrôler plus précisément le phénotype terminal des cellules transplantées et d'obtenir un nombre significatif de cellules fonctionnelles. Des travaux ont en effet démontré que les cellules prédifférenciées répondaient de manière plus efficace que les cellules neuroépithéliales immatures lors de transplantations (Lepore et al., 2004). D'autre part, les cellules restreintes à un lignage particulier survivent mieux, migrent de façon sélective, s'intègrent activement dans le SNC et limitent les effets délétères (tels que le sprouting ou l'allodynie) liés à l'intégration superflue de cellules des autres lignages (Andressen et al., 2001; Han et al., 2002; Hofstetter et al., 2005; Muramatsu et al., 2005; Windrem et al., 2004). Chacune de ces études recourt à des procédés différents et ne poursuit pas non plus le même objectif. Par exemple, Windrem cherche à sélectionner certaines cellules en particulier, les cellules A2B5+ (Windrem et al., 2004), alors que Hofstetter s'applique à éliminer un sous-type indésirable, les cellules astrocytaires (Hofstetter et al., 2005). Pourtant, les résultats obtenus s'accordent pour conclure que des transplantations de populations homogènes conduisent à une meilleure efficacité thérapeutique.
Ainsi, mettre en place des systèmes simples et efficaces pour se procurer les phénotypes cellulaires désirés et systématiser leur obtention à partir des cellules souches et progénitrices nerveuses fœtales en culture s'avère désormais nécessaire. Une telle recherche a donc fait l'objet de mon travail de thèse au sein du LGN.

III.Homogénéisation des populations cellulaires

Au cours de ma thèse, deux stratégies ont été envisagées afin d'homogénéiser les populations de cellules souches et progénitrices nerveuses fœtales à greffer. La première méthode consiste à orienter la différenciation des cellules vers un lignage voire un sous-type cellulaire donné par surexpression de gènes de développement impliqués dans le devenir neuronal versus glial des progéniteurs nerveux. La deuxième méthode cherche à sélectionner les cellules d'un lignage précis par expression de protéines rapportrices sous le contrôle de promoteurs spécifiques des différents lignages du SNC. Chacune de ces stratégies est fondée sur l'utilisation de vecteurs lentiviraux.

A. Orientation de la différenciation des cellules souches en culture

1. Justification de la stratégie

Au cours du développement du système nerveux central de mammifère, les progéniteurs multipotents produisent les cellules des trois lignages principaux –neurones, astrocytes et oligodendrocytes- à des temps et dans des endroits spécifiques (Temple, 2001). En général, la différenciation neuronale a lieu à des stades embryonnaires précoces (les marqueurs neuronaux sont détectés chez la souris à partir de E12 et affichent un pic à E15) alors que les deux autres lignages apparaissent plus tardivement (les marqueurs astrocytaires sont exprimés à partir de E16 et les oligodendrocytes matures émergent au stade post-natal). La détermination du devenir cellulaire a donc été décrite comme un choix binaire « neurone versus glie ». Dans notre stratégie d'orientation de la différenciation des progéniteurs nerveux fœtaux humains, l'étape critique réside, dès lors, dans la décision d'engendrer des cellules neuronales par opposition à des cellules gliales.

Des systèmes fondés sur des modèles développementaux ont récemment été élaborés pour orienter le devenir des cellules. Un certain nombre de protocoles a été établi *in vitro* pour engendrer des précurseurs neuronaux plutôt que gliaux et inversement, à partir de cellules ES principalement (Brustle et al., 1999; Li et al., 1998; Mujtaba et al., 1999; Okabe et al., 1996), mais également à partir de cellules souches neuroépithéliales (Johe et al., 1996; Kalyani et al.,

1998; Mayer-Proschel et al., 1997). En outre, la différenciation *in vitro* de ces différentes classes de cellules a pu être poussée jusqu'au phénotype terminal. Ainsi, les **cellules ES** ont été spécialisées en neurones dopaminergiques (Lee et al., 2000), en neurones sérotoninergiques (Kim et al., 2002), en motoneurones (Wichterle et al., 2002) ou en neurones GABAergiques (Barberi et al., 2003), tandis que les **cellules neuroépithéliales** ont surtout produits des neurones dopaminergiques (Riaz et al., 2004; Storch et al., 2001) et des oligodendrodytes (Danesin et al., 2006). Les conditions permettant d'enrichir ces cultures en un sous-type neuronal précis ont été essentiellement choisies sur la base d'une exposition séquentielle à des signaux épigénétiques* (facteurs solubles tels que l'acide rétinoïque, Shh, BDNF, GDNF, IL-1, LIF…), qui miment le développement nerveux *in vivo* (Figure I-8). Ces protocoles de différenciation sont efficaces mais relativement lourds et fastidieux à mettre à place. Une autre technique permettant de contourner ces inconvénients consiste à amorcer la différenciation en surexprimant *in vitro* des gènes du développement.

Des cellules d'origines variées ont déjà permis d'expérimenter ce procédé. Par exemple, des précurseurs nerveux dérivant de la surexpression du gène Nurr1* dans des cellules ES de souris sont positifs pour la tyrosine hydroxylase (Kim et al., 2007; Kim et al., 2003a; Kim et al., 2003b). De même, des cultures de cellules souches nerveuses de rat ou de souris adultes transduites avec un vecteur rétroviral exprimant le gène Ngn2, empruntent à 90% une voie neuronale (Falk et al., 2002; Hofstetter et al., 2005). Ou encore la transduction d'une lignée de cellules souches nerveuses de souris avec un vecteur rétroviral surexprimant le gène Ngn1 conduit à l'apparition d'un phénotype GABAergique majoritaire (Muramatsu et al., 2005). Enfin, la surexpression du gène Bcl-X_L dans des cellules souches nerveuses fœtales humaines induit la formation de neurones dopaminergiques (Liste et al., 2004). Cette nouvelle stratégie apporte des résultats intéressants et a motivé notre choix de tester et de comparer les effets, sur la différenciation des **cellules souches nerveuses fœtales humaines en culture**, de différents gènes du développement connus pour jouer un rôle dans la spécialisation neuronale : les **gènes proneuraux** (Nieto et al., 2001).

2. Orientation de la différenciation : les gènes proneuraux

a) Historique

Les premières études relatives aux gènes proneuraux remontent à la deuxième moitié du XXe siècle. A la fin des années 70, un groupe de gènes impliqué dans la régulation des premières

étapes du développement nerveux a été identifié chez la drosophile (Garcia-Bellido, 1979). L'analyse moléculaire a permis d'isoler 4 gènes différents, *achaete* (*ac*), *scute* (*sc*), *lethal of scute* (*lsc*) et *asense* (*ase*) (Gonzalez et al., 1989; Villares and Cabrera, 1987) et a révélé une structure commune, un domaine « **basic Helix-Loop-Helix** » (bHLH ou hélice-boucle-hélice basique), pour l'ensemble de ces gènes (Murre et al., 1989). Le gène *atonal* (*ato*) s'est ajouté plus tardivement à cette liste (Jarman et al., 1993).

Sur la base de la conservation de séquences entre les espèces (Figure I-12), des gènes homologues ont ensuite été découverts chez les vertébrés puis clonés (Guillemot, 1999; Lee, 1997). Parmi ces gènes, on peut citer en particulier :

- le gène de la protéine ***Neurogénine 1*** (ou Ngn1 ou Neurog1 ou Neurogenic Differentiation Factor 3 ou NeuroD3 ou Math4C) identifié pour la première fois chez les vertébrés (homme et souris) en 1996 (Ma et al., 1996; McCormick et al., 1996).
- le gène de la protéine ***Neurogénine 2*** (ou Ngn2 ou Neurog2 ou Math4A ou Atoh4) identifié pour la première fois chez les vertébrés en 1996 (Gradwohl et al., 1996).
- le gène de la protéine ***Neurogénine 3*** (ou Ngn3 ou Relax ou Math4B ou Atoh5) identifié pour la première fois chez les vertébrés (souris) en 1996 (Gradwohl et al., 1996; Sommer et al., 1996). En parallèle, une équipe de notre laboratoire a isolé le gène équivalent chez le rat en 1997 (Ravassard et al., 1997).
- le gène de la protéine ***Ash1*** (ou Achaete-Scute complex Homolog-like 1 ou Ascl1) cloné pour la première fois chez les mammifères (rat) en 1990 (Johnson et al., 1990). Le gène de souris a été identifié en 1991 (Lo et al., 1991) et le gène humain en 1993 (Ball et al., 1993). Le gène *ash1* est présent dans toutes les espèces analysées et porte un nom correspondant pour chacune d'entre elles (*mash1* chez la souris, *hash1* chez l'homme, *cash1* chez le poulet et *xash1* chez le xénope).

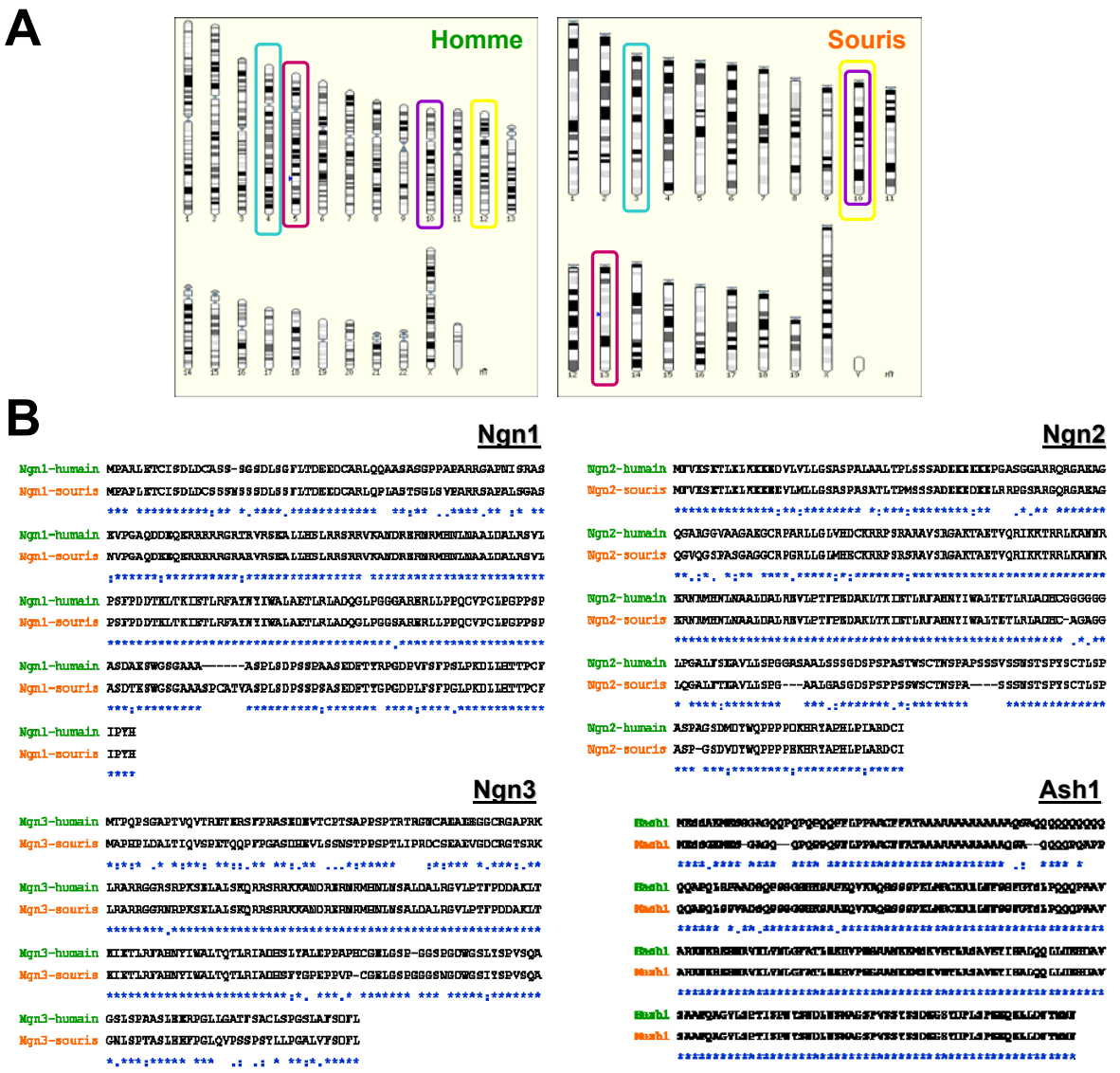


Figure I-12 : Comparaison des facteurs proneuraux humains et de souris

(A) Localisation chromosomique

Le gène Ngn1 (cadre rouge) est localisé sur le chromosome 5 chez l'homme et sur le chromosome 13 chez la souris.
Le gène Ngn2 (cadre bleu) est localisé sur le chromosome 4 chez l'homme et sur le chromosome 3 chez la souris.
Le gène Ngn3 (cadre violet) est localisé sur le chromosome 10 chez l'homme et chez la souris.
Le gène Ash1 (cadre jaune) est localisé sur le chromosome 12 chez l'homme et sur le chromosome 10 chez la souris.

(B) Comparaison des séquences protéiques humaines et de souris par alignement multiple

La séquence protéique correspondant au gène Ngn1 comporte 237 acides aminés chez l'homme et 244 acides aminés chez la souris.
La séquence protéique correspondant au gène Ngn2 comporte 272 acides aminés chez l'homme et 263 acides aminés chez la souris.
La séquence protéique correspondant au gène Ngn3 comporte 214 acides aminés chez l'homme et chez la souris.
La séquence protéique correspondant au gène Ash1 comporte 236 acides aminés chez l'homme et 231 acides aminés chez la souris

Une classification a pu être établie en comparant les analogies et les différences au niveau de la séquence protéique du motif bHLH (Figure I-13 B). Les différents gènes sont ainsi regroupés en familles distinctes, telles que la famille Neurogénine (Ngn), la famille NeuroD ou la famille Olig (Figure I-13 A) (Lee, 1997; Lu et al., 2000; Zhou et al., 2000). Les membres d'une même famille partagent des propriétés biochimiques qui les distinguent des autres gènes proneuraux à domaine bHLH.

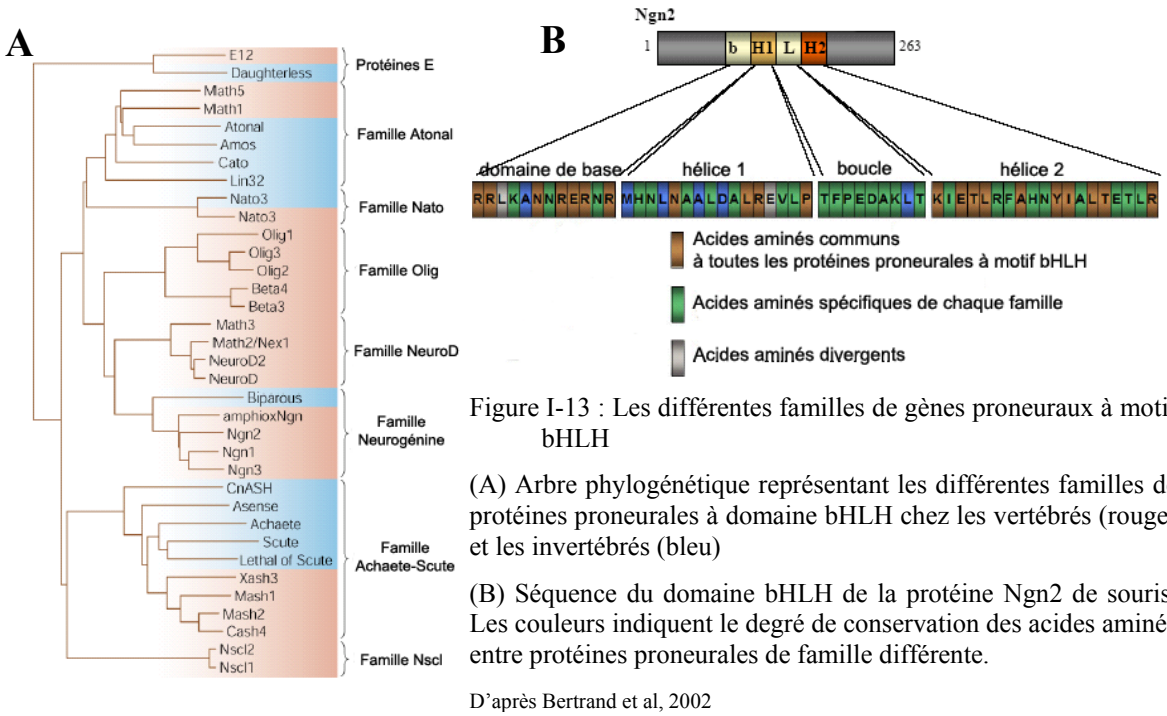


Figure I-13 : Les différentes familles de gènes proneuraux à motif bHLH

(A) Arbre phylogénétique représentant les différentes familles de protéines proneurales à domaine bHLH chez les vertébrés (rouge) et les invertébrés (bleu)

(B) Séquence du domaine bHLH de la protéine Ngn2 de souris. Les couleurs indiquent le degré de conservation des acides aminés entre protéines proneurales de famille différente.

D'après Bertrand et al, 2002

Des études ultérieures menées sur les gènes homologues de différentes espèces de vertébrés ont révélé un maintien non seulement des aspects structuraux mais également des aspects fonctionnels au cours de l'évolution. Pour un gène donné, la majorité des éléments de régulation sont conservés d'une espèce à l'autre parmi les vertébrés (Blader et al., 2004). Ceci indique qu'un gène proneural de souris, par exemple, peut fonctionner de façon identique dans des organismes aussi différents qu'une souris, un rat, un poisson zèbre, un poulet, un singe ou un homme.

b) Structure et propriétés biochimiques des gènes proneuraux

Les protéines proneurales présentent les caractéristiques communes à l'ensemble des protéines comportant un **motif bHLH** (Murre et al., 1989). Ce motif structural est classiquement rencontré dans la séquence protéique de molécules (facteurs de transcription*)

se liant à l'ADN sous forme dimérique* (Figure I-14 B). Cette structure se définit par deux **hélices α amphipathiques** (c'est-à-dire présentant des groupements chargés sur une face et neutres sur la face opposée) séparées par une **boucle polypeptidique** non structurée. L'assemblage en dimère s'effectue grâce à des interactions entre hélices amphipathiques de monomères distincts. Enfin, un **domaine basique**, situé du côté N-terminal de chacun des monomères, permet l'interaction de cette structure avec l'ADN (Figure I-14 A).

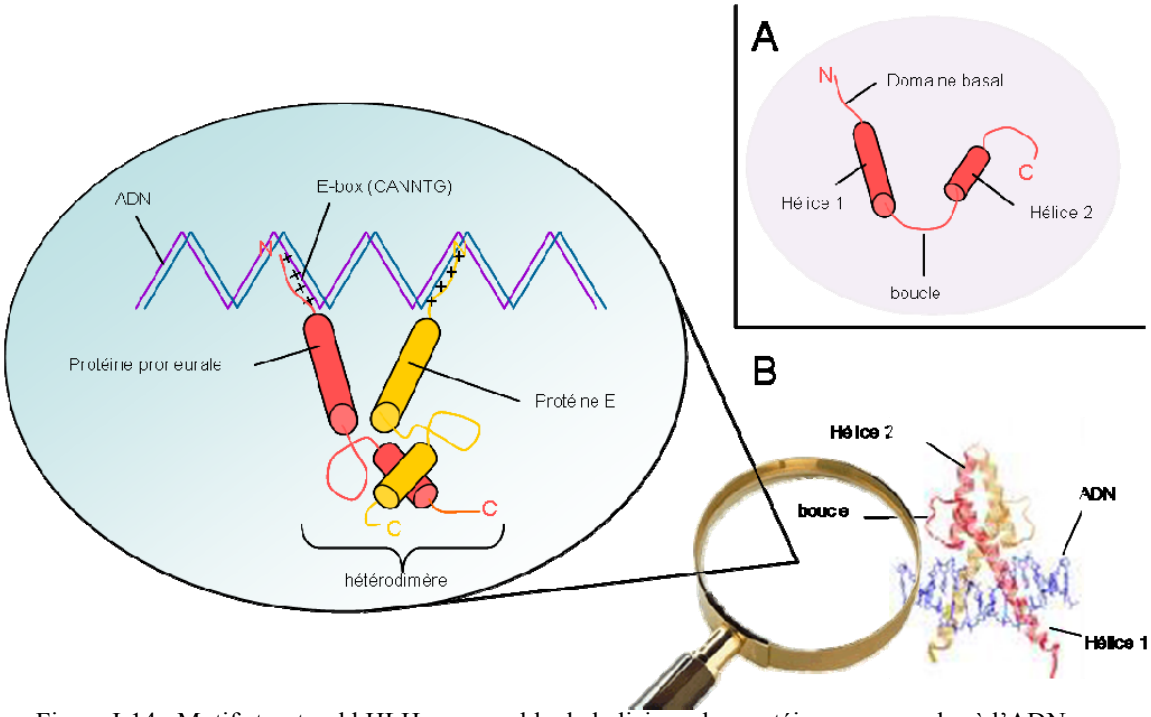


Figure I-14 : Motif structural bHLH responsable de la liaison des protéines proneurales à l'ADN

(A) Le motif bHLH comporte 2 hélices α amphipathiques séparées par une boucle polypeptidique non structurée. Le domaine basique situé en N-terminal permet l'interaction avec l'ADN.

(B) Deux chaînes protéiques différentes (protéine proneurale et protéine E) s'associent par l'intermédiaire d'interactions entre les hélices α pour former un hétérodimère. Des séquences d'acides aminés basiques situées en N-terminal de chaque monomère assurent la liaison à l'ADN au niveau de la séquence consensus CANNTG (E-box).

Dans le cas des protéines proneurales, la liaison à l'ADN s'effectue spécifiquement au niveau d'une séquence de 6 nucléotides CANNTG appelée la **boîte E** (ou « **E box** ») (Chien et al., 1996). D'autre part, cette fixation ne peut avoir lieu qu'à la condition que les complexes formés soient des **hétérodimères**. Pour jouer leur rôle de facteurs de transcription, les protéines proneurales vont donc s'associer à des protéines à domaine bHLH ubiquitaires*, les **protéines E** (Johnson et al., 1992; Massari and Murre, 2000), qui fonctionnent comme activateurs (Figure I-14 B). Chez les mammifères, ces protéines E peuvent être codées par 3

gènes différents : *E2A* (qui va ensuite donner E12 et E47), *HEB* et *E2-2* (Ellenberger et al., 1994).

Un certain nombre de molécules peuvent interférer avec l'activité des gènes proneuraux par l'intermédiaire de ces protéines E. Les facteurs d'inhibition de la différenciation ou **protéines Id** agissent en tant que répresseurs passifs. La présence d'un domaine HLH dans leur séquence leur confère une grande affinité pour les protéines E mais l'absence de domaine basique empêche leur liaison à l'ADN. Ainsi, ils entrent en compétition avec les protéines proneurales et séquestrent les protéines E en formant des hétérodimères qui ne peuvent pas se fixer à l'ADN (Yokota, 2001).

Les **protéines de vertébrés Hes, Her et Esr** constituent une autre famille d'inhibiteurs des gènes proneuraux (Kageyama and Nakanishi, 1997). En se fixant à l'ADN, elles empêchent les protéines proneurales de se fixer sur la boîte E et agissent ainsi comme des répresseurs classiques et directs de la transcription (Van Doren et al., 1994), mais elles peuvent également inhiber de manière indirecte l'activité proneurale en interférant avec la formation du complexe « protéine proneurale - protéine E » (Davis and Turner, 2001).

c) Rôle particulier des gènes Ngn1, Ngn2, Ngn3 et Mash1

Dans le contexte du développement de l'ectoderme (qui donne naissance au système nerveux) (Figure I-3), les gènes proneuraux constituent des éléments nécessaires et suffisants à l'apparition de progéniteurs engagés dans la voie de différenciation neuronale (Jan and Jan, 1994; Jimenez and Modolell, 1993). D'une manière générale, ils permettent d'amorcer la formation des lignages neuronaux, c'est-à-dire la **neurogenèse***. Leur action passe non seulement par le choix du devenir neuronal versus glial, mais également par la régulation de l'identité du sous-type neuronal formé à partir des progéniteurs nerveux.

Dans une stratégie d'orientation de la différenciation des cellules souches nerveuses fœtales humaines en culture, l'utilisation de gènes présentant de telles propriétés revêt tout son intérêt. Quatre de ces gènes se distinguent de manière singulière en tant que candidats potentiels à la surexpression. Les gènes Neurogénines (1, 2 et 3) et Mash1 s'avèrent, en effet, être des acteurs majeurs de la neurogenèse* et ont inévitablement attiré notre attention.

(1) Patrons d'expression

Les patrons d'expression des gènes Ngn1, Ngn2, Ngn3 et Mash1, observés **chez la souris**, suggèrent que ces gènes sont nécessaires dans différentes régions et à différents stades du

développement embryonnaire du système nerveux périphérique (SNP) et du système nerveux central (SNC).

(i) Localisation spatiale chez la souris

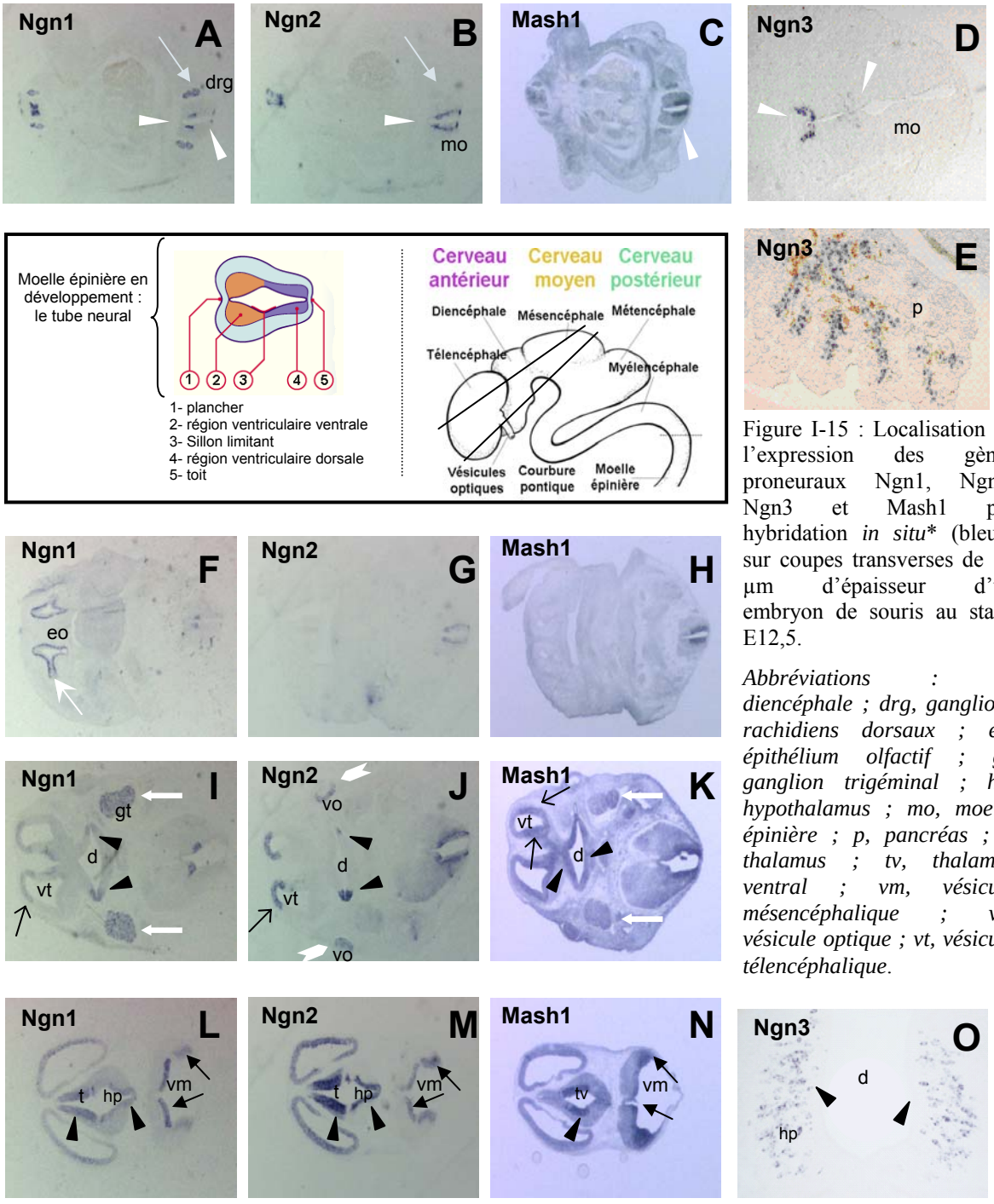


Figure I-15 : Localisation de l'expression des gènes proneuraux Ngn1, Ngn2, Ngn3 et Mash1 par hybridation *in situ** (bleue) sur coupes transverses de 14 µm d'épaisseur d'un embryon de souris au stade E12,5.

Abbréviations : d, diencéphale ; drg, ganglions rachidiens dorsaux ; eo, épithélium olfactif ; gt, ganglion trigéminal ; hp, hypothalamus ; mo, moelle épinière ; p, pancréas ; t, thalamus ; tv, thalamus ventral ; vm, vésicule mésencéphalique ; vo, vésicule optique ; vt, vésicule télencéphalique.

*Dans le **système nerveux périphérique** (SNP), l'expression des gènes Ngn est restreinte aux ganglions rachidiens sensitifs (ou Dorsal Root sensory Ganglia ou DRG) (Figures I-15 A et B) (Ma et al., 1996; Sommer et al., 1996), alors qu'à l'inverse, l'expression de Mash1 se

limite aux ganglions sympathiques, parasympathiques ou entériques du système nerveux autonome (Figure I-15 C) (Lo et al., 1991).
Notons qu'au niveau périphérique, le gène Ngn3 est principalement exprimé dans les précurseurs des cellules insulaires du pancréas (Ravassard et al., 1997; Sommer et al., 1996) (Figure I-15 E).

* Dans la **moelle épinière**, les gènes Ngn1 et Ngn2 sont très fortement exprimés dans la zone ventriculaire (ZV) du tube neural au niveau de deux zones bien distinctes (Figures I-15 A et B) : la première constitue une bande adjacente au toit du tube neural dorsal et la seconde est une région assez vaste du tube neural ventral (Sommer et al., 1996). Le domaine d'expression de Ngn2 au niveau du tube neural dorsal s'étend plus largement que celui de Ngn1.
Le gène Ngn3 est exprimé dans une région très restreinte de la moelle épinière située dans le tube neural ventral, juste à la limite du plancher (Sommer et al., 1996) (Figure I-15 D). Un second domaine dorsal montre une expression plus faible de Ngn3. Ce domaine se superpose avec ceux de Ngn1 et Ngn2.
Le gène Mash1 est exprimé dans la zone ventriculaire au niveau d'un territoire localisé entre les deux domaines d'expression des gènes Ngn 1 et 2 (Figure I-15 C), c'est-à-dire dans une région majoritairement dorsale (Sommer et al., 1996). L'expression combinée de Mash1 et des Ngn recouvre donc l'essentiel de la zone ventriculaire de la moelle épinière.

* Au cours du développement, les quatre facteurs bHLH, Ngn1, 2, 3 et Mash1, sont exprimés au niveau du **cerveau antérieur** (Guillemot and Joyner, 1993; Lo et al., 1991; Sommer et al., 1996) (Figures I-15 F-O).
Dans le télencéphale, leur expression est localisée dans la zone ventriculaire, où les progéniteurs commencent leur différenciation. De façon intéressante, les gènes Ngn sont exprimés au niveau du télencéphale dorsal qui donne naissance au cortex (Figures I-15 I et J), alors que le gène Mash1 est principalement exprimé dans le télencéphale ventral (Figure I-15 K) à partir duquel sont formés les ganglions de la base (Ma et al., 1997). Au niveau du neuroépithélium cortical, Ngn1 et 2 sont exprimées dans des régions identiques mais l'intensité d'expression de Ngn1 est très inférieure à celle de Ngn2.
Dans les autres régions du cerveau antérieur telles que l'épithélium olfactif (Figures I-15 E, F et G) ou le diencéphale (Figures I-15 I-O) (Ma et al., 1996), l'expression des gènes proneuraux présente également une complémentarité mutuelle entre les Ngn et Mash1. Les domaines d'expression de Ngn1 et 2 se superposent mais partiellement seulement : le

domaine de Ngn2 est souvent plus étendu. De plus, Ngn2 est exprimé dans les vésicules optiques (Figure I-15 J) ce qui n'est pas le cas de Ngn1, et Ngn1 est exprimé dans les ganglions trigéminaux (Figure I-15 I) ce qui n'est pas le cas de Ngn2. Le domaine d'expression de Ngn3 est encore plus restreint que celui des deux autres neurogénines : il est pratiquement limité exclusivement à la région de l'hypothalamus (Figure I-15 O), dans une zone où Ngn1 et Ngn2 ne sont pas exprimées.

L'analyse comparative de l'expression des quatre gènes proneuraux bHLH, Ngn1, Ngn2, Ngn3 et Mash1 montre que ces gènes définissent des populations distinctes de progéniteurs au cours du développement du système nerveux central et du système nerveux périphérique (Ma et al., 1997; Sommer et al., 1996).

Dans le SNC, s'il existe un chevauchement partiel des zones d'expression des 3 Neurogénines, au contraire, l'expression du gène Mash1 est localisée dans des régions complémentaires adjacentes mais non chevauchantes comparativement aux gènes Ngn (Ma et al., 1997). De même, dans le SNP, l'expression des gènes Ngn et Mash1 est complémentaire. Ces différences spatiales corroborent l'idée que des gènes proneuraux différents sont impliqués dans la spécialisation de sous-types neuronaux différents au cours de la neurogenèse. L'analyse du profil d'expression des gènes Ngn1, Ngn2, Ngn3 et Mash1 dans le temps peut également illustrer cette implication.

(ii) Localisation temporelle chez la souris

L'expression du gène Ngn1 est restreinte au système nerveux embryonnaire, avec un pic entre E10 et E12. Après le stade de développement E16 et jusqu'au stade adulte, aucune expression n'est plus détectée (Ma et al., 1996).

L'expression du gène Ngn2 est antérieure à celle de Ngn1 (Sommer et al., 1996). Le gène est très fortement exprimé entre E8,5 et E10,5, mais son expression diminue de manière significative à partir de E12 (Sommer et al., 1996). A la naissance, Ngn2 est encore exprimé le long des ventricules latéraux des vésicules télencéphaliques et dans le cervelet, mais aucune expression n'est plus détectée chez l'adulte (Gradwohl et al., 1996).

L'expression de Ngn3 est visible à partir de E9 et est maintenue jusqu'à E14 (Sommer et al., 1996). Ngn3 est exprimé dans les tissus nerveux embryonnaires et néonataux (Lee et al., 2003).

L'expression du gène Mash1 précède celle de Ngn1 (détection à partir de E8,5) et son activité est repérée au niveau de la zone ventriculaire du cerveau jusqu'à la naissance (Cau et al., 1997; Guillemot and Joyner, 1993) mais aussi chez l'adulte (Parras et al., 2004).

L'étude de l'expression des gènes proneuraux au cours du développement révèle une expression embryonnaire quasi-exclusive. Seul le gène Mash1 est détecté chez l'adulte. Cette analyse apporte donc des informations instructives quant à leur implication dans l'embryogenèse. Ainsi, l'expression opportune dans le temps et dans l'espace, des gènes Ngn1, Ngn2, Ngn3 et Mash1, légitime leur rôle majeur dans la formation et dans l'organisation du système nerveux embryonnaire. Leurs véritables attributions peuvent néanmoins être encore précisées.

(2) Rôle des gènes proneuraux au cours du développement

Des analyses génétiques par perte et gain de fonction ont été capitales pour identifier les gènes bHLH présentant une activité proneurale et déterminer leur réelle implication dans le développement nerveux. Elles ont révélé une forte hétérogénéité de fonctionnement entre les différents gènes. L'étude particulière des gènes Ngn1, Ngn2, Ngn3 et Mash1 illustre parfaitement cette affirmation.

(i) Rôle dans la neurogenèse

Au niveau du SNP, l'expression ectopique dans des cellules de la crête neurale des gènes bHLH Ngn1, Ngn2 et Mash1 est suffisante pour stimuler la différenciation neuronale des progéniteurs nerveux *in vivo* et *in vitro* (Cai et al., 2000; Farah et al., 2000; Fode et al., 2000; Ma et al., 1996; Mizuguchi et al., 2001). En particulier, l'expression des gènes **Ngn1** et **Ngn2** conduit à la formation de neurones sensitifs (Ma et al., 1998; Perez et al., 1999; Sun et al., 2001), tandis que la surexpression de **Mash1** induit la synthèse de neurones autonomes (Lo et al., 2002). Des expériences de perte de fonction ont démontré plus précisément que l'inactivation du gène Ngn1 prévient le développement des neurones sensoriels proximaux alors qu'à l'opposé, celle du gène Ngn2 touche la sous-classe des neurones sensoriels distaux (Fode et al., 1998; Ma et al., 1998). Une inhibition ciblée du gène Mash1 chez la souris perturbe le développement de plusieurs classes de neurones autonomes (sympathiques et parasympathiques) (Guillemot and Joyner, 1993).

Au niveau du SNC, les gènes **Ngn1** et **Mash1** contrôlent des étapes distinctes de la différenciation des neurones sensitifs de l'épithélium olfactif (Cau et al., 2002; Ma et al., 1997). Le gène **Ngn2** permet d'engendrer des neurones dopaminergiques du mésencéphale (Andersson et al., 2006; Kele et al., 2006; Thompson et al., 2006), des neurones glutamatergiques (Parras et al., 2002) et, en coopération avec le gène bHLH Olig2, des motoneurones (Mizuguchi et al., 2001; Novitch et al., 2001). De plus, quand le gène Ngn2 est inséré au niveau du locus du gène Mash1, par une stratégie de knock-in, les neurones du télencéphale ventral se différencient normalement et ne présentent pas de changements majeurs du phénotype. Ainsi, Ngn2 semble agir comme un facteur permissif qui nécessite la combinaison avec d'autres facteurs pour spécifier le phénotype neuronal (Parras et al., 2002). D'autre part, l'inhibition de Ngn2 entraîne une expression ectopique de **Mash1** au niveau du télencéphale dorsal, stimulant la neurogenèse ectopique de neurones GABAergiques dans cette région (Fode et al., 2000; Parras et al., 2002). De même, quand Mash1 remplace le gène Ngn2 au niveau du locus de Ngn2, les progéniteurs présents dans la zone dorsale du télencéphale ne suivent pas leur voie de différenciation classique mais au contraire, deviennent des neurones GABAergiques (Chapouton et al., 2001). Par ailleurs, l'expression ectopique du gène Mash1 dans la moelle épinière de poulet stimule l'expression des marqueurs spécifiques des neurones sérotoninergiques (Pattyn et al., 2004). Enfin, dans des embryons mutés pour Mash1, des précurseurs neuronaux sont produits mais leur développement est bloqué avant l'étape de différenciation terminale (Sommer et al., 1995).

Ainsi, ces études indiquent qu'en plus d'agir comme des déterminants neuronaux, les gènes Neurogénines et Mash1 jouent un rôle dans la spécification de l'identité neuronale, c'est-à-dire qu'ils définissent des populations distinctes de progéniteurs dans le système nerveux en développement. La combinaison de plusieurs gènes proneuraux peut, de surcroît, induire la formation de sous-types neuronaux différents de ceux induits par les gènes proneuraux seuls (Miyoshi et al., 2004; Mizuguchi et al., 2001; Novitch et al., 2001), ce qui, associé à une expression spatiale et temporelle adéquates, peut expliquer que l'ensemble des sous-types neuronaux de l'organisme puisse être synthétisé à partir d'un nombre restreint de facteurs bHLH. Il semblerait qu'au cours de la neurogenèse des mammifères, les toutes premières étapes impliquent l'expression d'un petit nombre de gènes proneuraux bHLH qui amorcent une cascade d'événements d'activation conduisant, finalement, à l'expression des gènes de la différenciation terminale (Ma et al., 1997). Malgré une implication considérable, le rôle des gènes proneuraux ne se limite, cependant, pas à la neurogenèse.

(ii) Rôle dans l'arrêt du cycle cellulaire

La différenciation des progéniteurs nerveux est précédée d'une diminution importante de la prolifération de ces mêmes progéniteurs (Farah et al., 2000). En effet, l'expression ectopique de Ngn2 diminue la proportion de progéniteurs en prolifération, indiquant que Ngn2 induit un arrêt du cycle cellulaire (Lo et al., 2002). De même, la comparaison de souris sauvages avec des souris doubles KO pour les gènes Ngn2 et Mash1, révèle que la présence de gènes proneuraux limite clairement le nombre de divisions cellulaires (Nieto et al., 2001).

Cet effet des gènes proneuraux sur le cycle cellulaire peut être direct ou simplement une conséquence de la différenciation. Certaines études énoncent une potentielle action des protéines à motifs bHLH sur l'inhibiteur de la prolifération p27kip1 (Chassot et al., 2007; Farah et al., 2000). Mais actuellement, le mécanisme précis par lequel les gènes proneuraux induisent un arrêt du cycle cellulaire reste encore méconnu, d'autant que des divergences fondamentales sont visibles d'un gène à l'autre. Les gènes Ngn entraînent une sortie rapide du cycle cellulaire et une différenciation très efficace des progéniteurs. A l'opposé, Mash1 est moins performant pour stimuler l'arrêt de la prolifération et la différenciation neuronale malgré des capacités identiques à diriger la différenciation des cellules neuroépithéliales (Casarosa et al., 1999; Horton et al., 1999). Cette différence dans l'activité des gènes proneuraux peut être interprétée comme le reflet de la sensibilité des cellules aux différents gènes. Mais ces variations sont-elles la conséquence de l'environnement cellulaire ou correspondent-elles à des modes d'action différents selon le gène considéré ? Les réponses ne sont pas tranchées.

(iii)Rôle dans la différenciation gliale

L'expression des gènes proneuraux culmine au moment de la neurogenèse et persiste pendant la différenciation astrocytaire (Ma et al., 1997; Sommer et al., 1996). Cependant, en culture, il existe une relation inverse entre le niveau d'expression des gènes proneuraux et la prédisposition des cellules à stimuler la différenciation astrocytaire (Sun et al., 2001). Ainsi, la surexpression de Ngn1 dans des progéniteurs nerveux *in vitro* bloque la formation d'astrocytes de manière quasi-totale (Sun et al., 2001) et des cultures de progéniteurs nerveux extraits des animaux KO pour les gènes Ngn2 et Mash1 forment des colonies contenant significativement plus d'astrocytes et moins de neurones (Nieto et al., 2001). Ainsi, en plus d'activer spécifiquement l'expression de gènes neuronaux, les gènes proneuraux semblent également jouer un rôle majeur dans l'inhibition de la différenciation gliale.

Les mécanismes régulant cette activité sont encore mal connus : les gènes proneuraux pourraient agir via une séquestration du complexe p300/Smad nécessaire à l'activité des promoteurs gliaux (Nakashima et al., 1999; Sun et al., 2001).

Néanmoins, il a été démontré que les gènes Ngn2 et Mash1 s'exprimaient respectivement dans des précurseurs astrocytaires et oligodendrocytaires (Kondo and Raff, 2000; Nieto et al., 2001; Parras et al., 2004; Wang et al., 2001). De même, le gène Ngn3 est exprimé dans des cellules dont le potentiel de différenciation est restreint aux lignages gliaux et sa surexpression permet de diriger la transcription à partir du promoteur oligodendrocytaire PLP (Lee et al., 2003). Ainsi, l'inhibition de la différenciation gliale n'est pas systématiquement induite en présence des gènes proneuraux. Leur rôle précis doit donc encore être approfondi.

(iv) Autres fonctions des gènes proneuraux

Des études récentes ont montré l'implication des gènes proneuraux dans la **migration des cellules** au cours de la neurogenèse (Ge et al., 2006) et la contribution du gène Ngn2 dans la stimulation de la connectivité entre neurones (Seibt et al., 2003).

L'ensemble des fonctionnalités potentielles des gènes proneuraux à motif bHLH n'a toujours pas été exploré à ce jour. En particulier, leur capacité à enrichir des populations cellulaires en un phénotype donné reste encore à vérifier.

d) Mécanisme d'action et régulation : la voie Notch

L'activité des protéines proneurales bHLH conduit à l'activation de la **voie de signalisation Notch** (Artavanis-Tsakonas et al., 1999; de la Pompa et al., 1997). En temps que facteurs de transcription*, les protéines Ngn et Mash1 induisent l'expression des protéines transmembranaires **Delta et Jagged**, qui sont les ligands du récepteur transmembranaire **Notch**. La liaison du domaine extracellulaire de Delta ou Jagged avec le domaine extracellulaire de Notch exprimé par les cellules adjacentes active le récepteur (Figure I-16). Cette activation de Notch libère son domaine intracellulaire qui est alors transporté jusqu'au noyau (Schroeter et al., 1998), où il s'associe avec le complexe protéique de liaison à l'ADN **CBF1-RBPjκ**. En l'absence de Notch, CBF1-RBPjκ est un répresseur transcriptionnel qui inhibe l'expression des protéines Hes1 et Hes5 en se liant à leur promoteur (Fortini and Artavanis-Tsakonas, 1994). Au contraire, la combinaison Notch-CBF1-RBPjκ active la

transcription et stimule l'expression des protéines Hes1, Hes5 et Hesr (Ohtsuka et al., 2001; Sakamoto et al., 2003).

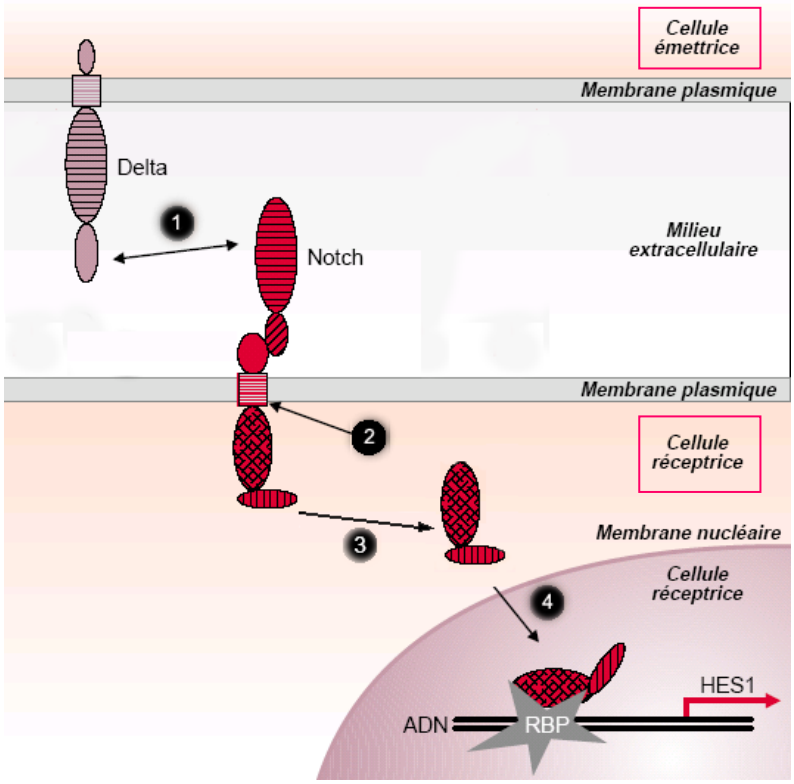


Figure I-16 : Mécanisme d'action de la voie de signalisation Notch

L'interaction ligand-récepteur Delta-Notch (1) entraîne un clivage du domaine intracellulaire de la protéine transmembranaire (2). La partie transcriptionnellement active est ainsi libérée (3). Après transport au niveau nucléaire, elle va pouvoir s'associer à des protéines de liaison à l'ADN telle que RBP (4) et stimuler l'expression de ces protéines cibles (Hes1 et Hes5).

(D'après Médecine/Science n°3, vol.15, mars 1999)

Comme nous l'avons vu précédemment, les **protéines Hes** (Hairy and Enhancer of Split) sont des inhibiteurs des protéines à motif bHLH (au même titre que les facteurs Id et les protéines Her et Esr). Leur rôle consiste donc à réprimer l'expression des protéines proneurales. Ainsi, au sein du tissu nerveux, une boucle de **rétrocontrôle** assure une régulation de l'expression des facteurs de transcription à motif bHLH (de la Pompa et al., 1997). Ce système concerne l'interaction d'une cellule avec ses cellules avoisinantes et est donc désigné sous le terme d'**inhibition latérale** (Figure I-17). Il permet vraisemblablement de limiter le nombre de cellules qui entrent en phase de différenciation afin de maintenir un pool de cellules immatures. Le facteur Notch contribue majoritairement à ce processus et joue donc un rôle fondamental dans l'inhibition de la différenciation neuronale et dans le maintien des cellules à un état indifférencié.

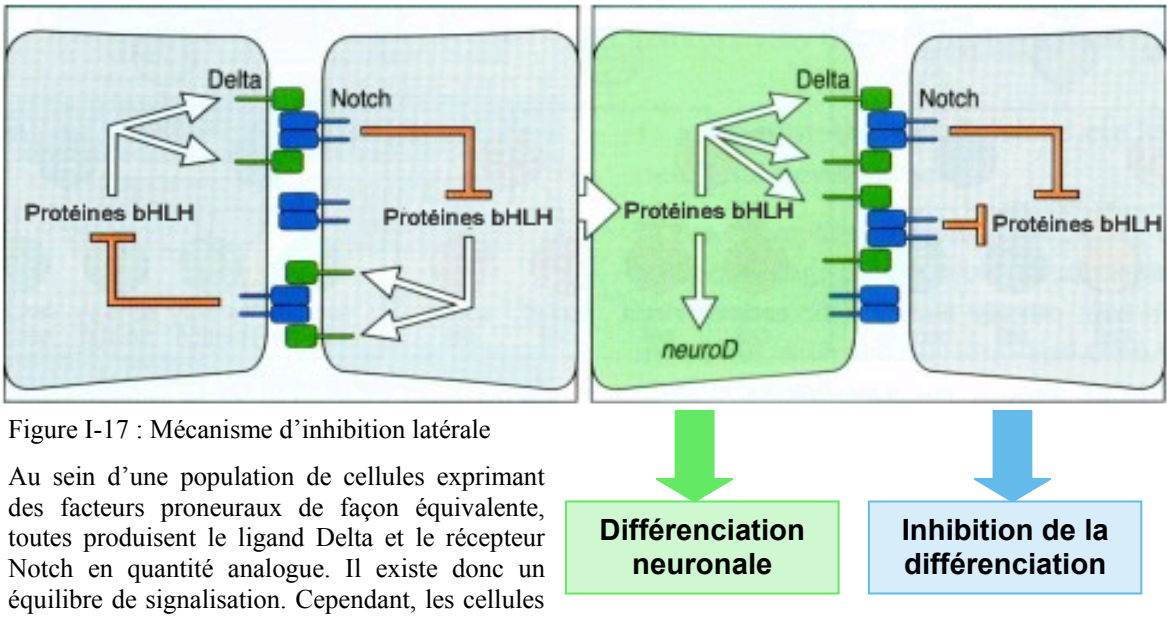


Figure I-17 : Mécanisme d'inhibition latérale

Au sein d'une population de cellules exprimant des facteurs proneuraux de façon équivalente, toutes produisent le ligand Delta et le récepteur Notch en quantité analogue. Il existe donc un équilibre de signalisation. Cependant, les cellules commencent à se différencier sous l'influence des protéines à motif bHLH et vont exprimer le facteur Delta de façon accrue, ce qui a pour conséquence directe d'activer la voie Notch au niveau des cellules adjacentes. Cette boucle de rétrocontrôle va alors inhiber l'expression des protéines proneurales et par conséquent, la différenciation des cellules avoisinantes.

Cependant, la présence du facteur Notch dans des cellules post-mitotiques a suggéré son implication dans des mécanismes autres que ceux de la neurogenèse, tels que la persistance des neurones différenciés ou la gliogenèse.

*Le facteur Notch a en effet été détecté dans les noyaux de neurones matures (Ahmad et al., 1995). Cette accumulation nucléaire semble profiter au **maintien des cellules dans un état de différenciation terminale**, mais reste inexpliquée. Des travaux ont néanmoins démontré une influence sur l'allongement des neurites existantes et sur la morphologie neuronale (Redmond et al., 2000; Sestan et al., 1999)

*D'autres études *in vivo* ont montré qu'une surexpression de Notch conduit à une **gliogenèse** excessive et prématurée (Chambers et al., 2001; Scheer et al., 2001) et que cette activité au niveau des cellules gliales passe par l'intermédiaire des cibles transcriptionnelles classiques du facteur Notch, Hes et Hesr (Hojo et al., 2000; Satow et al., 2001). Cette induction de la gliogenèse se produit au contact des neurones et a pour conséquence l'augmentation de l'expression des marqueurs spécifiques des astrocytes matures (Patten et al., 2003). A l'opposé, les cellules oligodendrocytaires, qui sont également des cellules gliales, connaissent

une inhibition de leur différenciation à la suite de l'expression du facteur Notch (Tanigaki et al., 2001; Wang et al., 1998).

D'une manière générale, la voie Notch est mise en cause dans le maintien des progéniteurs nerveux à l'état indifférencié, dans l'engagement des cellules vers la voie de différenciation gliale (plutôt que neuronale), dans l'inhibition de la différenciation oligodendrocytaire et dans la préservation des neurones spécialisés. Ces transformations sont autant d'événements qui peuvent influencer l'effet des protéines proneurales sur la différenciation des cellules. Cependant, cette action pléiotropique n'est finalement qu'un exemple (prépondérant toutefois). Un très grand nombre de signaux environnants peuvent répercuter leurs effets sur ceux des protéines bHLH. En particulier, l'ensemble des inhibiteurs directs (Hes, Id, Her, Esr) ou des activateurs directs (p300/CBP, PCAF) de l'activité des protéines bHLH joue un rôle majeur dans la neurogenèse (Ishibashi et al., 1995; Jen et al., 1997; Roth et al., 2001; Sun et al., 2001).

B. Méthode de tri cellulaire

1. Justification de la stratégie

En complément de la stratégie d'orientation de la différenciation, une seconde méthode vise à limiter l'hétérogénéité cellulaire en sélectionnant et en purifiant les cellules d'un lignage donné. Des techniques d'extraction sélective fondées sur l'expression spécifique d'antigènes de surface ont d'ores et déjà été expérimentées (Cai et al., 2002; Lee et al., 2005; Liu et al., 2004b; Uchida et al., 2000; Windrem et al., 2004). Elles consistent à « étiqueter » les cellules au moyen d'anticorps, fluorescents ou couplés à des billes magnétiques, dirigés contre le ou les épitopes de surface propres aux cellules d'intérêt. Le tri des cellules est ensuite réalisé par cytométrie en flux (FACS ou MACS). Afin d'accroître la pureté des échantillons cellulaires sélectionnés, des paramètres supplémentaires d'antigénicité, de taille ou de liaison à des molécules particulières peuvent être combinés au cours de la séparation (Capela and Temple, 2002; Rietze et al., 2001). Une autre méthode fondée sur l'expression spécifique de gènes rapporteurs permet d'isoler des cellules appartenant à un lignage déterminé (Figure I-18).

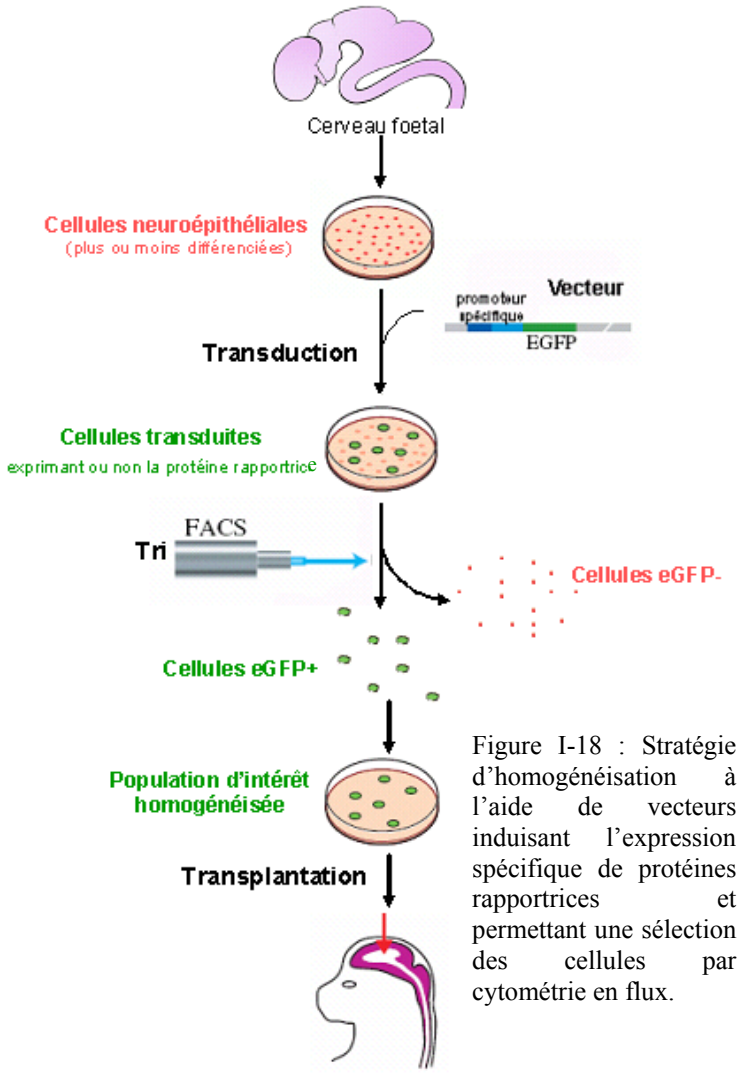


Figure I-18 : Stratégie d'homogénéisation à l'aide de vecteurs induisant l'expression spécifique de protéines rapportrices et permettant une sélection des cellules par cytométrie en flux.

