

# ÉCOLE NATIONALE VETERINAIRE D'ALFORT

---

Année 2008



## **LES CELLULES SOUCHES CHEZ L'ADULTE APPLICATIONS POSSIBLES EN MEDECINE VETERINAIRE**

THESE

Pour le

DOCTORAT VETERINAIRE

Présentée et soutenue publiquement devant

LA FACULTE DE MEDECINE DE CRETEIL

Le

par

**Camille BISMUTH**

Née le 30 septembre 1983 à Clamart (Hauts-de-Seine)

JURY

**Président : M.  
Professeur à la Faculté de Médecine de CRETEIL**

**Membres**

**Directeur : Mme Florence Bernex.**

**Maitre de conférences à l'ENVA**

**Assesseur : M. Laurent Tiret**

**Maitre de conférences à l'ENVA**

# **LES CELLULES SOUCHES CHEZ L'ADULTE. APPLICATIONS POSSIBLES EN MEDECINE VETERINAIRE.**

**NOM et prénom :** BISMUTH Camille

## **Résumé :**

Les cellules souches sont des cellules douées d'auto-renouvellement, indifférenciées et à potentialité variable. Elles ont été mises en évidence dans la majorité des organes de mammifères, dans un site propre à chaque organe appelé la « niche ». Chez l'adulte, les premières cellules souches ont été identifiées dans des tissus à renouvellement rapide comme la moelle osseuse, l'épiderme, les épithéliums respiratoire et digestif. Ensuite, les cellules souches ont été recherchées dans des tissus ayant une moindre capacité de renouvellement comme le foie, le muscle strié squelettique et le rein. Plus récemment, des cellules souches ont été découvertes dans le cerveau, le cœur et le tissu adipeux. En médecine humaine, il devient donc possible d'envisager le traitement de maladies dégénératives par l'apport de cellules souches visant à régénérer le lignage cellulaire défectueux. En parallèle, le concept de cellules souches cancéreuses commence à révolutionner notre conception de la transformation tumorale. Les principales indications thérapeutiques envisagées pour l'utilisation de cellules souches sont évaluées sur des modèles animaux puis utilisées en phase clinique chez l'Homme. On peut espérer que leur utilisation en médecine vétérinaire suivra, malgré les difficultés de mise en œuvre de cette thérapie.

## **Mots clés :**

CELLULE SOUCHE ADULTE, MOELLE OSSEUSE, TISSU ADIPEUX, CERVEAU, CŒUR, DIABÈTE, MYOPATHIE, THERAPIE CELLULAIRE, CELLULE SOUCHE CANCEREUSE, HOMME, SOURIS, RAT, CHIEN

## **Jury :**

Président : Pr.

Directrice : Dr. Florence BERNEX

Assesseur : Dr Laurent TIRET

## **Adresse de l'auteur :**

Melle Camille Bismuth

20 rue du château St-Leu

77240 CESSION

FRANCE

# **ADULT STEM CELLS. CONCEIVABLE USES IN VETERINARY MEDECINE.**

**SURNAME** : BISMUTH

**Given name** : Camille

## **Summary:**

Stem cells are self-renewing, undifferentiated and multipotent cells. In mammals, they have been found in many organs, in a specific location called “the niche”. In the adult, stem cells have been identified for the first time in tissues with fast renewal features, like bone marrow, skin, respiratory and digestive epitheliums. Then, stem cells have been searched in tissues with lower lineage-restoration capacities like liver, muscles and kidney. Recently, stem cells have been found in brain, heart and adipose tissue. In human medicine, degenerative diseases therapy is now being considered with stem cells use, in order to restore the deficient cellular lineage. In parallel, the cancer stem cells concept is going to change our conception of tumor progression. Most of the stem cells' purposes are evaluated in animal models and secondarily clinically tested in Human. In veterinary medicine, we hope that stem cell use will follow, in spite of the difficulties of the carry out of this therapy.