Des protéines fluorescentes (Chalfie et al., 1994) sont placées sous le contrôle de promoteurs, activés uniquement dans un type cellulaire d'intérêt. Ainsi, les cellules qui fluorescent sont caractéristiques d'un lignage précis et peuvent être séparées des autres cellules par FACS. Jusqu'à présent, ce tri, fondé sur une expression lignage-dépendante de protéines rapportrices, a permis d'extraire des cellules progénitrices à l'aide des promoteurs nestine* ou musashi1 (Wang et al., 2000), des précurseurs neuronaux à l'aide du promoteur de la tubuline α1 (Roy et al., 2000a; Roy et al., 2000b) ou des cellules oligodendrocytaires à l'aide du promoteur CNP2 (Roy et al., 1999). Nous avons choisi de tester ce système de sélection sur les cellules souches nerveuses fœtales humaines en culture en utilisant trois promoteurs différents pour diriger l'expression de protéines rapportrices dans des lignages distincts.

2. Description des promoteurs

Les trois promoteurs particuliers qui ont retenu notre attention sont désignés comme étant :

- le promoteur de la nestine* de rat, spécifique des cellules nerveuses immatures
- le promoteur de la synapsine I* humaine, spécifique du lignage neuronal
- le promoteur de la Protéine Acide Fibrillaire Gliale humaine (GFAP*), spécifique du lignage astrocytaire.

● le promoteur de la nestine*

L'élément activateur du second intron du gène de la nestine* est une région de 637pb située entre les bases 1162 et 1798 chez le rat (Lothian and Lendahl, 1997). Cette séquence, hautement conservée entre l'homme et le rat, est suffisante pour diriger l'expression spécifique du transgène dans les cellules souches immatures et les cellules progénitrices nerveuses. Le promoteur minimum de la protéine du stress hsp68 (Heat Shock Protein 68) est placé en aval de cet activateur pour amorcer la transcription (Roy et al., 2000a).

Lors d'expériences de purification cellulaire, ce promoteur a permis d'isoler après transfection* (au moyen de liposomes) des progéniteurs nerveux à partir de la zone ventriculaire de cerveau humain adulte (Roy et al, 2000). Les cellules sélectionnées expriment de manière uniforme la protéine nestine et ont incorporé pour une majorité d'entre elles du bromodéoxyuridine (BrdU) additionné au milieu de culture. De même, des cellules souches et des précurseurs nerveux ont été isolés à partir de cerveau fœtal humain par transduction au moyen de vecteurs adénoviraux exprimant la protéine GFP sous le contrôle du promoteur de la nestine (Keyoung et al., 2001). Dans cette étude, 99% des cellules sélectionnées expriment le marqueur nestine, 3% le marqueur β3tubuline et 9% le marqueur GFAP.

● le promoteur de la synapsine I*

Un fragment d'environ 470pb du promoteur de la synapsine I humaine (hSYN) permet l'expression spécifique du transgène dans les neurones (Kugler et al., 2001). Etant plus court que le promoteur de l'énolase spécifique des neurones (NSE), le promoteur hSYN est plus approprié pour des constructions lentivirales (Kugler et al., 2003).

Dans le but d'acquérir une expression restreinte aux neurones, la spécificité du promoteur de la synapsine humaine a été évaluée dans le contexte de transductions adénovirales (Kugler et al., 2001). Des analyses qualitatives ont révélé une expression neurone-spécifique dans des

cocultures de neurones et de glie extraits d'hippocampe de rat fœtal. Cependant, jusqu'à présent, aucune analyse quantitative précise n'a été réalisée et la spécificité d'expression n'a pas encore été testée dans des cultures humaines.

● le promoteur de la GFAP*

Le fragment de 2,2 kb du promoteur de la GFAP humaine (Besnard et al., 1991) permet une expression ciblée du transgène dans les astrocytes (Jakobsson et al., 2003). En effet, des études par transductions lentivirales dans le cerveau de rat (Jakobsson et al., 2003) ou par transfections* transitoires au phosphate de calcium dans des lignées de cellules humaines et dans des cultures primaires de rat (Besnard et al., 1991) ont démontré une expression astrocytaire quasi-exclusive du gène rapporteur. Cependant, aucune analyse quantitative n'a encore été réalisée sur des cellules nerveuses humaines en culture.

3. Principe de la stratégie

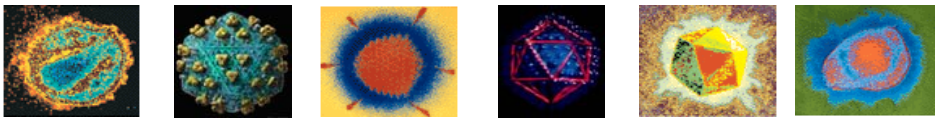
La sélection et la purification des cellules d'intérêt est obtenue par expression, au moyen de vecteurs lentiviraux, de protéines rapportrices (eYFP ou eGFP) sous le contrôle des promoteurs spécifiques des différents lignages cellulaires décrits ci-dessus. Les cellules souches nerveuses fœtales en culture peuvent être transduites avec ces vecteurs traceurs et devraient exprimer la fluorescence, une fois différenciées dans le lignage approprié. Ainsi, les cellules fluorescentes devraient être exclusivement des cellules immatures pour le promoteur nestine, des cellules neuronales pour le promoteur de la synapsine ou des cellules astrocytaires pour le promoteur GFAP. Par la suite, les cellules des différents lignages pourront être triées par cytométrie en flux et les populations homogènes greffées dans des modèles expérimentaux adaptés. Ces perspectives alléchantes sont cependant encore éloignées. La première étape de notre étude consiste en effet à vérifier et à valider la spécificité d'expression des différents promoteurs dans les cellules souches nerveuses fœtales en culture par une analyse rigoureuse du phénotype des cellules fluorescentes.

C. Les vecteurs lentiviraux

En thérapie génique, les modifications génétiques des cellules d'un organisme sont effectuées à l'aide de **vecteurs*** qui peuvent être d'origine **virale** (lentivirus, oncorétrovirus, adénovirus, virus adéno-associé (AAV), baculovirus ou virus herpès) (figure I-19 A) ou **non virale** (ADN, protéines, lipides ou polymères cationiques). L'utilisation majoritaire de vecteurs viraux se

justifie par leur efficacité à acheminer un gène désiré au niveau d'une cellule cible et à assurer son expression (figure I-19 B).

A



Vecteurs	Rétrovirus	Lentivirus	Adénovirus	Adénovirus Gutless	AAV	Virus de l'herpès
Capacité de clonage	5 kilobases (kb)	7 kb	7 kb	35 kb	4,8 kb	30-50 kb
Administration	*Ex vivo*	*Ex vivo et In vivo*	*Ex vivo et In vivo*	*Ex vivo et In vivo*	*Ex vivo et In vivo*	*Ex vivo et In vivo*
Expression du gène thérapeutique	Stable	Stable	Transitoire Stable en l'absence de division cellulaire	Transitoire Stable en l'absence de division cellulaire	Stable	Transitoire
Avantages	Intégratif, Recombinaison impossible	Transduction de cellules quiescentes	Hauts titres, Large tropisme	Large capacité de clonage, Recombinaison impossible	Intégratif, Recombinaison impossible	Tropisme (SNC)
Inconvénients	Pas de transduction des cellules en division	Risques de recombinaison	Toxique et immunogène	Difficile à produire, Capside immunogène	Faible capacité de clonage	Difficile à produire

B

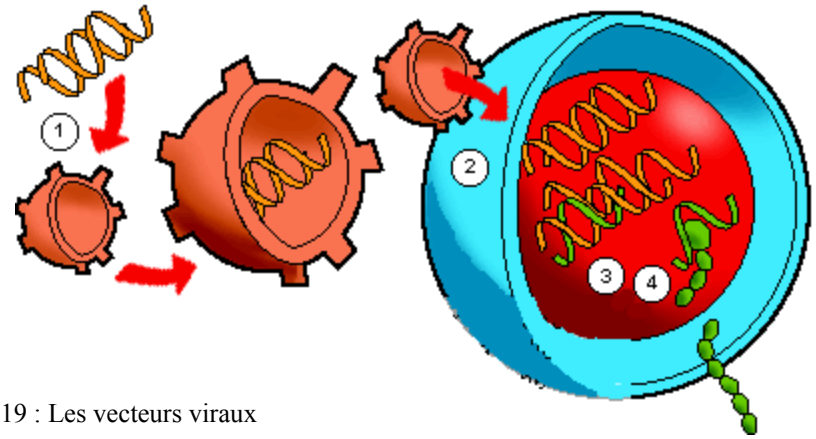


Figure I-19 : Les vecteurs viraux

A- Atouts et limites des vecteurs viraux : les rétrovirus, les lentivirus, les adénovirus, les virus AAV et les virus herpès

B- Schéma de transduction par un vecteur rétroviral
1-Fabrication d'un rétrovirus vecteur du gène d'intérêt
2-Entrée du gène dans le noyau de la cellule
3-Intégration et transcription du gène
4-Traduction des ARNm correspondants au gène en protéines

Au laboratoire, les cellules souches nerveuses fœtales humaines ont été transduites *in vitro* par différents types de vecteurs* dérivant aussi bien des lentivirus (Buchet et al., 2002a), que des adénovirus (Corti et al., 1999) ou des baculovirus (Sarkis et al., 2000), révélant ainsi leur aptitude à supporter une infection et à exprimer des gènes recombinants. Ces propriétés

associées à celles des vecteurs lentiviraux (Zennou et al., 2000; Zennou et al., 2001), pantrophiques* et à intégration stable, fournissent des outils appropriés pour influencer la différenciation des cellules en culture et/ou sélectionner une population d'intérêt.

1. Structure des lentivirus

Les vecteurs lentiviraux sont dérivés du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) de type I (Figure II-20 A) et appartiennent donc à la famille des rétrovirus*.

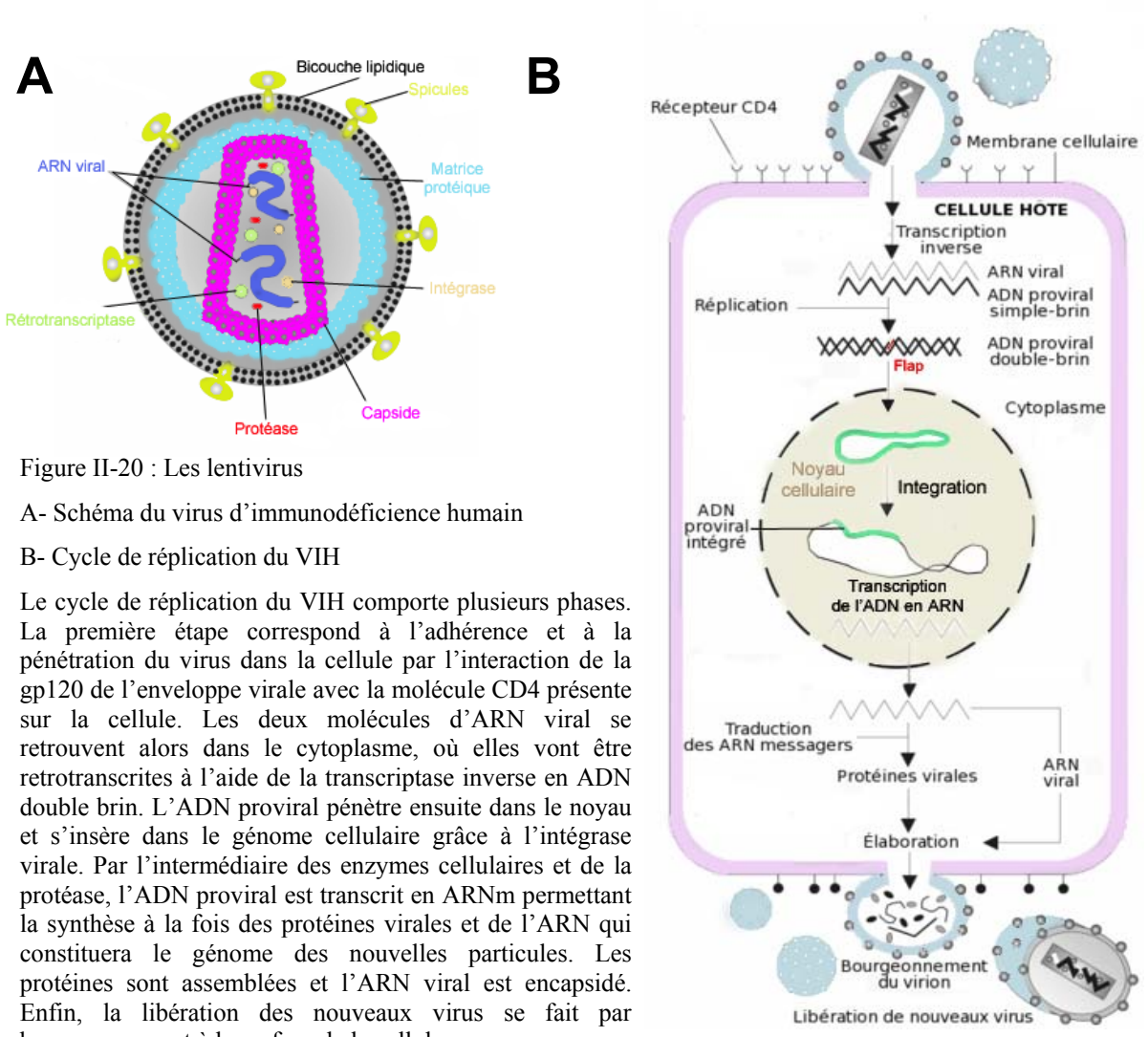


Figure II-20 : Les lentivirus

A- Schéma du virus d'immunodéficience humain

B- Cycle de réplication du VIH

Le cycle de réplication du VIH comporte plusieurs phases. La première étape correspond à l'adhérence et à la pénétration du virus dans la cellule par l'interaction de la gp120 de l'enveloppe virale avec la molécule CD4 présente sur la cellule. Les deux molécules d'ARN viral se retrouvent alors dans le cytoplasme, où elles vont être retrotranscrites à l'aide de la transcriptase inverse en ADN double brin. L'ADN proviral pénètre ensuite dans le noyau et s'insère dans le génome cellulaire grâce à l'intégrase virale. Par l'intermédiaire des enzymes cellulaires et de la protéase, l'ADN proviral est transcrit en ARNm permettant la synthèse à la fois des protéines virales et de l'ARN qui constituera le génome des nouvelles particules. Les protéines sont assemblées et l'ARN viral est encapsidé. Enfin, la libération des nouveaux virus se fait par bourgeonnement à la surface de la cellule.

La structure des lentivirus sauvages est relativement complexe. On distingue essentiellement :

* Une **enveloppe** constituée d'une bicouche lipidique, d'une matrice protéique, et des glycoprotéines gp120 et gp41 (spicules).

* Une **capside** (assemblage de protéines p24) qui contient:

-le génome viral : 2 ARN simple brin d'environ 10 kilobases (kb)

-des enzymes : la rétrotranscriptase, l'intégrase et la protéase

2. Multiplication

Pour accomplir leur cycle de réplication (Figure II-20 B), les virus doivent d'abord adhérer et pénétrer à l'intérieur de la cellule, ce qui nécessite l'interaction de la glycoprotéine d'enveloppe gp120 avec la molécule CD4 présente à la surface des cellules. Puis des interactions successives aboutissent à la fusion des enveloppes. La nucléocapside est alors relarguée dans le cytoplasme cellulaire permettant la libération des deux molécules d'ARN viral. Ces virus à ARN renferment une **rétrotranscriptase** (ou transcriptase inverse*) qui permet de synthétiser de l'ADN double brin à partir du génome viral. La présence d'une séquence Flap* (Zennou et al., 2000) au centre de cet ADN bicaténaire favorise son transport à travers la membrane nucléaire de la cellule hôte, quel que soit l'état de division de cette dernière. Les lentivirus ont, par conséquent, la capacité unique d'infecter des cellules aussi bien mitotiques que quiescentes. Dans le noyau, l'ADN proviral s'intègre au génome cellulaire sous l'effet de l'intégrase. Il est alors assimilé à un gène cellulaire et peut être transcrit par la cellule pour donner soit des ARNm (ultérieurement traduits en protéines virales), soit des génomes viraux.

3. ADN proviral

L'ADN des lentivirus sauvages qui va s'intégrer au génome cellulaire comporte essentiellement deux parties (Figure II-21) :

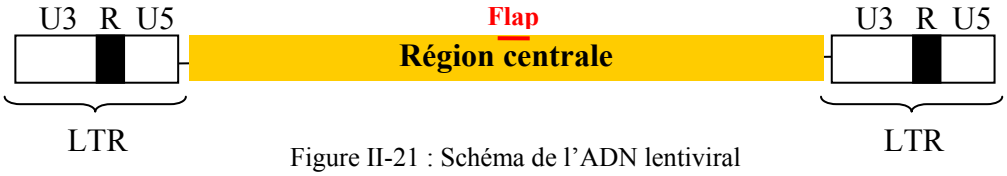


Figure II-21 : Schéma de l'ADN lentiviral

*__une région centrale__ comprenant :

- les gènes viraux :

  - le **gène *gag*** (group specific antigens) code des protéines de capside et de matrice

  - le **gène *pol*** (polymérase) code la rétrotranscriptase, l'intégrase et la protéase

  - le **gène *env*** (enveloppe) code les glycoprotéines constituant les spicules

  - le **gène *tat*** (transactivateur) code une protéine de régulation activant la transcription du génome viral

  - le **gène *rev*** (regulation of expression of viral proteins) code une protéine de régulation permettant l'exportation des ARNm vers le cytoplasme

- le **gène *nef*** (negative regulatory factor) code une protéine de régulation favorisant la réplication virale

- le **gène *vif*** (virion infectivity factor) code une protéine de régulation augmentant l'infectivité des nouveaux virions*

- le **gène *vpr*** (viral protein r) code une protéine de régulation jouant un rôle dans l'activation de la transcription

- le **gène *vpu*** (viral protein u) code une protéine de régulation jouant un rôle dans l'assemblage des virions

Seuls les gènes *gag*, *pol*, *env*, *tat* et *rev* sont essentiels. Les autres gènes, également appelés gènes accessoires peuvent être supprimés sans affecter l'efficacité du système.

● la séquence Ψ non traduite servant de signal d'encapsidation de l'ARN viral

● la séquence RRE (Rev Responsive Element) permettant l'exportation des ARNm vers le cytoplasme après fixation de la protéine rev

***deux régions non codantes** appelées LTR (Long Terminal Repeat), situées en 5' et 3' et constituées de 3 séquences : **U3, R** et **U5.** Ces séquences vont jouer des rôles différents selon leur localisation. En particulier, U3 en 5' est un promoteur amorçant la transcription, tandis que R en 3' permet la terminaison de cette transcription.

4. Squelette du vecteur lentiviral

Les propriétés de ces lentivirus, concernant notamment leur capacité à infecter des cellules quiescentes, leur intégration stable et leur faible toxicité, en font des outils intéressants et efficaces pour le transfert de gène*. Néanmoins, pour réduire les risques biologiques liés à leur utilisation en tant que vecteurs, des modifications majeures ont été apportées à l'ADN du virus sauvage (Brun et al., 2003; Donello et al., 1998; Naldini et al., 1996; Poznansky et al., 1991; Zennou et al., 2000) (Figure I-22).

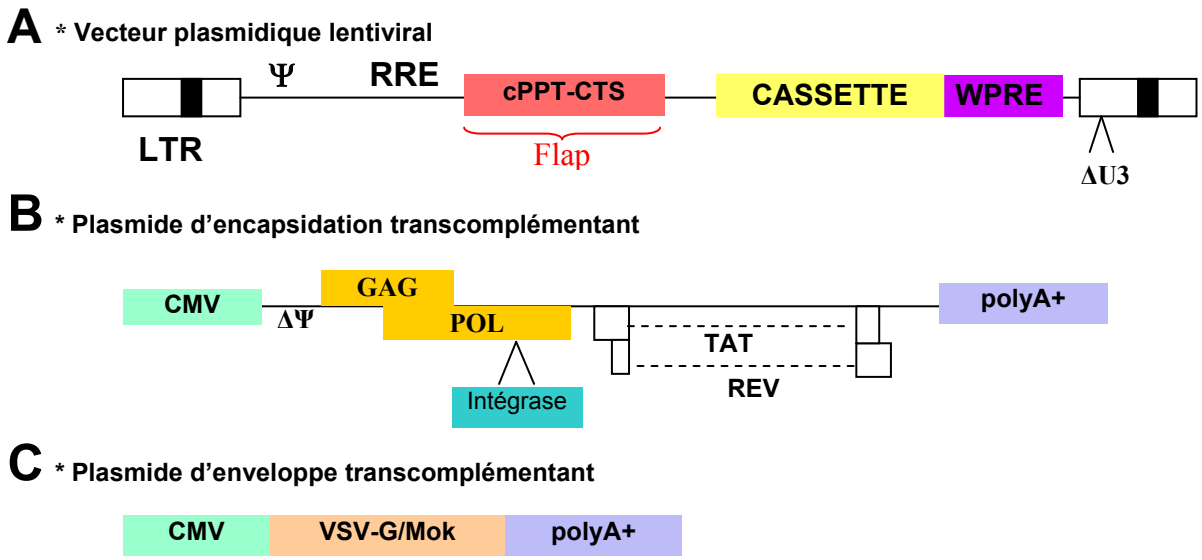


Figure I-22 : Constructions plasmidiques nécessaires à la production de vecteurs lentiviraux efficaces

● Le **plasmide* vecteur** pFlap-WPRE est délété de l'ensemble des gènes viraux. Il conserve uniquement la séquence Ψ, le RRE, la séquence Flap et les 2 LTR (Figure I-22 A). Néanmoins, la séquence U3 du LTR en 3' est inactivée afin d'éviter une transcription fortuite de l'ADN recombinant en présence de virus sauvage (Sirven et al., 2001). L'expression du transgène est améliorée par ajout d'une séquence « Woodchuck Hepatitis Regulatory Element » (WPRE) (Brun et al., 2003; Donello et al., 1998), qui stabilise l'ARNm.
De telles transformations aboutissent à un **virus défectif*** et rendent impossible la formation de particules virales à partir de cette seule séquence ADN. La synthèse de virus recombinants actifs et utilisables en expérimentation est donc assurée par **transcomplémentation*** : 2 virus auxiliaires* apportent les gènes des protéines lentivirales manquantes.

● Le **plasmide d'encapsidation** p8.91 (Zufferey et al., 1997) contient les gènes *gag*, *pol*, *tat* et *rev* sous le contrôle du promoteur du gène précoce du cytomégalovirus humain (CMV). Par souci de sécurité, le signal d'encapsidation Ψ, les 2 LTR et la plupart des gènes accessoires (Nef, Vif, Vpr, Vpu) sont délétés sur ce plasmide (Figure I-22 B).

● Le **plasmide d'enveloppe** apporte les gènes codant les protéines qui constituent l'enveloppe du virus. En fonction de la nature de ces protéines, le virus va se fixer puis infecter des cellules radicalement différentes (**tropisme***). Le gène *env* du VIH-1 limite l'infection aux cellules T CD4+. Par conséquent, pour élargir le spectre d'infection à d'autres types cellulaires, le gène *env* est remplacé par différents gènes d'enveloppe. Ainsi, selon le

plasmide d'enveloppe utilisé lors de la production, les virus synthétisés vont cibler tel ou tel type cellulaire : c'est ce que l'on appelle le **pseudotypage***. Deux modèles de plasmide d'enveloppe ont été expérimentés au cours de ma thèse (Figure I-22 C) :

- le **plasmide pCMV-VSV-G** code la protéine G d'enveloppe du Virus de la Stomatite Vésiculaire* (VSV) sous le contrôle d'un promoteur CMV (Zufferey et al., 1997). Les vecteurs pseudotypés avec l'enveloppe VSV* transduisent une large population de cellules. Au niveau du SNC, il s'agit principalement de neurones mais également d'astrocytes et d'oligodendrocytes (Zennou et al., 2001).
- le **plasmide pCMV-Mok** code la protéine G d'enveloppe du virus Mokola* sous le contrôle d'un promoteur CMV (Bahloul et al., 1998). Selon des résultats récents obtenus dans notre laboratoire (Brizard et al en préparation), le tropisme de l'enveloppe Mokola* est majoritairement astrocytaire.

5. Vecteurs lentiviraux utilisés comme outils pour enrichir les populations

Chacune de nos stratégies d'homogénéisation des populations cellulaires repose sur l'utilisation de vecteurs lentiviraux. Dans la première méthode, les vecteurs de différenciation sont produits après insertion des différents gènes proneuraux sous le contrôle du promoteur ubiquitaire* de la phosphoglycérate kinase (PGK) au niveau du site correspondant à la cassette d'expression (Figure I-22 A). La transcomplémentation est assuré par les plasmides p8.91 et pCMV-VSV-G. Dans la deuxième méthode, les vecteurs traceurs comportent les promoteurs spécifiques des différents lignages du SNC en amont d'un transgène codant les protéines fluorescentes. Ces vecteurs sont pseudotypés soit par l'enveloppe VSV*, soit par l'enveloppe Mokola*, selon l'utilisation que l'on souhaite en faire. Les cellules nerveuses fœtales en culture peuvent être transduites par ces vecteurs à des doses permettant un équilibre entre toxicité et efficacité de transduction. L'efficacité de chaque stratégie est évaluée par une analyse phénotypique qui permet de déterminer, dans un cas, l'influence des gènes proneuraux sur la différenciation cellulaire et, dans l'autre cas, la spécificité de l'expression induite par les promoteurs des différents lignages du SNC.

Matériel et Méthodes

I. Cultures de cellules souches nerveuses fœtales

A. Fondement légal

Les cellules souches et progéniteurs nerveux fœtaux humains sont isolés à partir des vésicules télencéphaliques de fœtus issus d'Interruptions Volontaires de Grossesse (IVG) entre la cinquième et la douzième semaine du développement embryonnaire (âge correspondant à la date limite légale d'avortement en France). Les prélèvements sont effectués par l'équipe médicale (Hôpital Robert Debré, Paris, France), de manière totalement indépendante de l'équipe scientifique. La transmission au laboratoire fait suite à l'obtention préalable du consentement éclairé de la mère, selon la loi en vigueur et dans le respect de la confidentialité. Les prélèvements sont annotés de manière sécurisée afin de conserver l'anonymat de la patiente tout en fournissant les informations relatives à l'échantillon : numéro, terme théorique*, datation échographique, sérologies HIV et hépatite B... Les études entreprises étant dédiées à des fins scientifiques et n'ayant pas pour but de rechercher les causes de l'IVG, nos recherches s'inscrivent dans le cadre de l'article L.1241-5 du code de la santé publique (Annexe #2).

B. Mise en culture et amplification

Les cellules souches nerveuses fœtales humaines utilisées dans les expériences sont isolées à partir de deux fœtus âgés de 6 et 7 semaines de développement embryonnaire et appelés respectivement TFH6 et TFH7. Les tissus fœtaux conservés dans du milieu d'hibernation (Brundin, 1992) (Annexe #3) sont transportés au laboratoire dans les quelques heures suivant l'intervention. Dans une pièce en confinement de type L2, entièrement dédiée à la culture de cellules dérivées de tissus humains, les vésicules télencéphaliques sont disséquées selon une procédure décrite antérieurement (Buc-Caron, 1995). Au cours de la dissection (Figure II-1), le cerveau est extrait de la boîte crânienne et les méninges soigneusement retirées. Les vésicules télencéphaliques ainsi débarrassées des membranes protectrices sont alors prélevées et découpées en morceaux de petite taille.

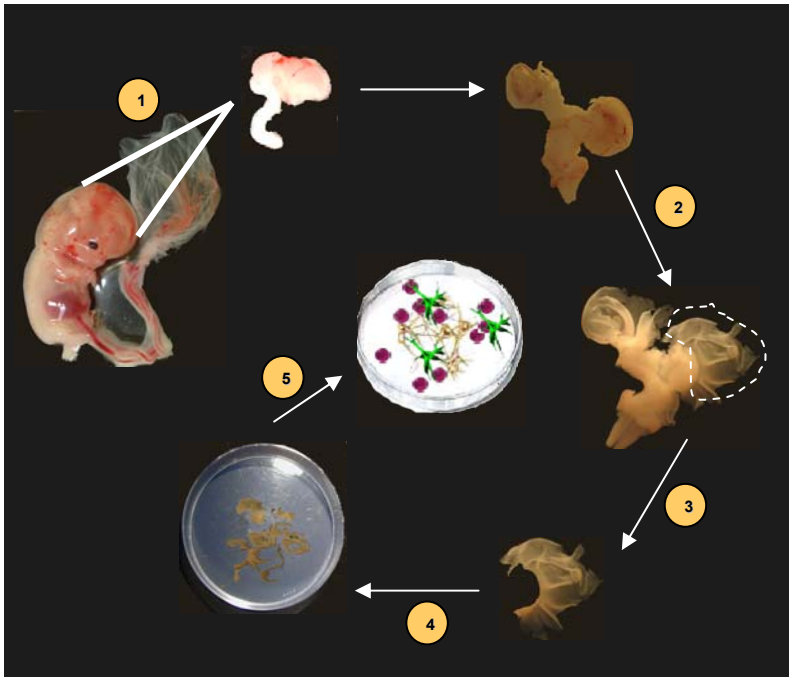


Figure II-1 : Les différentes étapes de la dissection des vésicules télencéphaliques fœtales conduisant à la mise en culture de progéniteurs nerveux humains

Le prélèvement fœtal est recueilli après IVG entre la cinquième et la douzième semaine de développement embryonnaire. Le cerveau est, tout d'abord, extrait de la boîte crânienne (1) et les méninges soigneusement retirées (2). Les vésicules télencéphaliques ainsi débarrassées des membranes protectrices sont alors prélevées (3) et découpées en morceaux de petite taille (4). Les cellules sont ensuite individualisées par traitement à l'ATV et à la DNaseI puis ensemencées en T75 à une densité de 10^6 cellules (5).

Un traitement de 20 minutes dans une solution d'ATV (Annexe #3) suivi d'une brève incubation à la DNaseI (Roche Diagnostics, Nutley, NJ ; #1 284 932 ; 20 µg/ml) permet de dissocier les cellules et d'éliminer les agrégats. L'action de la trypsine est bloquée par ajout de sérum de veau fœtal à 5% final et le sérum est ensuite retiré du milieu par centrifugation (10 minutes à 1000 tr/min). Les cellules individualisées obtenues sont ensemencées à la densité de 10^6 cellules par flasque T75 et amplifiées en suspension sous forme de neurosphères* dans un milieu standard (Annexe #3) supplémenté en EGF (Sigma, St. Louis, MO ; 20 ng/ml) et bFGF (Sigma, St. Louis, MO ; 20 ng/ml). Un rajout de milieu est effectué 2 fois par semaine et une centrifugation brève des cellules (1000 tr/min) est nécessaire lors du changement de milieu. Le passage a lieu tous les 15-20 jours par dissociation enzymatique des cellules (incubation de 10 minutes à 37°C en présence d'ATV). Après dissociation, les cellules continuent à se multiplier, donnant ainsi naissance à de nouvelles neurosphères. Cette procédure est répétée de manière séquentielle au fil des mois, entraînant un accroissement exponentiel du nombre de cellules souches et progéniteurs nerveux fœtaux humains et l'établissement d'une lignée cellulaire stable.

II. Vecteurs lentiviraux

Deux types de vecteurs, **vecteurs de différenciation** et **vecteurs traceurs,** sont construits à partir du schéma général du plasmide lentiviral décrit dans l'introduction (Figure I-22 A). Les plasmides obtenus sont appelés « plasmides de différenciation » et « plasmides traceurs ».

A. Construction des plasmides de différenciation

Les gènes proneuraux *Ngn1*, *Ngn2*, *Ngn3* et *Mash1* de rongeurs (souris ou rat) sont placés sous le contrôle du promoteur ubiquitaire* de la PhosphoGlycérate Kinase (PGK) (Figure II-2). L'ossature initiale est celle d'un plasmide lentiviral pFlap-PGK-WPRE contenant le promoteur PGK immédiatement suivi d'un site de clonage multiple*, au niveau duquel les gènes d'intérêt sont insérés.

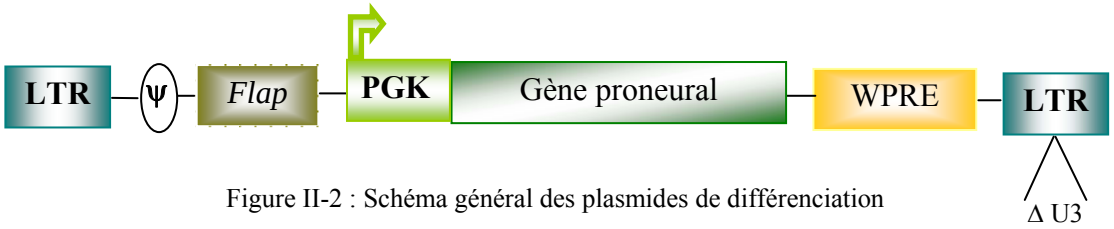


Figure II-2 : Schéma général des plasmides de différenciation

***Construction du plasmide PGK-Neurogénine 1**

La séquence codante du gène Ngn1 est amplifiée par une réaction de polymérisation en chaîne* (PCR) à partir d'ADN génomique de souris et en utilisant les amorces Ngn1 sens (5'CGGGATCCAAACCTCCTGTCCGTCTGTC3') et Ngn1 antisens (5'CCGCTCGAGGGGGGAGGAAGAAAGTATTG3'). Le fragment obtenu est alors sous-cloné dans le plasmide pGEM-t-easy (Promega, Madison, WI ; #A1360) et vérifié par séquençage. Le gène (734 pb) est ensuite intercalé entre la séquence du promoteur PGK et celle du WPRE en utilisant les sites de restriction BamHI et XhoI.

***Construction du plasmide PGK-Neurogénine 2**

Le fragment d'ADN complémentaire (ADNc) Ngn2 est amplifié par PCR à partir du plasmide pGEM-3-Ngn2 (gracieusement fourni par François Guillemot, London, UK) à l'aide des amorces Ngn2 sens (5'CGGGATCCCACACACCGGAGCAGCAG3') et Ngn2 antisens (5'CCGCTCGAGGGTAGAGGACGAGAGAGGGAGA3'). Le fragment obtenu est alors sous-cloné dans le plasmide pGEM-t-easy (Promega) et vérifié par séquençage. Le gène (791 pb) est ensuite introduit dans le plasmide pFlap-PGK-WPRE au niveau des sites de restrition BamHI et XhoI.

*** Construction du plasmide PGK-Neurogénine 3**

La séquence codante du gène Ngn3 (également appelé Relax) est amplifiée par PCR à partir d'ADN génomique de rat (Ravassard et al, 1997). Le fragment de PCR est ensuite sous-cloné dans le plasmide pcDNA3.0 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) et vérifié par séquençage.

Le gène (644pb) est finalement inséré dans le plasmide pFlap-PGK-WPRE au niveau des sites de restrition BamHI et XhoI.

*** Construction du plasmide PGK-Mash1**

Le fragment d'ADNc du gène Mash1 est extrait du plasmide pGEM-t-7ZF-Mash1 (gracieusement fourni par François Guillemot, London, UK) au niveau des sites AatII, puis sous-cloné dans le vecteur de clonage pGEM-t-easy (Promega) et vérifié par séquençage. Plusieurs clonages intermédiaires au niveau du site de clonage multiple du plasmide pFlap-Polylinker-WPRE sont nécessaires avant d'introduire le gène (695 pb) dans le plasmide pFlap-PGK-WPRE au niveau du site XhoI.

Les constructions finales sont respectivement notées pFlap-PGK-Ngn1-WPRE, pFlap-PGK-Ngn2-WPRE, pFlap-PGK-Ngn3-WPRE et pFlap-PGK-Mash1-WPRE.

B. Construction des plasmides traceurs

Les cassettes d'expression (promoteur + protéine fluorescente) sont insérées dans l'ossature lentivirale pFlap-Polylinker-WPRE (pFlap-PL-WPRE) décrite précédemment (Figure II-3).

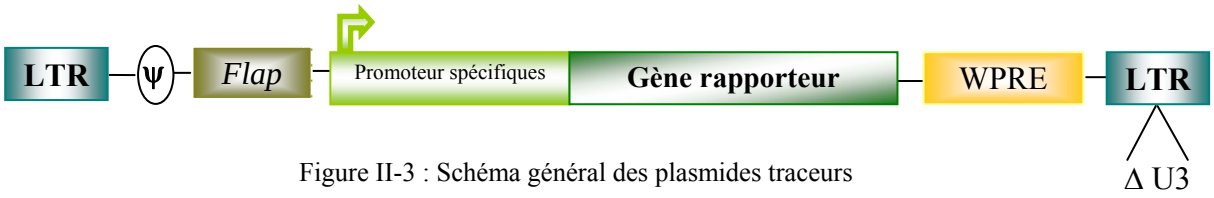


Figure II-3 : Schéma général des plasmides traceurs

*** Construction du plasmide Nestine-eYFP mitochondrial** :

Le promoteur Nestine-hsp68 (environ 1,5 kb) provient du plasmide pNestin/hsp68-eGFP (gracieusement fourni par Steven A. Goldman, New-York, NY). Il est inséré entre les sites BamHI et SmaI du pFlap-PL-WPRE pour former le plasmide pFlap-Nestine-WPRE.

L'ADNc du gène eYFP mitochondrial, extrait du plasmide peYFP-Mito (Clonetech, Palo Alto, CA ; #6115-1) est sous-cloné puis inséré en extrémités franches* en aval du promoteur Nestine au niveau du site SnaBI dans le plasmide pFlap-Nestine-WPRE. La construction finale est notée pFlap-Nestine-eYFPm-WPRE.

*** Construction du plasmide synapsine humaine-eGFP**

Différentes étapes de sous-clonages permettent d'intégrer la cassette « promoteur hSYN-eGFP » (environ 1,2 kb) du plasmide pMH4-I-SYN-eGFP (gracieusement fourni par Sebastian Kügler, Göttingen, Allemagne) entre les sites XbaI et SpeI du plasmide pFlap-PL-WPRE. La constuction finale est alors notée pFlap-hSYN-eGFP-WPRE.

*** Construction du plasmide GFAP humain-eGFP**

Dans un premier temps, le promoteur GFAP humain (hGFAP) de 2,2 kb (gracieusement fourni par Michael Brenner, Bethesda, MD) est intégré au plamide pFlap-PL-WPRE au niveau du site BamHI. Puis la protéine eGFP est, à son tour, insérée en aval du promoteur hGFAP au niveau des sites SmaI et XbaI. Le plasmide obtenu est noté pFlap-hGFAP-eGFP-WPRE.

C. Production

La production des virus recombinants s'effectue dans un niveau de confinement 3 par transfection* transitoire au phosphate de calcium (Annexe #3) de cellules HEK293T (lignée de cellules embryonnaires de rein humain) avec le plasmide d'encapsidation p8.91 (ΔVpr ΔVif ΔVpu ΔNef), le plasmide d'enveloppe (codant soit VSV, soit Mokola) et le plasmide vecteur. La récolte des virus a lieu 48h post-transfection. Les surnageants sont alors traités à la DNAseI (Roche Diagnostics, Nutley, NJ ; #1 284 932 ; 5 µg/ml) et filtrés avant d'être ultracentrifugés à 22000 rpm pendant 1h30. Les vecteurs viraux contenus dans le culot sont ensuite resuspendus en PBS1X, aliquotés et congelés à -80°C.

La détermination du titre de chaque stock est réalisée par dosage ELISA* (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay ; Beckman Coulter, Fullerton, CA ; #6604535) des protéines p24 de capside.

III.Dot-Blot

Pour vérifier la capacité des vecteurs de différenciation à transduire des cellules en culture, une lignée de cellules HEK293T* et les progéniteurs nerveux fœtaux humains sont ensemencés en plaques 6 puits préalablement traitées en gélatine (Merck, Darmstadt, Germany ; 25 µg/cm^2) et laminine (Sigma, St. Louis, MO ; 1,7 µg/cm^2). Chaque puits contient 7.10^5 cellules pour les lignées et 1,5.10^6 cellules pour les progéniteurs nerveux. Les cellules en suspension sont immédiatement mises au contact des différents vecteurs

lentiviraux construits et produits, par ajout de 100 ng p24 de vecteur au milieu de culture (11 ng p24/cm²). Les cellules sont récoltées après 5 jours et les ARN totaux sont extraits à l'aide du kit RNABle (Eurobio ; #GEXEXT00-0P). Les échantillons d'ARN sont dénaturés par dilution dans 100 µl de SSC5X (3 concentrations par échantillon : 1 µg, 5 µg et 10 µg) et déposés sur une membrane de nitrocellulose Hybond N+ (Amersham Biosciences, Fairfield, CT ; #RPN303B). Après 2 rinçages rapides en SSC 5X, les ARN sont fixés sur la membrane par passage dans un UV Stratalinker 1800 (Stratagène). Les ARNm sont ensuite détectés par hybridation des sondes *Ngn1*, *Ngn2*, *Ngn3* et *Mash1* (10^6 cpm/ml) marquées au Phosphore 32 (P^{32}) sur la nuit à 65°C. Des lavages successifs de 10 minutes dans un tampon contenant 0,1% de SDS et des concentrations décroissantes de SSC (2X, 1X, 0,5X puis 0,1X) permettent de décrocher les sondes hybridées de façon non spécifique. La radioactivité est détectée soit au PhosphoImager après 1h d'exposition sur un écran hypersensible pour les cellules HEK293T, soit par impression d'un film photographique (Hyperfilm, Amersham Biosciences ; #RPN1675K) à -70°C sur la nuit pour les progéniteurs nerveux.

IV. Transduction lentivirale des cellules en culture

A. Transduction avec les vecteurs de différenciation

Les cellules TFH6 et TFH7 sont maintenues en culture pendant respectivement 160 jours et 153 jours. Elles sont alors dissociées et ensemencées en plaques 24 puits sur substrat adhérent (gélatine/laminine) à une densité de $1{,}2.10^5$ cellules par puits dans un milieu standard « N2 » (Annexe #3) supplémenté en bFGF (Roche Diagnostics, Nutley, NJ ; 10 ng/ml). Les cellules sont entretenues dans ces conditions pendant 4 jours, avant transduction avec les différents vecteurs de différenciation. La transduction est effectuée dans du milieu complet (supplémenté en bFGF) par ajout de 50 ng p24 de vecteur par puits dans 400µl (26 ng p24/cm²) (jour 1). Le milieu est substitué 24h plus tard par du milieu standard supplémenté ou non en bFGF (jour 2). Au jour 5, les cellules sont fixées en paraformaldéhyde (PFA) 4% pendant 30min à température ambiante puis conservées à 4°C en PBS 1X. La validité des résultats est assurée par l'utilisation de deux témoins négatifs (transduction contrôle avec un vecteur VSV-PGK-LacZ et contrôle sans infection)

B. Transduction avec les vecteurs traceurs

Les cellules TFH6 maintenues en culture pendant 133 jours sont dissociées, resuspendues dans du milieu standard supplémenté en EGF (20 ng/ml) et bFGF (20 ng/ml), ensemencées à

une densité de 3.10^5 cellules par puits de plaque 6 puits, et maintenues en suspension pendant 5 jours. Elles sont alors transduites avec une gamme croissante de concentrations (5, 10, 20, 30 et 50 ng p24) pour chaque vecteur traceur (jour 1). Au jour 14, les cellules sont individualisées. Une partie est fixée pour l'analyse par FACS en formaldéhyde 1%. L'autre fraction utilisée pour l'analyse immunocytochimique est ensemencée en plaques 24 puits, sur des lamelles de verre préalablement traitées en gélatine (25 $\mu g/cm^2$) et laminine (1,7 $\mu g/cm^2$), à une densité de $1,2.10^5$ cellules par puits. Les cellules sont fixées au jour 16 en PFA 4% pendant 30 minutes et stockées à 4°C en PBS 1X.

V. Immunocytochimie

Les cellules fixées sur lamelles de verre sont saturées pendant 1h à température ambiante dans une solution de PBS 1X/0,25% gélatine/0,1% triton-X /10% sérum de chèvre fœtal. L'incubation avec les anticorps primaires, dilués en PBS 1X/0,25% gélatine/0,1% triton-X /2% sérum de chèvre fœtal se fait sur la nuit à 4°C avec les anticorps suivants :

- anti-GFP (Abcam ; #ab 290 ou ab1218 ; 1/800 ou 1/400)
- anti-Nestine (Chemicon, Billerica, MA ; #MAB5326 ; 1/500)
- anti-MAP-5 (Sigma ; #M4528 ; 1/400)
- anti-βIII-tubuline ou TuJ1 (Sigma ; #T8660 ; 1/400)
- anti-MAP-2 (Chemicon ; #24040368 ou 24070158 ; 1/800)
- anti-GFAP (Dako, Glostrup, Danemark ; #Z0334 ; 1/400)
- anti-A2B5 (gracieusement fourni par Annick Baron, Paris, France ; 1/2)
- anti-CNPase (Sigma, #C5922 ; 1/100)
- anti-O4 (gracieusement fourni par Annick Baron, Paris, France ; 1/10)
- anti-Ki67 (Abcam, Cambridge, Angleterre ; #ab15580 ; 1/400)
- anti-dopamine beta hydroxylase (DBH) (Chemicon ; #AB1538 ; 1/200)
- anti-sérotonine (Chemicon ; #MAB352 ; 1/50)
- anti-GABA (Sigma ; #A2052 ; 1/500)
- anti-GAD67 (Chemicon ; #MAB5406 ; 1/500)
- anti-HB9/HLXB9 (Abcam ; #ab12028 ; 1/100)
- anti-choline acétyltransférase (ChAT) (Chemicon ; AB143 ; 1/100)

Après 3 lavages en PBS 1X, les cellules sont incubées pendant 2h à température ambiante dans une solution de PBS 1X/0,25% gélatine/0,1% triton-X /2% sérum de chèvre fœtal contenant les anticorps secondaires suivants :

- anti-IgG de lapin conjugué à l'Alexa Fluor® 594 (Invitrogen ; #A11012 ; 1/1000)
- anti-IgG de lapin conjugué à l'Alexa Fluor® 488 (Invitrogen ; #A11008 ; 1/1000)
- anti-IgG de souris conjugué à l'Alexa Fluor® 594 (Invitrogen ; #A11005, 1/1000)
- anti-IgG de souris conjugué à l'Alexa Fluor® 488 (Invitrogen ; #A11001 ; 1/1000)
- anti-IgG_{2b} de souris conjugué à l'Alexa Fluor® 568 (Invitrogen ; #A11012 ; 1/1000)
- anti-IgG1 de souris conjugué au FITC (SouthernBiotech, Birmingham, AL ; #1070-02 ; 1/200)
- anti-IgM de souris conjugué au Texas-Red (SouthernBiotech, Birmingham, AL ; #1021-07 ; 1/100)

Les noyaux sont contre-colorés par une solution de Hoechst 33342 (Sigma ; #B2261 ; 35 ng/ml en PBS 1X). Les lamelles de verre sont ensuite montées en moviol (Annexe #3). Des photos couleur sont prises à l'objectif 20X ou à l'objectif 40X d'un microscope à fluorescence (Zeiss, Axioplan 2) équipé d'une caméra couleur (AxioCam HRc) (grossissement final : X200 ou X400). Pour chaque lamelle, 10 champs distincts sont photographiés et analysés par comptage des cellules marquées.

VI. Analyse par cytométrie en flux

Les cellules préparées pour la cytométrie en flux* sont dissociées avec de la trypsine (cellules HEK293T) ou de l'ATV (cellules nerveuses fœtales humaines), resuspendues dans leur milieu de culture puis fixées dans un volume équivalent de Formaldéhyde 2%-PBS 2X. Les cellules ainsi en suspension sont analysées pour leur fluorescence (pourcentage de cellules fluorescentes et fluorescence moyenne par cellule) grâce au cytomètre en flux « Becton Dickinson FACScan ». Les données sont ensuite traitées via le logiciel CellQuest.

VII. Statistiques

L'ensemble des expériences est réalisé en triplicate permettant ainsi un calcul de la moyenne et de l'erreur standard à la moyenne. La significativité statistique des résultats comparativement aux témoins est déterminée par une ANOVA à une voie suivie d'un test t.

Résultats

Au cours de ma thèse, deux procédures distinctes ont été adoptées afin d'homogénéiser les populations de cellules à greffer.

* La première consiste à surexprimer les gènes proneuraux à motif bHLH, Ngn1, Ngn2, Ngn3 et Mash1, dans des cellules souches et progénitrices nerveuses foetales humaines en culture, dans le but d'induire leur différenciation vers un phénotype particulier. La surexpression de chaque gène est dirigée par le promoteur ubiquitaire PGK dans des vecteurs lentiviraux dits « de différenciation », notés VSV-PGK-Ngn1, VSV-PGK-Ngn2, VSV-PGK-Ngn3 et VSV-PGK-Mash1. Les cellules transduites sont ensuite analysées par immunocytochimie puis comptage manuel, afin de déterminer la proportion de chaque marqueur cellulaire.

* La seconde repose sur la validation d'un système lentiviral (« vecteurs traceurs »), supposé induire l'expression spécifique de gènes rapporteurs (eGFP ou eYFP) sous le contrôle de promoteurs appartenant à des lignages cellulaires déterminés. L'appréciation de la spécificité est obtenue par caractérisation des différents types cellulaires présents dans la population fluorescence. L'objectif final consiste à sélectionner les cellules d'intérêt par cytométrie en flux.

Le bien-fondé de chacun de ces deux systèmes est vérifié par évaluation de l'enrichissement cellulaire pour le premier et par évaluation de la spécificité d'expression des transgènes pour le second.

I. Effet des gènes proneuraux

Dans le but d'enrichir les cultures en un type cellulaire donné, une première stratégie vise à aiguiller le devenir des progéniteurs nerveux humains vers un lignage précis par le biais de vecteurs lentiviraux surexprimant des gènes proneuraux à motif bHLH. Ainsi, nous avons construit des vecteurs lentiviraux (dits « de différenciation ») codant les gènes Ngn1, Ngn2, Ngn3 et Mash1 sous le contrôle du promoteur ubiquitaire PGK. Le rôle particulier de ces gènes a ensuite été évalué sur deux populations de cellules neuroépithéliales en culture (TFH7 et TFH6) à travers une analyse phénotypique pré- et post-transduction au moyen d'anticorps dirigés contre les différents lignages du SNC. Nous avons, par ailleurs, étudié l'influence sur la différenciation, du milieu de culture dans lequel sont maintenues les cellules après transduction.

A. Efficacité de transduction des vecteurs de différenciation

Afin d'évaluer l'efficacité de transduction des différents vecteurs de différenciation, c'est-à-dire leur capacité à pénétrer dans la cellule, à s'intégrer dans le génome et à exprimer le transgène, deux types cellulaires ont été utilisés : une lignée de cellules HEK293T (cellules embryonnaires de rein humain) et des progéniteurs nerveux humains en culture primaire. Pour la transduction, chaque type de cellules a été exposé à une dose de vecteurs de 11 ng p24/cm² et maintenu *in vitro* pendant 5 jours.

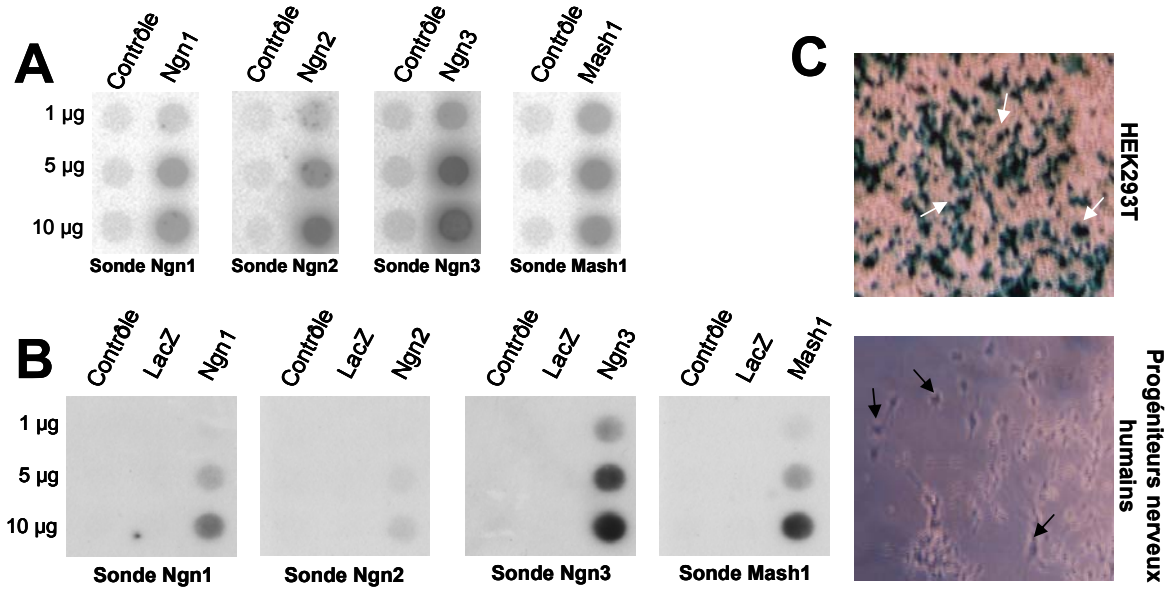


Figure III-1 : Efficacité de transduction des vecteurs de différenciation

Une lignée de cellules HEK293T et des progéniteurs nerveux humains ont été dissociés, ensemencés en plaques 6 puits et transduits avec 11 ng p24/cm² de vecteurs de différenciation. L'efficacité de transduction des différents vecteurs a été analysée par Dot-Blot (A et B) et par immunocytochimie (C) pour déterminer.

A, B- L'expression des gènes proneuraux a été vérifiée par Dot-Blot après extraction des ARN totaux. Des doses croissantes d'ARN (1, 5 et 10 µg) ont été déposées sur les membranes, chaque membrane correspondant à un type de cellules donné -HEK293T (B) ou précurseurs nerveux (C)- et à une transduction donnée (VSV-PGK-Ngn1 ou VSV-PGK-Ngn2 ou VSV-PGK-Ngn3 ou VSV-PGK-Mash1). Les sondes radioactives associées aux membranes permettent de mettre en évidence l'expression des transgènes dans les cellules. Les ARN isolés à partir de cellules non transduites (contrôle) ou de cellules transduites avec le vecteur VSV-PGK-LacZ constituent les témoins négatifs.

C- L'expression du transgène du vecteur contrôle VSV-PGK-LacZ a été analysée par détection de l'activité enzymatique de la β-galactosidase. Une coloration bleue (indiquée par les flèches noires et blanches) apparaît dans les cellules qui expriment la protéine (observation au microscope optique: grossissement X200).

Ne disposant pas d'anticorps anti-Ngn1, Ngn2, Ngn3 et Mash1 efficaces, nous avons analysé l'expression des gènes proneuraux au niveau transcriptionnel. Les ARN totaux des cellules non transduites et des cellules transduites avec les vecteurs VSV-PGK-Ngn1, VSV-PGK-Ngn2, VSV-PGK-Ngn3 et VSV-PGK-Mash1 ont été extraits, et la détection des ARN messagers spécifiques des différents transgènes a été réalisée par Dot-Blot. La révélation met en évidence la présence d'ARNm correspondant aux gènes Ngn1, Ngn2, Ngn3 et Mash1 dans

les cellules HEK293T (Figure III-1 A) et dans les progéniteurs nerveux humains (Figure III-1 B). Ceci indique non seulement que l'ADN des vecteurs de différenciation s'est intégré au génome des cellules hôtes mais également que cet ADN utilise la machinerie cellulaire pour mener à bien son processus de transcription.
L'efficacité de transduction du vecteur VSV-PGK-LacZ a également été déterminée par analyse de l'activité enzymatique de la β-galactosidase. L'observation microscopique des cellules montre l'apparition d'une coloration bleue, intense au niveau nucléaire, aussi bien dans les cellules HEK293T que dans les progéniteurs nerveux humains (Figure III-1 C). Cette réaction indique la présence de la protéine β-galactosidase dans les cellules, ce qui sous-entend que l'ADN viral s'est intégré dans le génome et que les cellules expriment le transgène.

Les différents résultats valident l'efficacité de transduction du vecteur contrôle et des vecteurs de différenciation et accréditent la stratégie de surexpression des gènes proneuraux.

B. Caractérisation de la population initiale

Deux fœtus âgés de 7 et 6 semaines embryonnaires, appelés respectivement TFH7 et TFH6, ont été utilisés dans cette étude. Les vésicules télencéphaliques ont été disséquées selon une procédure décrite ci-dessus (voir Matériel et Méthodes). Les cellules individualisées obtenues ont ensuite été mises en culture et amplifiées sous forme de neurosphères en présence d'EGF et de bFGF. Après respectivement 153 et 160 jours de culture, les cellules ont été ensemencées sur substrat adhérent afin de déterminer leur phénotype. Après fixation, une analyse immunocytochimique a été réalisée à l'aide d'anticorps dirigés contre les différents lignages du système nerveux central : anti-nestine pour les cellules immatures ; anti- Map5, anti-β3tubuline et anti-Map2 pour le lignage neuronal ; anti-GFAP pour le lignage astrocytaire ; anti-A2B5 et anti-O4 pour le lignage oligodendrocytaire (Figures III-2, III-3 et III-4). Des doubles marquages nestine/GFAP (Figure III-3) et A2B5/Map5 (Figure III-4) ont été effectués afin de discriminer les cellules de lignages distincts. Le potentiel de prolifération des cellules a été évalué grâce à un marquage anti-Ki67 (Figure III-2).

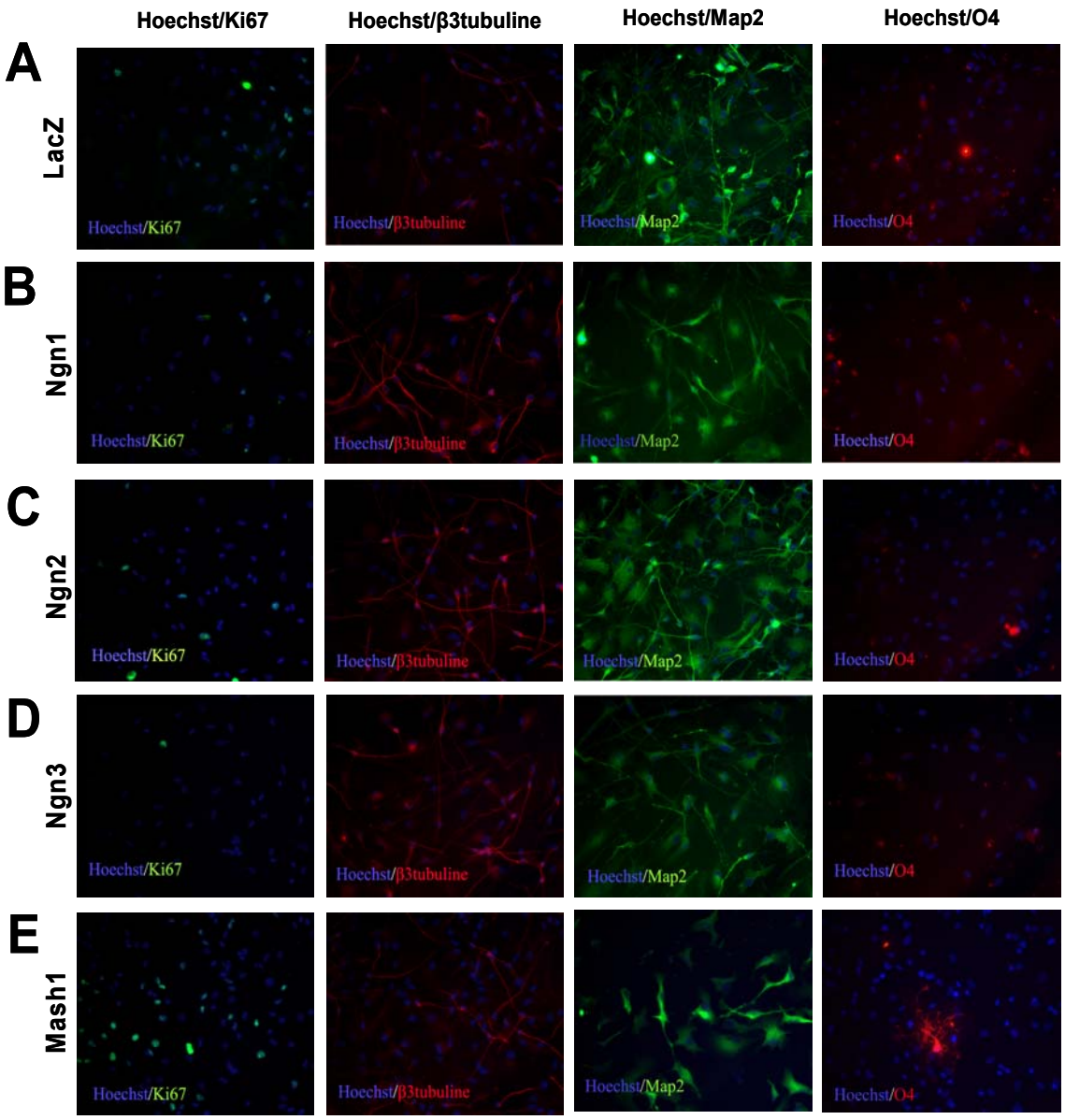


Figure III-2 : Phénotype des cellules transduites avec les vecteurs de différenciation

Les populations TFH7 et TFH6 transduites avec les vecteurs VSV-PGK-LacZ (A), VSV-PGK-Ngn1 (B), VSV-PGK-Ngn2 (C), VSV-PGK-Ngn3 (D) et VSV-PGK-Mash1 (E) ont été caractérisées par immunocytochimie afin de déterminer leur phénotype. Les anticorps anti-Ki67 permettent de visualiser les cellules en prolifération (coloration verte), les anticorps anti-β3tubuline (coloration rouge) et anti-Map2 (coloration verte) permettent de mettre en évidence les cellules du lignage neuronal et les anticorps anti-O4 détectent les cellules du lignage oligodendrocytaire (coloration rouge). Un marquage au hoechst permet de localiser les noyaux cellulaires (coloration bleue) (grossissement X200).

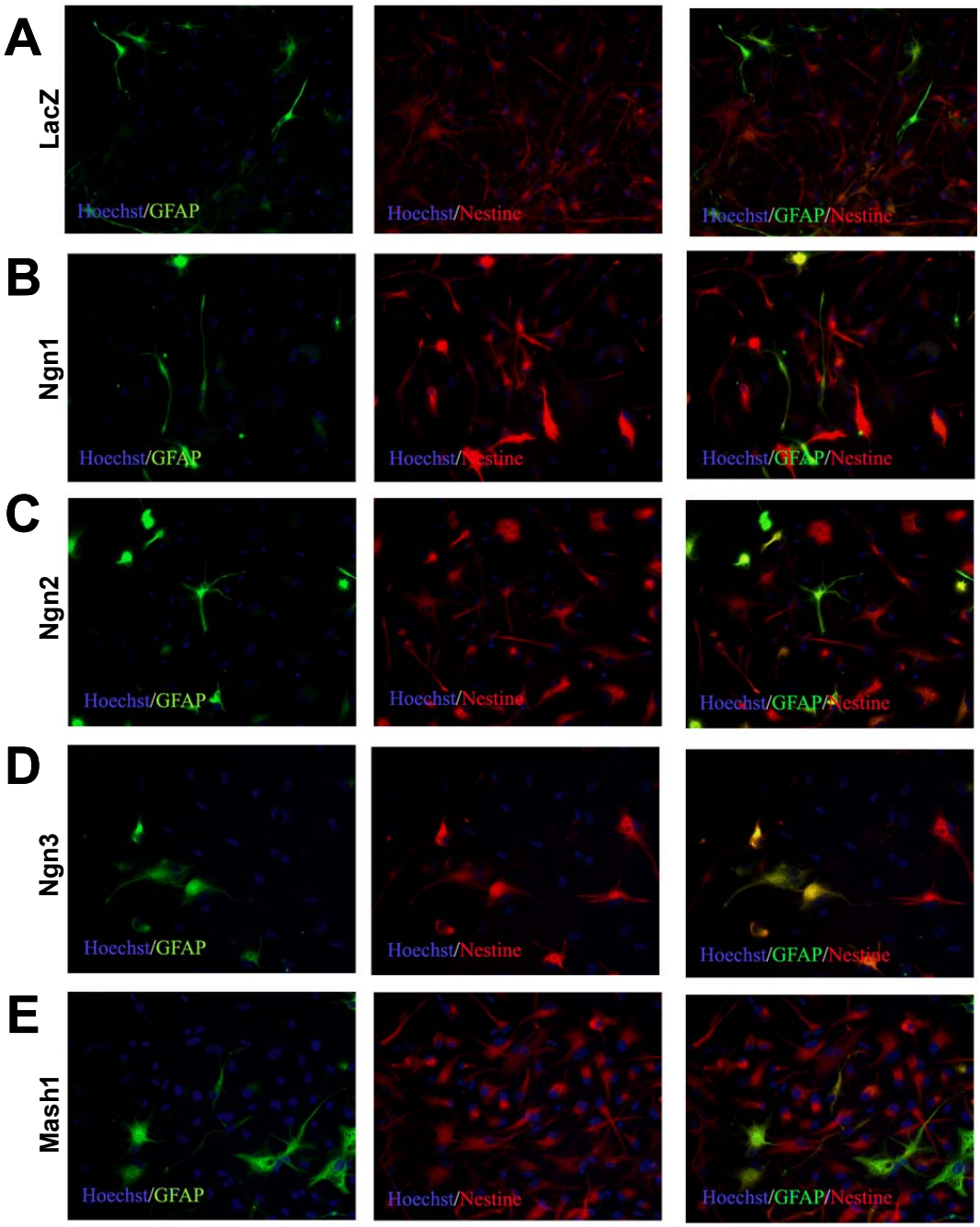


Figure III-3 : Analyse immunocytochimique nestine/GFAP

Les populations TFH7 et TFH6 transduites avec les vecteurs VSV-PGK-LacZ (A), VSV-PGK-Ngn1 (B), VSV-PGK-Ngn2 (C), VSV-PGK-Ngn3 (D) et VSV-PGK-Mash1 (E) ont été caractérisées par immunocytochimie afin de déterminer leur phénotype. Des doubles marquages nestine/GFAP permettent à la fois de visualiser les cellules nestine+ (coloration rouge) et GFAP+ (coloration verte) mais également de discriminer les cellules nestine+/GFAP+ (coloration jaune) appartenant vraisemblablement au lignage astrocytaire des cellules nestine+/GFAP- correspondant aux cellules immatures. Un marquage au hoechst (coloration bleue) permet de localiser les noyaux cellulaires.

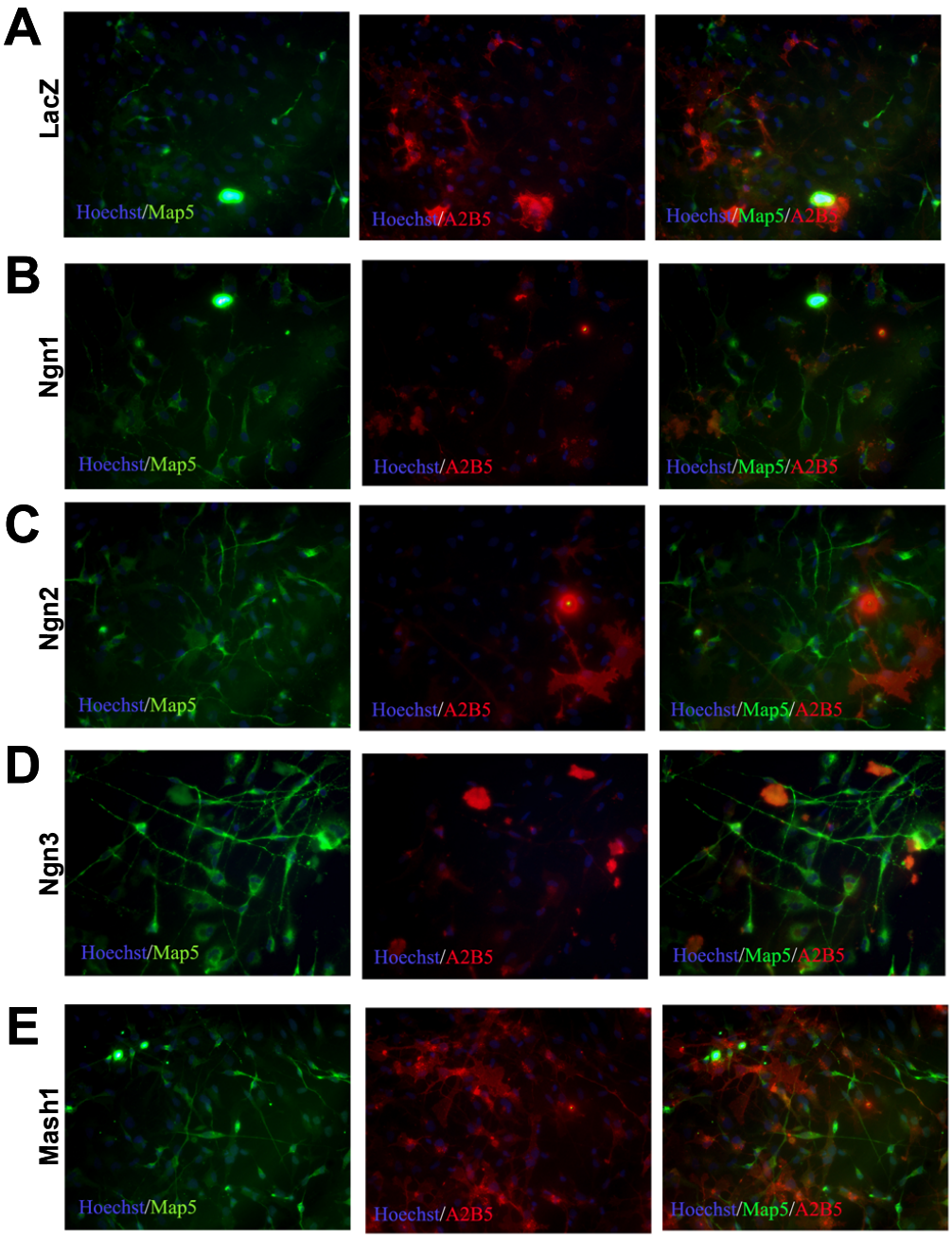


Figure III-4 : Phénotype des cellules transduites avec les vecteurs de différenciation

Les populations TFH7 et TFH6 transduites avec les vecteurs VSV-PGK-LacZ (A), VSV-PGK-Ngn1 (B), VSV-PGK-Ngn2 (C), VSV-PGK-Ngn3 (D) et VSV-PGK-Mash1 (E) ont été caractérisées par immunocytochimie afin de déterminer leur phénotype. Des doubles marquages A2B5/Map5 permettent à la fois de visualiser les cellules A2B5+ (coloration rouge) et Map5+ (coloration verte) mais également de discriminer les cellules A2B5+/Map5+ (coloration jaune) appartenant au lignage neuronal des cellules A2B5+/Map5- appartenant au lignage glial. Un marquage au hoechst (coloration bleue) permet de localiser les noyaux cellulaires (grossissement X200).

1. Phénotype initial de TFH7

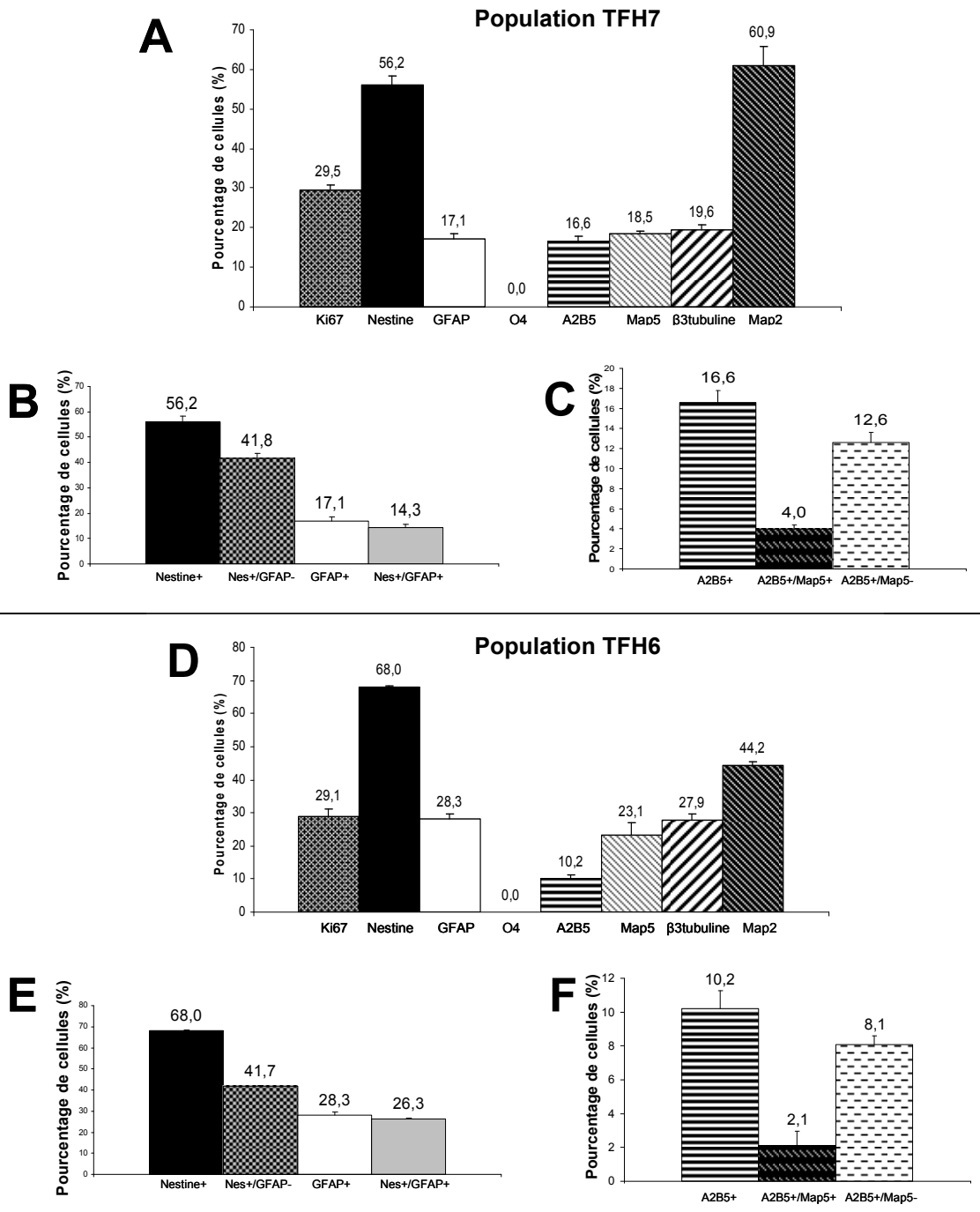


Figure III-5: Phénotype initial des populations cellulaires extraites des embryons TFH7 âgé de 7 semaines embryonnaires (A, B, C) et TFH6 âgé de 6 semaines embryonnaires (D, E, F).

Les progéniteurs nerveux ont été maintenus sous forme de neurosphères en présence de milieu standard supplémenté en EGF et bFGF pendant respectivement 153 et 160 jours. Ils ont ensuite été ensemencés sur substrat adhérent en plaques 24 puits à une densité de $1{,}2.10^5$ cellules/puits, maintenus pendant 4 jours dans un milieu supplémenté en bFGF, fixés au paraformaldéhyde 4% et analysés par immunocytochimie à l'aide d'anticorps dirigés contre les différents lignages du système nerveux central.

Dans les conditions de culture utilisées, 29,5% des cellules expriment le marqueur Ki67, 56,2% expriment le marqueur nestine, 17,1% le marqueur GFAP, 18,5% le marqueur Map5,

19,6% le marqueur β3tubuline, 60,9% le marqueur Map2, 16,6% le marqueur A2B5 et aucune n'exprime le marqueur O4 (Figure III-5 A).

Les cellules contiennent donc des cellules immatures ainsi que des cellules des lignages neuronal et glial. Cependant, il convient d'être prudent dans l'interprétation de ces données. En effet, si l'expression de Map5, β3tubuline, et Map2 est restreinte à un seul lignage (le lignage neuronal), il n'en est pas de même pour les marqueurs nestine, GFAP et A2B5. Ainsi, parmi les cellules nestine+, environ ¼ co-exprime la GFAP, alors que ¾ ne co-expriment pas cette protéine (Figure III-5 B). Bien que la GFAP soit connue pour être exprimée spécifiquement par les astrocytes, des études récentes ont montré que les cellules souches de la zone sous-ventriculaire (ZSV) adulte étaient également des cellules GFAP+ (Doetsch et al., 1999; Merkle et al., 2004). Depuis la parution de ces travaux, certaines études tendent à conclure un peu trop rapidement quant à la nature des cellules GFAP+ en culture et assimilent les cellules nestine+/GFAP+ à des cellules souches ou à des progéniteurs multipotents (Laywell et al., 2000; Rieske et al., 2007; Steindler and Laywell, 2003). Afin d'affiner l'interprétation de nos résultats et de discriminer entre cellules immatures (potentiellement « souche ») et astrocytes, nous avons effectué des doubles marquages GFAP/Ki67 et nestine/Ki67 (Figure III-6 A). L'analyse indique que de nombreuses cellules nestine+ co-expriment le marqueur Ki67 (et donc prolifèrent), alors qu'aucune cellule GFAP+ n'est doublement marquée. L'auto-renouvellement (et donc la prolifération) étant l'une des caractéristiques principales des cellules souches, nos observations nous permettent de conclure que, dans nos conditions de culture, les cellules GFAP+ (qui sont par ailleurs quasiment toutes nestine+) (Figures III-3 A et III-5 B) ne correspondent pas à une sous-population de cellules souches. Ainsi, nous considérerons pour la suite que les cellules GFAP+ (qu'elles soient nestine+ ou nestine-) sont des astrocytes et que les cellules nestine+/GFAP- sont des cellules immatures.

Il est également intéressant de constater que le marqueur A2B5 n'est pas spécifique du lignage oligodendrocytaire (Figure II-5 C) Environ ¼ des cellules A2B5+ co-exprime le marqueur Map5, suggérant leur appartenance au lignage neuronal. Cette hypothèse est confortée par l'analyse morphologique des cellules exprimant le marqueur A2B5 (Figure III-6 B). Les cellules A2B5+/Map5+ sont rondes, bipolaires et de petite taille, morphologie typique des neuroblastes. A l'opposé les cellules A2B5+/Map5- sont de grosses cellules plates très étalées. Ainsi contrairement à des études menées chez le rongeur qui rapportent une expression exclusivement gliale (Raff et al., 1983; Rao and Mayer-Proschel, 1997), le marqueur A2B5 caractérise aussi le lignage neuronal chez l'humain (Marconi et al., 2005).

Afin de rester prudents dans l'interprétation de nos résultats, dans la suite de notre étude, nous parlerons de « progéniteurs neuronaux A2B5+ » pour les cellules A2B5+/Map5+ et de progéniteurs gliaux (potentiellement oligodendrocytaires) pour les cellules A2B5+/Map5-.

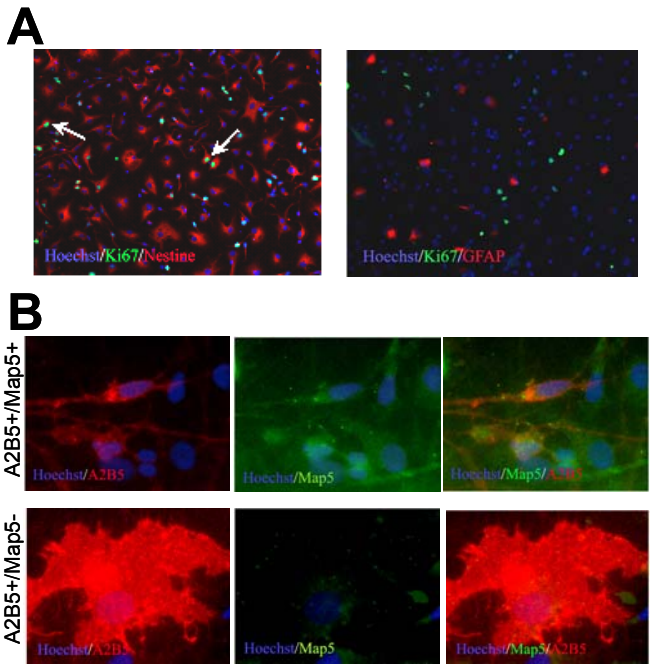


Figure III-6 : Discimination des populations doublement marquées nestine/GFAP et A2B5/Map5

L'analyse immunocytochimique effectuée sur les cellules neuroépithéliales en culture a mis en évidence que certaines cellules coexprimait les marqueurs nestine et GFAP et d'autres les marqueurs A2B5 et Map5. Une observation plus poussée de ces 2 sous-populations a fait ressortir certaines de leurs caractéristiques propres.

A- Des doubles marquages Ki67/nestine et Ki67/GFAP ont révélé l'absence de prolifération des cellules GFAP+ et à l'opposé, une forte proportion de cellules continue à se diviser parmi les cellules nestine+ (flèche blanche). Cette fraction correspond aux cellules neuroépithéliales immatures. (grossissement X 200)

B- Analyse morphologique des cellules A2B5+ (grossissement X 1000)
Les cellules A2B5+/Map5+ sont de petites cellules bipolaires : elles présentent une morphologie habituellement caractéristique des neuroblastes.
Les cellules A2B5+/Map5- sont de grosses cellules plates très étalées.

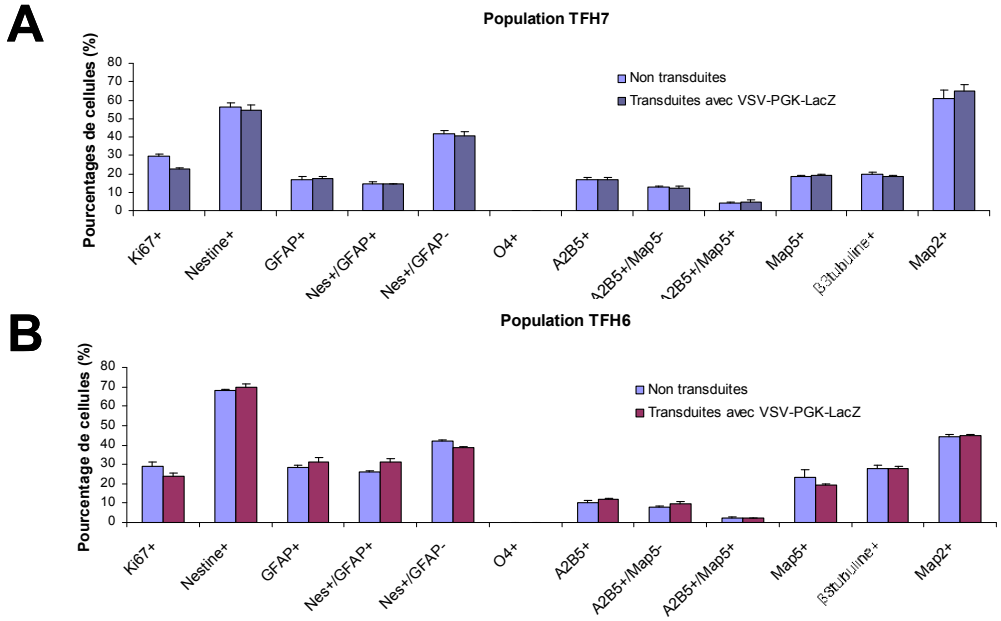


Figure III-7: Effet de la transduction sur les cellules en culture

Les cellules neuroépithéliales extraites des embryons TFH7 (A) et TFH6 (B) ont été dissociées et ensemencées sur support adhérent en plaques 24 puits à une densité de $1,2.10^5$ cellules/puits. Après 4 jours, une partie des cellules a été transduite avec 26 ng p24/cm² de vecteur VSV-PGK-LacZ. Les cellules ont été maintenues dans le milieu de culture standard supplémenté en bFGF, fixées 4 jours plus tard puis analysées par immunocytochimie afin de déterminer leur phénotype. La comparaison des résultats obtenus pour les cellules transduites et non transduites permet d'évaluer l'effet de la transduction en elle-même sur les cellules en culture.

2. Phénotype initial de TFH6

La population TFH6 présente un phénotype globalement similaire à celui de la population TFH7 : 29,1% des cellules prolifèrent, comme l'atteste l'expression de Ki67, 68% expriment le marqueur nestine, 28.3% le marqueur GFAP, 23,1% le marqueur Map5, 27,9% le marqueur β3tubuline, 44,2% le marqueur Map2, 10,2% le marqueur A2B5 et aucune cellule n'exprime le marqueur O4 (Figure III-5 D). Parmi les cellules nestine+, environ 1/3 correspond à des astrocytes nestine+/GFAP+ et 2/3 sont des cellules immatures nestine+/GFAP- (Figure III-5 E). Notons également que la quasi-totalité des cellules GFAP+ co-exprime la nestine. Parmi les cellules A2B5+, approximativement 1/5 correspond à des neuroblastes A2B5+/Map5+ (Figure III-5 F).
Globalement, une expression moins importante des marqueurs nestine, Map5 et β3tubuline associée à une expression plus importante du marqueur Map2 suggère un état de différenciation légèrement plus avancé de la population TFH7 par rapport à la population TFH6. Ces nuances pourraient refléter la différence d'âge entre les deux fœtus au moment du prélèvement.

En conclusion, dans les conditions de culture décrites précédemment, les populations cellulaires TFH7 et TFH6 prolifèrent activement (environ 30%), présentent une grande proportion de cellules immatures (environ 42% de cellules nestine+/GFAP-), ainsi que des cellules engagées dans les trois voies principales de différenciation du SNC : des neuroblastes (19-23% de cellules Map5+ et/ou β3tubuline+), des neurones matures (44-61% de cellules Map2+), des astrocytes (17-28% de cellules GFAP+) et des progéniteurs gliaux potentiellement oligodendrocytaires (8-12% de cellules A2B5+/Map5-).

C. Effet de la surexpression des gènes proneuraux

Afin de déterminer l'influence de la surexpression des gènes Ngn1, Ngn2, Ngn3 et Mash1 sur la différenciation des cellules *in vitro*, les populations TFH7 et TFH6 ont été transduites avec les vecteurs VSV-PGK-Ngn1, VSV-PGK-Ngn2, VSV-PGK-Ngn3 et VSV-PGK-Mash1. Les cellules ont été fixées 4 jours après transduction et leurs caractéristiques analysées par immunocytochimie.
Dans un premier temps, de manière à s'affranchir de l'effet potentiel de la transduction en elle-même, des cellules ont été transduites à l'aide d'un vecteur contrôle codant la β-

galactosidase (VSV-PGK-LacZ). Pour les deux populations cellulaires TFH7 et TFH6, aucune variation phénotypique significative n'est observée entre les cellules transduites avec le témoin et les cellules non transduites (Figure III-7). La transduction n'a donc pas d'incidence sur la prolifération et/ou la différenciation cellulaire. Les observations faites après transduction avec les vecteurs de différenciation sont donc exclusivement liées à la surexpression des gènes et non pas à la transduction.

1. Effet de la surexpression des gènes proneuraux sur la prolifération cellulaire

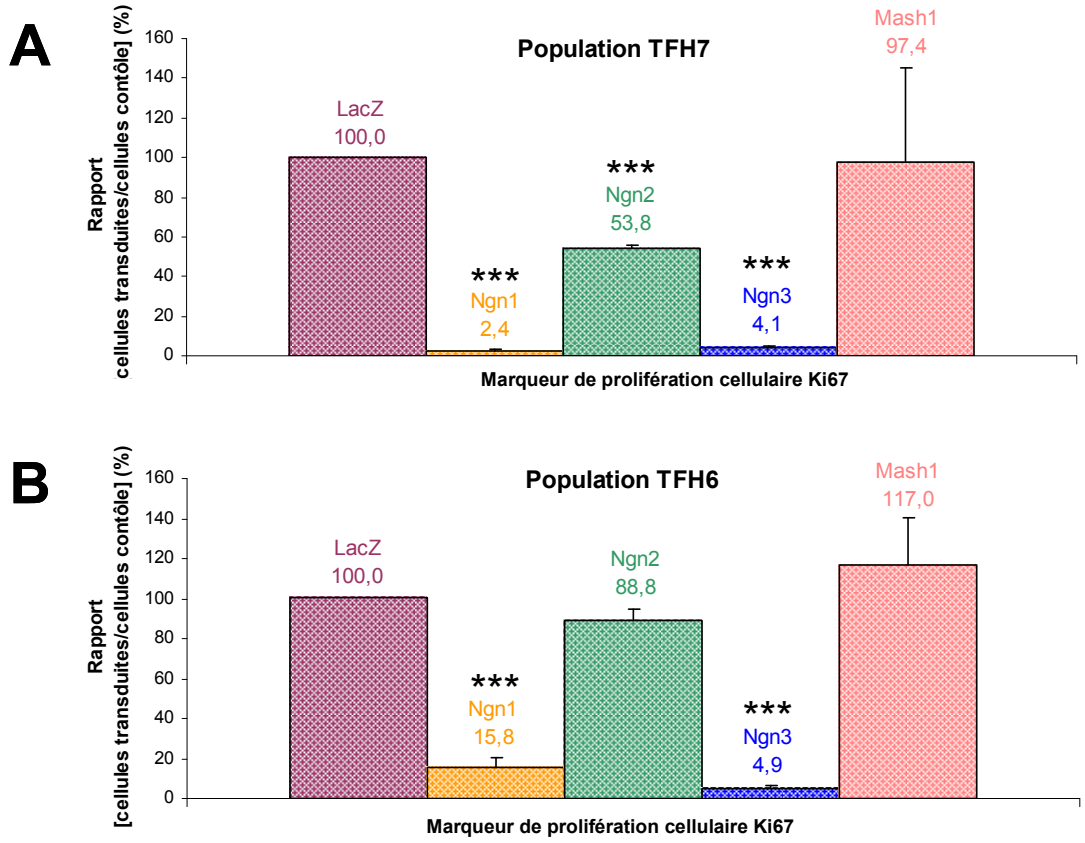


Figure III-8 : Effet des gènes proneuraux sur la prolifération cellulaire

Les progéniteurs nerveux des populations TFH7 (A) et TFH6 (B) ont été ensemencés sur support adhérent en plaques 24 puits et transduits avec 26 ng p24/cm² de vecteurs de différenciation surexprimant les gènes Ngn1, Ngn2, Ngn3 et Mash1. L'état de prolifération des cellules a été analysé 4 jours après transduction à l'aide d'un anticorps dirigé contre le marqueur de prolifération cellulaire Ki67. L'effet de la surexpression des gènes proneuraux sur la prolifération cellulaire a été évalué par comparaison avec des cellules transduites avec le vecteur contrôle VSV-PGK-LacZ. Le rapport des proportions des cellules Ki67+ dans les populations transduites avec les vecteurs de différenciation sur les proportions des cellules Ki67+ dans les populations transduites avec le vecteur contrôle permet de visualiser l'influence des différents gènes sur la prolifération.

La surexpression des gènes Ngn1 et Ngn3 induit une diminution drastique de la prolifération cellulaire, comme l'atteste le pourcentage des cellules Ki67+ après transduction (Figure III-8). Dans la population TFH7 (Figure III-8 A), leur proportion baisse de 97,6% avec le gène Ngn1 et de 95,9% avec le gène Ngn3.
Une évolution similaire mais moins marquée de la prolifération est observée suite à la surexpression du gène Ngn2. La proportion de cellules Ki67+ est diminuée de 46,2% par rapport au témoin.
En revanche, la surexpression du gène Mash1 n'induit aucun effet significatif sur la prolifération des cellules.
Des tendances identiques sont observées dans la population TFH6 (Figure III-8 B).

D'une manière générale, les gènes Neurogénines induisent donc une diminution de la prolifération cellulaire, particulièrement visible avec les gènes Ngn1 et Ngn3 (Figure III-2). Ces résultats corroborent des études antérieures qui montrent que ces facteurs de transcription* à motif bHLH entraînent un arrêt du cycle cellulaire (Nieto et al., 2001). En revanche, après 4 jours, la surexpression de Mash1 n'a pas (ou pas encore) d'effet sur la prolifération. Ceci est en accord avec les études menées par l'équipe de David Anderson (aux Etats-Unis) (Lo et al., 2002) et par l'équipe de François Guillemot (en France) (Parras et al., 2004), dont les justifications divergent légèrement. En effet, Liching Lo suggère que Mash1 a une plus grande capacité à maintenir la prolifération comparativement aux neurogénines, tandis que Carlos Parras suggère que Mash1 n'a tout simplement pas de rôle significatif sur l'autorenouvellement des progéniteurs neuraux en culture. Un maintien des cellules au-delà de 4 jours post-transduction permettrait de discriminer l'une ou l'autre de ces deux hypothèses.

2. Effet des gènes proneuraux sur la différenciation cellulaire

a) Effet de la surexpression du gène Ngn1

Dans la population TFH7 (Figure III-9 A), la surexpression du gène Ngn1 induit:

- une **diminution** très significative de la proportion des cellules **nestine+** (de 54,7% à 33,6%). Cette variation correspond exclusivement à une baisse de la proportion des cellules immatures nestine+/GFAP- (de 40,3% à 15,7%), puisque la surexpression n'a aucun effet sur la proportion des cellules de type astrocytaire nestine+/GFAP+ (Figure III-9 B).

- une **augmentation** de la proportion des cellules **Map5+** (de 19% à 37,7%) et **β3tubuline+** (de 18,8% à 39,4%), ainsi que celle des cellules **A2B5+** (de 16,6% à 38,5%). Parmi ces dernières (Figure III-9 C), seule la fraction de cellules neuroblastiques A2B5+/Map5+ augmente de manière très significative (de 4,6% à 20,5%) après surexpression de Ngn1. La proportion des cellules A2B5+/Map5- reste stable, à environ 15%.

Des résultats tout à fait analogues sont mis en évidence dans la population TFH6 (Figures III-9 D, E et F).

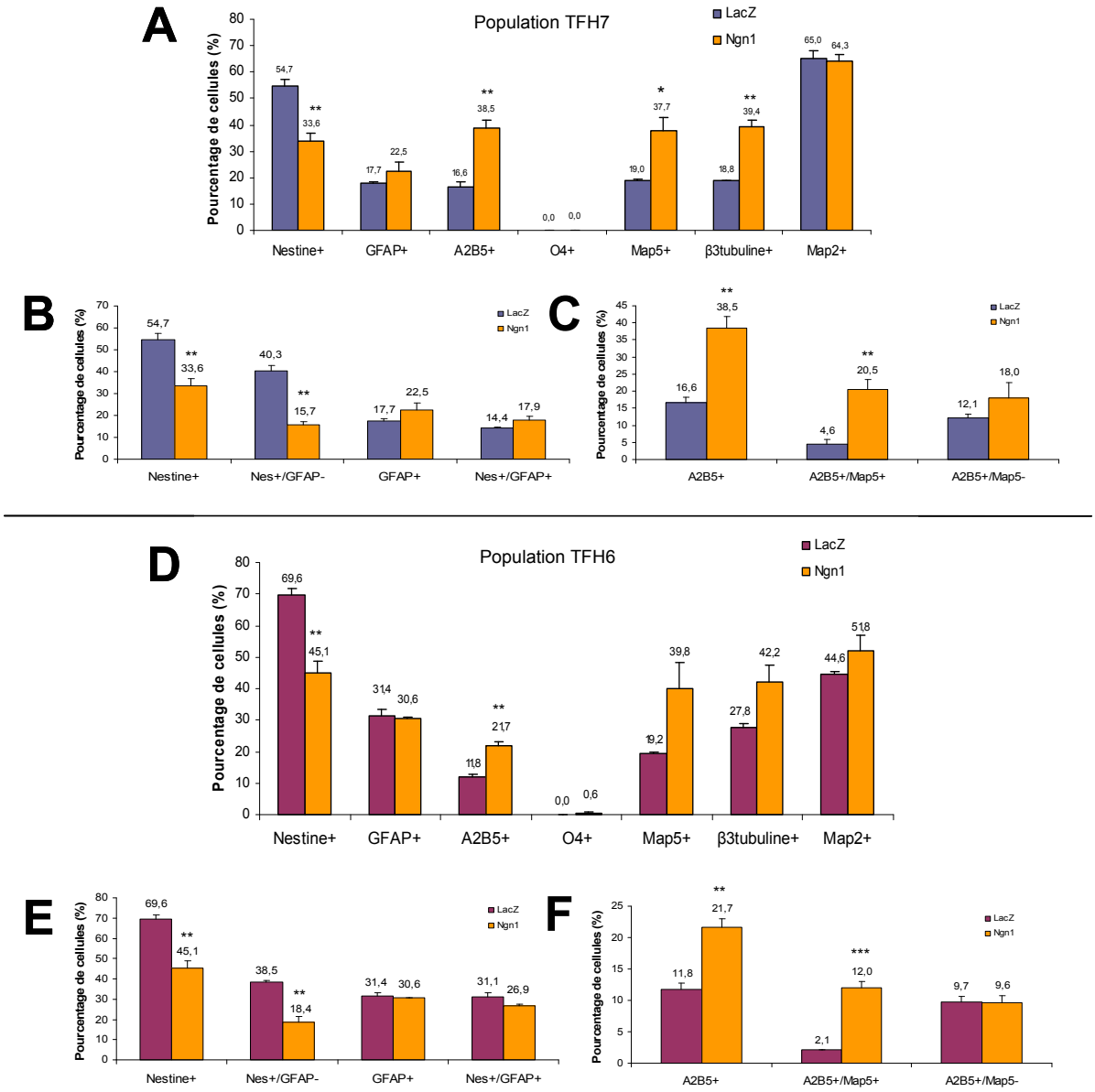


Figure III-9 : Effet de la surexpression Ngn1 sur la différenciation des populations cellulaires TFH7 (A, B, C) et TFH6 (D, E, F)

Les progéniteurs nerveux humains ont été maintenus sous forme de neurosphères en présence d'EGF et bFGF pendant respectivement 153 et 160 jours. Ils ont alors été ensemencés sur substrat adhérent en plaques 24 puits à une densité de $1{,}2.10^5$ cellules/puits et transduits avec 50 ng p24 de vecteur VSV-PGK-Ngn1. Après 4 jours de culture dans un milieu standard supplémenté en bFGF, ils ont été fixés au paraformaldéhyde 4% et caractérisés par immunocytochimie à l'aide d'anticorps dirigés contre les différents lignages du système nerveux central. La comparaison du phénotype obtenu avec celui des populations témoins transduites avec VSV-PGK-LacZ permet d'évaluer l'influence de la surexpression du gène Ngn1 sur la différenciation des cellules *in vitro*.

Ainsi, une diminution importante de la prolifération cellulaire et de la proportion des cellules immatures nestine+/GFAP-, associée à une augmentation significative de la proportion des neuroblastes Map5+ et/ou β3tubuline+ suggère un engagement vers la voie de différenciation neuronale des cellules surexprimant le gène Ngn1. Cette activation de la neurogenèse est en accord avec l'activité proneurale de Ngn1 (Ma et al., 1998; Ma et al., 1999; Ma et al., 1997)

et avec les résultats d'un certain nombre d'équipes qui montrent un accroissement de la proportion des cellules du lignage neuronal par surexpression de Ngn1 (Kim et al., 2004; Muramatsu et al., 2005; Sun et al., 2001). Cependant, il est admis que le gène Ngn1 stimule la neurogenèse, tout en inhibant la gliogenèse (Sun et al., 2001). Or dans nos expériences, aucune variation des cellules du lignage astrocytaire ou du lignage oligodendrocytaire n'a été mise en évidence. Sachant que la double fonction de Ngn1 au niveau neuronal et au niveau glial active des processus différents et indépendants (Sun et al., 2001), il semble que dans nos conditions, le mécanisme qui induit la neurogenèse (via activation de NeuroD) soit favorisé par rapport à celui qui limite la gliogenèse (via séquestration de CBP/p300/Smad1 et/ou suppression de la voie JaK/Stat). Mais cette préférence est-elle un état permanent dû à la surexpression de Ngn1 ou est-il question d'un déroulement chronologique ? Afin de le vérifier, il serait intéressant de conserver plus longuement les cellules transduites et d'analyser l'évolution de leur phénotype. L'étude des différentes voies de signalisation citées ci-dessus pourrait également apporter des compléments d'information.

b) Effet de la surexpression du gène Ngn2

Dans la population TFH7 (Figure III-10 A), la surexpression du gène Ngn2 :

- n'induit **pas de variation** significative de la proportion des cellules exprimant le marqueur **nestine** (environ 52%). Cependant, bien qu'aucun effet ne soit observé sur la population nestine+ globale, on constate que la proportion de cellules de type astrocytaire nestine+/GFAP+ augmente avec la surexpression de Ngn2 (de 14,4% à 24,7%), tandis que la proportion de cellules immatures nestine+/GFAP- diminue de façon significative (de 40,3% à 24,9%) (Figure III-10 B).
- induit une **augmentation** de la proportion des cellules du lignage neuronal exprimant les marqueurs **Map5** (de 19% à 35,7%), **β3tubuline** (de 18,8% à 44,4%) et **Map2** (de 65% à 78,1%), ainsi que celle des cellules exprimant le marqueur **A2B5** (de16,6% à 27,8%). Parmi les cellules A2B5+ (Figure III-10 C), la proportion des progéniteurs neuronaux A2B5+/Map5+ progresse de 4,6% à 14,3%, tandis que celle des progéniteurs gliaux (potentiellement oligodendrocytaires) A2B5+/Map5- demeure à un pourcentage d'environ 13%. Ainsi, la surexpression de Ngn2 semble affecter essentiellement la population neuroblastique parmi les cellules A2B5+.

Cette série d'expériences a été répétée sur le prélèvement TFH6 et des résultats comparables ont été obtenus (Figures III-10 D, E et F).

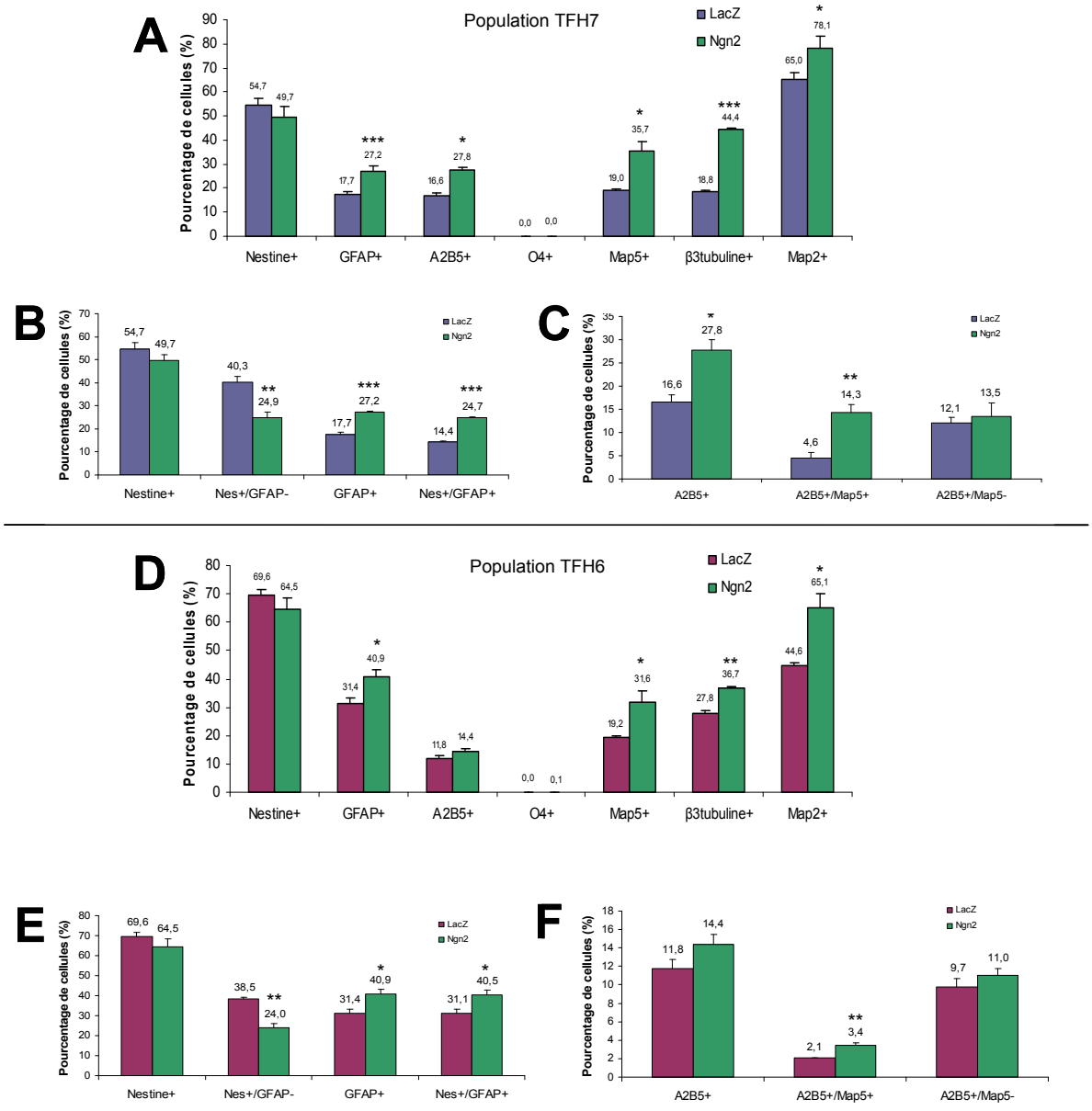


Figure III-10 : Effet de la surexpression de Ngn2 sur la différenciation des populations cellulaires TFH7 (A, B, C) et TFH6 (D, E, F)

Les progéniteurs nerveux humains ont été maintenus sous forme de neurosphères en présence d'EGF et bFGF pendant respectivement 153 et 160 jours. Ils ont alors été ensemencés sur substrat adhérent en plaques 24 puits à une densité de $1{,}2.10^5$ cellules/puits et transduits avec 50 ng p24 de vecteur VSV-PGK-Ngn2. Après 4 jours de culture dans un milieu supplémenté en bFGF, ils ont été fixés au paraformaldéhyde 4% et caractérisés par immunocytochimie à l'aide d'anticorps dirigés contre les différents lignages du système nerveux central. La comparaison du phénotype obtenu avec celui des populations témoins transduites avec VSV-PGK-LacZ permet d'évaluer l'influence de la surexpression du gène Ngn2 sur la différenciation des cellules *in vitro*.

En conclusion, la surexpression de Ngn2 induit une diminution de la prolifération et de la proportion de cellules immatures nestine+/GFAP-, en parallèle d'une augmentation des cellules du lignage neuronal (Map5+, β3tubuline+ et Map2+) et astrocytaire (GFAP+). Bien que l'équipe de Jonas Frisen ait montré que 90% des cellules souches nerveuses adultes, surexprimant le gène Ngn2 *in vitro*, sont positives pour le marqueur neuronal β3tubuline

(Falk et al., 2002), plusieurs études ont, à l'opposé, rapporté une expression du gène dans des précurseurs de neurones et d'astrocytes (Kondo and Raff, 2000; Nieto et al., 2001). Nos résultats suggèrent donc que la surexpression du gène Ngn2 induit un engagement des cellules vers les voies de différenciation neuronale et astrocytaire. Ainsi, contrairement à l'idée établie qui considère que les gènes à motif bHLH favorisent la différenciation neuronale au détriment de la différenciation gliale, l'implication de Ngn2 dans le développement de l'identité astrocytaire renforce l'hypothèse d'une double fonction pour le gène Ngn2 (Kondo and Raff, 2000; Nieto et al., 2001). Par ailleurs, l'enrichissement neuronal concerne aussi bien les neurones précoces (Map5+ et/ou β3tubuline+) que les neurones tardifs (Map2+), ce qui suppose que le gène Ngn2 pourrait jouer également un rôle dans la maturation des neurones le long du lignage neuronal.

c) Effet de la surexpression du gène Ngn3

Dans la population TFH7 (Figure III-11 A), la surexpression du gène Ngn3 induit :

- une **diminution** de la proportion des cellules **nestine+** (de 54,7% à 26,9%). Cette diminution s'explique à la fois par une diminution de la proportion des cellules immatures nestine+/GFAP- (de 40,3% à 15,6%) et par une diminution de la proportion des cellules astrocytaires nestine+/GFAP+ (de 14,4% à 11,3%) (Figure III-11 B). L'absence d'effet significatif sur la proportion globale de cellules GFAP+ (maintien aux alentours de 16,5%) suppose une augmentation de la proportion des cellules GFAP+/nestine- pour compenser l'augmentation de la proportion des cellules GFAP+/nestine+.
- une **augmentation** de la proportion des cellules neuroblastiques **Map5+** (de 19% à 35,3%) et **β3tubuline+** (de 18,8% à 36,4%), ainsi que de la proportion des cellules **A2B5+** (de 16,6% à 33,6%). L'augmentation de cette dernière est exclusivement liée à une augmentation très significative de la proportion des cellules A2B5+/Map5+ (neuroblastes), les cellules A2B5+/Map5- (progéniteurs gliaux) se maintenant à environ 14% (Figure III-11 C).
- une **diminution** significative de la proportion des cellules **Map2+** (de 65% à 38%).

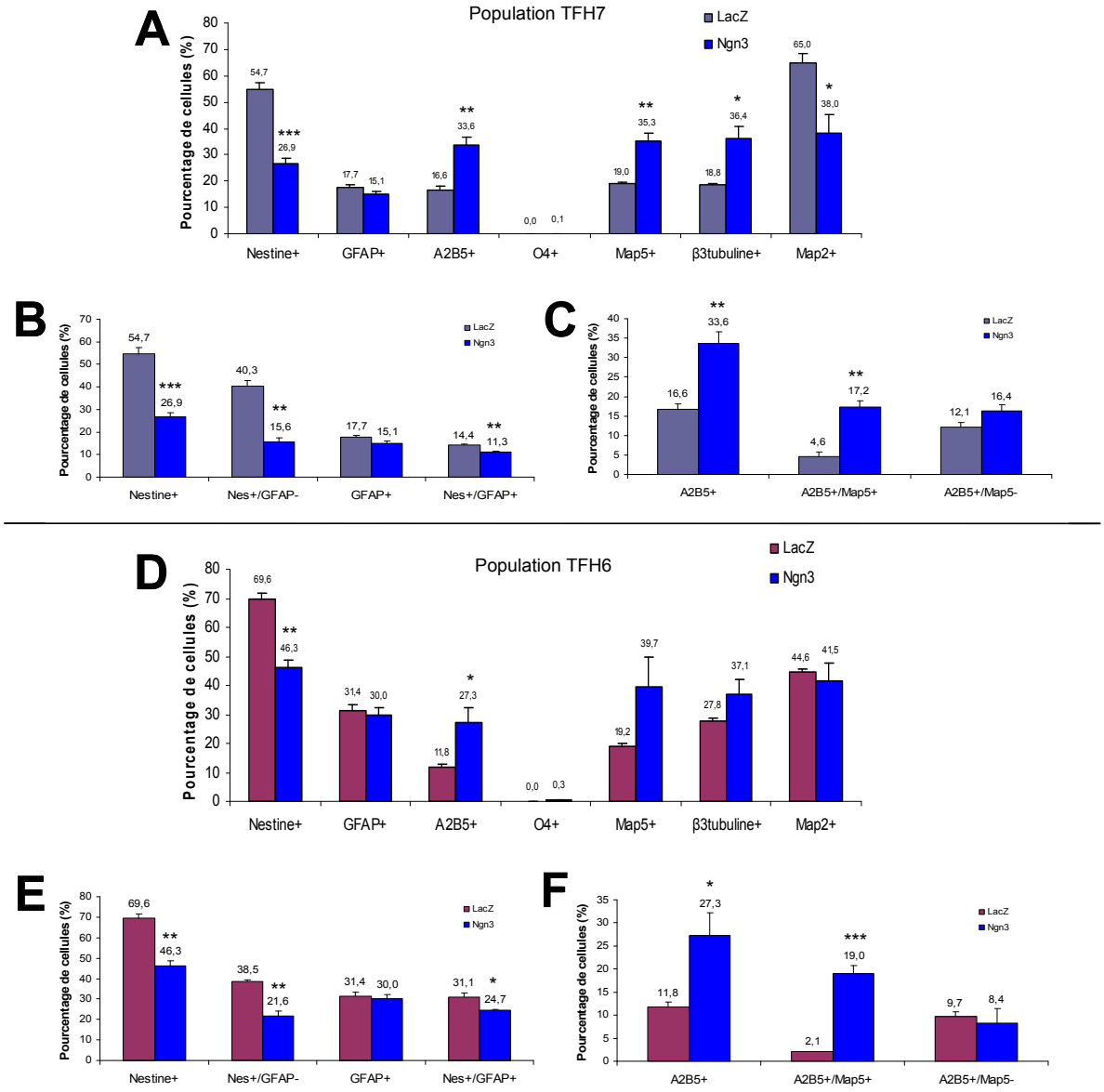


Figure III-11 : Effet de la surexpression de Ngn3 sur la différenciation des populations cellulaires TFH7 (A, B, C) et TFH6 (D, E, F)

Les progéniteurs nerveux humains ont été maintenus sous forme de neurosphères en présence d'EGF et bFGF pendant respectivement 153 et 160 jours. Ils ont alors été ensemencés sur substrat adhérent en plaques 24 puits à une densité de $1{,}2.10^5$ cellules/puits et transduits avec 50 ng p24 de vecteur VSV-PGK-Ngn3. Après 4 jours de culture dans un milieu supplémenté en bFGF, ils ont été fixés au paraformaldéhyde 4% et caractérisés par immunocytochimie à l'aide d'anticorps dirigés contre les différents lignages du système nerveux central. La comparaison du phénotype obtenu avec celui des populations témoins transduites avec VSV-PGK-LacZ permet d'évaluer l'influence de la surexpression du gène Ngn3 sur la différenciation des cellules *in vitro*.