## **Keywords:**

ADULT STEM CELL–BONE MARROW–ADIPOSE TISSU– BRAIN – HEART - DIABETES – MUSCULAR DYSTROPHY – CELLULAR THERAPY – CANCER STEM CELL – HUMAN – MOUSE – RAT – DOG

## **Jury:**

President: Pr.

Director: Dr. Florence BERNEX

Assessor: Dr Laurent TIRET

## **Author's address:**

Miss Camille Bismuth

20 rue du château St-Leu

77240 CESSON

FRANCE



## **LISTE DES MEMBRES DU CORPS ENSEIGNANT**

Directeur : M. le Professeur MIALOT Jean-Paul

Directeurs honoraires : MM. les Professeurs MORAILLON Robert, PARODI André-Laurent, PILET Charles, TOMA Bernard  
Professeurs honoraires: MM. BUSSIERAS Jean, CERF Olivier, LE BARS Henri, MIU-HAUD Guy, ROZIER Jacques, CLERC Bernard

### **DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET PHARMACEUTIQUES (DSBP)**

**Chef du département : Mme COMBRISSON Hélène, Professeur - Adjoint : Mme LE PODER Sophie, Maître de conférences**

<b>-UNITE D'ANATOMIE DES ANIMAUX DOMESTIQUES</b> Mme CREVIER-DENOIX Nathalie, Professeur M. DEGUEURCE Christophe, Professeur* Mme ROBERT Céline, Maître de conférences M. CHATEAU Henri, Maître de conférences	<b>- UNITE D'HISTOLOGIE , ANATOMIE PATHOLOGIQUE</b> M. CRESPEAU François, Professeur M. FONTAINE Jean-Jacques, Professeur * Mme BERNEX Florence, Maître de conférences Mme CORDONNIER-LEFORT Nathalie, Maître de conférences
<b>-UNITE DE PATHOLOGIE GENERALE , MICROBIOLOGIE, IMMUNOLOGIE</b> Mme QUINTIN-COLONNA Françoise, Professeur* M. BOULOUIS Henri-Jean, Professeur	<b>- UNITE DE VIROLOGIE</b> M. ELOIT Marc, Professeur * Mme LE PODER Sophie, Maître de conférences
<b>-UNITE DE PHYSIOLOGIE ET THERAPEUTIQUE</b> M. BRUGERE Henri, Professeur Mme COMBRISSON Hélène, Professeur* M. TIRET Laurent, Maître de conférences	<b>-DISCIPLINE : PHYSIQUE ET CHIMIE BIOLOGIQUES ET MEDICALES</b> M. MOUTHON Gilbert, Professeur
<b>-UNITE DE PHARMACIE ET TOXICOLOGIE</b> Mme ENRIQUEZ Brigitte, Professeur * M. TISSIER Renaud, Maître de conférences M. PERROT Sébastien, Maître de conférences	<b>-UNITE DE GENETIQUE MEDICALE ET MOLECULAIRE</b> M. PANTHIER Jean-Jacques, Professeur Mlle ABITBOL Marie, Maître de conférences
<b>-UNITE : BIOCHIMIE</b> M. MICHAUX Jean-Michel, Maître de conférences M. BELLIER Sylvain, Maître de conférences	<b>-DISCIPLINE : ETHIOLOGIE</b> M. DEPUTTE Bertrand, Professeur
	<b>-DISCIPLINE : ANGLAIS</b> Mme CONAN Muriel, Ingénieur Professeur agrégé certifié