La même série d'expériences a été répétée sur la population TFH6. Les résultats obtenus montre une tendance similaire, bien que les variations des cellules du lignage neuronal ne soient pas aussi significatives (Figures III-11 D, E et F).

En conclusion, la diminution hautement significative de la prolifération cellulaire et de la population de cellules immatures nestine+/GFAP-, conjointement à une augmentation de la

proportion des neuroblastes (Map5+, β3tubuline+), suggère que la surexpression de Ngn3 induit un engagement des cellules dans la voie de différenciation neuronale, ce qui est cohérent avec son caractère de gène proneural, son profil d'expression et son homologie avec les autres gènes à motif bHLH (Fode et al., 1998; Olson et al., 1998; Sommer et al., 1996). Cependant, la diminution de la proportion des neurones tardifs (Map2+) sous-entend que la différenciation neuronale activée par le gène Ngn3 n'est pas terminale, c'est-à-dire qu'elle ne permet pas d'atteindre le stade de neurone spécialisé et laisse penser qu'une partie des cellules matures pourraient soit mourir, soit se dédifférencier en réponse à la surexpression du gène. Jusqu'à présent, l'intérêt porté au gène Ngn3 concerne essentiellement son implication dans la différenciation des cellules pancréatiques (Baeyens et al., 2006; Breslin et al., 2007; Castaing et al., 2005; Johansson et al., 2007; Noguchi et al., 2006) et peu de données relatives à son activité au niveau du système nerveux sont disponibles pour permettre une comparaison. Néanmoins, son expression transitoire dans les précurseurs gliaux de la moelle épinière en développement et la diminution de l'expression du facteur Nkx2.2 induite par son inactivation suggère que le gène Ngn3 participe à la gliogenèse, et plus particulièrement à l'oligodendrogénèse (Lee et al., 2003). Or aucune variation des cellules gliales n'est mise en évidence dans nos conditions. Cette déficience pourrait se justifier par la chronologie des processus de différenciation qui suppose que la neurogenèse ait lieu avant la gliogenèse (Qian et al., 2000; Sugimori et al., 2007). Pour le vérifier, il faudrait allonger le temps pendant lequel les cellules transduites sont maintenues en culture avant l'analyse du phénotype.

d) Effet de la surexpression du gène Mash1

Dans la population TFH7 (Figure III-12 A), la surexpression du gène Mash1 :

- n'a **pas d'effet significatif** sur la proportion de cellules exprimant les marqueurs **nestine** (environ 52%) et **GFAP** (environ 17,6%). Au sein des cellules nestine+, ni la proportion des cellules nestine+/GFAP+, ni la proportion des cellules nestine+/GFAP- ne varient de manière significative (Figure III-12 B) à la suite de la surexpression du gène Mash1.
- induit une **augmentation** de la proportion des cellules neuroblastiques exprimant les marqueurs **Map5** (de 19% à 43,7%) et **β3tubuline** (de 18,8% à 19,2%).

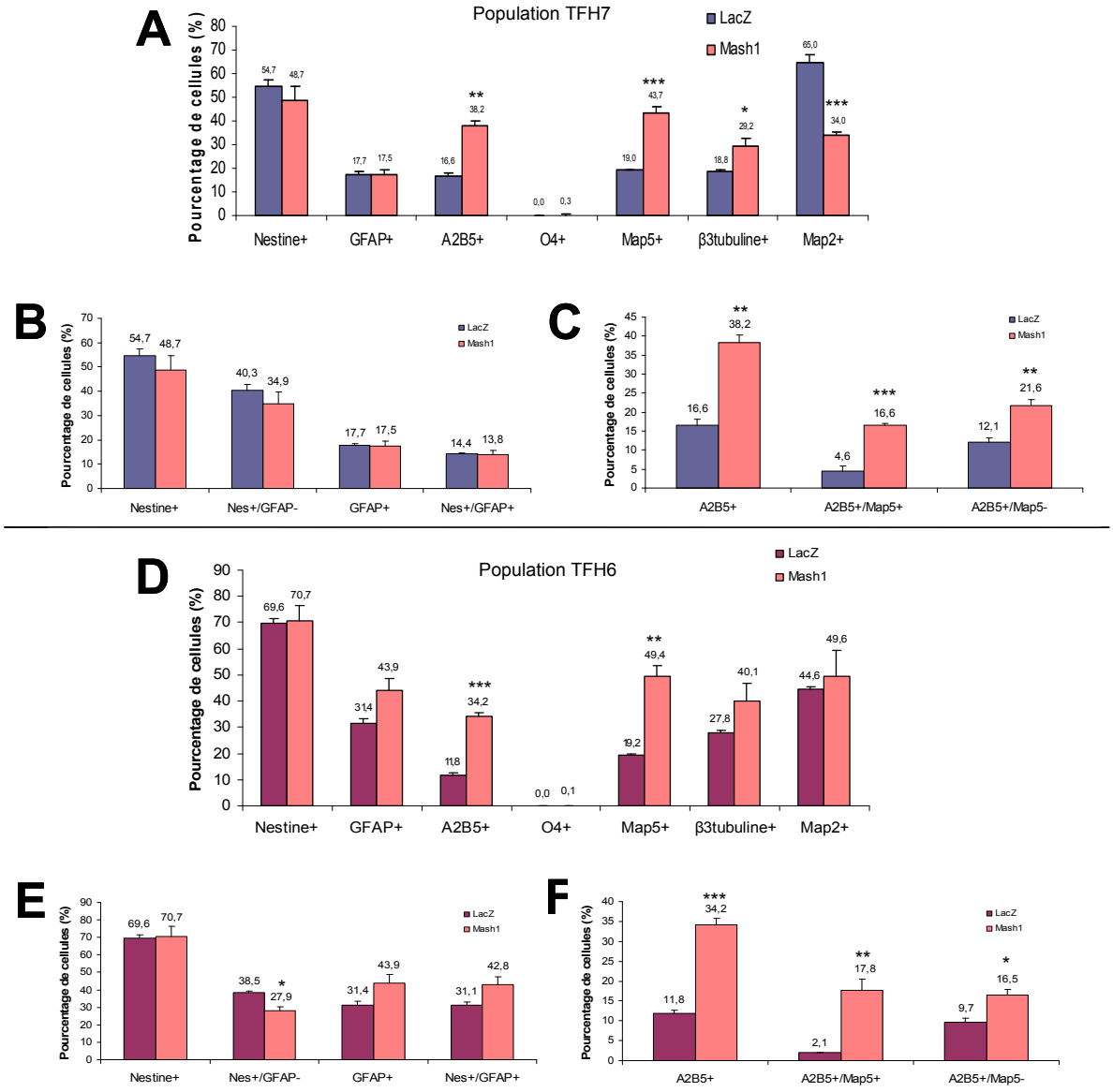


Figure III-12 : Effet de la surexpression de Mash1 sur la différenciation des populations cellulaires TFH7 (A, B, C) et TFH6 (D, E, F)

Les progéniteurs nerveux humains ont été maintenus sous forme de neurosphères en présence d'EGF et bFGF pendant respectivement 153 et 160 jours. Ils ont alors été ensemencés sur substrat adhérent en plaques 24 puits à une densité de $1{,}2.10^5$ cellules/puits et transduits avec 50 ng p24 de vecteur VSV-PGK-Mash1. Après 4 jours de culture dans un milieu supplémenté en bFGF, ils ont été fixés au paraformaldéhyde 4% et caractérisés par immunocytochimie à l'aide d'anticorps dirigés contre les différents lignages du système nerveux central. La comparaison du phénotype obtenu avec celui des populations témoins transduites avec VSV-PGK-LacZ permet d'évaluer l'influence de la surexpression du gène Mash1 sur la différenciation des cellules *in vitro*.

- induit une **augmentation** de la proportion des cellules **A2B5+** (de 16,6% à 38,2%). Cet accroissement résulte à la fois d'une augmentation hautement significative de la proportion des progéniteurs gliaux A2B5+/Map5- (de 4,6% à 16,6%) et d'une augmentation très significative de la proportion des neuroblastes A2B5+/Map5+

(de 12,1% à 21,6%) (Figure III-12 C). Notons également l'apparition de quelques pré-oligodendrocytes O4+ (Figure III-2) dans les populations de cellules surexprimant Mash1.

- induit une **diminution** hautement significative de la proportion des neurones matures exprimant le marqueur **Map2** (de 65% à 34%).

Les résultats observés dans la population TFH6 diffèrent légèrement de ceux observés dans la population TFH7 (Figures III-12 D, E et F). En réponse à la surexpression du gène Mash1, la proportion de cellules Map2+ reste constante et au contraire, la proportion des cellules immatures nestine+/GFAP- diminue significativement de 38,5% à 27, 9%.

En conclusion, la surexpression de Mash1 dans les progéniteurs nerveux humains fœtaux induit une augmentation conjointe des progéniteurs neuronaux (Map5+ et/ou β3tubuline+) et des progéniteurs gliaux (A2B5+/Map5-). Des études récentes (Battiste et al., 2007; Parras et al., 2004; Parras et al., 2007) ont montré que Mash1 jouerait un rôle crucial dans la spécification des lignages neuronaux et oligodendrocytaires au cours du développement post-natal. Ainsi, dans nos travaux, l'augmentation de la proportion des progéniteurs A2B5+ pourrait effectivement refléter, outre une augmentation des cellules du lignage neuronal, une augmentation de la proportion des précurseurs oligodendrocytaires. Cette hypothèse est confortée par l'apparition de cellules oligodendrocytaires plus matures exprimant le marqueur O4 suite à la surexpression de Mash1. Cependant, comme d'autres études chez la souris l'on suggéré (Parras et al., 2007), dans notre étude, Mash1 seul n'est pas suffisant pour induire la différenciation oligodendrocytaire terminale.
La diminution de la proportion de cellules Map2+ suggère quant à elle que la surexpression de Mash1 n'est pas impliquée dans la maturation des cellules le long du lignage neuronal. Comme c'est le cas pour Ngn3, cette diminution peut s'expliquer soit par la mort des neurones matures en culture, soit par une dédifférenciation éventuelle de ces cellules. Cependant, l'étude de Carlos Parras fournit certaines informations qui suggèrent que l'hypothèse de la mort cellulaire est la plus plausible (Parras et al., 2004). En effet, lorsque Ngn2 est remplacé par Mash1, leur capacité différente à engager la transition de l'état prolifératif vers la différenciation conduit à un excès de prolifération et/ou à un retard de différenciation, qui peuvent interférer avec la survie des cellules.

Dans une perspective d'homogénéisation des populations, l'ensemble des gènes proneuraux testés semblent induire un engagement des cellules dans la voie de différenciation neuronale

et par conséquent, une augmentation de la proportion des cellules du lignage neuronal précoce (Map5+ et/ou β3tubuline+) et/ou tardif (Map2+) associée à une diminution plus ou moins marquée de la proportion de cellules immatures. Ainsi, quel que soit le gène utilisé, la population neuronale représente au moins la moitié de la population globale après 4 jours de surexpression. La proportion la plus importante est atteinte avec le gène Ngn2 qui permet d'obtenir au moins 78% de cellules exprimant le marqueur Map2. Par surexpression des gènes proneuraux, le potentiel de différenciation des progéniteurs nerveux en culture semble donc être majoritairement restreint au lignage neuronal, ce qui permet d'envisager des expériences de transplantation substitutive dans un certain nombre de modèles animaux de lésion touchant spécifiquement les neurones. Cependant, comme nous venons de le démontrer, chacun de ces gènes agit différemment. En outre, ils semblent être impliqués dans la spécification de sous-types neuronaux différents (voir « Introduction »). Afin d'optimiser l'emploi de ces populations en thérapie cellulaire, il apparaît donc important de déterminer précisément la nature des neurones obtenus et de cibler exactement les pathologies concernées.

e) Différenciation terminale

Afin d'examiner le phénotype terminal des neurones présents dans les populations cellulaires, une analyse immunocytochimique a été réalisée à l'aide d'anticorps dirigés contre les principaux sous-types neuronaux. Ainsi, l'anticorps anti-dopamine β-hydroxylase (DBH) détectent les neurones adrénergiques, l'anti-sérotonine (5HT) les neurones sérotoninergiques, l'anti-glutamate décarboxylase isoforme 67 (GAD67) et l'anti-acide γ-aminobutyrique (GABA) les neurones GABAergiques, l'anti-Hb9 les motoneurones et l'anti-choline acétyltransférase (ChAT) les neurones cholinergiques.

La population transduite avec le contrôle VSV-PGK-LacZ contient des neurones majoritairement GABAergiques (GAD67+ et/ou GABA+) parmi les cellules neuronales différenciées (Figure III-13 A). Ce résultat est en accord avec les données de Meena Jain qui démontre qu'une réactivité GABAergique est prédominante au sein des neurones dérivant d'une amplification *in vitro* de précurseurs nerveux humains (Jain et al., 2003). La présence de quelques neurones adrénergiques, cholinergiques et motoneurones peut néanmoins être mentionnée. Par contre, aucun neurone sérotoninergique n'a été mis en évidence.

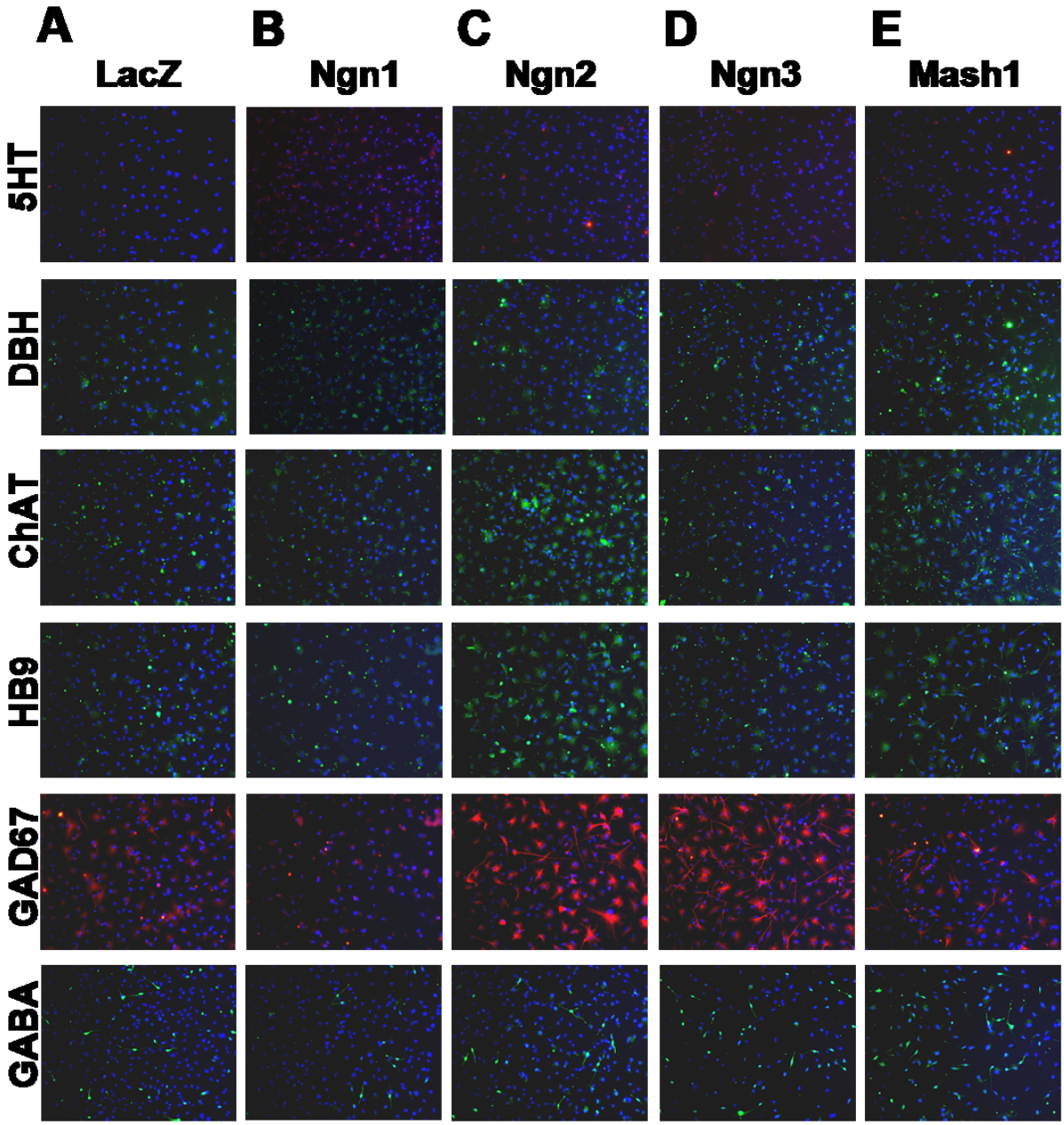


Figure III-13 : Phénotype terminal des cellules transduites avec les vecteurs de différenciation

Les populations TFH7 et TFH6 transduites avec les vecteurs VSV-PGK-LacZ (A), VSV-PGK-Ngn1 (B), VSV-PGK-Ngn2 (C), VSV-PGK-Ngn3 (D) et VSV-PGK-Mash1 (E) ont été caractérisées par immunocytochimie afin de déterminer leur phénotype neuronal terminal. Les anticorps anti-5HT permettent de visualiser les neurones sérotoninergiques (coloration rouge), les anticorps anti-DBH les neurones catécholaminergiques (coloration verte), les anticorps anti-ChAT les neurones cholinergiques (coloration verte), les anticorps anti-HB9 les motoneurones (coloration verte), et les anticorps anti-GAD67 (coloration rouge) et anti-GABA (coloration verte) les neurones GABAergiques. Un marquage au hoechst permet de localiser les noyaux cellulaires (coloration bleue) (grossissement X200).

Dans la population surexprimant le gène Ngn1 (Figure III-13 B), aucun sous-type neuronal particulier n'est accentué comparativement à la population contrôle. Au contraire, certaines catégories de neurones, tels que les neurones adrénergiques, les neurones GABAergiques ou les motoneurones semblent disparaître, ce qui suggère que certaines cellules matures

pourraient soit mourir, soit se dédifférencier en réponse à la surexpression du gène. Seuls les neurones cholinergiques sont maintenus dans une proportion équivalente à celle de la population contrôle. Ces résultats sont en contradiction avec les travaux de Dai Muramatsu qui rapporte que des cellules de télencéphale ventral de souris *in vitro* témoignent d'une différenciation GABAergique efficace lors de la transduction avec un vecteur rétroviral surexprimant le gène Ngn1 (Muramatsu et al., 2005). Une telle différence entre nos résultats et ceux de l'équipe japonaise pourrait s'expliquer par la nature des cellules maintenues en culture. En effet, dans les expériences réalisées par Dai Muramatsu, les progéniteurs proviennent d'une lignée cellulaire immortalisée (cellules MSP-1) établie à partir de souris knock out pour le facteur de transcription p53 (Yamada et al., 1999). Or, cette protéine p53 est connue pour jouer un rôle majeur dans les situations de stress, entraînant un arrêt de la division cellulaire et l'activation de la transcription d'un grand nombre de gènes. Ainsi, son absence pourrait donner lieu à une dérégulation cellulaire et conduire à une différenciation GABAergique ectopique en présence du gène Ngn1. Dans le cas des cellules dérivant de cultures primaires de télencéphale fœtal humain, la surexpression de Ngn1 *in vitro* ne semble pas stimuler l'apparition des marqueurs terminaux considérés. Au mieux, elle permet de restreindre, de manière privilégiée, le phénotype neuronal terminal aux neurones cholinergiques. Cependant, *in vivo*, le gène Ngn1 est principalement impliqué dans la formation des neurones sensoriels (Anderson, 1999; Cau et al., 2002; Ma et al., 1998). Or aucun des marqueurs utilisés dans l'analyse ne permet de les détecter. Ainsi, afin de parfaire l'étude sur la différenciation terminale de la population surexprimant le gène Ngn1 et de justifier le maintien de la proportion des cellules Map2+ au sein de cette population (voir « Effet de la surexpression des gènes proneuraux sur la différenciation cellulaire »), il apparaît nécessaire de caractériser les cellules au moyen de marqueurs tels que BRN3A, ISL2, NSCL-2 ou NeuroD-L, qui sont spécifiques des neurones sensoriels. D'ici là, aucune conclusion ne peut être tirée.

Dans la population surexprimant le gène Ngn2 (Figure III-13 C), plusieurs sous-types neuronaux sont présents dans une proportion nettement plus importante que dans la population contrôle. Ainsi, les neurones cholinergiques, les motoneurones et les neurones GABAergiques sont clairement favorisés. De manière plus modérée, des neurones adrénergiques sont également détectés. Par contre, aucun neurone sérotoninergique n'est mis en évidence. De tels résultats sont en accord avec les données de la littérature qui indiquent que le gène Ngn2 peut induire la formation d'au moins cinq sous-types neuronaux différents

à partir de progéniteurs nerveux : des neurones sensoriels (Perez et al., 1999), des motoneurones avec la coopération de facteurs tels que Olig2, Isl1 ou Lhx3 (Lee and Pfaff, 2003; Mizuguchi et al., 2001; Novitch et al., 2001; Scardigli et al., 2001), des neurones dopaminergiques avec la coopération du gène Nurr1 (Kele et al., 2006), des neurones GABAergiques (Parras et al., 2002) et des neurones glutamatergiques (non analysés ; (Schuurmans et al., 2004)). Ainsi, globalement, la surexpression du gène Ngn2 semble induire la maturation des neurones, comme nous l'avons déjà suggéré dans la première partie de l'étude (voir « Effet de la surexpression des gènes proneuraux sur la différenciation cellulaire »). Cependant, cette maturation n'entraîne pas l'apparition d'un phénotype terminal préférentiel.

Dans la population surexprimant le gène Ngn3 (Figure III-13 D), les sous-types neuronaux mis en évidence sont très similaires à ceux obtenus lors de la surexpression du gène Ngn2, à savoir des neurones adrénergiques, des neurones cholinergiques, des motoneurones et des neurones GABAergiques. Cependant, les proportions diffèrent de manière significative. Ainsi, le phénotype GABAergique apparaît prépondérant et assez proche en densité de celle observée suite à la surexpression du gène Ngn2, tandis que les 3 autres phénotypes sont beaucoup plus clairsemés. Par conséquent, contrairement aux conclusions déduites de l'analyse du marqueur Map2, la surexpression du gène Ngn3 semble induire la différenciation terminale des cellules souches nerveuses fœtales en culture et cette surexpression pourrait avantager, de manière prioritaire, la formation de neurones GABAergiques, sans pour autant exclure totalement la production d'autres classes de neurones.

Dans la population surexprimant le gène Mash1 (Figure III-13 E), les phénotypes cholinergiques, motoneurones et GABAergiques sont beaucoup plus prononcés que dans la population contrôle. D'autre part, la proportion des neurones cholinergiques et des motoneurones (qui peuvent constituer la même population) semble relativement moins élevée que lors de la surexpression du gène Ngn2. Le phénotype adrénergique est beaucoup moins marqué que les phénotypes cités ci-dessus, mais est incontestablement présent. L'ensemble de ces sous-types neuronaux -neurones adrénergiques, neurones cholinergiques, motoneurones et neurones GABAergiques- fait parti du panel de neurones engendrés par le gène Mash1 dans les différentes régions du système nerveux central et périphérique (Fode et al., 2000; Lo et al., 1998; Ohsawa et al., 2005; Yang et al., 2006). Ainsi, les populations

neuronales induites par la surexpression de Mash1 sont très analogues à celle développées *in vivo* sous l'influence de la protéine. Cependant, l'absence de cellules présentant un phénotype sérotoninergique atténue ce constat, puisque l'équipe de Jean-François Brunet a démontré que l'expression de Mash1 permettait le développement de neurones sérotoninergiques *in vivo* (Pattyn et al., 2004). L'implication d'un certain nombre d'autres facteurs tels que Nkx2.2, Gata3, Lmx1b et Pet1 dans cette formation suggère que l'environnement des cellules souches nerveuses fœtales humaines en culture n'est pas favorable à la production de neurones sérotoninergiques sous l'influence du gène Mash1. En définitive, la population obtenue est qualitativement très proche de celle induite par la surexpression de Ngn2 et aucun sous-type neuronal ne semble émerger par rapport aux autres.

Ainsi, comme établi par un grand nombre de travaux, les gènes proneuraux possèdent la capacité d'engendrer des sous-types neuronaux particuliers. Cependant, en terme d'enrichissement des populations, après 4 jours de surexpression, aucun des quatre gènes proneuraux à motif bHLH ne permet d'homogénéiser, de façon exclusive, le phénotype terminal des populations neuronales. Bien que la progression de certains sous-types comparativement à certains autres constitue une évolution non négligeable et relativement en accord avec la littérature, l'environnement, à savoir la population initiale dans un milieu de culture défini, n'exprime pas de signaux suffisamment explicites et cohérents pour que les cellules s'orientent dans une seule voie de différenciation.

D. Rôle du bFGF

La présence de bFGF dans le milieu de culture classique des progéniteurs nerveux humains soulève un certain nombre d'interrogations. Son rôle en temps qu'agent mitogène consiste à stimuler la mitose et par conséquent à favoriser le maintien des cellules à un état indifférencié (Buc-Caron, 1995). Or par surexpression des gènes proneuraux, c'est l'étape inverse qui est encouragée. Il est donc important de prendre en considération l'influence potentielle de ce facteur de croissance sur le processus de différenciation induit par les gènes Ngn et Mash1. Au cours de la différenciation, doit-on cultiver les cellules dans un milieu supplémenté ou privé de bFGF? La présence de bFGF dans le milieu de culture ne limite-t-elle pas les effets des facteurs de transcription ? Et le retrait du bFGF n'entraîne-t-il pas des conséquences annexes qui ne seraient pas attribuables aux facteurs de transcription ?

Afin de répondre à ces questions, les cellules neuroépithéliales extraites de l'embryon TFH7 ont été ensemencées en plaques 24 puits, transduites avec les différents vecteurs de différenciation puis maintenues dans du milieu supplémenté ou dépourvu de bFGF jusqu'au moment de la fixation 4 jours plus tard. Une analyse phénotypique comparable à celle réalisée pour évaluer l'influence des gènes de différenciation en présence de bFGF, permet d'examiner l'influence couplée des gènes proneuraux et du bFGF sur la population TFH7.

1. Effet du bFGF sur le phénotype de la population TFH7 non transduite

Afin d'apprécier l'influence du bFGF sur le phénotype de la population TFH7, les cellules neuroépithéliales ont été cultivées, parallèlement en présence et en absence de bFGF, sur support adhérent en plaques 24 puits. Les cellules ont été fixées après 3 jours de culture et caractérisées par immunocytochimie en utilisant des anticorps dirigés contre les marqueurs des différents lignages du SNC (nestine, GFAP, A2B5, O4, Map5, β3tubuline, Map2) et un anticorps dirigé contre le marqueur de prolifération cellulaire Ki67. La comparaison des proportions des différents marqueurs pour chaque condition de culture permet d'appréhender les conséquences d'un retrait de bFGF sur le phénotype des cellules.

Dans des conditions de carence en bFGF, les pourcentages des cellules Map5+ et β3tubuline+ passent respectivement de 18,5% à 32,4% et de 19,6% à 26% (Figure III-14). Les proportions des autres marqueurs restent dans l'ensemble très proches de celles observées dans des conditions où le milieu est supplémenté en bFGF. Ainsi, l'augmentation très significative du pourcentage de cellules du lignage neuronal suggère soit que le bFGF inhibe exclusivement la différenciation neuronale et que son retrait va l'activer, soit que le bFGF inhibe la différenciation en général et que le lignage neuronal est le premier à être activé après 3 jours de culture sans bFGF. *In vivo*, au cours du développement, la différenciation en neurones, astrocytes et oligodendrocytes est séquentielle (Bayer, 1991; Sauvageot and Stiles, 2002), les neurones étant formés avant les astrocytes qui sont eux-mêmes formés avant les oligodendrocytes. Des microcultures clonales de cellules souches nerveuses embryonnaires de souris ont montré que ce modèle était également valable *in vitro* (Qian et al., 1998; Qian et al., 2000). Ces données associées à la légère augmentation amorcée au niveau de la proportion des cellules GFAP+ suggèrent que l'hypothèse d'une inhibition globale de la différenciation est la bonne.

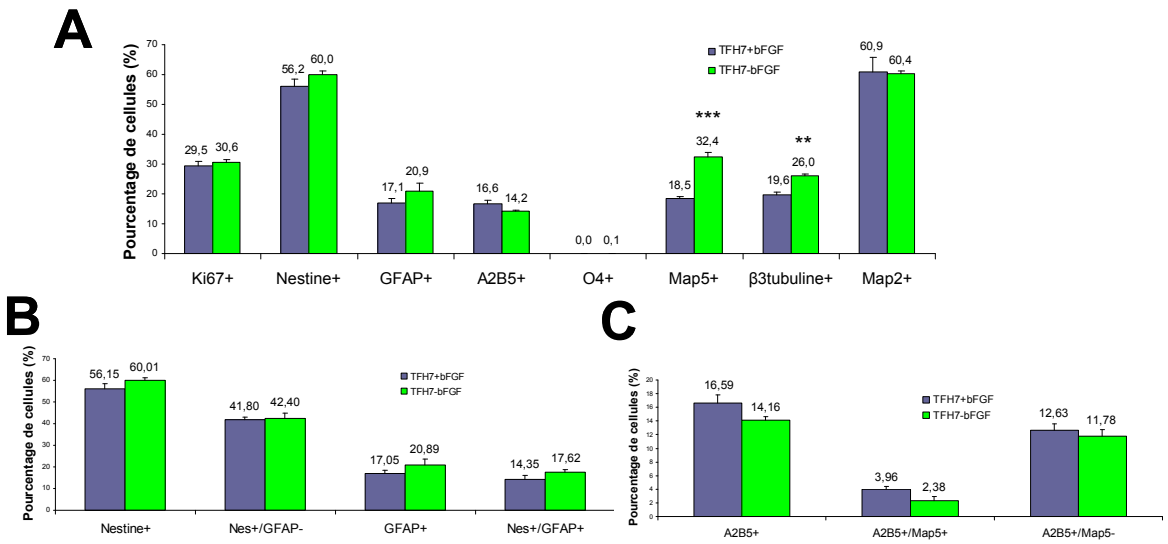


Figure III-14 : Influence du bFGF sur le phénotype cellulaire de la population TFH7

Les cellules neuroépithéliales extraites de l'embryon TFH7 ont été amplifiées sous forme de neurosphères en milieu standard supplémenté en EGF et bFGF pendant 160 jours. Elles ont alors été ensemencées en plaques 24 puits à une densité de $1{,}2.10^5$ cellules/puits en milieu « N2 » standard supplémenté en bFGF. Cinq jours plus tard, le milieu a été remplacé pour une partie des cellules par du milieu « N2 » standard supplémenté en bFGF et pour l'autre partie par du milieu « N2 » standard dépourvu de bFGF. Après trois jours de culture, les cellules ont été fixées puis caractérisées par immunocytochimie à l'aide d'anticorps dirigés contre les marqueurs des différents lignages du SNC (nestine, GFAP, A2B5, O4, Map5, β3tubuline, Map2) et contre le marqueur de prolifération cellulaire Ki67 (A). Des doubles marquages nestine/GFAP (B) et A2B5/Map5 (C) ont permis de discriminer les cellules de lignages distincts. Les proportions des différents marqueurs dans la population TFH7 ont été établies après comptage des cellules marquées.

2. Influence du bFGF après transduction des cellules avec le vecteur contrôle

Pour évaluer les conséquences du retrait du bFGF sur la réponse des cellules après transduction, la population TFH7 transduite à l'aide du vecteur contrôle VSV-PGK-LacZ a été placée dans un milieu de culture dépourvu de bFGF, fixée en PFA 4% après 3 jours et caractérisée par immunocytochimie. La comparaison du phénotype des cellules transduites avec le témoin et celui des cellules non transduites (Figure III-15) révèle un accroissement très significatif de la proportion des cellules du lignage astrocytaire GFAP+ (qui sont également majoritairement nestine+) et une diminution très significative de la proportion des cellules Ki67+. D'après la littérature, cette réaction cellulaire qui se traduit par une différenciation astrocytaire et un arrêt de la prolifération est un comportement classique face à un stress (Holmin et al., 2001; Mirescu and Gould, 2006). Ainsi, la transduction avec les vecteurs lentiviraux semble constituer une « agression » pour les cellules qui répondent en conséquence. Cependant, nous avons démontré qu'en présence de bFGF, la transduction n'a aucun effet sur le phénotype des cellules TFH7 en culture (Figure III-7 A). Ces résultats suggèrent donc que le bFGF pourrait compenser les effets de la transduction. En effet, des

études récentes ont montré non seulement que l'expression du facteur de croissance fibroblastique bFGF était induite à la suite d'un stress mécanique et pouvait agir en tant que neuroprotecteur (Bland et al., 2006; Ganat et al., 2002; Li and Hughes-Fulford, 2006; Molteni et al., 2001) mais également que cette expression stimulait la prolifération et la neurogenèse (Monfils et al., 2006).

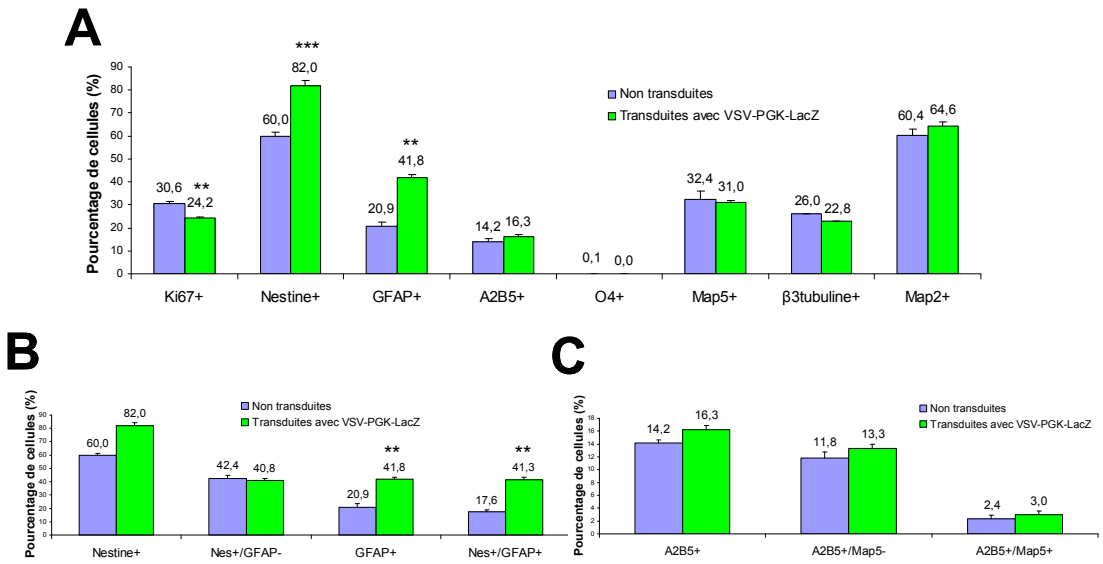


Figure III-15 : Effet de la transduction sur les cellules TFH7 cultivées sans bFGF

Les cellules neuroépithéliales extraites de l'embryon TFH7 ont été dissociées et ensemencées sur substrat adhérent en plaques 24 puits à une densité de $1{,}2.10^5$ cellules/puits. Après 4 jours, une partie des cellules a été transduite avec 26 ng p24/cm² de vecteur VSV-PGK-LacZ et une autre partie a été simplement maintenue en milieu de culture. 24h plus tard, le milieu supplémenté en bFGF a été remplacé par du milieu dépourvu de bFGF. Les cellules ont ainsi été privées de bFGF jusqu'au moment de la fixation 3 jours plus tard. La caractérisation par immunocytochimie a permis de déterminer leur phénotype. La comparaison des résultats obtenus pour les cellules transduites et non transduites permet d'évaluer l'effet de la transduction en elle-même sur les cellules en culture.

3. Effet de la surexpression des gènes proneuraux en absence de bFGF

Afin d'évaluer l'effet combiné du retrait de bFGF et de la surexpression des gènes proneuraux sur le phénotype des cellules en culture, les progéniteurs nerveux humains TFH7 ont été transduits avec les différents vecteurs de différenciation, maintenus pendant 3 jours dans un milieu standard dépourvu de bFGF et analysés par immunocytochimie. Les variations phénotypiques ont alors été déterminées par comparaison avec des cellules TFH7 transduites avec le vecteur VSV-PGK-LacZ et maintenues dans un milieu standard supplémenté en bFGF (Figures III-16 et IIII-17).

a) Effet sur la prolifération

Les proportions de cellules Ki67+ sont globalement similaires en présence et en absence de bFGF lors de la surexpression des gènes Ngn1 et Ngn3 (Figure III-16), ce qui coïncide avec une baisse de la prolifération comparativement à la population contrôle (cellules transduites avec VSV-PGK-LacZ et maintenues en bFGF). Avec le gène Ngn2, la diminution de la proportion des cellules Ki67+ mise en évidence en présence de bFGF (Figure III-8) est confirmée, voire accentuée (-60%) en absence de bFGF (Figure III-16). De la même manière, lors de la surexpression de Mash1, le retrait du bFGF entraîne une diminution hautement significative (-70%) de la proportion de cellules Ki67+, alors qu'en présence de bFGF, cette proportion est maintenue à un niveau équivalent de celui de la population contrôle (Figure III-16).

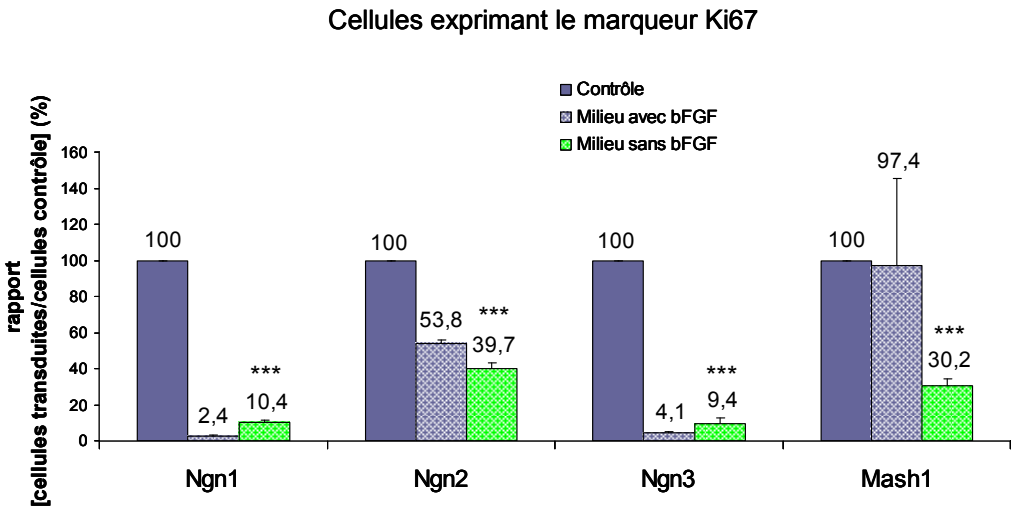


Figure III-16 : Effet de la surexpression des gènes proneuraux en absence de bFGF.

Les cellules neuroépithéliales extraites de l'embryon TFH7 ont été dissociées et ensemencées sur support adhérent en plaques 24 puits à une densité de 1,2.105 cellules/puits. Après 4 jours, les cellules ont été transduites avec les différents vecteurs de différenciation (26 ng p24/cm²). Lors du changement de milieu 24h post-infection, le milieu supplémenté en bFGF a été remplacé par du milieu dépourvu de bFGF. Les cellules ont ainsi été privées de bFGF jusqu'au moment de la fixation 3 jours plus tard. La caractérisation par immunocytochimie a permis de déterminer leur phénotype. La comparaison des résultats obtenus avec ceux de la population transduite avec le vecteur contrôle VSV-PGK-LacZ et maintenue en présence de bFGF permet d'évaluer l'effet combiné du retrait de bFGF et de la surexpression des gènes proneuraux.

Ainsi, la suppression du bFGF du milieu de culture des progéniteurs nerveux fœtaux humains semble intensifier l'arrêt de la prolifération cellulaire induite par la surexpression des gènes proneuraux. Un tel effet est conforme aux différentes études, qui indiquent que bFGF jouerait un rôle majeur dans la stimulation de la prolifération (Gensburger et al., 1987; Li and DiCicco-Bloom, 2004; Raballo et al., 2000). Cette action passerait par une augmentation de l'expression de la β-caténine, co-activateur transcriptionnel de la voie *wnt* (Chenn and Walsh, 2002; Israsena et al., 2004). En effet, il semblerait que la β-caténine encourage la

prolifération lorsque les conditions sont favorables (présence de bFGF) mais entraîne, à l'opposé, une sortie du cycle cellulaire dans des conditions de différenciation (absence de bFGF) (Israsena et al., 2004). D'autre part, il a été démontré que la β-caténine agit sur les promoteurs des gènes proneuraux à motif bHLH, tels que Ngn1, Ngn2 et dans une moindre mesure, Mash1 (Israsena et al., 2004), qui, à leur tour, vont encore induire un arrêt de la prolifération cellulaire. Ainsi, tous les éléments convergent pour inhiber la prolifération. Il est, maintenant, intéressant de vérifier si une telle concordance des signaux peut également avoir des conséquences sur la différenciation des cellules en culture.

b) Effet sur la différenciation

Les proportions de cellules immatures nestine+/GFAP- sont quasi-identiques, en absence et en présence de bFGF, lors de la surexpression d'un gène donné (données non présentées). Les variations observées par rapport au contrôle sont donc très similaires avec ou sans bFGF (voir « Effet de la surexpression des gènes proneuraux en présence de bFGF »). Notons toutefois que suite à la surexpression du gène Mash1, la baisse de la proportion de cellules immatures passe de -13% en présence de bFGF à -33% en absence de bFGF. Cependant, cette variation n'est pas significative. Par conséquent, après 3 jours, l'absence de bFGF lors de la surexpression des gènes proneuraux ne semble pas avoir de profondes conséquences au niveau des cellules indifférenciées.

Au contraire, les proportions de cellules astrocytaires nestine+/GFAP+ croissent de manière significative en absence de bFGF (Figure III-17). Ainsi, par rapport au contrôle, la proportion de cellules astrocytaires augmente de 71% lors de la surexpression du gène Ngn1, de 126% avec le gène Ngn2, de 77% avec le gène Ngn3 et de 74% avec le gène Mash1. Pour les gènes Ngn1, Ngn3 et Mash1, ces variations sont très comparables et pourraient refléter l'influence du bFGF dans la protection des cellules face au stress induit par la transduction (voir « Influence du bFGF dans la réaction post-transductionnelle »). En revanche, pour le gène Ngn2, la différence plus importante semble combiner à la fois l'effet du bFGF et celui du gène proneural qui, comme nous l'avons vu précédemment, entraîne une augmentation de la proportion des cellules du lignage astrocytaire.

Concernant le marqueur A2B5, les variations par rapport au contrôle sont identiques avec ou sans bFGF quel que soit le gène considéré (données non présentées). Cependant, parmi ces cellules A2B5+, la fraction de progéniteurs gliaux (potentiellement oligodendrocytaires) A2B5+/Map5- augmente, de manière significative, en absence de bFGF lors de la surexpression des gènes Ngn2 et Ngn3 (Figure III-17). A l'opposé, la fraction de cellules

neuroblastiques A2B5+/Map5+ reste relativement constante pour un gène donné quand le bFGF est retiré du milieu de culture (données non présentées). La suppression du bFGF associée à la surexpression des gènes Ngn2 et Ngn3 semble donc induire un engagement vers le lignage glial inexistant en présence de bFGF.

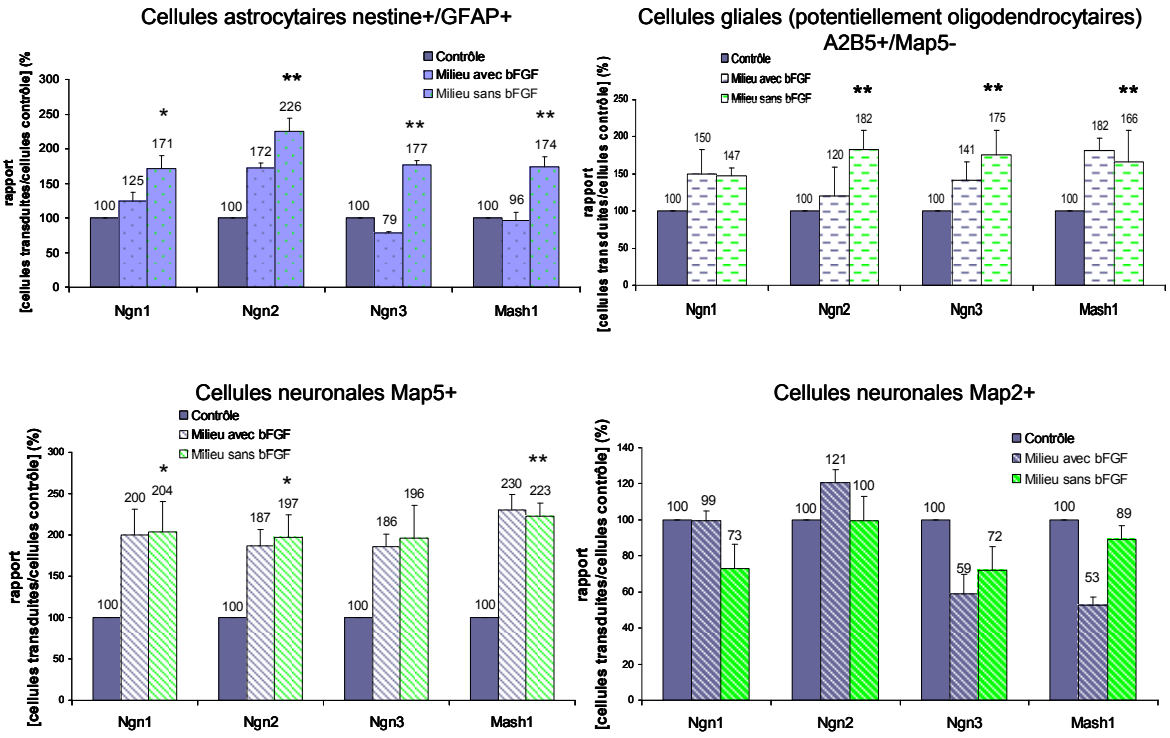


Figure III-17: Effet de la surexpression des gènes proneuraux en absence de bFGF.

Les cellules neuroépithéliales extraites de l'embryon TFH7 ont été dissociées et ensemencées sur sustrat adhérent en plaques 24 puits à une densité de $1{,}2.10^5$ cellules/puits. Après 4 jours, les cellules ont été transduites avec les différents vecteurs de différenciation (26 ng p24/cm²). 24h plus tard, le milieu supplémenté en bFGF a été remplacé par du milieu dépourvu de bFGF. Les cellules ont ainsi été privées de bFGF jusqu'au moment de la fixation 3 jours plus tard. La caractérisation par immunocytochimie a permis de déterminer leur phénotype. La comparaison des résultats obtenus avec ceux de la population transduite avec le vecteur contrôle VSV-PGK-LacZ et maintenue en présence de bFGF permet d'évaluer l'effet combiné du retrait de bFGF et de la surexpression des gènes proneuraux.

De tels résultats peuvent être mis en parallèle des travaux de Siddharthan Chandran qui démontrent que des cellules souches dérivant de la moelle épinière dorsale d'embryons de rat, cultivées en présence de bFGF, peuvent donner naissance à des cellules du lignage oligodendrocytaire lorsqu'elles sont placées dans des conditions de différenciation, c'est-à-dire lors du retrait de l'agent mitogène. Le mécanisme ne fait pas intervenir la voie « Sonic Hedgehog » (Shh) et est uniquement dépendant de la stimulation préalable par le bFGF (Abematsu et al., 2006; Chandran et al., 2003). Ainsi, il semblerait qu'un traitement transitoire au bFGF puisse « apprêter » les cellules et influencer leur potentiel de différenciation.

D'autre part, nos résultats concernant les précurseurs gliaux peuvent être rapprochés des travaux de Jeffrey Lee qui suggère que Ngn3 participe à la gliogenèse, et plus particulièrement à l'oligodendrogénèse, dans la moelle épinière de vertébré en développement (Lee et al., 2003). Remarquons, par ailleurs, que l'engagement vers la voie de différenciation gliale (potentiellement oligodendrocytaire) mise en évidence lors de la surexpression du gène Mash1 (voir « Effet de la surexpression de Mash1 ») est maintenue mais non accentuée lorsque le bFGF est retiré du milieu de culture (Figure III-17).

Si l'on considère enfin les marqueurs neuronaux, on constate que lors de la surexpression des différents gènes proneuraux, les proportions de cellules Map5+ sont très proches en présence et en absence de bFGF (Figure III-17), ce qui signifie que, pour un gène donné, les variations par rapport au contrôle sont sensiblement les mêmes (+104% avec le gène Ngn1, +97% avec le gène Ngn2, +96% avec le gène Ngn3 et +123% avec le gène Mash1). Des résultats similaires sont observés pour les cellules β3tubuline+ (données non présentées). Ainsi, les progressions à la hausse des populations de neurones précoces, mises en évidence lorsque les paramètres varient séparément, (voir « Effet du bFGF sur le phénotype de la population TFH7 non transduite » et « Effet des gènes proneuraux sur la différenciation cellulaire ») ne semblent pas s'additionner lorsque les paramètres varient de façon combinée (retrait du bFGF associée à la surexpression des gènes proneuraux). Les valeurs comparables, obtenues avec et sans bFGF, pourraient indiquer que l'enrichissement est préférentiellement dû à la surexpression des gènes proneuraux. Effectivement, l'action des gènes proneuraux est postérieure à celle du bFGF dans la chronologie de la signalisation cellulaire (action via la β-caténine) (Israsena et al., 2004) et les concentrations élevées en gènes proneuraux induites par la surexpression ont un impact probablement prédominant par rapport au bFGF, dont l'effet dans l'engagement neuronal passe finalement inaperçu. Ainsi, comme l'ont démontré Nelson et Svendsen, la présence à très faible dose (voire l'absence) de bFGF, est suffisante pour induire la neurogenèse, mais pas essentielle (Nelson and Svendsen, 2006; Qian et al., 1997). Malgré ces données, discriminer l'effet individuel de chacun des facteurs s'avère, néanmoins, être une opération délicate.

Lors de la surexpression des gènes proneuraux, la proportion des cellules exprimant le marqueur Map2 en absence de bFGF ne varie pas de manière significative par rapport au contrôle (Figure III-17). Or, en présence de bFGF, nous avions observé une augmentation significative de la proportion des cellules Map2+ lors de la surexpression du gène Ngn2 et une diminution significative lors de la surexpression des gènes Ngn3 et Mash1. Ainsi, lors de la surexpression du gène Ngn2, l'absence de bFGF semble inhiber la maturation neuronale et

à l'opposé, lors de la surexpression des gènes Ngn3 et Mash1, l'absence de bFGF semble limiter soit la mort des cellules matures, soit la dédifférenciation des cellules. Ces différences pourraient s'expliquer, une fois de plus, par l'action de bFGF sur la β-caténine, dont l'activité sur la transcription des gènes proneuraux varie d'un gène à l'autre (Israsena et al., 2004). Cependant, si on admet que l'influence du bFGF sur la différenciation neuronale est négligeable comparativement à la surexpression des gènes proneuraux (pas de variations des marqueurs Map5 et β3tubuline), la justification de ces variabilités repose vraisemblablement sur les mécanismes d'action impliqués dans l'activité des gènes pronauraux et/ou l'influence d'autres facteurs environnementaux qu'il conviendrait donc d'étudier plus précisément.

Globalement, le retrait du bFGF a des effets variables en fonction du gène proneural surexprimé. Ainsi, il n'entraîne aucune variation majeure du phénotype des cellules surexprimant le gène Ngn1 qui s'orientent principalement vers le lignage neuronal. Avec le gène Ngn2, l'absence de bFGF semble favoriser un engagement des cellules vers la voie de différenciation gliale (astrocytaire et/ou oligodendrocytaire) au détriment de la voie de différenciation neuronale. Enfin, les cellules surexprimant les gènes Ngn3 et Mash1 se dirigent à la fois vers le lignage neuronal ET vers le lignage glial et présentent une proportion plus élevée de cellules neuronales tardives.
Dans une perspective d'enrichissement des populations cellulaires, le maintien des cellules dans un milieu supplémenté en bFGF dépend essentiellement de la destination finale désirée des cellules, c'est-à-dire du type de pathologies ciblé.

II. Spécificité des promoteurs des différents lignages

Dans le but d'enrichir les cultures de progéniteurs nerveux en un type cellulaire donné, une deuxième stratégie vise à sélectionner et à purifier par FACS les cellules d'intérêt. Ceci peut être effectué à l'aide de vecteurs traceurs exprimant des protéines fluorescentes sous le contrôle de promoteurs spécifiques des différents lignages d'intérêt. Ainsi, nous avons construit des vecteurs codant soit l'eGFP, soit l'eYFP sous le contrôle du promoteur Synapsine pour le lignage neuronal (Kugler et al., 2001), du promoteur Nestine pour les cellules immatures (Roy et al., 2000a) et le promoteur GFAP pour le lignage astrocytaire (Jakobsson et al., 2003). Le succès de cette méthode repose essentiellement sur la spécificité d'expression des promoteurs choisis. Ainsi, pour confirmer et valider cette caractéristique, des précurseurs nerveux humains extraits des vésicules télencéphaliques du prélèvement TFH6 âgé de 6 semaines embryonnaires ont été mis en culture (voir Matériel et Méthodes) et transduits avec les différents vecteurs traceurs. Une étude immunocytochimique nous a alors permis de déterminer si les protéines fluorescentes étaient bien exprimées dans les lignages cellulaires désirés, en fonction du promoteur utilisé.

A. Capacité des vecteurs traceurs à transduire des cellules en culture

Afin d'évaluer l'efficacité de transduction des vecteurs traceurs *in vitro*, les progéniteurs nerveux humains TFH6 ont été amplifiés 133 jours sous forme de neurosphères en présence d'EGF et de bFGF, dissociés et transduits avec des doses croissantes de vecteurs traceurs VSV-Nestine-eYFP, VSV-hSYN-eGFP, VSV-GFAP-eGFP et Mokola-GFAP-eGFP. Une analyse immunocytochimique à l'aide d'anticorps anti-eGFP (ou eYFP) montre que le pourcentage de cellules fluorescentes augmente avec la quantité de vecteur selon des progressions logarithmiques (Figure III-18 A). Les courbes atteignent un plateau pour la dose maximale de vecteur de 50 ng de p24 (5,4 ng p24/cm²). A cette dose, 58% des cellules expriment le transgène avec le promoteur Synapsine, 35,3% avec le promoteur Nestine, 33,3% avec le promoteur GFAP associé à l'enveloppe VSV et 10,7% avec le promoteur GFAP associé à l'enveloppe Mokola. Ces différents pourcentages sont la résultante d'une combinaison de plusieurs facteurs : i) l'efficacité d'entrée du vecteur dans la cellule, qui dépend entre autres de l'enveloppe utilisée, ii) le nombre de copies de vecteur intégrées dans

le génome, qui dépend de la dose de vecteur administrée et de la taille de l'ADN viral (c'est-à-dire ici, de la taille du promoteur utilisé), iii) le promoteur utilisé, qui ne s'exprime pas de la même façon selon le type cellulaire transduit.

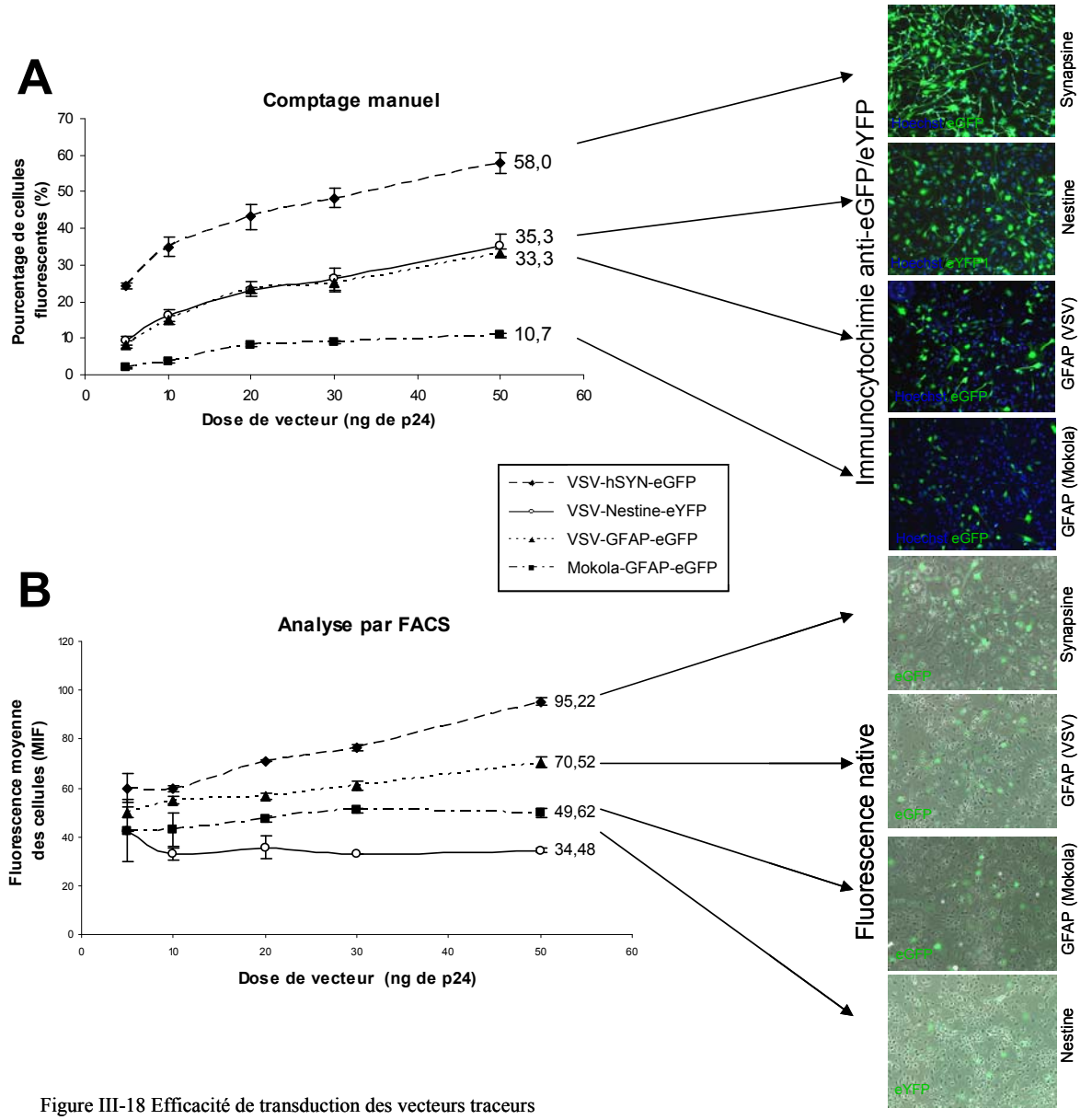


Figure III-18 Efficacité de transduction des vecteurs traceurs

Les cellules neuroépithéliales extraites de l'embryon TFH6 âgé de 6 semaines embryonnaires ont été transduites avec des doses croissantes de vecteurs traceurs

A- L'analyse immunocytochimique à l'aide d'un anticorps anti-eGFP/eYFP a mis en évidence les cellules exprimant les protéines eGFP et eYFP (coloration verte) sous le contrôle des promoteurs spécifiques des différents lignages. Une coloration Hoechst (bleue) a permis de localiser les noyaux cellulaires (grossissement X 200). Un comptage systématique des cellules marquées a été réalisé afin de déterminer le pourcentage de cellules fluorescentes dans la population globale en fonction de la dose de vecteur utilisée.

B- L'analyse par FACS a consisté à exciter les cellules en suspension à une longueur d'onde de 488 nm et à mesurer la fluorescence émise en retour par les fluorochromes (eGFP et eYFP) exprimés. La moyenne d'intensité de fluorescence (MIF) des progéniteurs nerveux a été déterminée pour chaque promoteur et en fonction de la dose de vecteur utilisée.

En parallèle, nous avons évalué la moyenne d'intensité de fluorescence (MIF) dans les cellules après transduction par les différents vecteurs traceurs. Celle-ci varie peu en fonction

de la dose administrée pour un vecteur donné (Figure III-18 B). En revanche, elle varie selon le promoteur utilisé (Figure III-18 B) : on observe ainsi, pour une dose de 50 ng p24 de vecteur, une MIF de 34 pour le promoteur Nestine, de 50 pour le promoteur GFAP avec l'enveloppe Mokola, de 71 avec le promoteur GFAP avec l'enveloppe VSV et de 95 pour le promoteur Synapsine. Ces différences peuvent refléter à la fois le nombre de copies intégrées dans le génome et l'activité de chaque promoteur.

Globalement, les vecteurs traceurs transduisent de manière efficace (quoique différente) les progéniteurs nerveux humains en culture.

B. Analyse de la spécificité d'expression induite par les promoteurs

Pour légitimer l'utilisation des vecteurs traceurs dans une stratégie de tri cellulaire, les promoteurs des différents lignages (Synapsine, Nestine et GFAP) doivent démontrer leur capacité à exprimer les protéines fluorescentes principalement dans les cellules du lignage leur correspondant. Par conséquent, les cellules de la population TFH6 amplifiées sous forme de neurosphères, transduites avec des doses croissantes de vecteurs traceurs et fixées après 15 jours ont été analysées par immunocytochimie à l'aide d'anticorps dirigés contre les différents lignages du SNC : anti-nestine pour les cellules immatures ; anti-GFAP pour le lignage astrocytaire ; anti-Map5 et anti-β3tubuline pour le lignage neuronal ; anti-CNPase pour le lignage oligodendrocytaire. Afin de faciliter l'étude, la fluorescence native a été intensifiée par l'emploi d'anticorps primaires dirigés contre les protéines fluorescentes eGFP et eYFP. Des double marquages « protéine fluorescente/marqueur cellulaire » (Figure III 19) ont permis de déterminer, par comptage manuel, la proportion de cellules des différents lignages dans la population fluorescente.

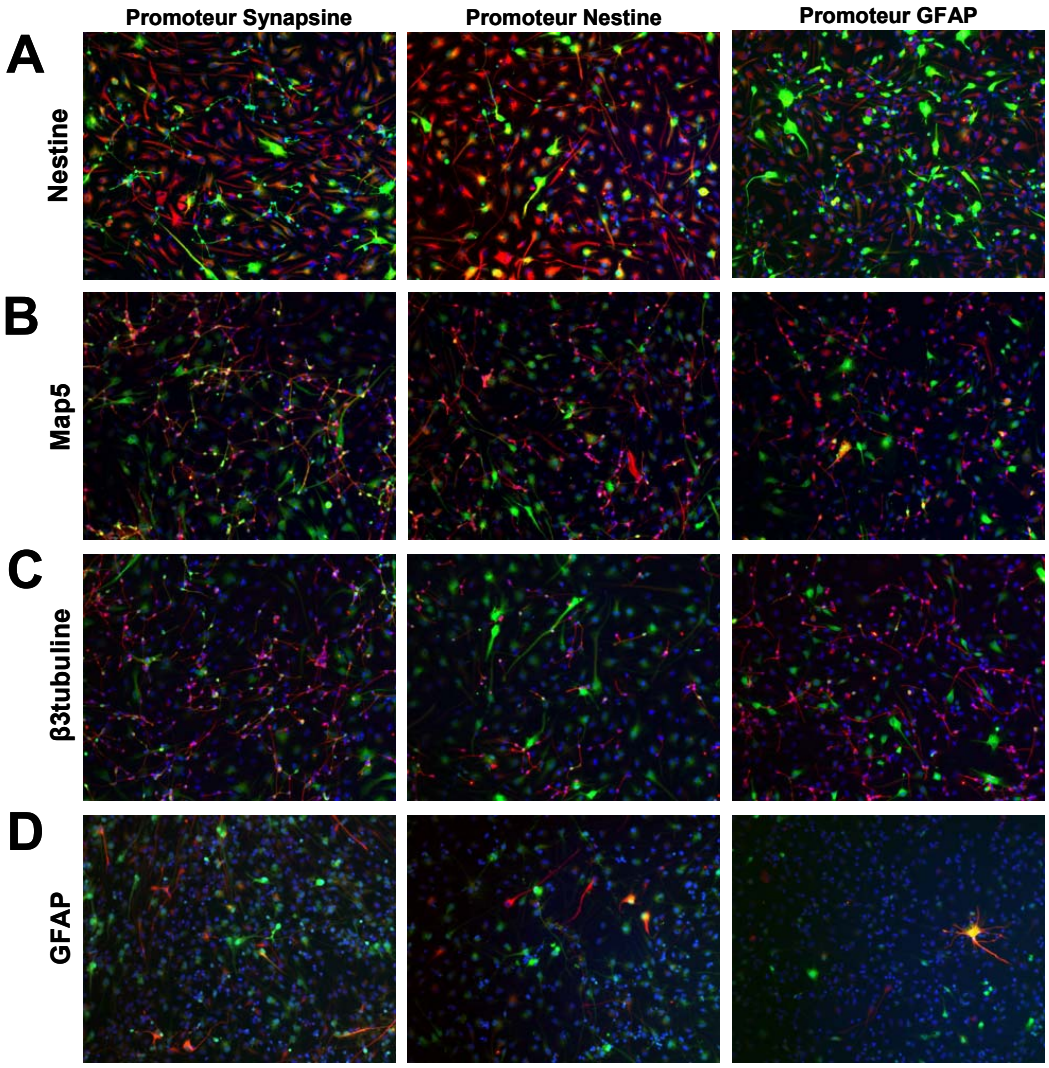


Figure III-19 : Phénotype des cellules TFH6 exprimant les protéines rapportrices.

Les promoteurs spécifiques des différents lignages du système nerveux central, le promoteur Synapsine, le promoteur Nestine et le promoteur GFAP, permettent l'expression des protéines rapportrices eGFP ou eYFP (coloration verte) dans des progéniteurs nerveux humains TFH6 en culture. Afin d'étudier la spécificité d'expression, le phénotype des populations fluorescentes a été déterminé par immunocytochimie à l'aide d'anticorps dirigés contres les marqueurs des différents lignages du SNC (coloration rouge) : le marqueur nestine pour les cellules immatures (A), les marqueurs Map5 (B) et β3tubuline (C) pour les cellules du lignage neuronal, le marqueur GFAP (D) pour les cellules du lignage astrocytaire et le marqueur CNPase pour les cellules du lignage oligodendrocytaire (données non présentées). Une coloration Hoechst (coloration bleue) permet de localiser les noyaux cellulaires. (grossissement X 200)

1. Spécificité d'expression des différents promoteurs à une dose de 50 ng p24/puits

D'après les résultats sur l'efficacité de la transduction décrits ci-dessus, une quantité de 50 ng p24 de vecteur traceur permet d'atteindre une transduction quasi-maximale des cellules en culture. L'examen du phénotype a donc été entrepris dans un premier temps sur les cellules TFH6 transduites avec cette dose de vecteur.

a) Phénotype de la population globale

Pour évaluer le niveau de spécificité des promoteurs, le phénotype des cellules fluorescentes a été comparé à celui de la population TFH6 globale (Figure III-20 A). Dans les conditions de culture utilisées, 58% des cellules expriment le marqueur nestine, 27% le marqueur GFAP, 12% le marqueur Map5, 15% le marqueur β3tubuline et aucune n'exprime le marqueur CNPase. Ainsi, la population TFH6 présente une grande proportion de cellules immatures, ainsi que des cellules engagées dans deux des voies principales de différenciation du SNC : le lignage astrocytaire et le lignage neuronal.

b) Phénotype des cellules fluorescentes

Dans la population qui exprime le transgène (population GFP+), les cellules exprimant chaque marqueur (nestine, GFAP, Map5, β3tubuline et CNPase) ont été recensées par comptage systématique des cellules doublement marquées (Figure III-19). La comparaison de la proportion des cellules des différents lignages dans la population GFP+ avec leur proportion dans la population globale fournit des informations relatives à la spécificité d'expression des différents promoteurs (Synapsine, Nestine et GFAP). Ainsi, la proportion de cellules appartenant au lignage du promoteur utilisé devrait augmenter dans la population de cellules GFP+ par rapport à la population globale. D'une manière générale, un promoteur est considéré spécifique lorsque au moins 80% des cellules fluorescentes appartiennent au lignage de ce promoteur.

***Cellules transduites avec le vecteur VSV-Synapsine-eGFP**

Dans la population TFH6 exprimant la protéine eGFP sous le contrôle du promoteur Synapsine (Figure III-20 B), seuls 13 et 16% expriment les marqueurs Map5 et β3tubuline, qui signent leur appartenance au lignage neuronal (c'est-à-dire le lignage du promoteur utilisé). En revanche, 59% expriment le marqueur nestine et 32% le marqueur GFAP, ce qui indique qu'une grande majorité des cellules n'appartient pas au lignage du promoteur utilisé. D'autre part, les proportions des cellules des différents lignages sont identiques dans la population GFP+ et dans la population globale, ce qui suggère que le promoteur Synapsine n'induit aucune expression préférentielle (dans un type cellulaire par rapport à un autre). Le promoteur Synapsine n'est donc pas spécifique à la dose de vecteur utilisée. Dans une perspective de tri cellulaire, l'utilisation de ce promoteur ne présente donc aucun intérêt à une telle dose.

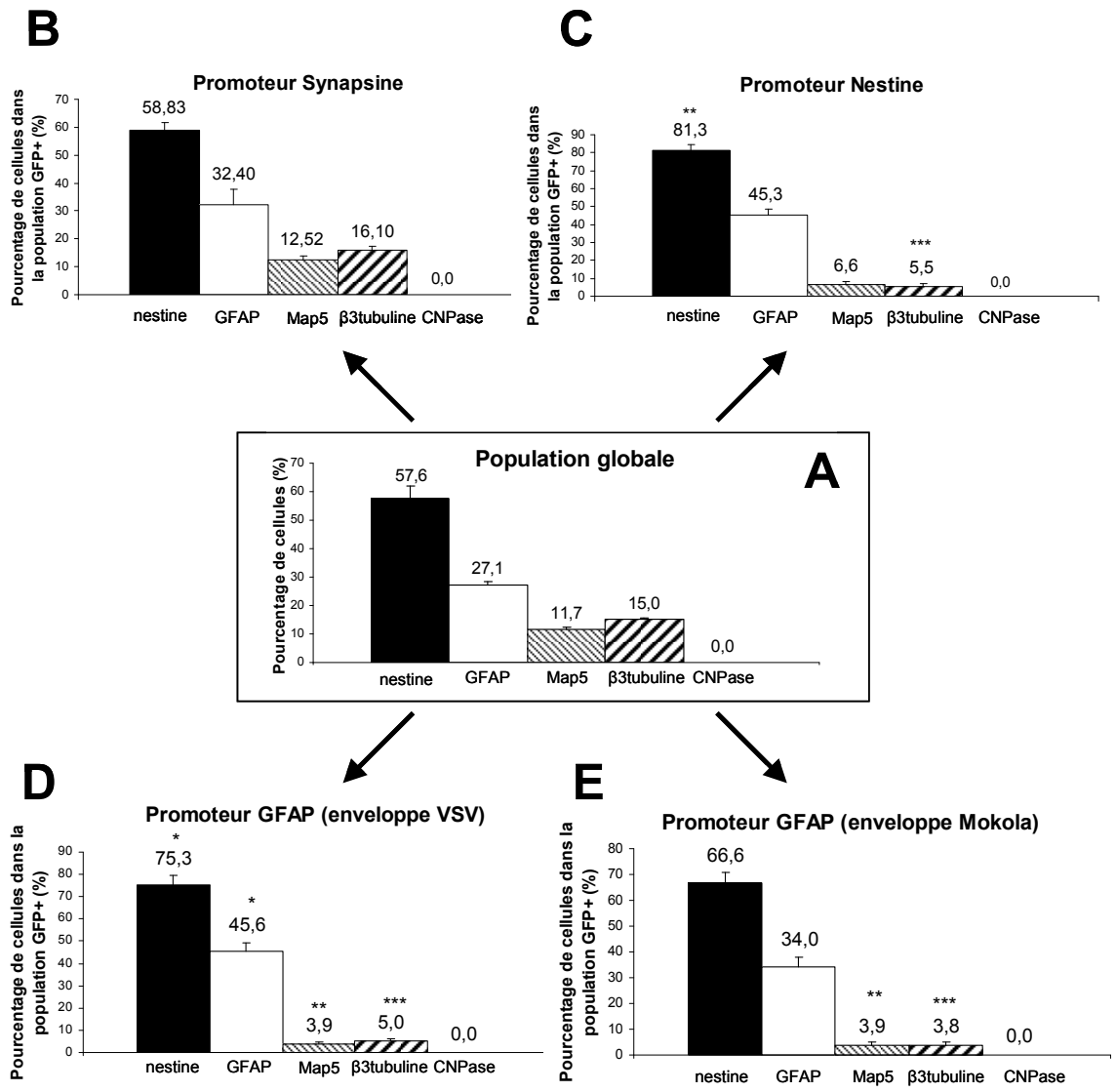


Figure III-20 : Phénotype des cellules transduites avec les vecteurs traceurs

Les progéniteurs nerveux isolés de l'embryon TFH6 ont été amplifiés sous forme de neurosphères pendant 133 jours puis transduits avec 5,4 ng p24/cm² de vecteurs traceurs. Fixés 15 jours après transduction, ils ont alors été analysés par immunocytochimie afin d'identifier le phénotype des cellules fluorescentes. Un comptage manuel des cellules a permis de déterminer la proportion des marqueurs des différents lignages du SNC dans la population de cellules exprimant les protéines fluorescentes sous le contrôle des différents promoteurs : le promoteur Synapsine (B), le promoteur Nestine (C), le promoteur GFAP associé à l'enveloppe VSV (D) et le promoteur GFAP associé à l'enveloppe Mokola (E). La spécificité d'expression a été comparée au phénotype global de la population TFH6 (A).

*Cellules transduites avec le vecteur VSV-Nestine-eYFP

Dans la population TFH6 exprimant la protéine eYFP sous le contrôle du promoteur Nestine (Figure III-20 C), 81% des cellules expriment le marqueur nestine, ce qui signifie que seuls 19% des cellules eYFP+ n'appartiennent pas au lignage du promoteur utilisé. Le promoteur peut donc être considéré comme spécifique. En effet, la proportion de cellules nestine+ augmente très significativement dans la population eYFP+ par rapport à la population globale.

En revanche, la proportion de cellules β3tubuline+ diminue de façon hautement significative. Ces variations indiquent bien une préférence d'expression dans le lignage nestine+.
Rappelons que les cellules nestine+ peuvent appartenir au lignage neuroépithélial (nestine+/GFAP-) ou au lignage astrocytaire (nestine+/GFAP+) (voir première partie des résultats). L'utilisation de ce vecteur dans une perspective de tri cellulaire permettrait donc d'enrichir la population en cellules immatures et en cellules astrocytaires. Ceci est conforté par la présence de 45% de cellules GFAP+ dans la population de cellules eYFP+.

***Cellules transduites avec les vecteurs VSV-GFAP-eGFP**

Dans la population TFH6 exprimant la protéine eGFP sous le contrôle du promoteur GFAP (Figure III-20 D), seuls 46% des cellules expriment le marqueur GFAP, alors que 75% expriment le marqueur nestine, 4% le marqueur Map5 et 5% le marqueur β3tubuline. Ainsi, 54% des cellules n'appartiennent pas au lignage du promoteur utilisé. Dans la population eGFP+, une augmentation significative de la proportion des cellules nestine+ et des cellules GFAP+ peut être mise en évidence par rapport à la population globale, ainsi qu'une diminution très significative de la proportion des cellules Map5+ et β3tubuline+. La différence de proportion entre la population globale et la population fluorescente est de +18% aussi bien pour les cellules exprimant le marqueur nestine que pour les cellules exprimant le marqueur GFAP. Si, comme nous l'avons évoqué ci-dessus, la majorité des cellules GFAP+ est également nestine+, il est très vraisemblable que les deux fractions cellulaires qui varient , nestine+ et GFAP+, soient en fait constituées par les mêmes cellules GFAP+/nestine+. Il reste néanmoins une large proportion de cellules nestine+ qui ne sont pas GFAP+ (30%) et qui expriment le gène rapporteur de façon non spécifique.

Ainsi, l'augmentation de la proportion, dans la population eGFP+, des cellules co-exprimant le marqueur GFAP et le marqueur nestine, associée à une diminution de la proportion des cellules du lignage neuronal, suggère que le promoteur GFAP fonctionne de manière préférentielle dans les cellules GFAP+. Cependant, cette préférence n'est pas suffisante pour conclure que le promoteur GFAP est spécifique. Dans une perspective de tri cellulaire, l'utilisation de ce promoteur ne permettrait pas d'obtenir une population cellulaire majoritairement astrocytaire.

***Cellules transduites avec le vecteur Mokola-GFAP-eGFP**

L'enveloppe virale joue un rôle important, au moment de la transduction, dans le ciblage du type de cellule qui intégrera l'ADN viral (tropisme*). Dans un objectif de tri cellulaire, cette étape initiale peut donc avoir des conséquences directes sur les proportions de cellules qui exprimeront ou non les protéines rapportrices. Pour accroître la spécificité du vecteur exprimant la protéine eGFP sous le contrôle du promoteur GFAP, l'enveloppe VSV permettant une transduction pantropique* a été remplacée par l'enveloppe Mokola afin de cibler plus spécifiquement les astrocytes au moment de la transduction (Brizard et al, en préparation).

Dans la population TFH6 fluorescente (Figure III-20 E), seuls 34% des cellules expriment le marqueur GFAP, alors que 67% expriment le marqueur nestine, 4% le marqueur Map5 et 4% le marqueur β3tubuline. Ainsi, 66% des cellules eGFP+ n'appartiennent pas au lignage du promoteur GFAP. Dans la population eGFP+, la proportion des cellules Map5+ et β3tubuline+ diminue de façon significative par rapport à la population globale. Les variations de la proportion des cellules nestine+ et GFAP+, respectivement de +9% et de +7%, ne sont pas significatives mais vont dans le même sens que celles observées avec le vecteur VSV-GFAP-eGFP.

Ainsi, les résultats obtenus avec les vecteurs à enveloppe Mokola sont très similaires à ceux obtenus avec les vecteurs à enveloppe VSV. Dans une perspective de tri cellulaire, l'enveloppe Mokola n'apporte pas d'amélioration par rapport à l'enveloppe VSV.

2. Rôle de la dose de vecteur sur la spécificité d'expression

Comme nous l'avons vu, trois vecteurs traceurs sur quatre expriment le transgène de façon non spécifique dans des cellules appartenant à un lignage différent de celui du promoteur utilisé. Cette non-spécificité peut être liée à plusieurs facteurs :

i) **la taille du promoteur**. Il influe sur l'efficacité d'entrée du vecteur dans la cellule et son intégration dans le génome.

ii) **le site d'intégration du transgène** dans le génome de l'hôte. Dans les zones de transcription active (« hot spot »), la fixation de facteurs de transcription ou de protéines d'initiation de la transcription peut se faire avec une basse affinité et induire une transcription non spécifique sous l'influence du promoteur choisi.

iii) **le nombre de copies intégrées** dans le génome. L'intégration d'un nombre élevé de transgènes augmente les risques d'intégration dans des zones de transcription active.

iv) **l'absence de certaines séquences régulatrices** du promoteur. Pour une utilisation facilitée des promoteurs, l'ensemble des études les concernant tente de réduire leur taille au maximum et de conserver uniquement les régions indispensables à leur bon fonctionnement en transcription. Ainsi les promoteurs que nous utilisons ne possèdent pas l'ensemble des séquences régulant leur activité *in vivo* (promoteurs tronqués). Or dans des conditions d'intégration au génome, ces séquences peuvent avoir une importance majeure et faire varier significativement la spécificité d'expression.

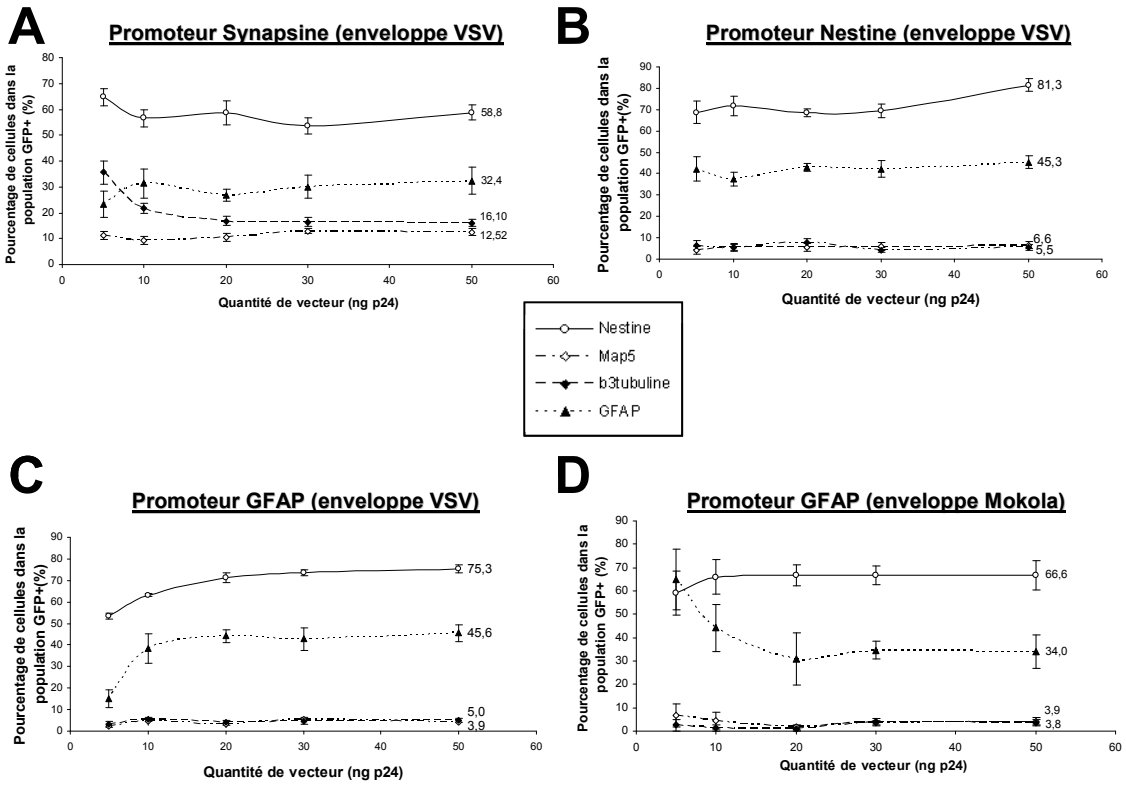


Figure III-21 : Analyse de la spécificité des promoteurs en fonction de la dose de vecteur traceur utilisée

Les progéniteurs nerveux isolés de l'embryon TFH6 ont été amplifiés sous forme de neurosphères pendant 133 jours puis trasnduits avec des doses décroissantes de vecteurs traceurs. Fixés 15 jours après transduction, ils ont alors été analysés par immunocytochimie afin d'identifier et de comparer le phénotype des cellules fluorescentes aux différentes doses. Chaque promoteur, le promoteur Synapsine (A), le promoteur Nestine (B), le promoteur GFAP associé à l'enveloppe VSV (C) et le promoteur GFAP associé à l'enveloppe Mokola (D) a ainsi été testé pour sa spécificité d'expression dans les cellules des différents lignages du SNC.

Dans notre étude, le seul aspect aisément modifiable afin d'accroître la spécificité d'expression des différents promoteurs consiste à réduire le nombre de copies intégrées en transduisant les progéniteurs nerveux humains avec des quantités décroissantes de vecteurs

traceurs. Pour évaluer l'effet de la dose de vecteurs sur la spécificité des promoteurs, des analyses phénotypiques similaires à celle décrite ci-dessus ont été réalisées. Les graphes obtenus représentent le pourcentage de cellules exprimant les différents marqueurs dans la population fluorescente en fonction de la dose de vecteur utilisée (Figure III-21).
Globalement, le pourcentage de cellules des différents lignages dans la population GFP+ reste relativement constant quelle que soit la dose de vecteur. Cependant, deux déviations intéressantes peuvent être mentionnées. La première concerne le promoteur Synapsine (Figure III-21 A). A une dose de 5 ng p24 de vecteur, la proportion des cellules exprimant le marqueur β3tubuline atteint 36%, soit plus du double de la valeur observée aux doses supérieures de vecteur. La seconde déviation concerne le promoteur GFAP associé à l'enveloppe Mokola (Figure III-21 D). A une dose de 5 ng p24 de vecteur, la proportion des cellules exprimant le marqueur GFAP s'élève à 65% soit plus du double de la valeur observée aux doses supérieures. Cette valeur est supérieure au pourcentage de cellules nestine+, ce qui suggère qu'à une telle dose la spécificité d'expression s'est affranchie des cellules nestine+/GFAP-.

En conclusion, l'absence de variation phénotypique majeure à des doses plus faibles de vecteur suggère que la diminution de la dose de vecteur (et par conséquent, la diminution du nombre de copies intégrées au génome) n'a pas de conséquences directes sur la spécificité d'expression des promoteurs. Il faut toutefois considérer les résultats obtenus avec la dose de 5 ng p24 de vecteur. L'augmentation de la proportion des cellules du lignage neuronal avec le promoteur Synapsine associé à l'enveloppe VSV et l'augmentation de la proportion des cellules du lignage astrocytaire avec le promoteur GFAP associé à l'enveloppe Mokola indiquent qu'à des doses très faibles, la spécificité d'expression de ces promoteurs est très largement accentuée.
Dans une perspective de tri cellulaire, il conviendra donc de trouver le bon équilibre entre une dose suffisamment élevée de vecteur pour transduire un nombre satisfaisant de cellules, et une dose suffisamment faible pour obtenir une spécificité, si ce n'est totale, du moins accrue des différents promoteurs.

Discussion

La thérapie cellulaire constitue l'une des stratégies les plus prometteuses pour le traitement d'un grand nombre de pathologies du SNC. Cependant, cette discipline n'en est qu'à ses balbutiements et requiert encore certains ajustements, en particulier concernant le choix des cellules à greffer. Ainsi, de nombreuses études plaident désormais en faveur d'une homogénéisation des populations pour les transplantations, afin d'augmenter la spécificité des greffes et cibler au mieux une pathologie donnée. Au cours de ma thèse, deux méthodes ont donc été abordées afin d'enrichir des populations de progéniteurs nerveux fœtaux humains en un type cellulaire donné : la première consiste à induire la différenciation des cellules vers un phénotype choisi ; la seconde consiste à sélectionner un type cellulaire d'intérêt. Pour ceci, nous avons construit des vecteurs lentiviraux dits « vecteurs de différenciation » et « vecteurs traceurs » et évalué chacune de ces stratégies, que nous allons maintenant commenter et comparer.

I. Première stratégie : orientation de la différenciation des progéniteurs nerveux humains par surexpression de gènes proneuraux

A. Effets comparés des gènes Ngn1, Ngn2, Ngn3 et Mash1

L'orientation de la différenciation des cellules humaines s'est fondée sur les connaissances que nous avons du rôle des gènes proneuraux à domaine bHLH. De nombreuses études décrivent leur influence primordiale au cours du développement, non seulement dans le choix du devenir neuronal ou glial des cellules souches nerveuses (Jan and Jan, 1994; Jimenez and Modolell, 1993), mais également dans la maturation des neurones vers un sous-type cellulaire donné (Nieto et al, 2001). D'autres études suggèrent aussi leur implication dans la gliogenèse (Sun et al., 2001) et dans l'arrêt du cycle cellulaire (Farah et al., 2000). Ainsi, nous avons évalué l'effet de la surexpression des gènes Ngn1, Ngn2, Ngn3 et Mash1 sur la prolifération et la différenciation des cellules humaines dans un système *in vitro*.

1. Effet sur la prolifération des cellules

Nous avons montré que la surexpression des Ngn induit une diminution de la prolifération, particulièrement marquée pour les gènes Ngn1 et Ngn3, alors que la surexpression de Mash1 ne semble pas avoir d'effet majeur sur cette caractéristique. Cette divergence fonctionnelle

entre les différents gènes proneuraux pourrait être le reflet de propriétés intrinsèques individuelles. En culture, tout comme *in vivo*, la voie de signalisation du facteur Notch est activée (Oishi et al., 2004) par l'expression des gènes proneuraux. Comme nous l'avons décrit dans l'introduction, elle régule ainsi leur activité par des mécanismes de rétrocontrôle. Or, Mash1 présente une sensibilité accrue, par rapport aux Ngn, à l'inhibition latérale induite par cette voie Notch (Lo et al., 2002). Ceci justifie que les cellules surexprimant ce gène sortent du cycle cellulaire plus lentement que les cellules surexprimant les neurogénines.

2. Effet sur la différenciation des cellules

La surexpression des quatre gènes proneuraux testés induit une diminution de la proportion des cellules immatures dans les cultures, en parallèle d'une différenciation majoritairement neuronale des populations cellulaires. Ces résultats sont en accord avec le rôle commun de ces facteurs de transcription au cours de la neurogénèse (Jan and Jan, 1994). Malgré cette tendance identique pour tous les gènes, nous avons toutefois mis en évidence des effets propres à chacun. Ainsi, Ngn1 et Ngn3 conduisent exclusivement vers un phénotype neuronal des cellules sans effet sur la population gliale. En revanche, Ngn2 apparaît impliqué à la fois dans la maturation le long du lignage neuronal, et dans la différenciation astrocytaire des cellules. Ceci est en accord avec la mise en évidence, au cours de différentes études, de son expression dans des précurseurs neuronaux mais également astrocytaires (Kondo and Raff, 2000; Nieto et al., 2001). De la même manière, la surexpression du gène Mash1 accroît la proportion des cellules neuronales et simultanément, celle des progéniteurs gliaux A2B5+, connus pour se différencier en astrocytes et oligodendrocytes après greffe dans un modèle de démyélinisation du corps calleux (Windrem et al., 2002). D'autre part, des travaux récents montrent l'implication du gène Mash1 dans la différenciation des précurseurs oligodendrocytaires durant le développement post-natal (Parras et al., 2004). Nos résultats semblent donc également indiquer que Mash1 pourrait induire, *in vitro*, un engagement glial, potentiellement oligodendrocytaire, des cellules humaines. Cependant, dans notre système, la proportion de pré-oligodendrocytes O4+ reste très faible et la surexpression du gène Mash1 seul ne paraît pas suffisante pour stimuler la différenciation terminale des oligodendrocytes. Ces résultats, qui avaient déjà été suggérés, chez la souris, par des expériences de gain et de perte de fonction pour le gène Mash1 (Parras et al., 2007), indiquent que d'autres facteurs pourraient être nécessaires pour la différenciation oligodendrocytaire. Notamment, le facteur à motif bHLH Olig2 pourrait agir en association avec Mash1 dans ce processus (Hack et al., 2004; Parras et al., 2007). Il serait donc intéressant d'évaluer l'influence de la co-expression

des gènes Mash1 et Olig2, dans les progéniteurs nerveux humains en culture, sur leur capacité à engendrer des oligodendrocytes.

3. Phénotype terminal des cellules

La différenciation des cellules humaines suite à la surexpression des gènes proneuraux étant majoritairement neuronale, nous avons testé, dans un second temps, le phénotype terminal des cellules, en nous intéressant aux sous-types cellulaires suivants : neurones sérotoninergiques, catécholaminergiques, cholinergiques, GABAergiques et motoneurones. Bien que les différents gènes Ngn et Mash1 soient connus pour avoir des rôles distincts dans la spécification des différents types neuronaux au cours du développement (Lo et al., 2002), aucun de ces gènes n'est suffisant pour induire la différenciation d'un seul sous-type neuronal dans notre système. En effet, les gènes Ngn2 et Mash1, par exemple, engendrent aussi bien des neurones cholinergiques, que des neurones GABAergiques ou des motoneurones. De façon similaire, avec les gènes Ngn1 et Ngn3, si les phénotypes cholinergiques et GABAergiques apparaissent respectivement prépondérants, ils ne sont cependant pas exclusifs.

Il est probable que l'incapacité des gènes proneuraux à engendrer un sous-type neuronal marqué soit le résultat de l'absence ou de la présence inappropriée de facteurs dans l'environnement des cellules. En effet, au cours du développement, les différents types cellulaires prennent naissance en réponse à un programme intrinsèque et à une interaction très étroite avec l'environnement. En revanche, lors de la mise en culture *in vitro*, les cellules souches nerveuses fœtales humaines sont isolées, c'est-à-dire sorties de leur contexte environnemental et placées dans un système très différent de celui qu'elles connaissaient *in situ*.

Notamment, dans le système nerveux en développement, des gradients dorso-ventraux de morphogènes induisent l'expression de différents gènes de position à homéodomaine, qui influencent largement la différenciation cellulaire. Ainsi, des protéines, telles que Pax2, Pax6, Phox2a, Phox2b ou Nkx2.2 possèdent la capacité de stimuler ou d'inhiber, de façon spécifique, les gènes bHLH, Ngn1, Ngn2, Ngn3, Mash1, Olig2, Id1 et Hes1, entraînant une grande variété dans le phénotype terminal des cellules (Dubreuil et al., 2002; John et al., 2005; Marquardt et al., 2001; Scardigli et al., 2001; Zhou et al., 2001). Par exemple, lorsque Mash1 est associé avec Nkx2.2, il définit à la fois des sous-populations neuronales et

oligodendrocytaires, alors qu'avec Pax6, il provoque principalement une différenciation neuronale et avec Olig2, une différenciation oligodendrocytaire (Sugimori et al., 2007). En revanche, la coopération de cette même protéine Olig2 avec la protéine proneurale Ngn2 régule spécifiquement la formation des motoneurones (Mizuguchi et al., 2001; Novitch et al., 2001). En définitive, la spécification d'une identité cellulaire donnée est donc la résultante d'une combinatoire très précise de facteurs modulant l'activité des gènes proneuraux. Les protéines à motif bHLH apparaissent donc plutôt comme des facteurs permissifs qui sont nécessaires à la progression normale des programmes de différenciation, mais qui doivent interagir avec d'autres facteurs dits « instructifs » pour orienter spécifiquement le devenir cellulaire. Ceci justifie qu'un petit nombre de protéines à motif bHLH permette d'engendrer l'ensemble des sous-types cellulaires nerveux présents dans l'organisme. *In vitro*, ces signaux différentiels disparaissent laissant place à un milieu homogène dans lequel les signaux et les régulations fines sont altérés.

Des études récentes abondent en ce sens et indiquent que les conditions spécifiques de culture *in vitro* (dissociation et amplification) induisent une dérégulation et une reprogrammation des cellules souches (fœtales ou adultes), c'est-à-dire l'acquisition ou la réacquisition de capacités de différenciation qu'elles ne possédaient pas (ou plus) au moment où elles ont été extraites des tissus (Anderson, 2001; Gabay et al., 2003; Hack et al., 2004; Machon et al., 2005; Santa-Olalla et al., 2003). Ces reprogrammations entraîneraient l'apparition de phénotypes aberrants (Dromard et al., 2007) d'où, au final, un potentiel de différenciation plus large. Les mécanismes mis en jeu ne sont pas clairs mais pourraient impliquer une dérégulation des facteurs de transcription, une réorganisation chromatinienne, une déméthylation (Jackson-Grusby et al., 2001; Taylor and Jones, 1979) ou d'autres modifications épigénétiques qui ne sont habituellement pas nécessaires aux progéniteurs pour engendrer leur répertoire normal de dérivés différenciés.

4. Influence du bFGF sur l'effet des gènes proneuraux

Au regard de cette influence majeure de l'environnement sur le devenir des cellules, l'une des questions cruciales concernant la différenciation des progéniteurs nerveux humains par surexpression des gènes proneuraux résidait dans le choix du milieu de culture dans lequel maintenir les cellules après transduction avec les différents vecteurs de différenciation. Nous avons donc évalué l'influence bFGF sur la différenciation induite par les différents gènes à motif bHLH en maintenant les cellules avec ou sans bFGF après transduction. Peu de

variations ont réellement été mises en évidence entre les différentes conditions de culture. Notons néanmoins qu'en absence de bFGF, la proportion de cellules astrocytaires est accentuée avec l'ensemble des gènes proneuraux, tout comme la proportion de progéniteurs gliaux A2B5+/Map5- avec les gènes Ngn2 et Ngn3. Dans une perspective thérapeutique visant les maladies neurodégénératives, la greffe de cellules astrocytaires apparaît parfois délétère (Fricker et al., 1999; Geloso et al., 2007). Ainsi, malgré un léger accroissement de la proportion de neurones différenciés avec les gènes Ngn3 et Mash1, il semble préférable de conserver les cellules en présence de bFGF.

B. Pathologies ciblées

La surexpression des gènes proneuraux permet une homogénéisation des populations cellulaires, bien que partielle, avec une préférence marquée pour un phénotype neuronal. Dans une perspective de médecine régénérative, les pathologies induisant une **dégénérescence spécifique des neurones**, telles que la maladie de Parkinson, la maladie de Huntington, la maladie d'Alzheimer ou la sclérose latérale amyotrophique par exemple, constituent donc des cibles appropriées quel que soit le gène surexprimé.

Le phénotype GABAergique étant prépondérant dans les différentes populations et particulièrement marqué dans les cellules transduites avec le vecteur exprimant le gène Ngn2, notre stratégie apparaît surtout spécifiquement adaptée au traitement de la **maladie de Huntington** (caractérisée par une dégénérescence sélective des neurones GABAergiques). Cibler spécifiquement le phénotype GABAergique pourrait améliorer les résultats d'essais cliniques réalisés jusqu'à présent (Bachoud-Levi et al., 2006; Bachoud-Levi et al., 2000).

Cependant, la proportion importante de motoneurones au sein des cellules surexprimant le gène Mash1 suppose aussi une application potentiellement performante dans le traitement des **lésions de la moelle épinière**. Dans le cadre d'un projet européen visant à traiter ce traumatisme, nous avons d'ores et déjà planifié de greffer de telles cellules dans des modèles animaux. D'autres expériences de thérapie cellulaire relative aux traumatismes médullaires ont, par ailleurs, démontré que les oligodendrocytes permettaient de myéliniser les axones au niveau du site de lésion, favorisant ainsi une protection neuronale et une récupération fonctionnelle (pour revue voir (McDonald and Belegu, 2006). Si la coexpression des gènes Mash1 et Olig2 s'avère efficace pour l'induction de la différenciation oligodendrocytaire, elle

pourrait alors être profitable au cours des transplantations au niveau de la moelle. En outre, les cellules obtenues pourraient, également, être utilisées dans le traitement de **maladies de la myéline**, telles que la sclérose en plaques ou certaines leucodystrophies.

C. Limites de la technique

1. Durée de la surexpression des gènes proneuraux

L'effet de la surexpression a été examiné 4 jours après transduction. Or l'action des facteurs de transcription fait suite à la pénétration du vecteur dans la cellule, à l'intégration de ce dernier dans le génome et à la mise en place des boucles de rétrocontrôle qui régulent le « timing » de la neurogenèse et de la gliogenèse et qui permettent d'aboutir aux différents sous-types cellulaires (Anderson, 1999; Pattyn et al., 2000). Leurs mécanismes nécessitent donc un délai pour être activés et pour s'acheminer vers la réponse finale. Après 4 jours de surexpression, il est fort probable que l'effet que nous observons ne soit qu'une ébauche de la réaction cellulaire induite par les protéines proneurales. Comme nous l'avons suggéré à plusieurs reprises dans la partie « Résultats », un allongement de la durée de surexpression des gènes proneuraux apporterait donc des précisions intéressantes, relatives notamment à l'influence du gène Mash1 sur la prolifération cellulaire, à celle des gènes Ngn1 et Ngn3 sur la différenciation gliale et à celle des gènes proneuraux, en général, sur la spécification neuronale. Idéalement, la fixation des cellules devrait avoir lieu au moins 8 jours après transduction. *In situ*, ce délai correspond au temps nécessaire à une cellule souche pour accomplir sa différenciation jusqu'au stade terminal.

2. Choix du vecteur viral

Au cours du développement, la différenciation est le résultat de régulations très fines, dépendantes des doses et de la chronologie d'expression des différents facteurs de transcription. Notamment, afin de permettre à la différenciation terminale de s'accomplir correctement, une réduction voire une extinction de l'expression des gènes proneuraux est nécessaire après un temps donné. Or dans notre système, l'expression des transgènes est induite par un promoteur ubiquitaire* fort, que les facteurs intrinsèques ne peuvent réprimer, ce qui constitue un frein majeur dans une perspective de greffe et de maintien des cellules *in vivo*. Les vecteurs de différenciation, tels que nous les avons utilisés, pourraient donc subir des améliorations afin d'optimiser nos résultats. Des développements récents dans le

« design » des vecteurs lentiviraux peuvent, notamment, apporter des solutions intéressantes. En particulier, l'utilisation de **vecteurs lentiviraux inductibles** permettrait de circonscrire le problème de l'expression continue des protéines proneurales. De tels vecteurs sont produits dans notre laboratoire (Vogel et al., 2004) et permettent de réguler le taux d'expression du transgène grâce à des doses variables de tétracycline et d'éteindre l'expression de celui-ci si nécessaire.

3. Phénotype *in vivo* difficilement prévisible

Les données de la littérature suggèrent qu'après greffe chez l'animal, l'évolution des cellules non génétiquement modifiées dépendra très largement de l'environnement cellulaire au niveau du site d'injection. Ainsi, les cellules se différencient préférentiellement en neurones dans les zones de neurogénèse et en astrocytes dans un environnement quiescent (Fricker et al., 1999). Cependant, une modification génétique entraînant la surexpression de facteurs de transcription modifie les propriétés intrinsèques des cellules, et leur réponse à l'environnement peut en être profondément bouleversée. Ainsi, après transfection avec le gène Ngn1, une lignée de cellules souches nerveuses extraites du télencéphale ventral acquiert un phénotype GABAergique caractéristique de leur environnement d'origine, et conserve cette caractéristique ventrale après greffe dans le cortex de souris adultes (Muramatsu et al., 2005). Dans ce cas, l'information fournie de manière intrinsèque à la cellule prime donc sur les signaux environnementaux.

D'autres études, en revanche, montrent que malgré l'instruction des cellules in vitro, celles-ci restent sensibles à l'environnement. C'est, en effet, ce que l'équipe de Jonas Frisen met en évidence lors de greffes dans un modèle de lésion de la moelle épinière. Dans leur étude, 90% des cellules nerveuses adultes surexprimant le gène Ngn2 *in vitro* deviennent des neurones (Falk et al., 2002). Cependant, quand ces mêmes cellules sont greffées dans la moelle lésée, la proportion de cellules neuronales n'est plus que de 44%, tandis que 32% des cellules présentent le phénotype oligodendrocytaire et 6% le phénotype astrocytaire (Hofstetter et al., 2005). Ainsi malgré une meilleure compréhension des mécanismes, une homogénéisation cellulaire et un ciblage des pathologies concernées, nous n'avons, en définitive, aucun moyen d'anticiper les effets de notre stratégie lors de transplantations dans des modèles animaux. La méthode expérimentale empirique semble donc être le seul moyen de connaître précisément les bienfaits que l'orientation de la différenciation cellulaire *in vitro* peuvent apporter en thérapie cellulaire.

II.Seconde stratégie : tri des cellules d'intérêt par expression d'une protéine rapportrice sous le contrôle d'un promoteur choisi

Dans le but de sélectionner un type cellulaire choisi, nous avons évalué la capacité de différents promoteurs (Nestine, Synapsine et GFAP) correspondant à différents lignages du SNC (respectivement cellules immatures, lignage neuronal et lignage astrocytaire) à diriger spécifiquement l'expression d'une protéine fluorescente (eYFP ou eGFP) dans les cellules souches et progénitrices fœtales humaines après transduction avec des vecteurs lentiviraux. Dans notre système expérimental (cellules humaines en culture, vecteurs lentiviraux, expression à 13 jours), seul le promoteur Nestine s'est avéré spécifique. Plus de 80% des cellules fluorescentes expriment le marqueur nestine. En revanche, les promoteurs Synapsine et GFAP n'ont pas permis de diriger spécifiquement l'expression dans les cellules.

A. Justification de la non-spécificité

Le choix des différents promoteurs utilisés était fondé sur des expériences antérieures ayant démontré leur capacité à diriger l'expression spécifique du transgène dans le lignage considéré (Jakobsson et al., 2003; Kugler et al., 2001; Roy et al., 2000a). Toutefois, les systèmes expérimentaux précédemment mis en œuvre sont différents de celui que nous avons adopté, aussi bien sur le plan des cellules utilisées que sur celui des méthodes de transduction/transfection.

En particulier, seule la spécificité du promoteur Nestine a été analysée dans des cellules fœtales humaines de manière quantitative (Keyoung et al., 2001; Roy et al., 2000a). Pour les promoteurs Synapsine et GFAP, l'évaluation de la spécificité a été essentiellement qualitative et a fait intervenir des cultures primaires fœtales de rat (Kugler et al., 2001), des lignées cellulaires (Besnard et al., 1991), des souris transgéniques (Jabs et al., 2005), des animaux adultes (Jakobsson et al., 2003), mais jamais des cellules fœtales humaines. Or comme nous l'avons vu avec les protéines proneurales et la différenciation, l'environnement cellulaire peut influer de manière importante sur la transcription des gènes. Les promoteurs sont les premières cibles de cette régulation.

Le système vectoriel peut également jouer un rôle essentiel dans la variabilité de la spécificité. Si le promoteur GFAP a auparavant été inséré et évalué dans des vecteurs lentiviraux analogues à ceux que nous avons employés (Jakobsson et al., 2003), en revanche, la spécificité des promoteurs Nestine et Synapsine a été vérifiée avec des vecteurs adénoviraux (Keyoung et al., 2001; Kugler et al., 2001) qui, au contraire des vecteurs lentiviraux, ne s'intègrent pas dans le génome et induisent une expression transitoire du transgène dans les cellules en division. Or cette capacité d'intégration des vecteurs lentiviraux peut justifier la non-spécificité des promoteurs Synapsine et GFAP. En effet, le site d'intégration du transgène et le nombre de copies intégrées dans le génome de l'hôte peuvent être sources d'interférences, qui conditionnent la spécificité. Ces incidences peuvent, de surcroît, être accentuées par les caractéristiques du promoteur en lui-même, c'est-à-dire en particulier sa taille et la présence ou non de séquences régulatrices. Un petit promoteur facilite l'entrée du vecteur dans la cellule, favorise son intégration au niveau du génome, notamment au niveau de zones de transcription actives et présente moins de séquences régulatrices pour gérer ses propriétés à diriger l'expression, d'où un risque accru de non-spécificité. C'est ainsi que, le promoteur Synapsine, qui est le plus court des trois promoteurs testés, est également celui qui présente la moins bonne spécificité. Réduire la taille des promoteurs pour simplifier leur utilisation peut donc avoir des conséquences drastiques en terme de spécificité.

Notons enfin que, dans notre système, l'utilisation de l'enveloppe Mokola n'a pas permis de cibler plus spécifiquement l'expression de la protéine rapportrice dans les cellules GFAP+. Or, selon des résultats obtenus dans notre laboratoire (Brizard et al, en préparation), l'utilisation de cette enveloppe restreint l'expression du transgène aux cellules astrocytaires après injection dans le striatum de souris C57Bl6/N. Son tropisme particulier ne semble pas se vérifier *in vitro* dans nos conditions. Pour le moment, on ne connaît pas le récepteur cellulaire de la protéine Mokola. Il est possible que ce récepteur ne soit pas exprimé spécifiquement à la surface des astrocytes dans les cellules humaines ; il est également envisageable qu'il soit exprimé de façon aberrante *in vitro*.

B. Brèche dans la spécificité du promoteur Nestine

Quelles que soient les divergences de nos résultats avec les données de la littérature concernant les promoteurs Synapsine et GFAP, nous avons cependant démontré qu'avec le promoteur Nestine, l'expression de la protéine rapportrice était bien localisée à 81% dans des

cellules nestine+. Ces résultats corroborent les données obtenues par l'équipe de Steven Goldman (Keyoung et al., 2001) qui réalise une sélection de cellules nestine+ à l'aide de vecteurs adénoviraux exprimant la protéine eGFP sous le contrôle du même promoteur Nestine. Une analyse attentive du phénotype des cellules nestine+ nous a cependant permis de démontrer que ces cellules n'appartenaient pas toutes au lignage neuroépithélial. En effet, parmi celles-ci, 56% co-expriment la GFAP, protéine classiquement associée au lignage astrocytaire. Si des études importantes et novatrices ont révélé de façon convaincante que les cellules souches nerveuses de la zone sous-ventriculaire de rat adulte sont des cellules de « type astrocytaire » exprimant la GFAP (Doetsch et al., 1999), il est important de ne pas assimiler ces résultats *in vivo* dans un modèle adulte à ceux obtenus *in vitro* avec des cellules embryonnaires, qui plus est humaines. La seule co-expression de la GFAP avec la nestine dans notre système ne permet pas de conclure à un phénotype neuroépithélial. Au contraire, nous avons montré qu'aucune cellule GFAP+ n'était en prolifération dans nos cultures, ce qui indique que ces cellules ne peuvent être considérées comme des cellules souches, dont l'une des caractéristiques fondamentales est l'autorenouvellement (et donc la prolifération). Les cellules nestine+/GFAP+ appartiennent donc au lignage astrocytaire. Dans une perspective de tri cellulaire, le promoteur Nestine permettrait donc de sélectionner une population à 81% nestine+, parmi laquelle 44% seraient des cellules immatures et 56% des cellules astrocytaires.

Afin de restreindre plus spécifiquement notre système de sélection aux cellules immatures, d'autres promoteurs peuvent être envisagés. En particulier, le promoteur de la protéine musashi1, spécifique des cellules progénitrices nerveuses (Kaneko et al., 2000) a été comparé au promoteur Nestine. Les deux promoteurs Nestine et Musashi1 définissent des populations différentes, bien que partiellement chevauchantes (Keyoung et al., 2001) et jusqu'à présent, aucune co-expression des marqueurs musashi1 et GFAP n'a été publiée. Par conséquent, le promoteur Musashi1 apparaît plus stringent que le promoteur Nestine pour distinguer les cellules souches nerveuses des cellules astrocytaires.

Dans une perspective de greffe, l'obtention d'une population homogène de cellules immatures permettrait d'évaluer le potentiel de différenciation des cellules souches nerveuses fœtales humaines dans différents contextes (zone neurogénique ou quiescente, cerveau adulte ou en développement, cerveau lésé…). Cependant, des études ont montré que ce stade de différenciation très immature n'était pas nécessairement le plus adapté pour une thérapie cellulaire et une récupération fonctionnelle efficaces. En effet, des populations enrichies en

cellules indifférenciées et greffées dans le cerveau sain de rat adulte montrent une survie et une différenciation en neurones et astrocytes moins importantes, comparativement à des greffes similaires de populations hétérogènes (Messina et al., 2003). De même, des cellules neuroépithéliales multipotentes purifiées ne survivent ni dans le striatum, ni dans l'hippocampe, ni dans la moelle épinière de rat adulte, alors que les progéniteurs neuronaux et gliaux isolés à partir de prélèvements identiques survivent, migrent et se différencient en neurones, astrocytes et oligodendrocytes dans les 3 régions du SNC (Lepore et al., 2004). Ainsi, si l'obtention de populations plus homogènes est important pour une thérapie plus efficace, le stade de différenciation des cellules joue également un rôle crucial. Sélectionner des cellules prédifférenciées apparaît beaucoup plus intéressant pour répondre à la question posée initialement.

C. Solutions pour améliorer l'efficacité du tri cellulaire

L'idée initiale de notre stratégie consistait à sélectionner de manière positive les cellules exprimant la protéine rapportrice. De cette manière, avec le promoteur Nestine, le tri par cytométrie en flux aurait permis de conserver les cellules fluorescentes (donc nestine+) et d'éliminer les cellules non fluorescentes. Cependant, puisque nous venons d'argumenter contre l'utilisation de populations homogènes nestine+, on peut envisager la stratégie inverse qui par une sélection négative permettrait de conserver les cellules non fluorescentes et d'éliminer les cellules fluorescentes. Etant donné que 81% des cellules fluorescentes sont nestine+, on pourrait ainsi imaginer se débarrasser d'une grande partie des cellules immatures et des cellules astrocytaires, tout en enrichissant la population en cellules neuronales. Il faut toutefois tenir compte de l'efficacité de transduction du vecteur VSV-Nestine-eYFP. En effet, nous avons démontré que seulement 35,3% des cellules totales exprimaient la protéine eYFP, ce qui signifie qu'en éliminant les cellules eYFP+, seuls 81% de 35,3% de cellules nestine+ pourraient être supprimés de la population. Cet enrichissement ne serait donc pas suffisant pour considérer la population sélectionnée comme homogène.

Par conséquent, si l'on veut utiliser la stratégie de tri cellulaire pour sélectionner des cellules engagées vers un lignage choisi, il est nécessaire d'améliorer la spécificité des promoteurs des autres lignages. Plusieurs solutions peuvent être proposées. Tout d'abord, l'utilisation du promoteur de la tubuline α1 (Tα1) pourrait constituer une alternative au promoteur Synapsine (Gloster et al, 1994). En effet, ce promoteur a déjà permis de sélectionner et d'isoler des

progéniteurs neuronaux à partir de cellules humaines adultes de la zone sous-ventriculaire, en dirigeant l'expression spécifique d'une protéine rapportrice (Roy et al., 2000a). Il conviendra néanmoins de vérifier cette spécificité dans nos conditions expérimentales, d'autant que des travaux récents ont révélé que le promoteur Synapsine serait, en fait, plus spécifique *in vivo* que le promoteur Tα1 (Hioki et al., 2007).

Une autre voie d'amélioration consisterait à utiliser un outil vectoriel lentiviral légèrement différent. Notamment, comme les promoteurs semblent plus spécifiques quand ils sont insérés dans des vecteurs adénoviraux épisomaux* (Keyoung et al., 2001; Kugler et al., 2001), nous pouvons supposer que l'utilisation des **vecteurs lentiviraux non-intégratifs**, développés récemment au laboratoire (Philippe et al., 2006), pourrait rétablir la spécificité d'expression induite par les promoteurs des différents lignages. Grâce à la formation d'un génome épisomal*, ces vecteurs permettraient d'écarter les contraintes liées à l'intégration du génome viral, telles que les interférences éventuelles du promoteur avec les facteurs de transcription ou les protéines d'initiation de la transcription, au niveau des zones de transcription active notamment. Cependant, l'expression du transgène présente l'inconvénient d'être transitoire dans les cellules en division et stable dans les cellules quiescentes, ce qui peut constituer un problème dans le cas des cellules souches prolifératives. Une autre option pourrait donc faire appel à des **vecteurs lentiviraux à intégration ciblée** afin de contrôler spécifiquement le site d'intégration de l'ADN viral au niveau du génome de l'hôte (Yant et al., 2007). Connaître et sélectionner les séquences qui entourent le transgène permettrait non seulement de limiter les interférences mais également de standardiser l'expression. Ce dernier système n'en est, cependant qu'à ses débuts. Sa validité et son efficacité doivent encore être confirmées, en particulier dans nos conditions expérimentales.

Les **vecteurs inductibles**, décrits précédemment comme une option à la régulation de l'expression des gènes proneuraux, pourraient aussi être profitables au perfectionnement des vecteurs traceurs en permettant une extinction de la protéine rapportrice une fois le tri effectué.

D. Conclusion

En l'état actuel de notre étude, la stratégie de tri cellulaire est réalisable uniquement avec le promoteur Nestine, qui n'est pourtant pas le promoteur le plus adapté. En outre, les promoteurs de lignages plus engagés demandent encore des améliorations. Par conséquent, parmi les deux systèmes que nous avons testés, l'exploitation de la stratégie

d'homogénéisation à l'aide des promoteurs Nestine, GFAP et Synapsine pour des greffes dans le SNC paraît prématurée, alors que la différenciation des cellules au moyen de gènes proneuraux semble, pour le moment, plus appropriée à cette médecine régénérative.

En revanche, l'obtention d'une population purifiée de cellules immatures grâce à l'utilisation du promoteur Nestine ou Musashi constitue une perspective particulièrement prometteuse pour l'étude des mécanismes de différenciation des cellules souches. En particulier, la combinaison de cette stratégie de tri cellulaire avec la surexpression des gènes proneuraux telle qu'elle a été menée dans la première partie de notre étude permettrait d'analyser l'action des facteurs de transcription à un stade de différenciation donné et sur une population relativement homogène. L'effet des facteurs de transcription serait alors plus standardisé. L'analyse permettrait enfin de discriminer leur influence sur les cellules souches (choix du devenir neurone/glie) par rapport à leur influence sur les progéniteurs (avancement le long du lignage cellulaire) et apporterait ainsi des résultats plus concluants concernant le mécanisme d'action de ces protéines proneurales. Ce système permettrait une approche plus ciblée pour l'étude des cascades mises en jeu, des voies de signalisation induites (JaK, Notch, MAP kinases) et du processus d'obtention du phénotype terminal des cellules par exemple.

III. Avenir de la thérapie cellulaire dans le SNC

A. Choix des cellules

1. Avantages des cellules foetales

Actuellement, quatre grandes catégories de cellules souches sont accessibles pour le traitement des lésions du SNC ou des maladies neurodégénératives : les cellules ES, les cellules souches germinales, les cellules souches nerveuses adultes et les cellules souches nerveuses fœtales. Comme nous l'avons déjà énoncé dans l'introduction, chacun de ces types cellulaires présente des avantages et des inconvénients propres, qui en font des outils plus ou moins adaptés aux différentes pathologies ciblées. Les cellules souches nerveuses fœtales possèdent en particulier l'avantage d'être déjà spécifiées vers un lignage nerveux, sans toutefois montrer les signes de vieillissement cellulaires des cellules souches adultes. En effet, comme pour les cellules somatiques*, des différences importantes, telles qu'une diminution de l'activité de la télomérase*, une perte de l'hétérozygotie pour un ou deux chromosomes, voire une complète délétion de certaines régions chromosomiques, apparaissent quand les cellules vieillissent (Bailey et al., 2004). Les cellules souches fœtales possèdent donc un taux de renouvellement plus élevé que celui des cellules souches adultes.

Notamment, en comparant le comportement, après greffe dans le cerveau de souris Shiverer nouveau-nées, de progéniteurs gliaux triés soit à partir d'une population de cellules nerveuses fœtales, soit à partir d'une population de cellules nerveuses adultes, Martha Windrem révèle que les cellules adultes se différencient plus vite, donnent plus de myéline mais migrent moins que les cellules fœtales qui, de surcroît, montrent une meilleure intégration (Windrem et al., 2004). Les cellules d'origine distincte, de par leurs propriétés propres, ne vont donc pas cibler les mêmes types de pathologies. Grâce à leur capacité de migration, les cellules souches fœtales semblent ainsi plus adaptées au traitement de pathologies diffuses telles que les leucodystrophies ou les maladies dégénératives, mais elles conviennent également à la nouvelle stratégie thérapeutique des cancers du SNC, qui utilise les cellules souches comme vecteurs d'un gène suppresseur de tumeurs (Aboody et al., 2000; Li et al., 2005).

Ces variations dans les aptitudes des cellules en fonction de leur âge se rencontrent également avec les cellules souches fœtales isolées à différents stades du développement. Ainsi, en

fonction du terme théorique du fœtus, elles présentent des propriétés inégales, notamment en terme de plasticité. De même chez l'animal, des cellules isolées à partir d'embryons de rat au stade E14,5 produisent moins de neurones après greffe dans des embryons de poulet que des cellules équivalentes isolées au stade E10,5 (White et al., 2001). Cette nuance pourrait en partie s'expliquer par une sensibilité réduite des cellules plus âgées pour le facteur neurogénique BMP2. Ces données semblent donc indiquer qu'au cours du développement, les cellules subissent des modifications intrinsèques influençant leur réponse aux signaux environnants, tout en maintenant leur multipotencialité et leur capacité d'autorenouvellement (White et al., 2001). D'autre part, nous avons observé que les cellules souches fœtales humaines extraites de deux prélèvements âgés respectivement de 6 et 7 semaines embryonnaires, affichent un phénotype légèrement différent après mise en culture. Les cellules isolées du fœtus le plus âgé semblent présenter un état de différenciation plus avancé, d'où vraisemblablement une malléabilité un peu moins importante. Par conséquent, utiliser des cellules au même stade de développement embryonnaire peut être considéré comme un élément indispensable pour la comparaison et la standardisation des études.

2. Limites des cellules foetales

a) Effets de l'amplification *in vitro*

Dans la plupart des expériences *in vitro* concernant les cellules souches nerveuses fœtales humaines, les cellules isolées sont exposées à de fortes concentrations de facteurs de croissance (en général EGF, bFGF et/ou LIF). Or de telles conditions de culture semblent favoriser une amplification préférentielle de certaines cellules au détriment de certaines autres. Par exemple, les cellules multipotentes acquièrent la capacité de se différencier uniquement en neurones, après exposition au bFGF (Palmer et al., 1999). De la même manière, des expériences réalisées par l'équipe de Clive Svendsen révèlent que les cellules progénitrices fœtales humaines perdent leur potentiel de différenciation *in vitro* (absence de différenciation oligodendrocytaire après plusieurs passages et neurogenèse réduite dans les cultures à long terme) et possèdent une durée de vie limitée (peu à peu, perte de la capacité d'auto-renouvellement et entrée en phase de sénescence*) (Wright et al., 2006). De tels résultats sont contraires au dogme qui décrit les cellules extraites de télencéphale fœtal humain comme des cellules souches capables de s'amplifier indéfiniment et de donner naissance aux cellules des trois lignages principaux du SNC, les neurones, les astrocytes et les oligodendrocytes.

L'amplification des cellules à long terme dans ces conditions *in vitro* semble donc modifier leurs propriétés et limiter ainsi leur exploitation en thérapeutique.

b) Matériel difficilement accessible

Idéalement, l'ensemble des expérimentations relatives aux cellules souches nerveuses fœtales devrait être réalisé à partir de cellules isolées à des stades de développement identiques, ce qui suppose un approvisionnement régulier et important de matériel. Or entre le début de nos travaux et aujourd'hui, le nombre de prélèvements disponibles a très largement diminué. Plusieurs facteurs peuvent être mis en cause. Tout d'abord, le travail sur les cellules extraites de télencéphale nécessite d'obtenir des produits d'IVG intacts. Or le pôle céphalique est particulièrement fragile et peut aisément être endommagé. D'autant que la technique permettant de récupérer le fœtus entier ou avec un minimum de dégâts au niveau du SNC est délicate et n'est pas maîtrisée par tous les gynécologues-obstétriciens. Il en résulte une détérioration fréquente des échantillons, qui ne sont alors plus exploitables.

En 2001, l'allongement du délai légal de l'IVG de 10 à 12 semaines de grossesse aurait pu avoir pour conséquence un accroissement du nombre des interventions pratiquées par l'équipe médicale. Mais la politique d'information sur la sexualité et la contraception visant à faciliter l'accès aux moyens contraceptifs, à prévenir les grossesses non désirées et à limiter le recours à l'IVG a permis de stabiliser le chiffre global (220 000 IVG/an). Ce chiffre cache cependant une augmentation constante du nombre d'opérations effectuées chez les mineures. Or dans le cadre des lois de bioéthique, il est interdit à l'équipe scientifique de disposer des prélèvements des femmes mineures. Un renforcement de ces lois en 2004 a encore réduit le nombre de prélèvements utilisables. Auparavant, les produits d'IVG étaient considérés comme déchet opératoire et l'obtention du consentement éclairé de la mère pour leur exploitation à des fins scientifiques n'était pas obligatoire, bien que fortement recommandée par le Comité Consultatif National d'Ethique (CCNE). Désormais, les prélèvements sont la propriété de la mère qui doit, par conséquent, autoriser l'équipe médicale à les remettre au laboratoire (Article L. 1241-5 du code de la santé publique ; Annexe #2). La loi prévoit aussi que ces prélèvements soient pratiqués dans le cadre de protocoles transmis préalablement à l'Agence de la biomédecine. Le non-respect de ces règles est puni de deux ans d'emprisonnement et de 30 000 euros d'amende.

La complexité des démarches et les risques encourus réfrènent les personnes impliquées dans la procédure. D'autant que le scandale des fœtus retrouvés dans la chambre mortuaire de l'hôpital Saint-Vincent de Paul, au cours de l'été 2005, a encore exacerbée la polémique relative à leur utilisation en recherche. Cette affaire a été l'occasion de réfléchir au statut à accorder à l'être prénatal. Est-ce une personne, une chose ? Les points de vue divergent selon que l'on se place dans des considérations philosophiques, religieuses ou scientifiques. Notamment, de nombreux philosophes développent l'idée qu'un être humain ne commence à exister que par sa relation avec l'autre, c'est-à-dire après la naissance. A l'opposé, la plupart des religions considère l'embryon comme un être humain dès sa conception. Enfin, scientifiquement parlant, plusieurs critères peuvent être pris en compte pour attribuer le statut d'un être humain à un fœtus : la fixation à l'utérus, l'activité cardiaque, l'activité cérébrale, la naissance… Le débat éthique autour du statut du fœtus est donc plus que jamais d'actualité.

Dans ces conditions et face aux difficultés pour s'approvisionner en matériel, les travaux sur les cellules souches fœtales humaines sont rendus encore plus délicats par leur fragilité. Malgré des méthodes de culture exigeantes et rigoureuses, la moindre modification de leur environnement (milieu de culture, température, pourcentage de CO2…) peut avoir des conséquences dramatiques sur leur survie. Le moindre incident apparaît alors comme un véritable désastre.

B. Choix de la stratégie thérapeutique

1. Greffe de cellules dans le système nerveux central

a) Caractéristiques des cellules à greffer

Actuellement, la question récurrente en thérapie cellulaire du SNC consiste à savoir si la composition des populations transplantées peut affecter la survie, la migration, la différenciation et/ou l'intégration des cellules au cours de la greffe. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, un grand nombre d'arguments vont en faveur de transplantations de populations homogènes de cellules par opposition à des populations mélangées et hétéroclites. C'est dans ce cadre que s'est inscrit mon projet de thèse. Cependant, les greffes utilisant de telles populations sont encore peu nombreuses dans les modèles animaux. La validité de la stratégie nécessite donc d'être davantage précisée *in vivo*. Mais avant tout, il s'avère

indispensable de déterminer le **stade de différenciation** auquel les cellules doivent être greffées.

Jusqu'à présent, les transplantations de cellules purifiées ont principalement été réalisées avec des **cellules immatures** et révèlent que ces populations de cellules strictement indifférenciées ne permettent pas une intégration dans le SNC (Lepore et al., 2004; Messina et al., 2003). Plusieurs arguments peuvent être avancés pour justifier ces résultats. En effet, au cours d'une greffe dans le SNC, en particulier chez le nouveau-né chez qui de nombreux progéniteurs n'ont pas encore atteint leur destination et/ou le stade de différenciation finaux, une compétition se met en place entre les cellules greffées et les cellules endogènes. De surcroit, si les cellules sont greffées à un stade très immature, elles peuvent engendrer, en plus des cellules voulues, des sous-types cellulaires indésirables, qui vont limiter les bénéfices de la greffe (comme les astrocytes par exemple). D'autre part, des études récentes révèlent que les signaux permettant de diriger la différenciation et la migration au cours du développement (Shh ou BMP par exemple) n'existent plus dans les tissus adultes, ce qui peut aussi expliquer pourquoi des cellules greffées dans le cerveau ne se différencient pas plus efficacement après greffe (Yang et al, 2004). Ces différents constats justifient, de plus en plus, la nécessité de faire correspondre très précisément la nature des cellules greffées à la pathologie concernée.

Cependant, transplanter des cellules ayant atteint leur différenciation terminale ne semble pas non plus la meilleure solution pour l'optimisation des résultats. En effet, ces **cellules matures post-mitotiques** survivent plus difficilement *in vitro* et leur manipulation est particulièrement délicate, notamment en raison des prolongements et connexions qu'elles ont pu établir *in vitro* et que la dissociation pourrait endommager. *In vivo*, leur survie incertaine et leur migration limitée en font des cellules utilisables uniquement dans le traitement de lésions ponctuelles et restreintes à une zone limitée. D'autre part, leur potentiel de différenciation très restreint ne leur permet de remplacer qu'un seul type cellulaire donné, et donc de ne cibler que des pathologies spécifiques de ce type cellulaire.

Les **cellules progénitrices** sont donc vraisemblablement les cellules les plus adaptées pour la thérapie cellulaire (Lepore et al., 2004). Ces cellules sont partiellement engagées dans une voie de différenciation, mais conservent malgré tout une certaine plasticité et leur capacité de migration. Elles possèdent ainsi toutes les caractéristiques indispensables à une transplantation adéquate et optimisée.

b) Limites de la stratégie de greffe de cellules

Au cours d'une transplantation, l'injection de cellules au niveau du SNC fait appel à une technique chirurgicale invasive utilisant une approche stéréotaxique. Des lésions supplémentaires peuvent en découler, entraîner des modifications de l'environnement et influer sur l'efficacité de la greffe. Notamment, suite à la blessure produite par le passage de l'aiguille, une cicatrice gliale caractérisée par une hyperplasie et une hypertrophie des astrocytes se forme rapidement (dès 24h). Ces astrocytes dits réactifs constituent à la fois une barrière physique empêchant la migration des cellules greffées et une barrière chimique inhibant l'élongation axonale, en particulier dans la moelle épinière (Alonso and Privat, 1993; Ribotta et al., 2004). D'autre part, le processus de greffe implique nécessairement une rupture de la barrière hémato-encéphalique (BHE), que les astrocytes réactifs vont également empêcher de restaurer, exposant ainsi le SNC à l'environnement périphérique.

En effet, en réponse à cette « agression » extérieure, le SNC va réagir en déclenchant un processus inflammatoire qui se caractérise par un afflux important de cellules telles que des lymphocytes, des phagocytes ou des fibroblastes au niveau du site lésé et par la synthèse de médiateurs chimiques spécifiques de l'inflammation (Duan et al., 1998). Cette réaction fait intervenir des phénomènes d'immunité, c'est-à-dire de résistance aux agressions, dont les cellules greffées peuvent subir les conséquences. En effet, dans des conditions d'allogreffe, les cellules transplantées sont reconnues comme étrangères et peuvent être soumises au rejet immunologique de l'hôte et être ainsi éliminées. Pour éviter un tel phénomène, le receveur peut être soumis à un traitement immunosuppresseur préalablement et consécutivement à la greffe.

2. Stratégie des « cellules souches intelligentes »

La capacité de migration des cellules souches nerveuses fœtales apparaît comme un moyen performant de contourner les perturbations liées à l'injection directe dans le SNC. On peut, en effet, envisager de réaliser des greffes moins invasives dans des zones éloignées du site de lésion. Récemment, il a ainsi été démontré que des cellules souches nerveuses injectées en intraveineuse dans la circulation sanguine pouvaient migrer jusqu'au site de lésion et apporter certaines améliorations fonctionnelles et histologiques dans des modèles animaux de la sclérose en plaque (Pluchino et al., 2003), de l'attaque vasculaire cérébrale (Chu et al., 2004a) ou de la maladie de Huntington (Lee et al., 2005).

Les mécanismes permettant cette migration de la circulation systémique au cerveau sont encore mal connus. Cependant, il semblerait que les cellules souches nerveuses expriment, à leur surface, diverses molécules d'adhésion (CD44, CCR par exemple) et possèdent la capacité de se fixer au niveau vasculaire, en particulier dans les zones où la BHE est endommagée (Pluchino et al., 2003). Des études ont révélé que ces molécules d'adhésion et leurs ligands (cytokines, interférons par exemple) étaient surexprimés au moment de la réaction inflammatoire (Pluchino et al., 2005). Ainsi, l'ensemble des pathologies du SNC associées à une inflammation pourrait, grâce à cette surexpression, attirer les cellules inflammatoires circulantes, ainsi que des cellules souches nerveuses présentes dans les vaisseaux sanguins.

L'injection de ces mêmes cellules chez l'animal sain ne montre aucune intégration dans le parenchyme cérébral, ce qui suppose, en effet, que seule une situation pathologique rend possible la migration et l'intégration des cellules souches. Par contre, les cellules souches nerveuses humaines injectées de façon systémique chez l'animal sain ou chez l'animal lésé se retrouvent dans des organes tels que les reins, les poumons et la rate, sans pour autant causer de destructions tissulaires ou induire la formation de tumeurs. Il pourrait être intéressant de vérifier que cette stratégie fonctionne également avec des cellules prédifférenciées et/ou dans des modèles animaux différents. L'idéal serait d'utiliser préférentiellement des modèles transgéniques au lieu de modèles réalisés par injection de toxines, tels que l'acide quinolinique pour la maladie de Huntington (Duan et al., 1998) ou la lysolécithine pour les pathologies de la myéline (Windrem et al., 2002), afin de s'affranchir de l'inflammation induite par le passage de l'aiguille et par la toxine en elle-même.

3. Stratégie de stimulation des cellules souches endogènes

La présence de cellules souches dans le SNC adulte est un atout majeur : elle contribue à maintenir la neurogénèse et la gliogénèse tout au long de la vie. Chez l'adulte, deux régions cérébrales principales sont concernées par cette activité : il s'agit de la zone sous-ventriculaire (Alvarez-Buylla et al., 1998; Doetsch et al., 1999; Sanai et al., 2004) et de la zone sous-granulaire de l'hippocampe (Eriksson et al., 1998; Lledo et al., 2006). Des études récentes réalisées chez l'animal ont montré que, en cas de lésion du SNC, ces cellules endogènes sont activées de façon notable : elles prolifèrent, migrent et se différencient pour remplacer les cellules perdues (Arvidsson et al., 2002; Magavi et al., 2000; Nait-Oumesmar et al., 1999). Cependant, dans de nombreuses situations cliniques telles que la maladie de

Parkinson, la maladie d'Alzheimer ou la sclérose en plaque par exemple, cette activation est insuffisante pour cibler efficacement la lésion ou surmonter la dégénérescence et ne permet pas une réversion de la maladie. Par conséquent, une stratégie séduisante consiste à stimuler, directement dans l'organisme, la capacité des cellules endogènes à remplacer les cellules lésées.

Jusqu'à présent, deux méthodes différentes ont été expérimentées *in vivo*. La première réside dans une infusion directe de facteurs de croissance (BDNF, FGF et/ou EGF) au niveau du tissu lésé (Ohori et al., 2006) et la seconde dans la surexpression des facteurs de transcription Ngn2 et Mash1 par le biais de vecteurs rétroviraux. Les résultats révèlent que la combinaison de ces deux manipulations au sein de la moelle épinière lésée permet de stimuler la production de neurones et d'oligodendrocytes à partir des précurseurs endogènes (Ohori et al., 2006). Cette orientation du devenir des cellules souches intrinsèques par les gènes proneuraux accroît encore l'intérêt qui leur est porté.

Cependant, la découverte récente de nombreuses caractéristiques communes entre les cellules souches et certaines cellules cancéreuses dans les tissus cérébraux adultes (Marx, 2003; Singh et al., 2003) a définitivement changé l'orientation donnée à la thérapie cellulaire et à la recherche sur le cancer. En effet, les cellules souches adultes normales et les cellules souches cancéreuses partagent la majeure partie des facteurs intrinsèques et extrinsèques qui régulent leurs voies de prolifération, d'autorenouvellement et de différenciation (Feinberg et al., 2006; Singh et al., 2004). Elles sont naturellement plus résistantes, aux traitements anticancéreux par exemple, que les autres cellules (Bao et al., 2006; Liu et al., 2006). Mais plus que tout, ces observations ont conduit à la conclusion que les cellules souches et progénitrices adultes pouvaient éventuellement devenir malignes et engendrer des cellules souches cancéreuses, responsables du développement et du maintien des masses tumorales (pour revue voir (Feinberg et al., 2006)). En conséquence, en thérapie cellulaire, il convient d'être particulièrement attentif et prudent quant à la stimulation des cellules souches endogènes par infusion de facteurs de croissance et modification génétique. Enfin, l'étude conjuguée de la biologie de ces cellules souches cancéreuses et de celle des cellules souches adultes saines devrait permettre d'améliorer le diagnostique préventif des cancers et le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques, qui bien évidemment, doivent être exclusivement dirigées contre les cellules cancéreuses.

Conclusion

Les connaissances relatives aux cellules souches en général, et aux cellules souches nerveuses fœtales en particulier, sont récentes et ont donné lieu à un très grand nombre d'informations en un temps extrêmement condensé. S'il est vrai qu'une grande majorité de ces données sont porteuses d'espoir, elles sont souvent soumises à des retours en arrière, des conclusions contradictoires, des hypothèses mises en doute…comme c'est généralement le cas dans les domaines novateurs. Dans une perspective thérapeutique, il apparaît donc indispensable de tirer tous les enseignements des données dont nous disposons et de garder la plus grande prudence quant à leur interprétation. En outre, il sera probablement nécessaire de considérer chaque stratégie individuellement, puisqu'UNE approche ne permettra pas de résoudre toutes les situations. C'est pourquoi, chaque étude, chaque expérience, chaque résultat apporte une pierre à l'édifice de la compréhension des cellules souches et constitue un pas supplémentaire vers leur utilisation efficace et maîtrisée en médecine régénératrice.

Lexique

Allogreffe : Greffe faite à partir d'un donneur. Le système HLA (Human Leukocyte Antigen) définit la compatibilité cellulaire, c'est-à-dire la plus ou moins grande similitude biologique entre les tissus du donneur et ceux du receveur.

Autogreffe : Greffe dans laquelle le greffon est prélevé sur le sujet chez qui le tissu doit être remplacé (le donneur et le receveur ne sont qu'une seule et même personne).

Blastocyste : Stade du début du développement embryonnaire (environ 5 à 6 jours après la fécondation dans l'espèce humaine) où les cellules forment une cavité remplie de liquide.

Cellules germinales : L'ensemble des cellules germinales, ou **germen**, d'un animal sont les cellules qui sont susceptibles de former les gamètes (spermatozoïdes ou ovules).

Cellules HEK293T : Lignée de cellules embryonnaires de rein humain

Cellule somatique : Toutes les cellules d'un organisme à l'exclusion des cellules germinales (gamètes femelles ou ovocytes et gamètes mâles ou spermatozoïdes), ainsi que leurs précurseurs.

Crêtes gonadiques : Masses de mésoderme (voir feuillet embryonnaire) correspondant aux futures gonades* et apparaissant lors du développement embryonnaire. Ces crêtes gonadiques sont situées sur la face interne du mésonéphros (rein embryonnaire).

Cytométrie en Flux : La cytofluorométrie de flux ou Fluorescence Activated-Cell Sorting (FACS) est une technique qui permet le dénombrement et l'analyse de cellules en suspension. Les cellules traversent, une à une, un faisceau laser de longueur d'onde donnée (ici λ=488nm). La lumière incidente va alors exciter les fluorochromes (ici eGFP ou eYFP) qui vont émettre à leur tour de la fluorescence. Elle va être détectée par des capteurs spécifiques qui transmettent ensuite l'information à un ordinateur (Figure α).

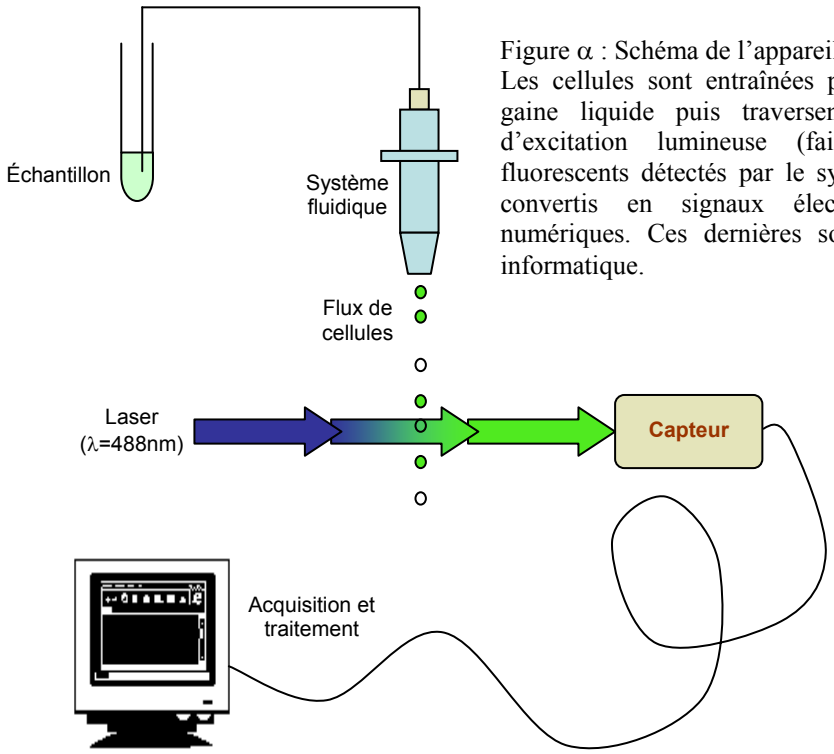


Figure α : Schéma de l'appareil à cytofluorométrie de flux
Les cellules sont entraînées par un fluide au centre d'une gaine liquide puis traversent, une par une, la source d'excitation lumineuse (faisceau laser). Les signaux fluorescents détectés par le système optique sont amplifiés, convertis en signaux électroniques puis en valeurs numériques. Ces dernières sont analysées grâce à l'unité informatique.

L'analyse par FACS fournit pour chaque échantillon le pourcentage de cellules fluorescentes ainsi que la fluorescence moyenne par cellule. Des appareils plus élaborés appelés des trieurs permettent l'analyse mais également le tri des cellules sans les endommager, rendant ainsi possible la mise en culture des populations cellulaires spécifiquement sélectionnées.

Défectif : Se dit d'un bactériophage ou d'un virus qui, par suite d'une ou plusieurs mutations, est incapable d'accomplir seul son cycle infectieux.

Dot-Blot : Le dot-blot est une technique de biologie moléculaire qui permet de quantifier des ARN donnés sans séparation préalable sur gel d'électrophorèse. Les ARN totaux extraits des cellules sont déposés sur une membrane de nylon. La détection des ARN d'intérêt est ensuite réalisée par hybridation à l'aide de sondes ADN radiomarquées puis exposition sur film radiographique.

ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) : Méthode de dosage immunoenzymatique qualitative et quantitative, servant, ici, pour la détection de l'antigène p24 non complexé du VIH.

Epigénétique : Modifications de l'expression des gènes non codées par la séquence d'ADN (méthylations par exemple). Ces modifications ne s'accompagnent pas de changements dans la séquence du gène mais dans l'organisation chromatinienne et donc dans l'accessibilité aux

facteurs de régulation génique. Ce type de régulation peut cibler l'ADN, l'ARN ou les protéines et agir au niveau du noyau ou du cytoplasme. Ces modifications transmissibles et réversibles constituent un des fondements de la diversité biologique.

Episomal (génome) : Elément génétique indépendant.

Extrémités franches : Extrémités de fragments d'acides nucléiques en double brin ne portant pas de prolongements simple brin.

Facteur de transcription : Protéine nécessaire à l'initiation ou à la régulation de la transcription chez les eucaryotes.

Feuillet embryonnaire : Lors de la formation de l'**embryon**, les cellules s'organisent toujours en feuillets de cellules, qui se distinguent les uns des autres lorsque celui-ci réalise sa **gastrulation** : le feuillet extérieur s'appelle alors **ectoderme**, le feuillet intérieur, **endoderme** et le feuillet intermédiaire,. **mésoderme**. Chacun de ces feuillets a pour rôle de constituer les organes du futur individu :

- L'ectoderme génère l'épiderme et le système nerveux
- L'endoderme génère le tube digestif et ses glandes annexes (pancréas)
- Le mésoderme génère les muscles, le squelette, les vaisseaux sanguins

Signalons qu'une partie des muscles et du squelette de la tête provient de l'ectoderme via les cellules de la **crête neurale** : on parle alors de mésectoderme.

Filament intermédiaire : Constituants du cytosquelette de dimension intermédiaire (d'où leur nom) formés de protéines fibrillaires assemblées de façon hélicoïdale.

GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) : Filament intermédiaire* de 52kDa présent dans les cellules gliales telles que les astrocytes ou les cellules épendymaires (cellules gliales tapissant le canal épendymaire et les ventricules cérébraux)..

Gonade : Principal organe génital, c'est-à-dire testicules chez l'homme et ovaires chez la femme.

Hybridation In Situ (HIS) : Hybridation d'une sonde d'ADN ou d'ARN spécifique marquée avec l'ARN ou l'ADN cellulaire, sur une coupe de tissu ou des cellules fixées.

Ilots de Langerhans : Cellules endocrines du pancréas regroupées en îlots disséminés. L'insuline est sécrétée par les cellules β.

Mokola : Lyssavirus de la famille des rabdovirus (virus de la rage)

Multipotent : Capacité à produire plusieurs types de cellules différenciées.

Mutagenèse dirigée : Introduction d'une mutation précise dans un fragment d'ADN cloné, suivie de la réinsertion de la séquence mutée dans le gène original et remplacement de l'ADN sauvage correspondant.

Nestine : Filament intermédiaire* spécifique des cellules souches du SNC.

Neurogenèse : Création par mitose et différenciation de cellules neuronales conduisant à la formation et au maintien du système nerveux.

Neurosphère : Groupement clonal contenant un mélange de cellules différenciées, indifférenciées et mortes dérivant de la prolifération d'une cellule unique selon des divisions cellulaires symétriques et asymétriques (Figure β).

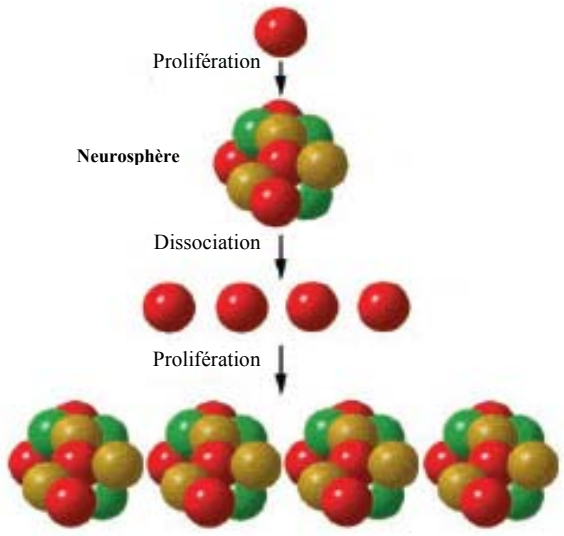


Figure β : Formation des neurosphères

Chaque cellule souche (rouge) en se divisant va former un amas hétérogène de cellules différenciées (vertes), indifférenciées (rouge) et mortes (jaunes). Quand les neurosphères sont dissociées, les cellules souches continuent à proliférer pour donner naissance à des neurosphères secondaires et ainsi de suite.

Niche : Position occupée par une population de cellules, un organisme ou plus généralement une espèce dans un système donné.

Nullipotent : Incapacité d'une cellule à produire d'autres cellules.

Pantropique : Infectant de façon indiscriminée les différents types de cellules.

Phénotype : Ensemble des caractères observables chez un individu, résultant de l'interaction entre son génotype et les effets de son environnement.

Plasmide : Petite molécule circulaire d'ADN extrachromosomique présente chez les bactéries, capable de se répliquer de façon autonome, dans la cellule d'origine et dans une cellule-hôte. Cette molécule porte des caractères génétiques non essentiels à la cellule-hôte. Certains plasmides sont utilisés comme vecteurs de clonage de gènes.

Plasmide recombiné ou recombinant : Plasmide dans lequel a été inséré un fragment d'ADN étranger.

Pluripotent : Capacité à donner naissance à quasiment tous les types cellulaires.

Pseudotypage : Incorporation d'une enveloppe virale hétérologue, c'est-à-dire constituée de glycoprotéines différentes de celles habituellement exprimées à la surface du virus. Ce changement a pour conséquence directe une modification du tropisme*, qui correspond alors à celui de la nouvelle enveloppe virale.

Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR) : Méthode de biologie moléculaire permettant d'amplifier le nombre de copies d'une séquence **spécifique** d'ADN (l'**Amplicon**). Cette technique est fondée sur la combinaison de deux facteurs :

I- les propriétés de synthèse enzymatique et d'initiation « ADN double brin spécifique » des « ADN polymérases ADN dépendantes thermostables ».

II- les propriétés d'hybridation et de déshybridation des brins complémentaires d'ADN en fonction de la température.

Ces éléments permettent de contrôler l'activité enzymatique grâce à des transitions de température (assurées par un **thermocycleur**) répétées de manière cyclique

Rétrovirus : Virus qui utilise l'ARN comme matériel génétique.

Sénescence : Vieillissement de l'organisme.

Séquence Flap : Lors de la transcription réverse des lentivirus, la séquence Flap constitue un chevauchement de 2 brins d'ADN en cours de synthèse, induit par les séquences cPPT (polypurine tract *cis*-active sequence) et CTS (Central Termination Sequence). Cet assemblage va servir de signal favorisant le transport de l'ADN viral vers le noyau de la cellule hôte.

Site de clonage multiple (ou polylinker) : Séquence ADN correspondant à une succession de sites uniques pour un certain nombre d'enzymes de restriction. C'est à ce niveau l'on va insérer l'ADN étranger.

Synapsine I : Protéine membranaire qui retient les vésicules synaptiques (contenant les neurotransmetteurs) ancrées sur le cytosquelette d'actine.

Télomérase : Ribonucléoprotéine qui ajoute des répétitions à l'extrémité des chromosomes, afin de maintenir leur longueur et d'empêcher l'entrée dans la phase de sénescence*. Son rôle est très largement rattaché au potentiel de prolifération considérable des cellules souches.

Tératome : Tumeur composée de tissus appartenant aux 3 feuillets germinaux embryonnaires. Il est généralement localisé au niveau des ovaires ou des testicules. Il peut être produit expérimentalement chez l'animal par injection de cellules souches pluripotentes, afin de déterminer leur capacité à se différencier.

Terme théorique : Il permet de déterminer l'âge de l'embryon en fonction de la date des dernières règles. Il se calcule en ajoutant deux semaines au stade de développement embryonnaire déterminé par rapport à la date de conception (date de début de la grossesse).

Totipotent : Capacité à engendrer un individu complet.

Transcriptase inverse (ou rétrotranscriptase) : Enzyme qui permet d'obtenir une séquence d'ADN à partir d'une séquence d'ARN.

Transfection : Introduction d'un ADN étranger dans une cellule cultivée *in vitro*.

Transfert de gène : Introduction dans le génome d'une cellule d'un gène provenant d'un autre organisme, ou du même organisme, pour renforcer son expression

Trophoblaste : Couche superficielle de cellules du blastocyste qui va permettre de former le placenta.

Tropisme : Capacité d'un virus à infecter un type cellulaire particulier au sein d'une espèce donnée.

Ubiquitaire : Un composé ubiquitaire (ou ubiquiste) possède, comme son nom l'indique, le "don d'ubiquité", c'est à dire la faculté d'être présent en plusieurs lieux à la fois.

-Les protéines exprimées dans toutes les cellules d'un organisme sont dites ubiquitaires.

-Un promoteur ubiquitaire va permettre l'expression des protéines placées sous son contrôle dans toutes les cellules de l'organisme.

Unipotent : Capacité à ne produire qu'un seul type de cellules différenciées.

Vecteur : -Tout système permettant le transfert de gènes choisis dans une cellule d'un organisme.

-Molécule d'acide nucléique dans laquelle il est possible d'insérer des fragments d'acide nucléique étranger, pour ensuite les introduire et les maintenir dans une cellule hôte.

Virion : Particule virale individuelle par opposition à virus qui désigne plus généralement l'organisme biologique.

Virus auxiliaire : Virus qui assure les fonctions manquantes d'un virus défectif*, pour lui permettre de terminer son cycle infectieux au cours d'une infection mixte.

Virus de la stomatite vésiculeuse (VSV) : Vésiculovirus de la famille des rabdovirus (virus de la rage)

Annexes

Annexe #1

Article 1 : « Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy »

Paolo De Coppi, Georg Bartsch Jr., M. Minhaj Siddiqui, Tao Xu, Cesar C. Santos, Laura Perin, Gustavo Mostoslavsky, **Angéline C. Serre**, Evan Y. Snyder, James J. Yoo, Mark E. Furth, Shay Soker and Anthony Atala

ARTICLES

nature biotechnology

Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy

Paolo De Coppi[1,3], Georg Bartsch, Jr[1,3], M Minhaj Siddiqui[1], Tao Xu[1], Cesar C Santos[1], Laura Perin[1], Gustavo Mostoslavsky[2], Angéline C Serre[2], Evan Y Snyder[2], James J Yoo[1], Mark E Furth[1], Shay Soker[1] & Anthony Atala[1]

Stem cells capable of differentiating to multiple lineages may be valuable for therapy. We report the isolation of human and rodent amniotic fluid–derived stem (AFS) cells that express embryonic and adult stem cell markers. Undifferentiated AFS cells expand extensively without feeders, double in 36 h and are not tumorigenic. Lines maintained for over 250 population doublings retained long telomeres and a normal karyotype. AFS cells are broadly multipotent. Clonal human lines verified by retroviral marking were induced to differentiate into cell types representing each embryonic germ layer, including cells of adipogenic, osteogenic, myogenic, endothelial, neuronal and hepatic lineages. Examples of differentiated cells derived from human AFS cells and displaying specialized functions include neuronal lineage cells secreting the neurotransmitter L-glutamate or expressing G-protein-gated inwardly rectifying potassium channels, hepatic lineage cells producing urea, and osteogenic lineage cells forming tissue-engineered bone.

© 2006 Nature Publishing Group http://www.nature.com/naturebiotechnology

Amniotic fluid is known to contain multiple cell types derived from the developing fetus[1,2]. Cells within this heterogeneous population can give rise to diverse differentiated cells including those of adipose, muscle, bone and neuronal lineages[3–6]. We now describe lines of broadly multipotent AFS cells, and use retroviral marking to verify that clonal human AFS cells can give rise to adipogenic, osteogenic, myogenic, endothelial, neurogenic and hepatic lineages, inclusive of all embryonic germ layers. In this respect, they meet a commonly accepted criterion for pluripotent stem cells, without implying that they can generate every adult tissue.

Neurons, hepatocytes and osteoblasts are among the cell types for which improved stem cell sources may open up novel therapeutic applications. For each of these examples we show that AFS cells can yield differentiated cells that express lineage-specific markers and acquire characteristic functions *in vitro*. In addition, we present initial studies indicating that AFS cells induced toward particular lineages can generate specialized cells after implantation *in vivo*. We show that AFS cells directed to neural lineage differentiation by exposure to nerve growth factor (NGF) are able to widely engraft the developing mouse brain in a manner similar to that observed previously for neural stem cells[7]. In addition, we document the formation of tissue-engineered bone from printed constructs of osteogenically differentiated human AFS cells in immune-deficient mice.

RESULTS

Clonal stem cell lines from amniotic fluid

Approximately 1% of the cells in cultures of human amniocentesis specimens obtained for prenatal genetic diagnosis express the surface antigen c-Kit (CD117), the receptor for stem cell factor[8] (Supplementary Table 1 online). We used immunoselection with magnetic microspheres to isolate the c-Kit–positive population from many amniocentesis specimens and found that these cells can be readily expanded in culture as stable lines, termed AFS cells. We have routinely established clonal AFS cell lines with a typical doubling time of about 36 h and no need for feeder layers. Sub-confluent cells show no evidence of spontaneous differentiation. However, under specific inducing conditions AFS cells are able to give rise to lineages representative of the three embryonic germ layers.

We used flow cytometry to assess markers expressed by human AFS cells (Supplementary Fig. 1 and Supplementary Methods online). Five clonal lines gave similar results. The cells were positive for Class I major histocompatibility (MHC) antigens (HLA-ABC), and some were weakly positive for MHC Class II (HLA-DR). The AFS cells were negative for markers of the hematopoietic lineage (CD45) and of hematopoietic stem cells (CD34, CD133). However, they stained positively for a number of surface markers characteristic of mesenchymal and/or neural stem cells, but not embryonic stem (ES) cells, including CD29, CD44 (hyaluronan receptor), CD73, CD90 and CD105 (endoglin)[5,9,10]. Human AFS cells also were positive for stage-specific embryonic antigen (SSEA)-4 (ref. 11), a marker expressed by ES cells but generally not by adult stem cells. The AFS cells did not express other surface markers characteristic of ES[12,13] and embryonic germ (EG) cells[14], SSEA-3 and Tra-1-81. Some lines were weakly positive for Tra-1-60. Over 90% of the cells expressed the transcription factor Oct4, which has been associated with the maintenance of the undifferentiated state and the pluripotency of ES and EG cells[15].

[1]Wake Forest Institute for Regenerative Medicine, Wake Forest University School of Medicine, Medical Center Boulevard, Winston-Salem, NC, 27157-1094, USA. [2]Children's Hospital and Harvard Medical School, 300 Longwood Avenue, Boston, Massachusetts, 02115, USA. [3]These authors contributed equally to this work. Correspondence should be addressed to A.A. (aatala@wfubmc.edu).

Received 27 July 2006; accepted 20 November 2006; published online 7 January 2007; doi:10.1038/nbt1274

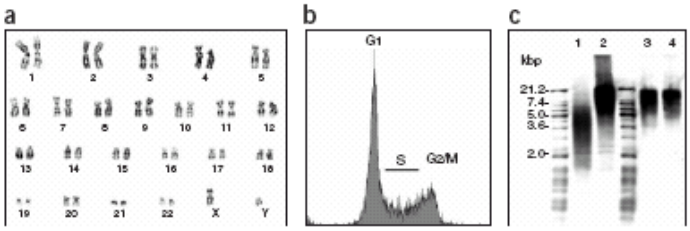


Figure 1 Clonal human AFS cells have a normal karyotype and retain long telomeres. (a) Giemsa band karyogram showing chromosomes of late passage (>250 p.d.) cells. (b) Flow cytometry of late passage cells showing DNA stained with propidium iodide. G1 and G2/M indicate 2n and 4n cellular DNA content, respectively. S indicates cells undergoing DNA synthesis, intermediate in DNA content between 2n and 4n. (c) Conserved telomere length of AFS cells between early passage (20 p.d., lane 3) and late passage (250 p.d., lane 4). Short length (lane 1) and high length (lane 2) telomere standards are provided in the assay kit. Marker lengths are indicated. p.d., population doubling.

We also isolated AFS lines by immunoselection of cells expressing c-Kit from the amniotic fluid of mice and rats. The rodent AFS cells closely resemble the human AFS cells in their growth properties and capacity for *in vitro* differentiation (data not shown). Murine AFS cells, like those from human amniotic fluid, express both embryonic and adult stem cell markers (Supplementary Fig. 2 online).

Whereas normal somatic stem cells are nontumorigenic, ES cells grow as teratocarcinomas when implanted *in vivo*[12,16–18]. None of four human AFS cell lines tested, including late-passage cells, formed tumors in severe combined immunodeficient (SCID)/Beige mice (CB17/Icr.Cg-*Prkdc*^{scid}*Lyst*^{bg}/Crl). Moreover, karyotypes of eleven human lines from pregnancies in which the fetus was male revealed one X and one Y chromosome and a normal diploid complement of autosomes (Fig. 1a). There were no obvious chromosomal rearrangements as judged by Giemsa banding. The AFS cells, even after expansion to 250 population doublings (p.d.), showed a homogeneous, diploid DNA content in the G1 (prereplicative) phase of the cell cycle (Fig. 1b). The G1 and G2 cell-cycle checkpoints appeared intact. Analysis of terminal restriction fragments[19] showed that the average length of telomeres of human AFS cells stayed constant, ~20 kbp, between early (20 p.d.) and late passage (250 p.d.) cells (Fig. 1c).

Cloned AFS cells are broadly multipotent

We tested lines obtained from nineteen different amniocentesis donors and found that AFS cells were able to differentiate along adipogenic, osteogenic, myogenic, endothelial, neurogenic and hepatic pathways[20].

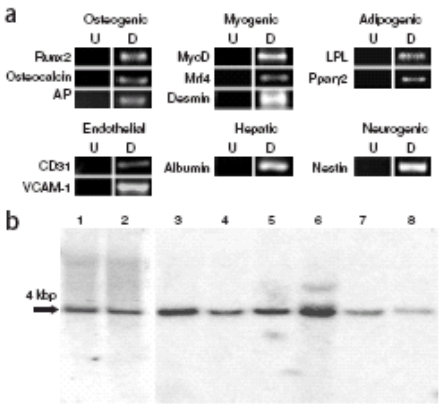


Figure 2 Clonal human AFS cells are broadly multipotent. Clonality of AFS cells and differentiated cells derived from was verified by retroviral marking. (a) RT-PCR analysis of mRNAs for lineages indicated using a retrovirally marked second round subclone of AFS cells. U: Control undifferentiated cells. D: cells maintained under conditions to promote osteogenic (8 d), myogenic (8 d), adipogenic (16 d), endothelial (8 d), hepatic (45 d), neurogenic (8 d) differentiation. (b) Southern blot analysis of inserted GFP retroviral DNA in differentiated cells from (a); arrow indicates 4-kbp junction fragment in *Bam*H1 digested DNA from undifferentiated cells of a GFP positive subclone of AFS cells (lane 1) and the second round subclone (lane 2) used for transcript analysis after differentiation under adipogenic (lane 3), endothelial (lane 4), hepatic (lane 5), osteogenic (lane 6), myogenic (lane 7), and neurogenic (lane 8) conditions.

The induced differentiation to multiple fates could be documented by expression of mRNAs for lineage-specific genes (Fig. 2a)

Multilineage differentiation was characteristic of AFS cells cloned by limiting dilution. To rigorously confirm that cloned AFS cells and their differentiated derivatives descended from a single cell, we used marking with a retroviral vector. Because retroviral DNA will insert into almost any chromosomal region[21], the presence of a provirus at a unique genomic site can identify a clonal population descended from the cell in which an integration event occurred. We infected a presumptively clonal AFS line with a vector encoding green fluorescent protein (CMMP-eGFP) and identified candidate GFP-positive subclones. One contained a single GFP provirus, identified by a unique 4-kbp *Bam*H1 junction fragment between viral and host sequences in a Southern blot of genomic DNA (Fig. 2b). The cells were recloned by limiting dilution, and the resulting second round subclones again contained the signature 4-kbp *Bam*H1 junction fragment. We found that these subclones displayed the same capacity for differentiation along six lineage pathways as the original line. Furthermore, each population of differentiated cells contained the marker provirus, documented by the 4-kbp junction fragment (Fig. 2b). This finding excludes the possibility that the putatively cloned populations were actually oligoclonal, comprising distinct progenitors for different lineages. We conclude that the AFS cells are indeed broad-spectrum multipotent (that is, pluripotent) stem cells.

Function of differentiated cells derived from AFS cells

In addition to showing that induced stem cells express lineage-specific markers, it is important to confirm that they can give rise to cells with sufficient specialized function to have potential therapeutic utility. We assessed functionality with at least one lineage corresponding to each embryonic germ layer.

Neuronal lineage differentiation (ectoderm) was induced in a two-stage system. In a first culture phase, over 80% of the initial AFS cell population became positive for nestin, a marker first defined in neural stem cells[22] (Fig. 3a). Under conditions expected to bias for

© 2006 Nature Publishing Group http://www.nature.com/naturebiotechnology

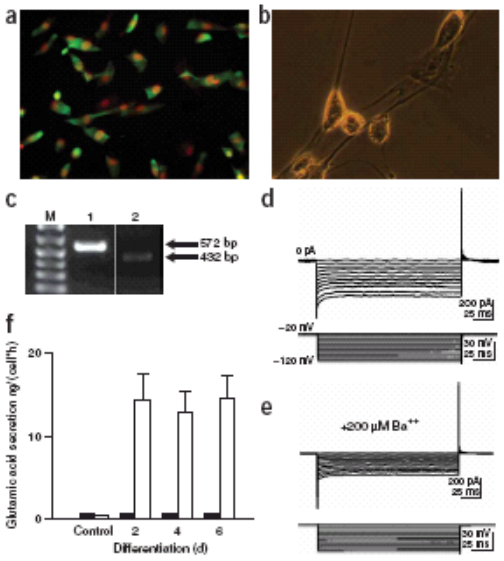


Figure 3 Neurogenic differentiation of human AFS cells in culture. (a) Immunofluorescence staining for nestin after 8 d in first stage neurogenic differentiation. (b) Phase contrast micrograph showing cells after second stage of neurogenic differentiation under conditions biasing for production of dopaminergic neurons – individual cells with pyramidal morphology, as shown, were assessed for potassium channels by voltage clamping. (c) RT-PCR showing expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (lane 1) and GIRK2 (lane 2) after second stage of neurogenic differentiation. M indicates size markers. Sizes of PCR products are shown. (d,e) Whole cell voltage clamping on individual cells as in b was carried out as described in Methods. High potassium bath (d). High potassium bath + 200 µM $BaCl_2$ (e). (f) Secretion of neurotransmitter glutamic acid in response to potassium ions in cells after neurogenic differentiation in the presence of NGF (open bars) and after maintenance of undifferentiated cells in standard growth medium (closed bars).

dopaminergic neurons[23], a fraction of these cells assumed a distinct pyramidal morphology (Fig. 3b). Transcript analysis showed expression of the *GIRK2* gene, encoding a member of the G-protein-gated inwardly rectifying potassium (GIRK) channel family, a marker of dopaminergic neurons[24] (Fig. 3c). Voltage clamping of individual cells revealed a barium-sensitive potassium channel consistent with the GIRK2 channel (Fig. 3d,e). Furthermore, after application of another neurogenic induction protocol using NGF, AFS cells acquired the ability to secrete the excitatory neurotransmitter L-glutamate in response to stimulation by potassium ions (Fig. 3f).

The ability to participate in the development of the central nervous system provided another test of neural lineage differentiation of AFS cells. After induction in neurogenic medium, human AFS cells were injected into the lateral cerebral ventricles of the brains of newborn mice, both wild-type and homozygous twitcher (C57BL/6J-Galc^{twi}) mutants, as done previously with neural stem cells[25]. The twitcher mice are deficient in the lysosomal enzyme galactocerebrosidase and undergo extensive neurodegeneration and neurological deterioration, initiating with dysfunction of oligodendrocytes, similar to that seen in the genetic disease Krabbe globoid leukodystrophy[26]. Implantation into the lateral ventricles affords the cells access to the subventricular zone, a secondary germinal zone in the cerebrum that persists throughout life and from which resident neural progenitors readily migrate into and integrate within cerebral parenchyma[7]. The grafted cells dispersed throughout the host mouse brains and survived efficiently for at least 2 months. Within the first month human cells already were present in a variety of brain regions including periventricular areas, the hippocampus and the olfactory bulb, where they integrated seamlessly and appeared morphologically indistinguishable from surrounding murine cells (Fig. 4). Neither deformation of the host brain nor any neoplastic process was evident. The pattern of migration of the transplanted cells was not random; they populated the same areas in all of the engrafted mice. However, the number of engrafted human cells was higher in the brains of the twitcher mutants (~70% of injected cells) than in the wild-type recipients (~30%).

We observed induction of markers characteristic of the hepatocyte lineage (endoderm) in AFS cells cultured for up to 45 d in a multistep system. Proteins expressed by hepatic differentiated AFS cells included albumin, alpha-fetoprotein, hepatocyte nuclear factor 4 (HNF4), hepatocyte growth factor receptor (c-Met) and the multidrug

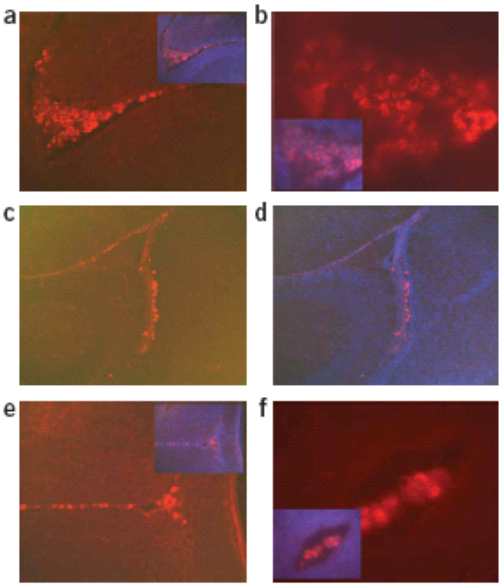


Figure 4 Engraftment of neurogenically differentiated human AFS cells in mouse brain. Differentiation was induced by incubation with NGF and cells were injected into brains of newborn mice as described. Samples shown were obtained 1 month after injection into twitcher mice (wild type and *twi* mutant recipients gave qualitatively similar results). Red staining with antibody to a 65-kDa mitochondrial protein (perinuclear localization) reveals human cells. Blue staining (DAPI: superimposed image in d and insets of a,b,e,f) shows cell nuclei. (a) Lateral ventricle. (b) Higher magnification view of lateral ventricle. (c) Periventricular area and hippocampus. (d) Same field as c, with DAPI staining superimposed. (e) Third ventricle. (f) Olfactory bulb.

© 2006 Nature Publishing Group http://www.nature.com/naturebiotechnology

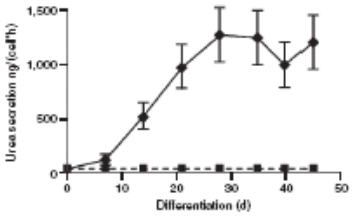


Figure 5 Urea secretion by human AFS cells after hepatogenic *in vitro* differentiation. Urea secretion was assessed from undifferentiated human AFS cells maintained in normal growth medium (rectangles) or after hepatogenic differentiation (diamonds).

resistance membrane transporter MDR1[30]. Furthermore, hepatic lineage cells obtained by differentiation of AFS cells were able to secrete urea, a characteristic liver-specific function (Fig. 5).

Differentiation of AFS cells in osteogenic medium *in vitro* yielded functional osteoblasts (mesoderm), which produced mineralized calcium (Fig. 6a and Supplementary Fig. 3 online). The cells also expressed and secreted alkaline phosphatase, a surface marker of osteoblasts (Supplementary Fig. 3)[27]. As a 'proof of concept' of the utility of AFS cells for tissue engineering, we asked whether the cells could contribute to bone formation *in vivo*. For this purpose we embedded human AFS cells in an alginate/collagen scaffold by thermal inkjet printing[28,29]. Printed cell/scaffold constructs cultured in osteogenic inductive medium for 45 d stained intensely for mineralized calcium with Alizarin red S and showed nodules consistent with bone formation (Supplementary Fig. 3).

For the *in vivo* assessment, printed human AFS cell/scaffold constructs were prepared, incubated for 1 week in osteogenic medium and implanted subcutaneously in immunodeficient mice. An unseeded control scaffold also was implanted in each mouse. After 8 weeks constructs were recovered and analyzed histologically using von Kossa's stain (Fig. 6b,c). Highly mineralized tissue was observed from the implanted cell-seeded scaffolds but not from the implanted unseeded scaffolds. After 18 weeks the generation of hard tissue within the printed constructs was assessed by micro CT scanning of the recipient mice (Fig. 6d–f and Supplementary Video online). At sites of implantation of the scaffolds containing AFS cells, blocks of bone-like material were observed with density somewhat greater than that of mouse femoral bone. Control scaffolds lacking AFS cells did not promote the formation of bony tissue.

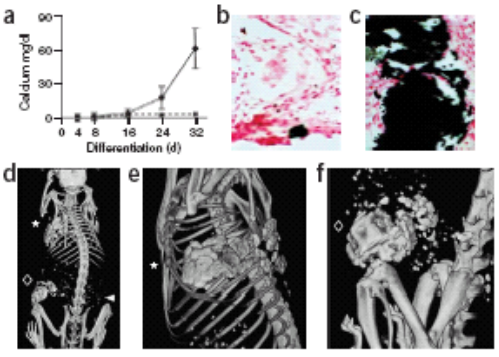


Figure 6 Tissue engineered bone from human AFS cells. (**a**) Calcium deposition of human AFS cells maintained in osteogenic differentiation medium *in vitro* was quantified by measuring calcium-cresolophthalein complex levels (closed line) and compared to that of undifferentiated (broken line) AFS cells. (**b**) Staining by method of von Kossa of control printed, unseeded alginate/collagen scaffold recovered 8 weeks after implantation in *nu/nu* mouse. (**c**) Staining by method of von Kossa of printed scaffold of AFS cells in alginate/collagen scaffold recovered 8 weeks after implantation; black staining indicates strong mineralization. (**d–f**) Micro CT scan of mouse 18 weeks after implantation of printed constructs. ◀ region of implantation of control scaffold without AFS cells; *, ◇ scaffolds seeded with AFS cells. Close-up views of seeded scaffolds indicated by symbols (**e,f**). Movie file of Micro CT scan is available in Supplementary Information (**Supplementary Video**).

DISCUSSION

We have demonstrated that stem cells can be obtained routinely from human amniotic fluid, using backup cells from amniocentesis specimens that would otherwise be discarded. The AFS cells grow easily in culture and appear phenotypically and genetically stable. They are capable of extensive self-renewal, a defining property of stem cells. The absence of senescence and maintenance of long telomeres for over 250 p.d. far exceeds the typical 'Hayflick limit' of about 50 p.d. for many post-embryonic cells, which generally is attributed to the progressive shortening of telomeres[30].

The consistent presence of a Y chromosome in lines derived from cases in which the amniocentesis donor carried a male child implies that AFS cells originate in the developing fetus. The surface marker profile of AFS cells and their expression of the transcription factor Oct4 suggests that they represent an intermediate stage between pluripotent ES cells[12,16,17] and lineage-restricted adult stem cells. Unlike ES cells, AFS cells do not form tumors *in vivo*. A low risk of tumorigenicity would be advantageous for eventual therapeutic applications.

Potential sources of AFS cells in the developing fetus are diverse[31]. CD117 (c-Kit), the surface marker used for immunoselection of AFS cells, plays an important role in gametogenesis, melanogenesis and hematopoiesis[32,33]. This receptor protein is present on human ES cells[34], primordial germ cells and many somatic stem cells, including, but not limited to, those of the neural crest[35,36]. Despite sharing expression of c-Kit, AFS cells appear clearly distinct from ES cells, germline stem cells and certain adult stem cell populations, such as hematopoietic stem cells, on the basis of differences both in a variety of cell surface markers and in gene expression patterns assessed by transcriptional profiling[37]. Thus, the role of AFS cells in ontogeny is not yet clear.

AFS cells can serve as precursors to a broad spectrum of differentiated cell types. We used retroviral marking of AFS cell clones to rigorously assess their multipotent character. Cells from a marked clone were induced to differentiate along six distinct lineages (adipogenic, osteogenic, myogenic, endothelial, neurogenic and hepatic). DNA of the resulting specialized cells contained a unique marker junction fragment between proviral and cellular sequences in the genome. In addition to the markers and cell types documented here, we have demonstrated that human AFS cells of the same clone can be induced to express markers characteristic of cardiac muscle, including cardiac myosin, troponin I and troponin T, and of pancreatic beta-cells, including Pax6, neurogenin D and insulin (data not shown). Human AFS cells can therefore yield differentiated cells corresponding to each of the three embryonic germ layers. The full

© 2006 Nature Publishing Group http://www.nature.com/naturebiotechnology

© 2006 Nature Publishing Group http://www.nature.com/naturebiotechnology

range of adult somatic cells to which AFS cells can give rise remains to be determined.

Most current strategies in cell therapy and tissue engineering use cells obtained from biopsies of patients' tissues. However, for some applications autologous cells from an appropriate tissue cannot be readily obtained or expanded in culture. Stem cell lines that can be propagated easily, maintain genetic stability, and can be induced to differentiate into desired specialized cells may offer an alternative source[38].

AFS cells are able to differentiate along adipogenic, osteogenic, myogenic, endothelial, neurogenic and hepatic pathways. We show the acquisition of lineage-specific functionality by AFS cells differentiated *in vitro* toward neurons, osteoblasts and hepatocytes. For some cell types, acquisition of a full terminally differentiated phenotype is difficult to achieve in culture. The expression of characteristic functions may demand multistage protocols, as exemplified here by the expression of GIRK channels after neurogenic differentiation. Similarly, we observed urea secretion after hepatogenic differentiation. This represents a liver-specific function that requires the coordinated expression of several enzymes and specific mitochondrial amino acid transporters[39].

Another approach is to initiate differentiation *in vitro* and/or to use a regulatory gene to bias lineage-specific differentiation, and then allow cells to complete their development and acquisition of specialized functions *in vivo*. We find that neurogenically induced human AFS cells are capable of migration and integration into the parenchyma of the mouse brain, particularly in the twitcher disease model in which endogenous cells undergo degeneration, creating a 'cellular vacuum'[25]. In this study we did not assess in detail the phenotypes of the implanted human cells. However, the pattern of incorporation and morphologies of cells derived from the AFS cells appeared similar to those obtained previously in the same animal model after implantation of murine neural progenitor and stem-like cells[7]. In that case the donor-derived cells were identified as astrocytes and oligodendrocytes.

We also find that human AFS cells, seeded in a printed scaffold and exposed for one week to osteogenic-inducing medium, can form bone over a period of several months *in vivo* after subcutaneous implantation. After the induction period in culture, the cells expressed several genes characteristic of the osteoblast lineage, as shown by RT-PCR and secreted alkaline phosphatase, but did not yet show extensive deposition of calcium. By 2 months after implantation the constructs had undergone extensive mineralization, and after 4–5 months analysis by micro CT scanning confirmed the production of high-density tissue-engineered bone.

We conclude that AFS cells are pluripotent stem cells capable of giving rise to multiple lineages including representatives of all three embryonic germ layers. AFS cells hold potential for a variety of therapeutic applications. They are obtained from routine clinical amniocentesis specimens. We have isolated similar stem cell populations from prenatal chorionic villus biopsies and from placental biopsies obtained after full-term pregnancies. In the future, banking of these stem cells may provide a convenient source both for autologous therapy in later life and for matching of histocompatible donor cells with recipients.

METHODS

Isolation of AFS cells. Confluent back-up human amniocentesis cultures were received from the clinical cytogenetics laboratory, and cells were harvested by trypsinization and either expanded once or immediately subjected to immunoselection. AFS cells were grown in α-MEM medium (Gibco, Invitrogen) containing 15% ES-FBS, 1% glutamine and 1% penicillin/streptomycin (Gibco), supplemented with 18% Chang B and 2% Chang C (Irvine Scientific) at 37 °C with 5% CO_2 atmosphere. For derivation of the murine AFS cell line for which the antigenic profile is shown (Supplementary Fig. 2), amniotic fluid was collected from a pregnant C57BL/6J mouse at embryonic day 11.5 d under light microscopy using a 30-gauge needle, and the recovered cells were cultured in 24-well dishes. After expansion to confluence (5–7 d), a single-cell suspension was prepared by gentle trypsinization. For immunoselection of c-Kit–positive human or murine cells from single-cell suspensions, the cells were incubated with a rabbit polyclonal antibody to CD117 (c-Kit), specific for the protein's extracellular domain (amino acids 23–322) (Santa Cruz Biotechnology). The CD117-positive cells were purified by incubation with magnetic Goat Anti-Rabbit IgG MicroBeads and selection on a Mini-MACS apparatus (Miltenyi Biotec) following the protocol recommended by the manufacturer. Human cells also were selected with monoclonal anti-CD117 directly conjugated to MicroBeads (Miltenyi Biotec). AFS cells were subcultured routinely at a dilution of 1:4 to 1:8 and not permitted to expand beyond ~70% of confluence. Clonal AFS cell lines were generated by the limiting dilution method in 96-well plates.

Telomere length assay. Determination of the lengths of terminal restriction fragments was carried out using the TeloTAGGG Telomere Length Assay kit (Roche Molecular), according to the manufacturer's protocol.

Absence of tumor formation. Cells of each of four independent human AFS cell lines were injected into the rear leg muscles of 4-week-old male SCID/Beige mice (CB17/Icr.Cg-*Prkdc*^{scid}*Lyst*^{bg}/Crl) (Charles River Laboratories). For each line eight mice were injected with 3–8 × 10^6 cells per animal. Three months after injection the mice were killed and the injected muscles were subjected to histological examination. No tumors were observed.

Retroviral marking. Cells were infected with CMMP-eGFP[40] obtained from the Harvard Gene Therapy Initiative (Harvard Medical School). Cell clones that expressed GFP were obtained by limiting dilution and expanded. Clonality was confirmed by Southern blot analysis with a GFP probe. Genomic DNA was obtained from 1 × 10^7 cells by phenol-chloroform extraction. 10 mg of DNA was digested overnight at 37 °C with *Bam*HI and subjected to electrophoresis for 3 h in a 1% agarose gel. The separated fragments were denatured with alkali, transferred onto membranes (Zeta-Probe GT, Bio-Rad) and incubated with a ^{32}P-labeled GFP DNA probe overnight at 65 °C in Rapid-hyb buffer (Amersham Biosciences). The hybridized blots were washed according to the manufacturer's instructions. Bound probe was visualized by autoradiography.

Differentiation of AFS cells in culture. Cells were induced to differentiate in culture under the conditions described below. RNA was then extracted for RT-PCR analysis to confirm lineage-specific gene expression.

Adipogenic. Cells were seeded at a density of 3,000 cells/cm^2 and were cultured in DMEM low-glucose medium with 10% FBS, antibiotics (Pen/Strep, Gibco/BRL), and adipogenic supplements (1 μM dexamethasone, 1 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, 10 μg/ml insulin, 60 μM indomethacin (Sigma-Aldrich))[41].

Osteogenic. Cells were seeded at a density of 3,000 cells/cm^2 and were cultured in DMEM low-glucose medium with 10% FBS (FBS, Gibco/BRL), Pen/Strep and osteogenic supplements (100 nM dexamethasone, 10 mM beta-glycerophosphate (Sigma-Aldrich), 0.05 mM ascorbic acid-2-phosphate (Wako Chemicals))[41].

Myogenic. Cells were seeded at a density of 3,000 cells/cm^2 on plastic plates precoated with Matrigel (Collaborative Biomedical Products; incubation for 1 h at 37 °C at 1 mg/ml in DMEM) in DMEM low-glucose formulation containing 10% horse serum (Gibco/BRL), 0.5% chick embryo extract (Gibco/BRL) and Pen/Strep[42]. Twelve hours after seeding, 3 μM 5-aza-2′-deoxycytidine (5-azaC; Sigma-Aldrich) was added to the culture medium for 24 h. Incubation then continued in complete medium lacking 5-azaC, with medium changes every 3 d[43].

Endothelial. Cells were seeded at 3,000 cells/cm^2 on plastic plates precoated with gelatin and maintained in culture for 1 month in endothelial cell

medium-2 (EG-M™-2, Clonetics; Cambrex Bioproducts) supplemented with 10% FBS, and Pen/Strep. Recombinant human bFGF (StemCell Technologies) was added at intervals of 2 d at 2 ng/ml.

Neurogenic. Cells were seeded at a concentration of 3,000 cells/cm^2 on tissue culture plastic plates and cultured in DMEM low-glucose medium, Pen/Strep, supplemented with 2% DMSO, 200 μM butylated hydroxyanisole (BHA, Sigma-Aldrich)[44] and NGF (25 ng/ml). After 2 d the cells were returned to AFS growth medium lacking DMSO and BHA but still containing NGF. Fresh NGF was added at intervals of 2 d. For a two-stage induction procedure designed to yield dopaminergic cells, the AFS cells were first seeded on plates coated with fibronectin (1 μg/ml) and incubated in DMEM/F12 medium supplemented with N2 and 10 ng/ml bFGF for 8 d. Fresh bFGF was added every second day. Under these conditions over 80% of cells showed expression of nestin. The cells then were transferred to conditions biasing to production of dopaminergic neurons[23].

Hepatic. Cells were seeded at a density of 5,000 cells/cm^2 on plastic plates coated with Matrigel. They were expanded in AFS growth medium for 3 d to achieve a semi-confluent density. The medium was then changed to DMEM low-glucose formulation containing 15% FBS, 300 μM monothioglycerol (Sigma-Aldrich), 20 ng/ml hepatocyte growth factor (Sigma-Aldrich), 10 ng/ml oncostatin M (Sigma-Aldrich), 10^{-7} M dexamethasone (Sigma-Aldrich), 100 ng/ml FGF4 (Peprotech), 1× ITS (insulin, transferrin, selenium; Roche) and Pen/Strep. The cells were maintained in this differentiation medium for 2 weeks, with medium changes every third day. They were then harvested using trypsin, and plated into a collagen sandwich gel (0.11 mg/cm^2 for both the lower and upper layers)[45,46]. The hepatogenic cultures were maintained for up to 45 total days.

RT-PCR. Analysis of mRNA expression by reverse transcription (RT)-PCR was carried out using standard protocols. Primer sequences, PCR conditions and DNA fragment sizes are available on request. Transcripts encoding the following proteins were assessed for the specified lineages. Osteogenic: runx2, osteocalcin, alkaline phosphatase (AP). Myogenic: MyoD, Mrf4, desmin. Adipogenic: lipoprotein lipase (LPL), peroxisome proliferator activated receptor (Ppary). Endothelial: CD31, vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). Hepatic: albumin. Neurogenic: nestin.

Nestin immunofluorescence. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS and incubated with rabbit antiserum against nestin (Abcam) followed by FITC-labeled anti-rabbit IgG prepared in goats (Vector).

Whole-cell voltage clamp recording for GIRK channel. Cells were induced using the two-stage procedure designed to bias for dopaminergic neurons. Methods for voltage clamp recording from individual cells were similar to those described previously[47]. Coverslips (11 mm) containing cultured neuronal morphology cells derived from human AFS cells were transferred to a Zeiss Axioskop2 microscope with DIC and phase-contrast optics. During recording, cells were perfused with a standard bathing medium (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.5 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM HEPES, pH 7.2, 37 °C). Whole-cell patch clamp electrodes (1- to 2-μm tip diameter, 2–5 MΩ) were pulled from borosilicate glass and filled with intracellular recording solution (100 mM KCH_3SO_3, 40 mM KCl, 0.2 mM EGTA, 0.02 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 2 mM ATP, 300 μM GTP, 10 mM HEPES buffer) for voltage clamp measures. Putative pyramidal neurons were visualized by phase contrast optics at 10–20× and recording electrodes placed next to the target while slight pressure was applied to the pipette contents. Appropriate gigaohm seals were achieved and the cell-attached patch was ruptured and the cells assessed for recording using an AxoClamp 2A amplifier. Voltage clamp recordings and command voltage steps were controlled by a Digidata 1320 controller connected to the AxoClamp. Recordings are analyzed using pClamp software (Axon Instruments). Compensation for junction potentials, series resistance (5-10 MΩ), leakage, and capacitance (10–30 pF) used amplifier controls, as well as subtraction within the pClamp program. After the seal stabilized, the bathing medium was changed to a 'high-K' solution suitable for recording the GIRK inward rectifier potassium channel (44 mM NaCl, 96 mM KCl, 1.5 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM HEPES, 1.0 μM TTX, pH 7.2, 37 °C). After 2 min in the bath, the resting membrane potential rose to approximately –20 mV owing to the increased extracellular potassium. From this baseline, GIRK was evoked using transient (150 ms) hyperpolarizing voltage steps (–10 to –100 mV). After recording the inward currents, barium ($BaCl_2$ 200 μM) was added to the bath to block GIRK-specific inward current. A reduction in the amplitude of currents evoked by the same hyperpolarizing voltage step protocol in the presence of barium indicated the presence of GIRK-mediated potassium current.

L-glutamate secretion. Cells were treated with 50 mM KCl and extracellular L-glutamic acid was measured using the Amplex Red Glutamic Acid/Glutamate Oxidase Assay Kit (Molecular Probes, Invitrogen) following the manufacturer's recommendations.

AFS cell implantation in mouse brain. Human AFS cells were cultured in NGF-containing neurogenic induction medium. Thirteen wild-type CD-1 mice and twenty twitcher mice were transplanted as neonates (P0, P1 or P2) as described[25]. Homozygous twitcher pups were obtained by mating of heterozygous C57BL/6J-Galc^{twi} breeders (initially obtained from Jackson Laboratories). Briefly, cryoanesthetized pups received an intracerebroventricular injection of 5 × 10^4 cells in 2 μl of Hank's Balanced Salt Solution, containing trypan blue to facilitate injection, per ventricle. The lateral ventricles were visualized by transillumination of the head. Pups were returned to maternal care until weaning. Injected mice were sacrificed at intervals up to 2 months after transplantation and perfused with 4% paraformaldehyde. Cryopreserved brain tissue embedded in OCT (TissueTek, Miles) was serially sliced into 20-μm thick sections. Engrafted cells were detected by indirect immunofluorescence using a human-specific monoclonal antibody to a 65-kDa mitochondrial protein (MAB1273; Chemicon). The secondary anti-mouse IgG antibody was conjugated with either Texas Red or rhodamine. Nuclei of all cells were visualized by DAPI staining.

Urea production. Cells were differentiated to the hepatic lineage as described. The cells were incubated with NH_4Cl and ornithine, and a urea nitrogen assay kit (Sigma-Aldrich) was used following the manufacturer's instructions.

Printed scaffolds for bone differentiation. Printing of scaffolds and cells was carried out with an HP DeskJet 550C printer modified as previously described[28,29]. For three-dimensional structures, a *z*-axis module with a controlled elevator chamber was added to the modified printers. AFS cells were suspended in $CaCl_2$ solution at 2–3 × 10^6 cells/ml. Scaffold/cell constructs (rectangular sheet, 8 × 6 × 4 mm) were fabricated by layer-by-layer printing of the AFS cells into an alginate/collagen composite gel. These samples were cultured in osteogenic differentiation medium for 1 week before implantation. Cell-free scaffolds incubated in this medium were prepared as a control.

Implantation of printed bone constructs. Experiments were performed according to ACUC protocols at Wake Forest University Health Sciences. Printed constructs with and without AFS cells were implanted subcutaneously into outbred athymic nude (*nu/nu*) mice (Charles River Laboratories). Three constructs with cells and one control construct lacking cells were implanted per mouse. After 8 weeks some implants were retrieved and analyzed by von Kossa's staining to visualize the mineralized tissues. The printed samples were fixed in 10% formalin and embedded in paraffin. Sections of 5 μm were prepared and stained with 5% $AgNO_3$ and counterstained with nuclear fast red solution. After 18 weeks implanted mice were scanned using a microCT scanner (MicroCAT).

Note: Supplementary information is available on the Nature Biotechnology website.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge support from the Joshua Frase Foundation, Fondazione Citta' della Speranza, the Crown Foundation and the March of Dimes. We are grateful to Paola Dal Cin and Mark Pettenati for access to amniocentesis specimens, Sam Deadwyler and Robert Hampson for electrophysiology, and Daragh Conrad and Heather Mertz for the cover image.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

P.D.C., G.B. and M.M.S., cell isolation and *in vitro* differentiation; T.X. and J.J.Y., *in vivo* bone engineering; C.C.S. and S.S., neuronal differentiation; L.P.,

© 2006 Nature Publishing Group http://www.nature.com/naturebiotechnology

telomere length; G.M. and M.M.S., retroviral marking; A.C.S. and E.Y.S., brain engraftment; S.S. and M.E.F., molecular analysis; A.A., principal investigator.

COMPETING INTERESTS STATEMENT

The authors declare competing financial interests (see the *Nature Biotechnology* website for details).

Published online at http://www.nature.com/naturebiotechnology/
Reprints and permissions information is available online at http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/

1. Priest, R.E., Marimuthu, K.M. & Priest, J.H. Origin of cells in human amniotic fluid cultures: ultrastructural features. *Lab. Invest.* **39**, 106–109 (1978).
2. Polgar, K. *et al.* Characterization of rapidly adhering amniotic fluid cells by combined immunofluorescence and phagocytosis assays. *Am. J. Hum. Genet.* **45**, 786–792 (1989).
3. DeCoppi, P. *et al.* Human fetal stem cell isolation from amniotic fluid. In *American Academy of Pediatrics National Conference*, p. 210–211, (San Francisco, 2001).
4. In 't Anker, P.S. *et al.* Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood* **102**, 1548–1549 (2003).
5. Tsai, M.S., Lee, J.L., Chang, Y.J. & Hwang, S.M. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Hum. Reprod.* **19**, 1450–1456 (2004).
6. Prusa, A.R. *et al.* Neurogenic cells in human amniotic fluid. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **191**, 309–314 (2004).
7. Taylor, R.M. & Snyder, E.Y. Widespread engraftment of neural progenitor and stem-like cells throughout the mouse brain. *Transplant. Proc.* **29**, 845–847 (1997).
8. Zsebo, K.M. *et al.* Stem cell factor is encoded at the Sl locus of the mouse and is the ligand for the c-kit tyrosine kinase receptor. *Cell* **63**, 213–224 (1990).
9. Barry, F.P., Boynton, R.E., Haynesworth, S., Murphy, J.M. & Zaia, J. The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **265**, 134–139 (1999).
10. Barry, F., Boynton, R., Murphy, M., Haynesworth, S. & Zaia, J. The SH-3 and SH-4 antibodies recognize distinct epitopes on CD73 from human mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **289**, 519–524 (2001).
11. Kannagi, R. *et al.* Stage-specific embryonic antigens (SSEA-3 and -4) are epitopes of a unique globo-series ganglioside isolated from human teratocarcinoma cells. *EMBO J.* **2**, 2355–2361 (1983).
12. Thomson, J.A. *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**, 1145–1147 (1998).
13. Carpenter, M.K., Rosler, E. & Rao, M.S. Characterization and differentiation of human embryonic stem cells. *Cloning Stem Cells* **5**, 79–88 (2003).
14. Shamblott, M.J. *et al.* Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 13726–13731 (1998).
15. Pan, G.J., Chang, Z.Y., Scholer, H.R. & Pei, D. Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4. *Cell Res.* **12**, 321–329 (2002).
16. Martin, G.R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 7634–7638 (1981).
17. Evans, M.J. & Kaufman, M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**, 154–156 (1981).
18. Cowan, C.A. *et al.* Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. *N. Engl. J. Med.* **350**, 1353–1356 (2004).
19. Bryan, T.M., Englezou, A., Dunham, M.A. & Reddel, R.R. Telomere length dynamics in telomerase-positive immortal human cell populations. *Exp. Cell Res.* **239**, 370–378 (1998).
20. Siddiqui, M.M. & Atala, A. Amniotic fluid-derived pluripotential cells: adult and fetal. In *Handbook of Stem Cells, Vol. 2.* (eds. R. Lanza et al.) 175–180, (Elsevier Academic Press, Amsterdam, 2004).
21. Wu, X. & Burgess, S.M. Integration target site selection for retroviruses and transposable elements. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**, 2588–2596 (2004).
22. Lendahl, U., Zimmerman, L.B. & McKay, R.D. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* **60**, 585–595 (1990).
23. Perrier, A.L. *et al.* Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 12543–12548 (2004).
24. Liao, Y.J., Jan, Y.N. & Jan, L.Y. Heteromultimerization of G-protein-gated inwardly rectifying K+ channel proteins GIRK1 and GIRK2 and their altered expression in weaver brain. *J. Neurosci.* **16**, 7137–7150 (1996).
25. Taylor, R.M. *et al.* Intrinsic resistance of neural stem cells to toxic metabolites may make them well suited for cell non-autonomous disorders: evidence from a mouse model of Krabbe leukodystrophy. *J. Neurochem.* **97**, 1585–1599 (2006).
26. Suzuki, K. & Suzuki, K. The twitcher mouse: a model for Krabbe disease and for experimental therapies. *Brain Pathol.* **5**, 249–258 (1995).
27. Rodan, G.A. & Noda, M. Gene expression in osteoblastic cells. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **1**, 85–98 (1991).
28. Roth, E.A. *et al.* Inkjet printing for high-throughput cell patterning. *Biomaterials* **25**, 3707–3715 (2004).
29. Xu, T., Jin, J., Gregory, C., Hickman, J.J. & Boland, T. Inkjet printing of viable mammalian cells. *Biomaterials* **26**, 93–99 (2005).
30. Shay, J.W. & Wright, W.E. Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 72–76 (2000).
31. Gosden, C.M. Amniotic fluid cell types and culture. *Br. Med. Bull.* **39**, 348–354 (1983).
32. Chabot, B., Stephenson, D.A., Chapman, V.M., Besmer, P. & Bernstein, A. The proto-oncogene c-kit encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse W locus. *Nature* **335**, 88–89 (1988).
33. Fleischman, R.A. From white spots to stem cells: the role of the Kit receptor in mammalian development. *Trends Genet.* **9**, 285–290 (1993).
34. Hoffman, L.M. & Carpenter, M.K. Characterization and culture of human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* **23**, 699–708 (2005).
35. Guo, C.S., Wehrle-Haller, B., Rossi, J. & Ciment, G. Autocrine regulation of neural crest cell development by steel factor. *Dev. Biol.* **184**, 61–69 (1997).
36. Crane, J.F. & Trainor, P.A. Neural crest stem and progenitor cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **22**, 267–286 (2006).
37. Hipp, J. & Atala, A. GeneChips in regenerative medicine. In *Principles of Regenerative Medicine* (eds. A. Atala, R. Lanza, J.A. Thomson & R.M. Nerem) in press (Elsevier, Philadelphia, 2006).
38. Atala, A. Recent developments in tissue engineering and regenerative medicine. *Curr. Opin. Pediatr.* **18**, 167–171 (2006).
39. Morris, S.M., Jr. Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* **22**, 87–105 (2002).
40. Klein, C., Bueler, H. & Mulligan, R.C. Comparative analysis of genetically modified dendritic cells and tumor cells as therapeutic cancer vaccines. *J. Exp. Med.* **191**, 1699–1708 (2000).
41. Jaiswal, N., Haynesworth, S.E., Caplan, A.I. & Bruder, S.P. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J. Cell. Biochem.* **64**, 295–312 (1997).
42. Ferrari, G. *et al.* Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* **279**, 1528–1530 (1998).
43. Rosenblatt, J.D., Lunt, A.I., Parry, D.J. & Partridge, T.A. Culturing satellite cells from living single muscle fiber explants. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **31**, 773–779 (1995).
44. Hamazaki, T. *et al.* Hepatic maturation in differentiating embryonic stem cells in vitro. *FEBS Lett.* **497**, 15–19 (2001).
45. Schwartz, R.E. *et al.* Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J. Clin. Invest.* **109**, 1291–1302 (2002).
46. Woodbury, D., Schwarz, E.J., Prockop, D.J. & Black, I.B. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J. Neurosci. Res.* **61**, 364–370 (2000).
47. Hampson, R.E., Zhuang, S.Y., Weiner, J.L. & Deadwyler, S.A. Functional significance of cannabinoid-mediated, depolarization-induced suppression of inhibition (DSI) in the hippocampus. *J. Neurophysiol.* **90**, 55–64 (2003).

© 2006 Nature Publishing Group http://www.nature.com/naturebiotechnology

Annexe #2

Notions d'éthique

Art. L. 1241-5 du code de la santé publique

inséré par Loi n° 2004-800 du 6 août 2004 art. 27 Journal Officiel du 7 août 2004.

« Des tissus ou cellules embryonnaires ou foetaux ne peuvent être prélevés, conservés et utilisés à l'issue d'une interruption de grossesse qu'à des fins diagnostiques, thérapeutiques ou scientifiques. La femme ayant subi une interruption de grossesse donne son consentement écrit après avoir reçu une information appropriée sur les finalités d'un tel prélèvement. Cette information doit être postérieure à la décision prise par la femme d'interrompre sa grossesse. Un tel prélèvement ne peut avoir lieu si la femme ayant subi l'interruption de grossesse est mineure ou fait l'objet d'une mesure de protection légale, sauf s'il s'agit de rechercher les causes de l'interruption de grossesse. Dans ce cas, la femme ayant subi cette interruption de grossesse doit avoir reçu auparavant une information sur son droit de s'opposer à un tel prélèvement.

Les tissus et cellules embryonnaires ou foetaux prélevés à l'occasion d'une interruption de grossesse, lorsqu'ils sont conservés en vue d'une utilisation ultérieure, sont soumis aux seules dispositions des articles L. 1211-1, L. 1211-3 à L. 1211-7 et du chapitre III du présent titre.

Les prélèvements à des fins scientifiques autres que ceux ayant pour but de rechercher les causes de l'interruption de grossesse ne peuvent être pratiqués que dans le cadre de protocoles transmis, préalablement à leur mise en oeuvre, à l'Agence de la biomédecine. L'agence communique la liste de ces protocoles, accompagnée le cas échéant de son avis sur ces derniers, au ministre chargé de la recherche. Celui-ci peut suspendre ou interdire la réalisation de ces protocoles, lorsque leur pertinence scientifique ou la nécessité du prélèvement n'est pas établie, ou lorsque le respect des principes éthiques n'est pas assuré. »

Annexe #3

Protocoles

***Composition du milieu d'hibernation**

KCl	30mM
Glucose	5mM
$MgCl_2.6H_2O$	0,24mM
$NaH_2PO_4.\ H_2O$	10.95mM
$Na_2HPO_4.\ 2H_2O$	5mM
Acide lactique	0,18%

Eau pour préparations injectables

Ajuster le pH à 7,2 avec du KOH.

Sorbitol 140mM

Filtrer 2 fois par filtration sur filtres 0,22µm.
Aliquoter.
Stocker à 4°C.

***Composition de la solution d'ATV**

NaCl	8g/l
KCl	0,4g/l
Glucose	1g/l
$NaHCO_3$	0,58g/l
Trypsine	0,5g/l
Tritriplex III (EDTA)	0,2g/l

Qsp H_2O

Filtrer et aliquoter
Stocker à -20°C

***Composition du milieu de culture pour cultures adhérentes (milieu N2)**

Glucose 45% (Sigma, St. Louis, MO ; #G8769)	0,3%
Supplément N2 100X (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA ; #17502-048)	1X
Insuline 2,5mg/ml (Sigma, St. Louis, MO ; #D6421)	20µg/ml
bFGF 10µg/ml (Roche Diagnostics, Nutley, NJ ; #1 123 149)	20ng/ml
L-Glutamine 200mM (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA ; #25030-024)	2mM
Pénicilline 10000UI/ml (Eurobio, Courtaboeuf, France ; #CABPES01-0U)	100UI/ml
Streptomycine 10000µg/ml (Eurobio, Courtaboeuf, France ; #CABPES01-0U)	100µg/ml
Amphotericine B 250µg/ml (Sigma, St. Louis, MO ; #A9528)	0,25µg/ml
Qsp milieu DMEM-F12 (Sigma, St. Louis, MO ; #D6421)	

***Composition du milieu de culture pour neurosphères (milieu NEF)**

B27 Supplement 50X (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA ; #17504-044)	0,25X
Glucose 45% (Sigma, St. Louis, MO ; #G8769)	0,3%
Solution tampon Hépès 1M (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA ; #15630-056)	5mM
Supplément N2 100X (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA ; #17502-048)	1X
Insuline 2,5mg/ml (Sigma, St. Louis, MO ; #D6421)	20µg/ml
EGF 50µg/ml (Sigma, St. Louis, MO ; #E9644)	20ng/ml
bFGF 25µg/ml (Sigma, St. Louis, MO ; #F0291)	20ng/ml
L-Glutamine 200mM (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA ; #25030-024)	2mM
Pénicilline 10000UI/ml (Eurobio, Courtaboeuf, France ; #CABPES01-0U)	100UI/ml
Streptomycine 10000µg/ml (Eurobio, Courtaboeuf, France ; #CABPES01-0U)	100µg/ml
Amphotericine B 250µg/ml (Sigma, St. Louis, MO ; #A9528)	0,25µg/ml
Qsp milieu DMEM-F12 (Sigma, St. Louis, MO ; #D6421)	

***Transfection transitoire au phosphate de calcium**

La transfection au phosphate de calcium se fait en deux temps.

Premièrement, on prépare une solution contenant :

- la quantité d'ADN souhaitée
- de l'eau stérile et
- du chlorure de calcium à 0,25M

Cette solution est incubée 30 minutes à température ambiante avant d'être déposée goutte à goutte dans un volume équivalent d'une solution saline d'Hepes 2X (HBS ; Sigma, St. Louis, MO ; #51558).

Il y a alors formation de précipités qui sont déposés sur les cellules HEK293T en culture.

***Préparation de Moviol**

-Peser 6g de glycérol dans un tube Falcon 50ml

-Ajouter 2,4g de Moviol

-Agiter pour mélanger

-Ajouter 6ml H2O

-Laisser 2 heures à température ambiante

-Ajouter 12ml de Tris 0,2M pH 8,5

-Chauffer 10 min à 50°C en agitant de temps en temps

-Centrifuger 15 min 3000rpm

-Aliquoter par 1ml

-Conserver à –20°C

	25ml	50ml	100ml	150ml
glycérol	6g	12g	24g	36g
moviol	2,4g	4,8g	9,6g	14,4g
eau distillée	6ml	12ml	24ml	36ml
Tris 0,2M	12ml	24ml	48ml	72ml

Références bibliographiques

Abematsu, M., Kagawa, T., Fukuda, S., Inoue, T., Takebayashi, H., Komiya, S., and Taga, T. (2006). Basic fibroblast growth factor endows dorsal telencephalic neural progenitors with the ability to differentiate into oligodendrocytes but not gamma-aminobutyric acidergic neurons. J Neurosci Res *83*, 731-743.

Aboody, K. S., Brown, A., Rainov, N. G., Bower, K. A., Liu, S., Yang, W., Small, J. E., Herrlinger, U., Ourednik, V., Black, P. M., *et al.* (2000). Neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: evidence from intracranial gliomas. Proc Natl Acad Sci U S A *97*, 12846-12851.

Ahmad, I., Zaqouras, P., and Artavanis-Tsakonas, S. (1995). Involvement of Notch-1 in mammalian retinal neurogenesis: association of Notch-1 activity with both immature and terminally differentiated cells. Mech Dev *53*, 73-85.

Alonso, G., and Privat, A. (1993). Reactive astrocytes involved in the formation of lesional scars differ in the mediobasal hypothalamus and in other forebrain regions. J Neurosci Res *34*, 523-538.

Alvarez-Buylla, A., Garcia-Verdugo, J. M., Mateo, A. S., and Merchant-Larios, H. (1998). Primary neural precursors and intermitotic nuclear migration in the ventricular zone of adult canaries. J Neurosci *18*, 1020-1037.

Amit, M., Carpenter, M. K., Inokuma, M. S., Chiu, C. P., Harris, C. P., Waknitz, M. A., Itskovitz-Eldor, J., and Thomson, J. A. (2000). Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. Dev Biol *227*, 271-278.

Anderson, D. J. (1999). Lineages and transcription factors in the specification of vertebrate primary sensory neurons. Curr Opin Neurobiol *9*, 517-524.

Anderson, D. J. (2001). Stem cells and pattern formation in the nervous system: the possible versus the actual. Neuron *30*, 19-35.

Andersson, E., Jensen, J. B., Parmar, M., Guillemot, F., and Bjorklund, A. (2006). Development of the mesencephalic dopaminergic neuron system is compromised in the absence of neurogenin 2. Development *133*, 507-516.

Andressen, C., Stocker, E., Klinz, F. J., Lenka, N., Hescheler, J., Fleischmann, B., Arnhold, S., and Addicks, K. (2001). Nestin-specific green fluorescent protein expression in embryonic stem cell-derived neural precursor cells used for transplantation. Stem Cells *19*, 419-424.

Armstrong, R. J., Watts, C., Svendsen, C. N., Dunnett, S. B., and Rosser, A. E. (2000). Survival, neuronal differentiation, and fiber outgrowth of propagated human neural precursor grafts in an animal model of Huntington's disease. Cell Transplant *9*, 55-64.

Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D., and Lake, R. J. (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. Science *284*, 770-776.

Arvidsson, A., Collin, T., Kirik, D., Kokaia, Z., and Lindvall, O. (2002). Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. Nat Med *8*, 963-970.

Bachoud-Levi, A. C., Gaura, V., Brugieres, P., Lefaucheur, J. P., Boisse, M. F., Maison, P., Baudic, S., Ribeiro, M. J., Bourdet, C., Remy, P., *et al.* (2006). Effect of fetal neural transplants in patients with Huntington's disease 6 years after surgery: a long-term follow-up study. Lancet Neurol *5*, 303-309.

Bachoud-Levi, A. C., Remy, P., Nguyen, J. P., Brugieres, P., Lefaucheur, J. P., Bourdet, C., Baudic, S., Gaura, V., Maison, P., Haddad, B., *et al.* (2000). Motor and cognitive improvements in patients with Huntington's disease after neural transplantation. Lancet *356*, 1975-1979.

Baeyens, L., Bonne, S., German, M. S., Ravassard, P., Heimberg, H., and Bouwens, L. (2006). Ngn3 expression during postnatal in vitro beta cell neogenesis induced by the JAK/STAT pathway. Cell Death Differ *13*, 1892-1899.

Bahloul, C., Jacob, Y., Tordo, N., and Perrin, P. (1998). DNA-based immunization for exploring the enlargement of immunological cross-reactivity against the lyssaviruses. Vaccine *16*, 417-425.

Bailey, K. J., Maslov, A. Y., and Pruitt, S. C. (2004). Accumulation of mutations and somatic selection in aging neural stem/progenitor cells. Aging Cell *3*, 391-397.

Ball, D. W., Azzoli, C. G., Baylin, S. B., Chi, D., Dou, S., Donis-Keller, H., Cumaraswamy, A., Borges, M., and Nelkin, B. D. (1993). Identification of a human achaete-scute homolog highly expressed in neuroendocrine tumors. Proc Natl Acad Sci U S A *90*, 5648-5652.

Bao, S., Wu, Q., McLendon, R. E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A. B., Dewhirst, M. W., Bigner, D. D., and Rich, J. N. (2006). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. Nature *444*, 756-760.

Barberi, T., Klivenyi, P., Calingasan, N. Y., Lee, H., Kawamata, H., Loonam, K., Perrier, A. L., Bruses, J., Rubio, M. E., Topf, N., *et al.* (2003). Neural subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application in parkinsonian mice. Nat Biotechnol *21*, 1200-1207.

Battiste, J., Helms, A. W., Kim, E. J., Savage, T. K., Lagace, D. C., Mandyam, C. D., Eisch, A. J., Miyoshi, G., and Johnson, J. E. (2007). Ascl1 defines sequentially generated lineage-restricted neuronal and oligodendrocyte precursor cells in the spinal cord. Development *134*, 285-293.

Bayer, S. A., and Altman, J. (1991). Neocortical Development, 2nd Ed edn).

Becker, A. J., Mc, C. E., and Till, J. E. (1963). Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. Nature *197*, 452-454.

Berthod, F., and Damour, O. (1997). In vitro reconstructed skin models for wound coverage in deep burns. Br J Dermatol *136*, 809-816.

Besnard, F., Brenner, M., Nakatani, Y., Chao, R., Purohit, H. J., and Freese, E. (1991). Multiple interacting sites regulate astrocyte-specific transcription of the human gene for glial fibrillary acidic protein. J Biol Chem *266*, 18877-18883.

Bjornson, C. R., Rietze, R. L., Reynolds, B. A., Magli, M. C., and Vescovi, A. L. (1999). Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. Science *283*, 534-537.

Blader, P., Lam, C. S., Rastegar, S., Scardigli, R., Nicod, J. C., Simplicio, N., Plessy, C., Fischer, N., Schuurmans, C., Guillemot, F., and Strahle, U. (2004). Conserved and acquired features of neurogenin1 regulation. Development *131*, 5627-5637.

Bland, S. T., Schmid, M. J., Greenwood, B. N., Watkins, L. R., and Maier, S. F. (2006). Behavioral control of the stressor modulates stress-induced changes in neurogenesis and fibroblast growth factor-2. Neuroreport *17*, 593-597.

Breslin, M. B., Wang, H. W., Pierce, A., Aucoin, R., and Lan, M. S. (2007). Neurogenin 3 recruits CBP co-activator to facilitate histone H3/H4 acetylation in the target gene INSM1. FEBS Lett *581*, 949-954.

Broxmeyer, H. E., Hangoc, G., Cooper, S., Ribeiro, R. C., Graves, V., Yoder, M., Wagner, J., Vadhan-Raj, S., Benninger, L., Rubinstein, P., and et al. (1992). Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood and estimation of its potential for transplantation in adults. Proc Natl Acad Sci U S A *89*, 4109-4113.

Brun, S., Faucon-Biguet, N., and Mallet, J. (2003). Optimization of transgene expression at the posttranscriptional level in neural cells: implications for gene therapy. Mol Ther *7*, 782-789.

Brundin, P. (1992). Dissection, preparation and implantation of human embryonic brain tissue. In Neural Transplantation, a Practical Approach, S. D. a. A. Bjorklund, ed. (Oxford, IRL Press), pp. 139-160.

Brustle, O., Choudhary, K., Karram, K., Huttner, A., Murray, K., Dubois-Dalcq, M., and McKay, R. D. (1998). Chimeric brains generated by intraventricular transplantation of fetal human brain cells into embryonic rats. Nat Biotechnol *16*, 1040-1044.

Brustle, O., Jones, K. N., Learish, R. D., Karram, K., Choudhary, K., Wiestler, O. D., Duncan, I. D., and McKay, R. D. (1999). Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. Science *285*, 754-756.

Buc-Caron, M. H. (1995). Neuroepithelial progenitor cells explanted from human fetal brain proliferate and differentiate in vitro. Neurobiol Dis *2*, 37-47.

Buchet, D., Buc-Caron, M. H., Sabate, O., Lachapelle, F., and Mallet, J. (2002a). Long-term fate of human telencephalic progenitor cells grafted into the adult mouse brain: effects of previous amplification in vitro. J Neurosci Res *68*, 276-283.

Buchet, D., Serguera, C., Zennou, V., Charneau, P., and Mallet, J. (2002b). Long-term expression of beta-glucuronidase by genetically modified human neural progenitor cells grafted into the mouse central nervous system. Mol Cell Neurosci *19*, 389-401.

Cai, J., Wu, Y., Mirua, T., Pierce, J. L., Lucero, M. T., Albertine, K. H., Spangrude, G. J., and Rao, M. S. (2002). Properties of a fetal multipotent neural stem cell (NEP cell). Dev Biol *251*, 221-240.

Cai, L., Morrow, E. M., and Cepko, C. L. (2000). Misexpression of basic helix-loop-helix genes in the murine cerebral cortex affects cell fate choices and neuronal survival. Development *127*, 3021-3030.

Caldwell, M. A., He, X., Wilkie, N., Pollack, S., Marshall, G., Wafford, K. A., and Svendsen, C. N. (2001). Growth factors regulate the survival and fate of cells derived from human neurospheres. Nat Biotechnol *19*, 475-479.

Cao, F., Hata, R., Zhu, P., Ma, Y. J., Tanaka, J., Hanakawa, Y., Hashimoto, K., Niinobe, M., Yoshikawa, K., and Sakanaka, M. (2006). Overexpression of SOCS3 inhibits astrogliogenesis and promotes maintenance of neural stem cells. J Neurochem *98*, 459-470.

Capela, A., and Temple, S. (2002). LeX/ssea-1 is expressed by adult mouse CNS stem cells, identifying them as nonependymal. Neuron *35*, 865-875.

Carpenter, M. K., Cui, X., Hu, Z. Y., Jackson, J., Sherman, S., Seiger, A., and Wahlberg, L. U. (1999). In vitro expansion of a multipotent population of human neural progenitor cells. Exp Neurol *158*, 265-278.

Casarosa, S., Fode, C., and Guillemot, F. (1999). Mash1 regulates neurogenesis in the ventral telencephalon. Development *126*, 525-534.

Castaing, M., Guerci, A., Mallet, J., Czernichow, P., Ravassard, P., and Scharfmann, R. (2005). Efficient restricted gene expression in beta cells by lentivirus-mediated gene transfer into pancreatic stem/progenitor cells. Diabetologia *48*, 709-719.

Cattaneo, E., and McKay, R. (1990). Proliferation and differentiation of neuronal stem cells regulated by nerve growth factor. Nature *347*, 762-765.

Cau, E., Casarosa, S., and Guillemot, F. (2002). Mash1 and Ngn1 control distinct steps of determination and differentiation in the olfactory sensory neuron lineage. Development *129*, 1871-1880.

Cau, E., Gradwohl, G., Fode, C., and Guillemot, F. (1997). Mash1 activates a cascade of bHLH regulators in olfactory neuron progenitors. Development *124*, 1611-1621.

Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., and Prasher, D. C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science *263*, 802-805.

Chambers, C. B., Peng, Y., Nguyen, H., Gaiano, N., Fishell, G., and Nye, J. S. (2001). Spatiotemporal selectivity of response to Notch1 signals in mammalian forebrain precursors. Development *128*, 689-702.

Chandran, S., Kato, H., Gerreli, D., Compston, A., Svendsen, C. N., and Allen, N. D. (2003). FGF-dependent generation of oligodendrocytes by a hedgehog-independent pathway. Development *130*, 6599-6609.

Chapouton, P., Schuurmans, C., Guillemot, F., and Gotz, M. (2001). The transcription factor neurogenin 2 restricts cell migration from the cortex to the striatum. Development *128*, 5149-5159.

Chassot, A. A., Turchi, L., Virolle, T., Fitsialos, G., Batoz, M., Deckert, M., Dulic, V., Meneguzzi, G., Busca, R., and Ponzio, G. (2007). Id3 is a novel regulator of p27(kip1) mRNA in early G1 phase and is required for cell-cycle progression. Oncogene.

Chenn, A., and Walsh, C. A. (2002). Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors. Science *297*, 365-369.

Chien, C. T., Hsiao, C. D., Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (1996). Neuronal type information encoded in the basic-helix-loop-helix domain of proneural genes. Proc Natl Acad Sci U S A *93*, 13239-13244.

Chu, K., Kim, M., Chae, S. H., Jeong, S. W., Kang, K. S., Jung, K. H., Kim, J., Kim, Y. J., Kang, L., Kim, S. U., and Yoon, B. W. (2004a). Distribution and in situ proliferation patterns of intravenously injected immortalized human neural stem-like cells in rats with focal cerebral ischemia. Neurosci Res *50*, 459-465.

Chu, K., Kim, M., Jung, K. H., Jeon, D., Lee, S. T., Kim, J., Jeong, S. W., Kim, S. U., Lee, S. K., Shin, H. S., and Roh, J. K. (2004b). Human neural stem cell transplantation reduces spontaneous recurrent seizures following pilocarpine-induced status epilepticus in adult rats. Brain Res *1023*, 213-221.

Chu, K., Kim, M., Park, K. I., Jeong, S. W., Park, H. K., Jung, K. H., Lee, S. T., Kang, L., Lee, K., Park, D. K., *et al.* (2004c). Human neural stem cells improve sensorimotor deficits in the adult rat brain with experimental focal ischemia. Brain Res *1016*, 145-153.

Clarke, D. L., Johansson, C. B., Wilbertz, J., Veress, B., Nilsson, E., Karlstrom, H., Lendahl, U., and Frisen, J. (2000). Generalized potential of adult neural stem cells. Science *288*, 1660-1663.

Corti, O., Sabate, O., Horellou, P., Colin, P., Dumas, S., Buchet, D., Buc-Caron, M. H., and Mallet, J. (1999). A single adenovirus vector mediates doxycycline-controlled expression of tyrosine hydroxylase in brain grafts of human neural progenitors. Nat Biotechnol *17*, 349-354.

Cossu, G., Cicinelli, P., Fieri, C., Coletta, M., and Molinaro, M. (1985). Emergence of TPA-resistant 'satellite' cells during muscle histogenesis of human limb. Exp Cell Res *160*, 403-411.

Cummings, B. J., Uchida, N., Tamaki, S. J., Salazar, D. L., Hooshmand, M., Summers, R., Gage, F. H., and Anderson, A. J. (2005). Human neural stem cells differentiate and promote locomotor recovery in spinal cord-injured mice. Proc Natl Acad Sci U S A *102*, 14069-14074.

Danesin, C., Agius, E., Escalas, N., Ai, X., Emerson, C., Cochard, P., and Soula, C. (2006). Ventral neural progenitors switch toward an oligodendroglial fate in response to increased Sonic hedgehog (Shh) activity: involvement of Sulfatase 1 in modulating Shh signaling in the ventral spinal cord. J Neurosci *26*, 5037-5048.

Davis, A. A., and Temple, S. (1994). A self-renewing multipotential stem cell in embryonic rat cerebral cortex. Nature *372*, 263-266.

Davis, R. L., and Turner, D. L. (2001). Vertebrate hairy and Enhancer of split related proteins: transcriptional repressors regulating cellular differentiation and embryonic patterning. Oncogene *20*, 8342-8357.

De Coppi, P., Bartsch, G., Jr., Siddiqui, M. M., Xu, T., Santos, C. C., Perin, L., Mostoslavsky, G., Serre, A. C., Snyder, E. Y., Yoo, J. J., *et al.* (2007). Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. Nat Biotechnol *25*, 100-106.

de la Pompa, J. L., Wakeham, A., Correia, K. M., Samper, E., Brown, S., Aguilera, R. J., Nakano, T., Honjo, T., Mak, T. W., Rossant, J., and Conlon, R. A. (1997). Conservation of the Notch signalling pathway in mammalian neurogenesis. Development *124*, 1139-1148.

Doetsch, F., Caille, I., Lim, D. A., Garcia-Verdugo, J. M., and Alvarez-Buylla, A. (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. Cell *97*, 703-716.

Donello, J. E., Loeb, J. E., and Hope, T. J. (1998). Woodchuck hepatitis virus contains a tripartite posttranscriptional regulatory element. J Virol *72*, 5085-5092.

Dromard, C., Bartolami, S., Deleyrolle, L., Takebayashi, H., Ripoll, C., Simonneau, L., Prome, S., Puech, S., Tran, V. B., Duperray, C., *et al.* (2007). NG2 and Olig2 expression provides evidence for phenotypic deregulation of cultured central nervous system and peripheral nervous system neural precursor cells. Stem Cells *25*, 340-353.

Duan, W. M., Widner, H., Cameron, R. M., and Brundin, P. (1998). Quinolinic acid-induced inflammation in the striatum does not impair the survival of neural allografts in the rat. Eur J Neurosci *10*, 2595-2606.

Dubreuil, V., Hirsch, M. R., Jouve, C., Brunet, J. F., and Goridis, C. (2002). The role of Phox2b in synchronizing pan-neuronal and type-specific aspects of neurogenesis. Development *129*, 5241-5253.

Dunnett, S. B., and Bjorklund, A. (1999). Prospects for new restorative and neuroprotective treatments in Parkinson's disease. Nature *399*, A32-39.

Ellenberger, T., Fass, D., Arnaud, M., and Harrison, S. C. (1994). Crystal structure of transcription factor E47: E-box recognition by a basic region helix-loop-helix dimer. Genes Dev *8*, 970-980.

Eng, L. F., Ghirnikar, R. S., and Lee, Y. L. (2000). Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). Neurochem Res *25*, 1439-1451.

Englund, U., Bjorklund, A., Wictorin, K., Lindvall, O., and Kokaia, M. (2002). Grafted neural stem cells develop into functional pyramidal neurons and integrate into host cortical circuitry. Proc Natl Acad Sci U S A *99*, 17089-17094.

Englund, U., Ericson, C., Rosenblad, C., Mandel, R. J., Trono, D., Wictorin, K., and Lundberg, C. (2000). The use of a recombinant lentiviral vector for ex vivo gene transfer into the rat CNS. Neuroreport *11*, 3973-3977.

Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A. M., Nordborg, C., Peterson, D. A., and Gage, F. H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. Nat Med *4*, 1313-1317.

Falk, A., Holmstrom, N., Carlen, M., Cassidy, R., Lundberg, C., and Frisen, J. (2002). Gene delivery to adult neural stem cells. Exp Cell Res *279*, 34-39.

Farah, M. H., Olson, J. M., Sucic, H. B., Hume, R. I., Tapscott, S. J., and Turner, D. L. (2000). Generation of neurons by transient expression of neural bHLH proteins in mammalian cells. Development *127*, 693-702.

Feinberg, A. P., Ohlsson, R., and Henikoff, S. (2006). The epigenetic progenitor origin of human cancer. Nat Rev Genet *7*, 21-33.

Flax, J. D., Aurora, S., Yang, C., Simonin, C., Wills, A. M., Billinghurst, L. L., Jendoubi, M., Sidman, R. L., Wolfe, J. H., Kim, S. U., and Snyder, E. Y. (1998). Engraftable human neural stem cells respond to developmental cues, replace neurons, and express foreign genes. Nat Biotechnol *16*, 1033-1039.

Fode, C., Gradwohl, G., Morin, X., Dierich, A., LeMeur, M., Goridis, C., and Guillemot, F. (1998). The bHLH protein NEUROGENIN 2 is a determination factor for epibranchial placode-derived sensory neurons. Neuron *20*, 483-494.

Fode, C., Ma, Q., Casarosa, S., Ang, S. L., Anderson, D. J., and Guillemot, F. (2000). A role for neural determination genes in specifying the dorsoventral identity of telencephalic neurons. Genes Dev *14*, 67-80.

Fortini, M. E., and Artavanis-Tsakonas, S. (1994). The suppressor of hairless protein participates in notch receptor signaling. Cell *79*, 273-282.

Fricker, R. A., Carpenter, M. K., Winkler, C., Greco, C., Gates, M. A., and Bjorklund, A. (1999). Site-specific migration and neuronal differentiation of human neural progenitor cells after transplantation in the adult rat brain. J Neurosci *19*, 5990-6005.

Fuchs, E., and Segre, J. A. (2000). Stem cells: a new lease on life. Cell *100*, 143-155.

Gabay, L., Lowell, S., Rubin, L. L., and Anderson, D. J. (2003). Deregulation of dorsoventral patterning by FGF confers trilineage differentiation capacity on CNS stem cells in vitro. Neuron *40*, 485-499.

Galli, R., Borello, U., Gritti, A., Minasi, M. G., Bjornson, C., Coletta, M., Mora, M., De Angelis, M. G., Fiocco, R., Cossu, G., and Vescovi, A. L. (2000a). Skeletal myogenic potential of human and mouse neural stem cells. Nat Neurosci *3*, 986-991.

Galli, R., Pagano, S. F., Gritti, A., and Vescovi, A. L. (2000b). Regulation of neuronal differentiation in human CNS stem cell progeny by leukemia inhibitory factor. Dev Neurosci *22*, 86-95.

Ganat, Y., Soni, S., Chacon, M., Schwartz, M. L., and Vaccarino, F. M. (2002). Chronic hypoxia up-regulates fibroblast growth factor ligands in the perinatal brain and induces fibroblast growth factor-responsive radial glial cells in the sub-ependymal zone. Neuroscience *112*, 977-991.

Garcia-Bellido, A. (1979). Genetic analysis of the achaete-scute system of Drosophila melanogaster. Genetics *91*, 491-520.

Ge, W., He, F., Kim, K. J., Blanchi, B., Coskun, V., Nguyen, L., Wu, X., Zhao, J., Heng, J. I., Martinowich, K., *et al.* (2006). Coupling of cell migration with neurogenesis by proneural bHLH factors. Proc Natl Acad Sci U S A *103*, 1319-1324.

Geloso, M. C., Giannetti, S., Cenciarelli, C., Budoni, M., Casalbore, P., Maira, G., and Michetti, F. (2007). Transplantation of Foetal Neural Stem Cells into the Rat Hippocampus During Trimethyltin-Induced Neurodegeneration. Neurochem Res.

Gensburger, C., Labourdette, G., and Sensenbrenner, M. (1987). Brain basic fibroblast growth factor stimulates the proliferation of rat neuronal precursor cells in vitro. FEBS Lett *217*, 1-5.

Gonzalez, F., Romani, S., Cubas, P., Modolell, J., and Campuzano, S. (1989). Molecular analysis of the asense gene, a member of the achaete-scute complex of Drosophila melanogaster, and its novel role in optic lobe development. Embo J *8*, 3553-3562.

Gradwohl, G., Fode, C., and Guillemot, F. (1996). Restricted expression of a novel murine atonal-related bHLH protein in undifferentiated neural precursors. Dev Biol *180*, 227-241.

Guillemot, F. (1999). Vertebrate bHLH genes and the determination of neuronal fates. Exp Cell Res *253*, 357-364.

Guillemot, F., and Joyner, A. L. (1993). Dynamic expression of the murine Achaete-Scute homologue Mash-1 in the developing nervous system. Mech Dev *42*, 171-185.

Hack, M. A., Sugimori, M., Lundberg, C., Nakafuku, M., and Gotz, M. (2004). Regionalization and fate specification in neurospheres: the role of Olig2 and Pax6. Mol Cell Neurosci *25*, 664-678.

Han, S. S., Kang, D. Y., Mujtaba, T., Rao, M. S., and Fischer, I. (2002). Grafted lineage-restricted precursors differentiate exclusively into neurons in the adult spinal cord. Exp Neurol *177*, 360-375.

Hayman, M. W., Christie, V. B., Keating, T. S., and Przyborski, S. A. (2006). Following the differentiation of human pluripotent stem cells by proteomic identification of biomarkers. Stem Cells Dev *15*, 221-231.

Hioki, H., Kameda, H., Nakamura, H., Okunomiya, T., Ohira, K., Nakamura, K., Kuroda, M., Furuta, T., and Kaneko, T. (2007). Efficient gene transduction of neurons by lentivirus with enhanced neuron-specific promoters. Gene Ther.

Hofstetter, C. P., Holmstrom, N. A., Lilja, J. A., Schweinhardt, P., Hao, J., Spenger, C., Wiesenfeld-Hallin, Z., Kurpad, S. N., Frisen, J., and Olson, L. (2005). Allodynia limits the usefulness of intraspinal neural stem cell grafts; directed differentiation improves outcome. Nat Neurosci *8*, 346-353.

Hojo, M., Ohtsuka, T., Hashimoto, N., Gradwohl, G., Guillemot, F., and Kageyama, R. (2000). Glial cell fate specification modulated by the bHLH gene Hes5 in mouse retina. Development *127*, 2515-2522.

Holmin, S., von Gertten, C., Sandberg-Nordqvist, A. C., Lendahl, U., and Mathiesen, T. (2001). Induction of astrocytic nestin expression by depolarization in rats. Neurosci Lett *314*, 151-155.

Horton, S., Meredith, A., Richardson, J. A., and Johnson, J. E. (1999). Correct coordination of neuronal differentiation events in ventral forebrain requires the bHLH factor MASH1. Mol Cell Neurosci *14*, 355-369.

Huber, G., and Matus, A. (1984a). Differences in the cellular distributions of two microtubule-associated proteins, MAP1 and MAP2, in rat brain. J Neurosci *4*, 151-160.

Huber, G., and Matus, A. (1984b). Immunocytochemical localization of microtubule-associated protein 1 in rat cerebellum using monoclonal antibodies. J Cell Biol *98*, 777-781.

In 't Anker, P. S., Scherjon, S. A., Kleijburg-van der Keur, C., Noort, W. A., Claas, F. H., Willemze, R., Fibbe, W. E., and Kanhai, H. H. (2003). Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. Blood *102*, 1548-1549.

Ishibashi, M., Ang, S. L., Shiota, K., Nakanishi, S., Kageyama, R., and Guillemot, F. (1995). Targeted disruption of mammalian hairy and Enhancer of split homolog-1 (HES-1) leads to up-regulation of neural helix-loop-helix factors, premature neurogenesis, and severe neural tube defects. Genes Dev *9*, 3136-3148.

Israsena, N., Hu, M., Fu, W., Kan, L., and Kessler, J. A. (2004). The presence of FGF2 signaling determines whether beta-catenin exerts effects on proliferation or neuronal differentiation of neural stem cells. Dev Biol *268*, 220-231.

Itskovitz-Eldor, J., Schuldiner, M., Karsenti, D., Eden, A., Yanuka, O., Amit, M., Soreq, H., and Benvenisty, N. (2000). Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. Mol Med *6*, 88-95.

Iwanami, A., Kaneko, S., Nakamura, M., Kanemura, Y., Mori, H., Kobayashi, S., Yamasaki, M., Momoshima, S., Ishii, H., Ando, K.*, et al.* (2005). Transplantation of human neural stem cells for spinal cord injury in primates. J Neurosci Res *80*, 182-190.

Jabs, R., Pivneva, T., Huttmann, K., Wyczynski, A., Nolte, C., Kettenmann, H., and Steinhauser, C. (2005). Synaptic transmission onto hippocampal glial cells with hGFAP promoter activity. J Cell Sci *118*, 3791-3803.

Jackson-Grusby, L., Beard, C., Possemato, R., Tudor, M., Fambrough, D., Csankovszki, G., Dausman, J., Lee, P., Wilson, C., Lander, E., and Jaenisch, R. (2001). Loss of genomic methylation causes p53-dependent apoptosis and epigenetic deregulation. Nat Genet *27*, 31-39.

Jain, M., Armstrong, R. J., Tyers, P., Barker, R. A., and Rosser, A. E. (2003). GABAergic immunoreactivity is predominant in neurons derived from expanded human neural precursor cells in vitro. Exp Neurol *182*, 113-123.

Jakobsson, J., Ericson, C., Jansson, M., Bjork, E., and Lundberg, C. (2003). Targeted transgene expression in rat brain using lentiviral vectors. J Neurosci Res *73*, 876-885.

Jan, Y. N., and Jan, L. Y. (1994). Genetic control of cell fate specification in Drosophila peripheral nervous system. Annu Rev Genet *28*, 373-393.

Jarman, A. P., Grau, Y., Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (1993). atonal is a proneural gene that directs chordotonal organ formation in the Drosophila peripheral nervous system. Cell *73*, 1307-1321.

Jen, Y., Manova, K., and Benezra, R. (1997). Each member of the Id gene family exhibits a unique expression pattern in mouse gastrulation and neurogenesis. Dev Dyn *208*, 92-106.

Jimenez, F., and Modolell, J. (1993). Neural fate specification in Drosophila. Curr Opin Genet Dev *3*, 626-632.

Johansson, K. A., Dursun, U., Jordan, N., Gu, G., Beermann, F., Gradwohl, G., and Grapin-Botton, A. (2007). Temporal control of neurogenin3 activity in pancreas progenitors reveals competence windows for the generation of different endocrine cell types. Dev Cell *12*, 457-465.

Johe, K. K., Hazel, T. G., Muller, T., Dugich-Djordjevic, M. M., and McKay, R. D. (1996). Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system. Genes Dev *10*, 3129-3140.

John, A., Wildner, H., and Britsch, S. (2005). The homeodomain transcription factor Gbx1 identifies a subpopulation of late-born GABAergic interneurons in the developing dorsal spinal cord. Dev Dyn *234*, 767-771.

Johnson, J. E., Birren, S. J., and Anderson, D. J. (1990). Two rat homologues of Drosophila achaete-scute specifically expressed in neuronal precursors. Nature *346*, 858-861.

Johnson, J. E., Birren, S. J., Saito, T., and Anderson, D. J. (1992). DNA binding and transcriptional regulatory activity of mammalian achaete-scute homologous (MASH) proteins revealed by interaction with a muscle-specific enhancer. Proc Natl Acad Sci U S A *89*, 3596-3600.

Kageyama, R., and Nakanishi, S. (1997). Helix-loop-helix factors in growth and differentiation of the vertebrate nervous system. Curr Opin Genet Dev *7*, 659-665.

Kalyani, A. J., Piper, D., Mujtaba, T., Lucero, M. T., and Rao, M. S. (1998). Spinal cord neuronal precursors generate multiple neuronal phenotypes in culture. J Neurosci *18*, 7856-7868.

Kaneko, Y., Sakakibara, S., Imai, T., Suzuki, A., Nakamura, Y., Sawamoto, K., Ogawa, Y., Toyama, Y., Miyata, T., and Okano, H. (2000). Musashi1: an evolutionally conserved marker for CNS progenitor cells including neural stem cells. Dev Neurosci *22*, 139-153.

Kele, J., Simplicio, N., Ferri, A. L., Mira, H., Guillemot, F., Arenas, E., and Ang, S. L. (2006). Neurogenin 2 is required for the development of ventral midbrain dopaminergic neurons. Development *133*, 495-505.

Kelly, S., Bliss, T. M., Shah, A. K., Sun, G. H., Ma, M., Foo, W. C., Masel, J., Yenari, M. A., Weissman, I. L., Uchida, N., *et al.* (2004). Transplanted human fetal neural stem cells survive, migrate, and differentiate in ischemic rat cerebral cortex. Proc Natl Acad Sci U S A *101*, 11839-11844.

Keyoung, H. M., Roy, N. S., Benraiss, A., Louissaint, A., Jr., Suzuki, A., Hashimoto, M., Rashbaum, W. K., Okano, H., and Goldman, S. A. (2001). High-yield selection and extraction of two promoter-defined phenotypes of neural stem cells from the fetal human brain. Nat Biotechnol *19*, 843-850.

Kim, H. J., Sugimori, M., Nakafuku, M., and Svendsen, C. N. (2007). Control of neurogenesis and tyrosine hydroxylase expression in neural progenitor cells through bHLH proteins and Nurr1. Exp Neurol *203*, 394-405.

Kim, J. H., Auerbach, J. M., Rodriguez-Gomez, J. A., Velasco, I., Gavin, D., Lumelsky, N., Lee, S. H., Nguyen, J., Sanchez-Pernaute, R., Bankiewicz, K., and McKay, R. (2002). Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. Nature *418*, 50-56.

Kim, J. Y., Koh, H. C., Lee, J. Y., Chang, M. Y., Kim, Y. C., Chung, H. Y., Son, H., Lee, Y. S., Studer, L., McKay, R., and Lee, S. H. (2003a). Dopaminergic neuronal differentiation from rat embryonic neural precursors by Nurr1 overexpression. J Neurochem *85*, 1443-1454.

Kim, N. W., Piatyszek, M. A., Prowse, K. R., Harley, C. B., West, M. D., Ho, P. L., Coviello, G. M., Wright, W. E., Weinrich, S. L., and Shay, J. W. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. Science *266*, 2011-2015.

Kim, S., Yoon, Y. S., Kim, J. W., Jung, M., Kim, S. U., Lee, Y. D., and Suh-Kim, H. (2004). Neurogenin1 is sufficient to induce neuronal differentiation of embryonal carcinoma P19 cells in the absence of retinoic acid. Cell Mol Neurobiol *24*, 343-356.

Kim, T. E., Lee, H. S., Lee, Y. B., Hong, S. H., Lee, Y. S., Ichinose, H., Kim, S. U., and Lee, M. A. (2003b). Sonic hedgehog and FGF8 collaborate to induce dopaminergic phenotypes in the Nurr1-overexpressing neural stem cell. Biochem Biophys Res Commun *305*, 1040-1048.

Kirschenbaum, B., Nedergaard, M., Preuss, A., Barami, K., Fraser, R. A., and Goldman, S. A. (1994). In vitro neuronal production and differentiation by precursor cells derived from the adult human forebrain. Cereb Cortex *4*, 576-589.

Kondo, T., and Raff, M. (2000). Basic helix-loop-helix proteins and the timing of oligodendrocyte differentiation. Development *127*, 2989-2998.

Kugler, S., Kilic, E., and Bahr, M. (2003). Human synapsin 1 gene promoter confers highly neuron-specific long-term transgene expression from an adenoviral vector in the adult rat brain depending on the transduced area. Gene Ther *10*, 337-347.

Kugler, S., Meyn, L., Holzmuller, H., Gerhardt, E., Isenmann, S., Schulz, J. B., and Bahr, M. (2001). Neuron-specific expression of therapeutic proteins: evaluation of different cellular promoters in recombinant adenoviral vectors. Mol Cell Neurosci *17*, 78-96.

Kuznetsov, S. A., Mankani, M. H., Gronthos, S., Satomura, K., Bianco, P., and Robey, P. G. (2001). Circulating skeletal stem cells. J Cell Biol *153*, 1133-1140.

Laywell, E. D., Rakic, P., Kukekov, V. G., Holland, E. C., and Steindler, D. A. (2000). Identification of a multipotent astrocytic stem cell in the immature and adult mouse brain. Proc Natl Acad Sci U S A *97*, 13883-13888.

Le Belle, J. E., and Svendsen, C. N. (2002). Stem cells for neurodegenerative disorders: where can we go from here? BioDrugs *16*, 389-401.

Lee, J., Wu, Y., Qi, Y., Xue, H., Liu, Y., Scheel, D., German, M., Qiu, M., Guillemot, F., Rao, M., and Gradwohl, G. (2003). Neurogenin3 participates in gliogenesis in the developing vertebrate spinal cord. Dev Biol *253*, 84-98.

Lee, J. E. (1997). Basic helix-loop-helix genes in neural development. Curr Opin Neurobiol *7*, 13-20.

Lee, S. H., Lumelsky, N., Studer, L., Auerbach, J. M., and McKay, R. D. (2000). Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. Nat Biotechnol *18*, 675-679.

Lee, S. K., and Pfaff, S. L. (2003). Synchronization of neurogenesis and motor neuron specification by direct coupling of bHLH and homeodomain transcription factors. Neuron *38*, 731-745.

Lee, S. T., Chu, K., Park, J. E., Lee, K., Kang, L., Kim, S. U., and Kim, M. (2005). Intravenous administration of human neural stem cells induces functional recovery in Huntington's disease rat model. Neurosci Res *52*, 243-249.

Lepore, A. C., Han, S. S., Tyler-Polsz, C. J., Cai, J., Rao, M. S., and Fischer, I. (2004). Differential fate of multipotent and lineage-restricted neural precursors following transplantation into the adult CNS. Neuron Glia Biol *1*, 113-126.

Li, B., and DiCicco-Bloom, E. (2004). Basic fibroblast growth factor exhibits dual and rapid regulation of cyclin D1 and p27 to stimulate proliferation of rat cerebral cortical precursors. Dev Neurosci *26*, 197-207.

Li, C. F., and Hughes-Fulford, M. (2006). Fibroblast growth factor-2 is an immediate-early gene induced by mechanical stress in osteogenic cells. J Bone Miner Res *21*, 946-955.

Li, M., Pevny, L., Lovell-Badge, R., and Smith, A. (1998). Generation of purified neural precursors from embryonic stem cells by lineage selection. Curr Biol *8*, 971-974.

Li, S., Tokuyama, T., Yamamoto, J., Koide, M., Yokota, N., and Namba, H. (2005). Bystander effect-mediated gene therapy of gliomas using genetically engineered neural stem cells. Cancer Gene Ther *12*, 600-607.

Liker, M. A., Petzinger, G. M., Nixon, K., McNeill, T., and Jakowec, M. W. (2003). Human neural stem cell transplantation in the MPTP-lesioned mouse. Brain Res *971*, 168-177.

Lindvall, O., Rehncrona, S., Brundin, P., Gustavii, B., Astedt, B., Widner, H., Lindholm, T., Bjorklund, A., Leenders, K. L., Rothwell, J. C., and et al. (1989). Human fetal dopamine neurons grafted into the striatum in two patients with severe Parkinson's disease. A detailed account of methodology and a 6-month follow-up. Arch Neurol *46*, 615-631.

Liste, I., Garcia-Garcia, E., and Martinez-Serrano, A. (2004). The generation of dopaminergic neurons by human neural stem cells is enhanced by Bcl-XL, both in vitro and in vivo. J Neurosci *24*, 10786-10795.

Liu, G., Yuan, X., Zeng, Z., Tunici, P., Ng, H., Abdulkadir, I. R., Lu, L., Irvin, D., Black, K. L., and Yu, J. S. (2006). Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. Mol Cancer *5*, 67.

Liu, S., Liu, H., Pan, Y., Tang, S., Xiong, J., Hui, N., Wang, S., Qi, Z., and Li, L. (2004a). Human embryonic germ cells isolation from early stages of post-implantation embryos. Cell Tissue Res *318*, 525-531.

Liu, Y., Han, S. S., Wu, Y., Tuohy, T. M., Xue, H., Cai, J., Back, S. A., Sherman, L. S., Fischer, I., and Rao, M. S. (2004b). CD44 expression identifies astrocyte-restricted precursor cells. Dev Biol *276*, 31-46.

Lledo, P. M., Alonso, M., and Grubb, M. S. (2006). Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. Nat Rev Neurosci *7*, 179-193.

Lo, L., Dormand, E., Greenwood, A., and Anderson, D. J. (2002). Comparison of the generic neuronal differentiation and neuron subtype specification functions of mammalian achaete-scute and atonal homologs in cultured neural progenitor cells. Development *129*, 1553-1567.

Lo, L., Tiveron, M. C., and Anderson, D. J. (1998). MASH1 activates expression of the paired homeodomain transcription factor Phox2a, and couples pan-neuronal and subtype-specific components of autonomic neuronal identity. Development *125*, 609-620.

Lo, L. C., Johnson, J. E., Wuenschell, C. W., Saito, T., and Anderson, D. J. (1991). Mammalian achaete-scute homolog 1 is transiently expressed by spatially restricted subsets of early neuroepithelial and neural crest cells. Genes Dev *5*, 1524-1537.

Lothian, C., and Lendahl, U. (1997). An evolutionarily conserved region in the second intron of the human nestin gene directs gene expression to CNS progenitor cells and to early neural crest cells. Eur J Neurosci *9*, 452-462.

Lu, Q. R., Yuk, D., Alberta, J. A., Zhu, Z., Pawlitzky, I., Chan, J., McMahon, A. P., Stiles, C. D., and Rowitch, D. H. (2000). Sonic hedgehog--regulated oligodendrocyte lineage genes encoding bHLH proteins in the mammalian central nervous system. Neuron *25*, 317-329.

Ma, Q., Chen, Z., del Barco Barrantes, I., de la Pompa, J. L., and Anderson, D. J. (1998). neurogenin1 is essential for the determination of neuronal precursors for proximal cranial sensory ganglia. Neuron *20*, 469-482.

Ma, Q., Fode, C., Guillemot, F., and Anderson, D. J. (1999). Neurogenin1 and neurogenin2 control two distinct waves of neurogenesis in developing dorsal root ganglia. Genes Dev *13*, 1717-1728.

Ma, Q., Kintner, C., and Anderson, D. J. (1996). Identification of neurogenin, a vertebrate neuronal determination gene. Cell *87*, 43-52.

Ma, Q., Sommer, L., Cserjesi, P., and Anderson, D. J. (1997). Mash1 and neurogenin1 expression patterns define complementary domains of neuroepithelium in the developing CNS and are correlated with regions expressing notch ligands. J Neurosci *17*, 3644-3652.

Machon, O., Backman, M., Krauss, S., and Kozmik, Z. (2005). The cellular fate of cortical progenitors is not maintained in neurosphere cultures. Mol Cell Neurosci *30*, 388-397.

Magavi, S. S., Leavitt, B. R., and Macklis, J. D. (2000). Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. Nature *405*, 951-955.

Marconi, S., De Toni, L., Lovato, L., Tedeschi, E., Gaetti, L., Acler, M., and Bonetti, B. (2005). Expression of gangliosides on glial and neuronal cells in normal and pathological adult human brain. J Neuroimmunol *170*, 115-121.

Marquardt, T., Ashery-Padan, R., Andrejewski, N., Scardigli, R., Guillemot, F., and Gruss, P. (2001). Pax6 is required for the multipotent state of retinal progenitor cells. Cell *105*, 43-55.

Marx, J. (2003). Cancer research. Mutant stem cells may seed cancer. Science *301*, 1308-1310.

Massari, M. E., and Murre, C. (2000). Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. Mol Cell Biol *20*, 429-440.

Matsui, Y., Zsebo, K., and Hogan, B. L. (1992). Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. Cell *70*, 841-847.

Mayer-Proschel, M., Kalyani, A. J., Mujtaba, T., and Rao, M. S. (1997). Isolation of lineage-restricted neuronal precursors from multipotent neuroepithelial stem cells. Neuron *19*, 773-785.

McBride, J. L., Behrstock, S. P., Chen, E. Y., Jakel, R. J., Siegel, I., Svendsen, C. N., and Kordower, J. H. (2004). Human neural stem cell transplants improve motor function in a rat model of Huntington's disease. J Comp Neurol *475*, 211-219.

McCormick, M. B., Tamimi, R. M., Snider, L., Asakura, A., Bergstrom, D., and Tapscott, S. J. (1996). NeuroD2 and neuroD3: distinct expression patterns and transcriptional activation potentials within the neuroD gene family. Mol Cell Biol *16*, 5792-5800.

McDonald, J. W., and Belegu, V. (2006). Demyelination and remyelination after spinal cord injury. J Neurotrauma *23*, 345-359.

Menasche, P., Hagege, A. A., Scorsin, M., Pouzet, B., Desnos, M., Duboc, D., Schwartz, K., Vilquin, J. T., and Marolleau, J. P. (2001). Myoblast transplantation for heart failure. Lancet *357*, 279-280.

Menezes, J. R., and Luskin, M. B. (1994). Expression of neuron-specific tubulin defines a novel population in the proliferative layers of the developing telencephalon. J Neurosci *14*, 5399-5416.

Merkle, F. T., Tramontin, A. D., Garcia-Verdugo, J. M., and Alvarez-Buylla, A. (2004). Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. Proc Natl Acad Sci U S A *101*, 17528-17532.

Messina, D. J., Alder, L., and Tresco, P. A. (2003). Comparison of pure and mixed populations of human fetal-derived neural progenitors transplanted into intact adult rat brain. Exp Neurol *184*, 816-829.

Mirescu, C., and Gould, E. (2006). Stress and adult neurogenesis. Hippocampus *16*, 233-238.

Miyoshi, G., Bessho, Y., Yamada, S., and Kageyama, R. (2004). Identification of a novel basic helix-loop-helix gene, Heslike, and its role in GABAergic neurogenesis. J Neurosci *24*, 3672-3682.

Mizuguchi, R., Sugimori, M., Takebayashi, H., Kosako, H., Nagao, M., Yoshida, S., Nabeshima, Y., Shimamura, K., and Nakafuku, M. (2001). Combinatorial roles of olig2 and neurogenin2 in the coordinated induction of pan-neuronal and subtype-specific properties of motoneurons. Neuron *31*, 757-771.

Molcayni, M., Bentz, K., Maegele, M., Simanski, C., Carlitscheck, C., Schneider, A., Hescheler, J., Bouillon, B., Schafer, U., and Neugebauer, E. (2007). Embryonic stem cell transplantation after experimental traumatic brain injury dramatically improves neurological outcome, but may cause tumors. J Neurotrauma *24*, 216-225.

Molteni, R., Fumagalli, F., Magnaghi, V., Roceri, M., Gennarelli, M., Racagni, G., Melcangi, R. C., and Riva, M. A. (2001). Modulation of fibroblast growth factor-2 by stress and corticosteroids: from developmental events to adult brain plasticity. Brain Res Brain Res Rev *37*, 249-258.

Monfils, M. H., Driscoll, I., Kamitakahara, H., Wilson, B., Flynn, C., Teskey, G. C., Kleim, J. A., and Kolb, B. (2006). FGF-2-induced cell proliferation stimulates anatomical, neurophysiological and functional recovery from neonatal motor cortex injury. Eur J Neurosci *24*, 739-749.

Morrison, S. J., Prowse, K. R., Ho, P., and Weissman, I. L. (1996). Telomerase activity in hematopoietic cells is associated with self-renewal potential. Immunity *5*, 207-216.

Morrison, S. J., Uchida, N., and Weissman, I. L. (1995). The biology of hematopoietic stem cells. Annu Rev Cell Dev Biol *11*, 35-71.

Mouly, V., Edom, F., Barbet, J. P., and Butler-Browne, G. S. (1993). Plasticity of human satellite cells. Neuromuscul Disord *3*, 371-377.

Mujtaba, T., Piper, D. R., Kalyani, A., Groves, A. K., Lucero, M. T., and Rao, M. S. (1999). Lineage-restricted neural precursors can be isolated from both the mouse neural tube and cultured ES cells. Dev Biol *214*, 113-127.

Muramatsu, D., Sato, Y., Hishiyama, S., Miyamoto, Y., and Hisatsune, T. (2005). Transplantation of GABAergic neurons into adult mouse neocortex. Exp Neurol *194*, 1-11.

Murre, C., McCaw, P. S., and Baltimore, D. (1989). A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. Cell *56*, 777-783.

Nait-Oumesmar, B., Decker, L., Lachapelle, F., Avellana-Adalid, V., Bachelin, C., and Van Evercooren, A. B. (1999). Progenitor cells of the adult mouse subventricular zone proliferate, migrate and differentiate into oligodendrocytes after demyelination. Eur J Neurosci *11*, 4357-4366.

Nakashima, K., Yanagisawa, M., Arakawa, H., Kimura, N., Hisatsune, T., Kawabata, M., Miyazono, K., and Taga, T. (1999). Synergistic signaling in fetal brain by STAT3-Smad1 complex bridged by p300. Science *284*, 479-482.

Naldini, L., Blomer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F. H., Verma, I. M., and Trono, D. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. Science *272*, 263-267.

Nelson, A. D., and Svendsen, C. N. (2006). Low concentrations of extracellular FGF-2 are sufficient but not essential for neurogenesis from human neural progenitor cells. Mol Cell Neurosci *33*, 29-35.

Nieto, M., Schuurmans, C., Britz, O., and Guillemot, F. (2001). Neural bHLH genes control the neuronal versus glial fate decision in cortical progenitors. Neuron *29*, 401-413.

Noguchi, H., Xu, G., Matsumoto, S., Kaneto, H., Kobayashi, N., Bonner-Weir, S., and Hayashi, S. (2006). Induction of pancreatic stem/progenitor cells into insulin-producing cells by adenoviral-mediated gene transfer technology. Cell Transplant *15*, 929-938.

Novitch, B. G., Chen, A. I., and Jessell, T. M. (2001). Coordinate regulation of motor neuron subtype identity and pan-neuronal properties by the bHLH repressor Olig2. Neuron *31*, 773-789.

Odorico, J. S., Kaufman, D. S., and Thomson, J. A. (2001). Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. Stem Cells *19*, 193-204.

Ohori, Y., Yamamoto, S., Nagao, M., Sugimori, M., Yamamoto, N., Nakamura, K., and Nakafuku, M. (2006). Growth factor treatment and genetic manipulation stimulate neurogenesis and oligodendrogenesis by endogenous neural progenitors in the injured adult spinal cord. J Neurosci *26*, 11948-11960.

Ohsawa, R., Ohtsuka, T., and Kageyama, R. (2005). Mash1 and Math3 are required for development of branchiomotor neurons and maintenance of neural progenitors. J Neurosci *25*, 5857-5865.

Ohtsuka, T., Sakamoto, M., Guillemot, F., and Kageyama, R. (2001). Roles of the basic helix-loop-helix genes Hes1 and Hes5 in expansion of neural stem cells of the developing brain. J Biol Chem *276*, 30467-30474.

Ohyu, J., Yamanouchi, H., and Takashima, S. (1997). Immunohistochemical study of microtubule-associated protein 5 (MAP5) expression in the developing human brain. Brain Dev *19*, 541-546.

Oishi, K., Kamakura, S., Isazawa, Y., Yoshimatsu, T., Kuida, K., Nakafuku, M., Masuyama, N., and Gotoh, Y. (2004). Notch promotes survival of neural precursor cells via mechanisms distinct from those regulating neurogenesis. Dev Biol *276*, 172-184.

Okabe, S., Forsberg-Nilsson, K., Spiro, A. C., Segal, M., and McKay, R. D. (1996). Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. Mech Dev *59*, 89-102.

Olson, E. C., Schinder, A. F., Dantzker, J. L., Marcus, E. A., Spitzer, N. C., and Harris, W. A. (1998). Properties of ectopic neurons induced by Xenopus neurogenin1 misexpression. Mol Cell Neurosci *12*, 281-299.

Ostenfeld, T., and Svendsen, C. N. (2003). Recent advances in stem cell neurobiology. Adv Tech Stand Neurosurg *28*, 3-89.

Owen, M. (1988). Marrow stromal stem cells. J Cell Sci Suppl *10*, 63-76.

Palmer, T. D., Markakis, E. A., Willhoite, A. R., Safar, F., and Gage, F. H. (1999). Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. J Neurosci *19*, 8487-8497.

Parras, C. M., Galli, R., Britz, O., Soares, S., Galichet, C., Battiste, J., Johnson, J. E., Nakafuku, M., Vescovi, A., and Guillemot, F. (2004). Mash1 specifies neurons and oligodendrocytes in the postnatal brain. Embo J *23*, 4495-4505.

Parras, C. M., Hunt, C., Sugimori, M., Nakafuku, M., Rowitch, D., and Guillemot, F. (2007). The proneural gene Mash1 specifies an early population of telencephalic oligodendrocytes. J Neurosci *27*, 4233-4242.

Parras, C. M., Schuurmans, C., Scardigli, R., Kim, J., Anderson, D. J., and Guillemot, F. (2002). Divergent functions of the proneural genes Mash1 and Ngn2 in the specification of neuronal subtype identity. Genes Dev *16*, 324-338.

Patten, B. A., Peyrin, J. M., Weinmaster, G., and Corfas, G. (2003). Sequential signaling through Notch1 and erbB receptors mediates radial glia differentiation. J Neurosci *23*, 6132-6140.

Pattyn, A., Hirsch, M., Goridis, C., and Brunet, J. F. (2000). Control of hindbrain motor neuron differentiation by the homeobox gene Phox2b. Development *127*, 1349-1358.

Pattyn, A., Simplicio, N., van Doorninck, J. H., Goridis, C., Guillemot, F., and Brunet, J. F. (2004). Ascl1/Mash1 is required for the development of central serotonergic neurons. Nat Neurosci *7*, 589-595.

Perez, S. E., Rebelo, S., and Anderson, D. J. (1999). Early specification of sensory neuron fate revealed by expression and function of neurogenins in the chick embryo. Development *126*, 1715-1728.

Philippe, S., Sarkis, C., Barkats, M., Mammeri, H., Ladroue, C., Petit, C., Mallet, J., and Serguera, C. (2006). Lentiviral vectors with a defective integrase allow efficient and sustained transgene expression in vitro and in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A *103*, 17684-17689.

Piacibello, W., Sanavio, F., Garetto, L., Severino, A., Dane, A., Gammaitoni, L., and Aglietta, M. (1998). Differential growth factor requirement of primitive cord blood hematopoietic stem cell for self-renewal and amplification vs proliferation and differentiation. Leukemia *12*, 718-727.

Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., and Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science *284*, 143-147.

Pluchino, S., Quattrini, A., Brambilla, E., Gritti, A., Salani, G., Dina, G., Galli, R., Del Carro, U., Amadio, S., Bergami, A., *et al.* (2003). Injection of adult neurospheres induces recovery in a chronic model of multiple sclerosis. Nature *422*, 688-694.

Pluchino, S., Zanotti, L., Rossi, B., Brambilla, E., Ottoboni, L., Salani, G., Martinello, M., Cattalini, A., Bergami, A., Furlan, R., *et al.* (2005). Neurosphere-derived multipotent precursors promote neuroprotection by an immunomodulatory mechanism. Nature *436*, 266-271.

Polgar, K., Adany, R., Abel, G., Kappelmayer, J., Muszbek, L., and Papp, Z. (1989). Characterization of rapidly adhering amniotic fluid cells by combined immunofluorescence and phagocytosis assays. Am J Hum Genet *45*, 786-792.

Potten, C. S., and Loeffler, M. (1990). Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. Development *110*, 1001-1020.

Potten, C. S., and Morris, R. J. (1988). Epithelial stem cells in vivo. J Cell Sci Suppl *10*, 45-62.

Poznansky, M., Lever, A., Bergeron, L., Haseltine, W., and Sodroski, J. (1991). Gene transfer into human lymphocytes by a defective human immunodeficiency virus type 1 vector. J Virol *65*, 532-536.

Priest, R. E., Marimuthu, K. M., and Priest, J. H. (1978). Origin of cells in human amniotic fluid cultures: ultrastructural features. Lab Invest *39*, 106-109.

Prusa, A. R., Marton, E., Rosner, M., Bettelheim, D., Lubec, G., Pollack, A., Bernaschek, G., and Hengstschlager, M. (2004). Neurogenic cells in human amniotic fluid. Am J Obstet Gynecol *191*, 309-314.

Qian, X., Davis, A. A., Goderie, S. K., and Temple, S. (1997). FGF2 concentration regulates the generation of neurons and glia from multipotent cortical stem cells. Neuron *18*, 81-93.

Qian, X., Goderie, S. K., Shen, Q., Stern, J. H., and Temple, S. (1998). Intrinsic programs of patterned cell lineages in isolated vertebrate CNS ventricular zone cells. Development *125*, 3143-3152.

Qian, X., Shen, Q., Goderie, S. K., He, W., Capela, A., Davis, A. A., and Temple, S. (2000). Timing of CNS cell generation: a programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells. Neuron *28*, 69-80.

Raballo, R., Rhee, J., Lyn-Cook, R., Leckman, J. F., Schwartz, M. L., and Vaccarino, F. M. (2000). Basic fibroblast growth factor (Fgf2) is necessary for cell proliferation and neurogenesis in the developing cerebral cortex. J Neurosci *20*, 5012-5023.

Raff, M. C., Miller, R. H., and Noble, M. (1983). A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium. Nature *303*, 390-396.

Rafuse, V. F., Soundararajan, P., Leopold, C., and Robertson, H. A. (2005). Neuroprotective properties of cultured neural progenitor cells are associated with the production of sonic hedgehog. Neuroscience *131*, 899-916.

Rao, M. S., and Mayer-Proschel, M. (1997). Glial-restricted precursors are derived from multipotent neuroepithelial stem cells. Dev Biol *188*, 48-63.

Ravassard, P., Chatail, F., Mallet, J., and Icard-Liepkalns, C. (1997). Relax, a novel rat bHLH transcriptional regulator transiently expressed in the ventricular proliferating zone of the developing central nervous system. J Neurosci Res *48*, 146-158.

Redmond, L., Oh, S. R., Hicks, C., Weinmaster, G., and Ghosh, A. (2000). Nuclear Notch1 signaling and the regulation of dendritic development. Nat Neurosci *3*, 30-40.

Reske-Nielsen, E., Oster, S., and Reintoft, I. (1987). Astrocytes in the prenatal central nervous system. From 5th to 28th week of gestation. An immunohistochemical study on paraffin-embedded material. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [A] *95*, 339-346.

Reubinoff, B. E., Pera, M. F., Fong, C. Y., Trounson, A., and Bongso, A. (2000). Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. Nat Biotechnol *18*, 399-404.

Riaz, S. S., Theofilopoulos, S., Jauniaux, E., Stern, G. M., and Bradford, H. F. (2004). The differentiation potential of human foetal neuronal progenitor cells in vitro. Brain Res Dev Brain Res *153*, 39-51.

Ribotta, M. G., Menet, V., and Privat, A. (2004). Glial scar and axonal regeneration in the CNS: lessons from GFAP and vimentin transgenic mice. Acta Neurochir Suppl *89*, 87-92.

Riederer, B., Cohen, R., and Matus, A. (1986). MAP5: a novel brain microtubule-associated protein under strong developmental regulation. J Neurocytol *15*, 763-775.

Rieske, P., Azizi, S. A., Augelli, B., Gaughan, J., and Krynska, B. (2007). A population of human brain parenchymal cells express markers of glial, neuronal and early neural cells and differentiate into cells of neuronal and glial lineages. Eur J Neurosci *25*, 31-37.

Rietze, R. L., Valcanis, H., Brooker, G. F., Thomas, T., Voss, A. K., and Bartlett, P. F. (2001). Purification of a pluripotent neural stem cell from the adult mouse brain. Nature *412*, 736-739.

Rochat, A., Kobayashi, K., and Barrandon, Y. (1994). Location of stem cells of human hair follicles by clonal analysis. Cell *76*, 1063-1073.

Roitberg, B. Z., Mangubat, E., Chen, E. Y., Sugaya, K., Thulborn, K. R., Kordower, J. H., Pawar, A., Konecny, T., and Emborg, M. E. (2006). Survival and early differentiation of human neural stem cells transplanted in a nonhuman primate model of stroke. J Neurosurg *105*, 96-102.

Rosser, A. E., Tyers, P., and Dunnett, S. B. (2000). The morphological development of neurons derived from EGF- and FGF-2-driven human CNS precursors depends on their site of integration in the neonatal rat brain. Eur J Neurosci *12*, 2405-2413.

Roth, S. Y., Denu, J. M., and Allis, C. D. (2001). Histone acetyltransferases. Annu Rev Biochem *70*, 81-120.

Roy, N. S., Benraiss, A., Wang, S., Fraser, R. A., Goodman, R., Couldwell, W. T., Nedergaard, M., Kawaguchi, A., Okano, H., and Goldman, S. A. (2000a). Promoter-targeted selection and isolation of neural progenitor cells from the adult human ventricular zone. J Neurosci Res *59*, 321-331.

Roy, N. S., Wang, S., Harrison-Restelli, C., Benraiss, A., Fraser, R. A., Gravel, M., Braun, P. E., and Goldman, S. A. (1999). Identification, isolation, and promoter-defined separation of mitotic oligodendrocyte progenitor cells from the adult human subcortical white matter. J Neurosci *19*, 9986-9995.

Roy, N. S., Wang, S., Jiang, L., Kang, J., Benraiss, A., Harrison-Restelli, C., Fraser, R. A., Couldwell, W. T., Kawaguchi, A., Okano, H., *et al.* (2000b). In vitro neurogenesis by progenitor cells isolated from the adult human hippocampus. Nat Med *6*, 271-277.

Sabate, O., Horellou, P., Vigne, E., Colin, P., Perricaudet, M., Buc-Caron, M. H., and Mallet, J. (1995). Transplantation to the rat brain of human neural progenitors that were genetically modified using adenoviruses. Nat Genet *9*, 256-260.

Sabin, F. R. (1920). Studies on the origin nof blood corpuscles as seen in the living blastoderm of checks during the second day of incubation. Contrib Embryol *9*, 214-262.

Sakamoto, M., Hirata, H., Ohtsuka, T., Bessho, Y., and Kageyama, R. (2003). The basic helix-loop-helix genes Hesr1/Hey1 and Hesr2/Hey2 regulate maintenance of neural precursor cells in the brain. J Biol Chem *278*, 44808-44815.

Sanai, N., Tramontin, A. D., Quinones-Hinojosa, A., Barbaro, N. M., Gupta, N., Kunwar, S., Lawton, M. T., McDermott, M. W., Parsa, A. T., Manuel-Garcia Verdugo, J., *et al.* (2004). Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. Nature *427*, 740-744.

Santa-Olalla, J., Baizabal, J. M., Fregoso, M., del Carmen Cardenas, M., and Covarrubias, L. (2003). The in vivo positional identity gene expression code is not preserved in neural stem cells grown in culture. Eur J Neurosci *18*, 1073-1084.

Sarkis, C., Serguera, C., Petres, S., Buchet, D., Ridet, J. L., Edelman, L., and Mallet, J. (2000). Efficient transduction of neural cells in vitro and in vivo by a baculovirus-derived vector. Proc Natl Acad Sci U S A *97*, 14638-14643.

Satow, T., Bae, S. K., Inoue, T., Inoue, C., Miyoshi, G., Tomita, K., Bessho, Y., Hashimoto, N., and Kageyama, R. (2001). The basic helix-loop-helix gene hesr2 promotes gliogenesis in mouse retina. J Neurosci *21*, 1265-1273.

Sauvageot, C. M., and Stiles, C. D. (2002). Molecular mechanisms controlling cortical gliogenesis. Curr Opin Neurobiol *12*, 244-249.

Scardigli, R., Schuurmans, C., Gradwohl, G., and Guillemot, F. (2001). Crossregulation between Neurogenin2 and pathways specifying neuronal identity in the spinal cord. Neuron *31*, 203-217.

Scheer, N., Groth, A., Hans, S., and Campos-Ortega, J. A. (2001). An instructive function for Notch in promoting gliogenesis in the zebrafish retina. Development *128*, 1099-1107.

Schroeter, E. H., Kisslinger, J. A., and Kopan, R. (1998). Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. Nature *393*, 382-386.

Schuurmans, C., Armant, O., Nieto, M., Stenman, J. M., Britz, O., Klenin, N., Brown, C., Langevin, L. M., Seibt, J., Tang, H., *et al.* (2004). Sequential phases of cortical specification involve Neurogenin-dependent and -independent pathways. Embo J *23*, 2892-2902.

Seibt, J., Schuurmans, C., Gradwhol, G., Dehay, C., Vanderhaeghen, P., Guillemot, F., and Polleux, F. (2003). Neurogenin2 specifies the connectivity of thalamic neurons by controlling axon responsiveness to intermediate target cues. Neuron *39*, 439-452.

Sell, S. (1990). Is there a liver stem cell? Cancer Res *50*, 3811-3815.

Sestan, N., Artavanis-Tsakonas, S., and Rakic, P. (1999). Contact-dependent inhibition of cortical neurite growth mediated by notch signaling. Science *286*, 741-746.

Shamblott, M. J., Axelman, J., Wang, S., Bugg, E. M., Littlefield, J. W., Donovan, P. J., Blumenthal, P. D., Huggins, G. R., and Gearhart, J. D. (1998). Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. Proc Natl Acad Sci U S A *95*, 13726-13731.

Shapiro, A. M., Lakey, J. R., Ryan, E. A., Korbutt, G. S., Toth, E., Warnock, G. L., Kneteman, N. M., and Rajotte, R. V. (2000). Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. N Engl J Med *343*, 230-238.

Singh, S. K., Clarke, I. D., Terasaki, M., Bonn, V. E., Hawkins, C., Squire, J., and Dirks, P. B. (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. Cancer Res *63*, 5821-5828.

Singh, S. K., Hawkins, C., Clarke, I. D., Squire, J. A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R. M., Cusimano, M. D., and Dirks, P. B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. Nature *432*, 396-401.

Sirven, A., Ravet, E., Charneau, P., Zennou, V., Coulombel, L., Guetard, D., Pflumio, F., and Dubart-Kupperschmitt, A. (2001). Enhanced transgene expression in cord blood CD34(+)-derived hematopoietic cells, including developing T cells and NOD/SCID mouse repopulating cells, following transduction with modified trip lentiviral vectors. Mol Ther *3*, 438-448.

Slack, J. M. (2000). Stem cells in epithelial tissues. Science *287*, 1431-1433.

Sommer, I., and Schachner, M. (1981). Monoclonal antibodies (O1 to O4) to oligodendrocyte cell surfaces: an immunocytological study in the central nervous system. Dev Biol *83*, 311-327.

Sommer, L., Ma, Q., and Anderson, D. J. (1996). neurogenins, a novel family of atonal-related bHLH transcription factors, are putative mammalian neuronal determination genes that reveal progenitor cell heterogeneity in the developing CNS and PNS. Mol Cell Neurosci *8*, 221-241.

Sommer, L., Shah, N., Rao, M., and Anderson, D. J. (1995). The cellular function of MASH1 in autonomic neurogenesis. Neuron *15*, 1245-1258.

Sprinkle, T. J., Agee, J. F., Tippins, R. B., Chamberlain, C. R., Faguet, G. B., and De Vries, G. H. (1987). Monoclonal antibody production to human and bovine 2':3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase): high-specificity recognition in whole brain acetone powders and conservation of sequence between CNP1 and CNP2. Brain Res *426*, 349-357.

Steindler, D. A., and Laywell, E. D. (2003). Astrocytes as stem cells: nomenclature, phenotype, and translation. Glia *43*, 62-69.

Storch, A., Paul, G., Csete, M., Boehm, B. O., Carvey, P. M., Kupsch, A., and Schwarz, J. (2001). Long-term proliferation and dopaminergic differentiation of human mesencephalic neural precursor cells. Exp Neurol *170*, 317-325.

Sugimori, M., Nagao, M., Bertrand, N., Parras, C. M., Guillemot, F., and Nakafuku, M. (2007). Combinatorial actions of patterning and HLH transcription factors in the spatiotemporal control of neurogenesis and gliogenesis in the developing spinal cord. Development *134*, 1617-1629.

Sun, Y., Nadal-Vicens, M., Misono, S., Lin, M. Z., Zubiaga, A., Hua, X., Fan, G., and Greenberg, M. E. (2001). Neurogenin promotes neurogenesis and inhibits glial differentiation by independent mechanisms. Cell *104*, 365-376.

Svendsen, C. N., Clarke, D. J., Rosser, A. E., and Dunnett, S. B. (1996). Survival and differentiation of rat and human epidermal growth factor-responsive precursor cells following grafting into the lesioned adult central nervous system. Exp Neurol *137*, 376-388.

Svendsen, C. N., ter Borg, M. G., Armstrong, R. J., Rosser, A. E., Chandran, S., Ostenfeld, T., and Caldwell, M. A. (1998). A new method for the rapid and long term growth of human neural precursor cells. J Neurosci Methods *85*, 141-152.

Tamaki, S., Eckert, K., He, D., Sutton, R., Doshe, M., Jain, G., Tushinski, R., Reitsma, M., Harris, B., Tsukamoto, A., *et al.* (2002). Engraftment of sorted/expanded human central nervous system stem cells from fetal brain. J Neurosci Res *69*, 976-986.

Tanigaki, K., Nogaki, F., Takahashi, J., Tashiro, K., Kurooka, H., and Honjo, T. (2001). Notch1 and Notch3 instructively restrict bFGF-responsive multipotent neural progenitor cells to an astroglial fate. Neuron *29*, 45-55.

Tarasenko, Y. I., Gao, J., Nie, L., Johnson, K. M., Grady, J. J., Hulsebosch, C. E., McAdoo, D. J., and Wu, P. (2007). Human fetal neural stem cells grafted into contusion-injured rat spinal cords improve behavior. J Neurosci Res *85*, 47-57.

Taylor, S. M., and Jones, P. A. (1979). Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine. Cell *17*, 771-779.

Temple, S. (2001). The development of neural stem cells. Nature *414*, 112-117.

Thompson, L. H., Andersson, E., Jensen, J. B., Barraud, P., Guillemot, F., Parmar, M., and Bjorklund, A. (2006). Neurogenin2 identifies a transplantable dopamine neuron precursor in the developing ventral mesencephalon. Exp Neurol *198*, 183-198.

Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., and Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science *282*, 1145-1147.

Thorgeirsson, S. S. (1993). Hepatic stem cells. Am J Pathol *142*, 1331-1333.

Tsai, M. S., Lee, J. L., Chang, Y. J., and Hwang, S. M. (2004). Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. Hum Reprod *19*, 1450-1456.

Turnpenny, L., Brickwood, S., Spalluto, C. M., Piper, K., Cameron, I. T., Wilson, D. I., and Hanley, N. A. (2003). Derivation of human embryonic germ cells: an alternative source of pluripotent stem cells. Stem Cells *21*, 598-609.

Uchida, N., Buck, D. W., He, D., Reitsma, M. J., Masek, M., Phan, T. V., Tsukamoto, A. S., Gage, F. H., and Weissman, I. L. (2000). Direct isolation of human central nervous system stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A *97*, 14720-14725.

Van Doren, M., Bailey, A. M., Esnayra, J., Ede, K., and Posakony, J. W. (1994). Negative regulation of proneural gene activity: hairy is a direct transcriptional repressor of achaete. Genes Dev *8*, 2729-2742.

Vescovi, A. L., Parati, E. A., Gritti, A., Poulin, P., Ferrario, M., Wanke, E., Frolichsthal-Schoeller, P., Cova, L., Arcellana-Panlilio, M., Colombo, A., and Galli, R. (1999). Isolation and cloning of multipotential stem cells from the embryonic human CNS and establishment of transplantable human neural stem cell lines by epigenetic stimulation. Exp Neurol *156*, 71-83.

Villa, A., Snyder, E. Y., Vescovi, A., and Martinez-Serrano, A. (2000). Establishment and properties of a growth factor-dependent, perpetual neural stem cell line from the human CNS. Exp Neurol *161*, 67-84.

Villares, R., and Cabrera, C. V. (1987). The achaete-scute gene complex of D. melanogaster: conserved domains in a subset of genes required for neurogenesis and their homology to myc. Cell *50*, 415-424.

Vogel, R., Amar, L., Thi, A. D., Saillour, P., and Mallet, J. (2004). A single lentivirus vector mediates doxycycline-regulated expression of transgenes in the brain. Hum Gene Ther *15*, 157-165.

Wang, S., Roy, N. S., Benraiss, A., and Goldman, S. A. (2000). Promoter-based isolation and fluorescence-activated sorting of mitotic neuronal progenitor cells from the adult mammalian ependymal/subependymal zone. Dev Neurosci *22*, 167-176.

Wang, S., Sdrulla, A., Johnson, J. E., Yokota, Y., and Barres, B. A. (2001). A role for the helix-loop-helix protein Id2 in the control of oligodendrocyte development. Neuron *29*, 603-614.

Wang, S., Sdrulla, A. D., diSibio, G., Bush, G., Nofziger, D., Hicks, C., Weinmaster, G., and Barres, B. A. (1998). Notch receptor activation inhibits oligodendrocyte differentiation. Neuron *21*, 63-75.

White, P. M., Morrison, S. J., Orimoto, K., Kubu, C. J., Verdi, J. M., and Anderson, D. J. (2001). Neural crest stem cells undergo cell-intrinsic developmental changes in sensitivity to instructive differentiation signals. Neuron *29*, 57-71.

Wichterle, H., Lieberam, I., Porter, J. A., and Jessell, T. M. (2002). Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. Cell *110*, 385-397.

Williams, B. P., Read, J., and Price, J. (1991). The generation of neurons and oligodendrocytes from a common precursor cell. Neuron *7*, 685-693.

Windrem, M. S., Nunes, M. C., Rashbaum, W. K., Schwartz, T. H., Goodman, R. A., McKhann, G., 2nd, Roy, N. S., and Goldman, S. A. (2004). Fetal and adult human oligodendrocyte progenitor cell isolates myelinate the congenitally dysmyelinated brain. Nat Med *10*, 93-97.

Windrem, M. S., Roy, N. S., Wang, J., Nunes, M., Benraiss, A., Goodman, R., McKhann, G. M., 2nd, and Goldman, S. A. (2002). Progenitor cells derived from the adult human subcortical white matter disperse and differentiate as oligodendrocytes within demyelinated lesions of the rat brain. J Neurosci Res *69*, 966-975.

Wright, L. S., Prowse, K. R., Wallace, K., Linskens, M. H., and Svendsen, C. N. (2006). Human progenitor cells isolated from the developing cortex undergo decreased neurogenesis and eventual senescence following expansion in vitro. Exp Cell Res *312*, 2107-2120.

Wu, P., Ye, Y., and Svendsen, C. N. (2002). Transduction of human neural progenitor cells using recombinant adeno-associated viral vectors. Gene Ther *9*, 245-255.

Yamada, K., Hisatsune, T., Uchino, S., Nakamura, T., Kudo, Y., and Kaminogawa, S. (1999). NMDA receptor mediated Ca2+ responses in neurons differentiated from p53-/- immortalized Murine neural stem cells. Neurosci Lett *264*, 165-167.

Yang, X., Tomita, T., Wines-Samuelson, M., Beglopoulos, V., Tansey, M. G., Kopan, R., and Shen, J. (2006). Notch1 signaling influences v2 interneuron and motor neuron development in the spinal cord. Dev Neurosci *28*, 102-117.

Yant, S. R., Huang, Y., Akache, B., and Kay, M. A. (2007). Site-directed transposon integration in human cells. Nucleic Acids Res.

Yokota, Y. (2001). Id and development. Oncogene *20*, 8290-8298.

Zennou, V., Petit, C., Guetard, D., Nerhbass, U., Montagnier, L., and Charneau, P. (2000). HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. Cell *101*, 173-185.

Zennou, V., Serguera, C., Sarkis, C., Colin, P., Perret, E., Mallet, J., and Charneau, P. (2001). The HIV-1 DNA flap stimulates HIV vector-mediated cell transduction in the brain. Nat Biotechnol *19*, 446-450.

Zhou, Q., Choi, G., and Anderson, D. J. (2001). The bHLH transcription factor Olig2 promotes oligodendrocyte differentiation in collaboration with Nkx2.2. Neuron *31*, 791-807.

Zhou, Q., Wang, S., and Anderson, D. J. (2000). Identification of a novel family of oligodendrocyte lineage-specific basic helix-loop-helix transcription factors. Neuron *25*, 331-343.

Zietlow, R., Pekarik, V., Armstrong, R. J., Tyers, P., Dunnett, S. B., and Rosser, A. E. (2005). The survival of neural precursor cell grafts is influenced by in vitro expansion. J Anat *207*, 227-240.

Zufferey, R., Nagy, D., Mandel, R. J., Naldini, L., and Trono, D. (1997). Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. Nat Biotechnol *15*, 871-875.

Résumé

Dans une perspective de médecine régénératrice, les cellules souches nerveuses et progénitrices fœtales humaines constituent indéniablement un des outils les plus adaptés au traitement des lésions du SNC et des maladies neurodégénératives. Jusqu'à présent, leur utilisation en thérapie cellulaire a eu recours à des populations hétérogènes composées à la fois de cellules immatures, de cellules en voie de différenciation et de cellules pleinement différenciées. Or des études récentes ont révélé l'intérêt de disposer de populations enrichies en un type cellulaire donné afin d'améliorer l'efficacité des greffes. Pour homogénéiser les populations et mieux cibler les pathologies, nous avons donc mis en œuvre deux stratégies. La première consiste à surexprimer, dans les cellules en culture, les gènes proneuraux à motif bHLH Ngn1, Ngn2, Ngn3 et Mash1 au travers de vecteurs lentiviraux dits « de différenciation ». Cette surexpression a permis d'orienter la différenciation des cellules majoritairement vers le lignage neuronal et également de spécifier des sous-types neuronaux. La seconde méthode utilise des vecteurs lentiviraux traceurs pour exprimer une protéine rapportrice sous le contrôle de promoteurs spécifiques des différents lignages du SNC en vue de leur sélection par tri cellulaire. Nous avons ainsi utilisé le promoteur Nestine pour les cellules immatures, le promoteur Synapsine pour les cellules neuronales et le promoteur GFAP pour les cellules astrocytaires. Si les promoteurs Synapsine et GFAP ont révélé une spécificité contestable, le promoteur Nestine, quant à lui, a permis de sélectionner une population enrichie à 81% en cellules nestine+. Ce travail s'inscrit dans un projet de plus grande envergure, qui a pour but d'évaluer les bénéfices de greffes de ces populations homogénéisées.

Mots-clés : cellules souches nerveuses fœtales humaines, gènes proneuraux bHLH, différenciation, tri cellulaire, vecteurs lentiviraux, thérapie cellulaire

Abstract

In a therapeutic purpose, human fetal neural stem cells may be the most suitable tool for the treatment of central nervous system injuries or neurodegenerative disorders. Until now, their use in cell-based therapy has appealed to heterogeneous populations consisting of immature cells, committed progenitors and fully mature cells. However, recent studies have revealed the interest of enriching the populations in a specific cellular type in order to improve graft efficiency. In our study, two different strategies were developed to homogenize human fetal progenitor populations. In the first one, neuronal differentiation was achieved by lentiviral vector-mediated overexpression of 4 proneural genes: Neurogenine 1, 2, 3 and Mash1. In the second one, lentiviral vectors were used to promote reporter protein expression under the control of lineage-specific promoters: the Nestine promoter for immature cells; the human Synapsine promoter for neurons and the GFAP promoter for astrocytes. Although hSYN and GFAP promoters were shown to be non-specific, the Nestine promoter drove GFP-expression in a majority of nestine-positive cells. These two methods should allow a selection of the desired populations. A larger-scale project should now evaluate the advantage of grafting homogeneous populations.

Key words : human fetal neural stem cells, bHLH proneural genes, differentiation, cell sorting, lentiviral vectors, cell-based therapy