### **DEPARTEMENT D'ELEVAGE ET DE PATHOLOGIE DES EQUIDES ET DES CARNIVORES (DEPEC)**

**Chef du département : M. POLACK Bruno, Maître de conférences - Adjoint : M. BLOT Stéphane, Maître de conférences**

<b>- UNITE DE MEDECINE</b> M. POUCHELON Jean-Louis, Professeur* Mme CHETBOUL Valérie, Professeur M. BLOT Stéphane, Maître de conférences M. ROSENBERG Charles, Maître de conférences Mme MAUREY Christelle, Maître de conférences	<b>- UNITE DE PATHOLOGIE CHIRURGICALE</b> M. FAYOLLE Pascal, Professeur * M. MAILHAC Jean-Marie, Maître de conférences M. MOISSONNIER Pierre, Professeur Mme VIAUDEAU-DUVAU Véronique, Maître de conférences Mme RAVARY Bérangère, Maître de conférences (rattachée au DPASP) M. ZILBERSTEIN Luca, Maître de conférences contractuel M. HIDALGO Antoine, Maître de conférences contractuel
<b>- UNITE DE CLINIQUE EQUINE</b> M. DENOIX Jean-Marie, Professeur M. AUDIGIE Fabrice, Maître de conférences* Mme MESPOUILIES-RIVIERE Céline, Maître de conférences contractuel Melle PRADIER Sophie, Maître de conférences contractuel	<b>- UNITE DE RADIOLOGIE</b> Mme BEGON Dominique, Professeur* Mme STAMBOULI Fouzia, Maître de conférences contractuel
<b>-UNITE DE REPRODUCTION ANIMALE</b> Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, Maître de conférences* (rattachée au DPASP) M. NUDELmann Nicolas, Maître de conférences M. FONTBONNE Alain, Maître de conférences M. REMY Dominique, Maître de conférences (rattaché au DPASP) M. DESBOIS Christophe, Maître de conférences Mlle CONSTANT Fabienne, Maître de conférences (rattachée au DPASP) Melle DEGUILLAUME Laure, Maître de conférences contractuel (rattachée au DPASP)	<b>- DISCIPLINE : OPHTALMOLOGIE</b> Mlle CHAHORY Sabine, Maître de conférences contractuel
	<b>- UNITE DE PARASITOLOGIE ET MALADIES PARASITAIRES</b> M. CHERMETTE René, Professeur M. POLACK Bruno, Maître de conférences* M. GUILLOT Jacques, Professeur Mme MARIGNAC Geneviève, Maître de conférences contractuel Mlle HALOS Lénaïg, Maître de conférences
	<b>-UNITE DE NUTRITION-ALIMENTATION</b> M. PARAGON Bernard, Professeur * M. GRANDJEAN Dominique, Professeur

### **DEPARTEMENT DES PRODUCTIONS ANIMALES ET DE LA SANTE PUBLIQUE (DPASP)**

**Chef du département : M. MAILLARD Renaud, Maître de conférences - Adjoint : Mme DUFOUR Barbara, Maître de conférences**

<b>-UNITE DES MALADIES CONTAGIEUSES</b> M. BENET Jean-Jacques, Professeur* Mme HADDAD/ HOANG-XUAN Nadia, Maître de conférences Mme DUFOUR Barbara, Maître de conférences	<b>- UNITE DE ZOOTECHNIE, ECONOMIE RURALE</b> M. COURREAU Jean-François, Professeur M. BOSSE Philippe, Professeur Mme GRIMARD-BAILLY Bénédicte, Professeur Mme LEROY Isabelle, Maître de conférences M. ARNE Pascal, Maître de conférences M. PONTER Andrew, Maître de conférences*
<b>-UNITE D'HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS D'ORIGINE ANIMALE</b> M. BOLNOT François, Maître de conférences * M. CARLIER Vincent, Professeur Mme COLMIN Catherine, Maître de conférences M. AUGUSTIN Jean-Christophe, Maître de conférences	<b>- UNITE DE PATHOLOGIE MEDICALE DU BETAIL ET DES ANIMAUX DE BASSE-COUR</b> M. MILLEMANN Yves, Maître de conférences* Mme BRUGERE-PICOUX Jeanne, Professeur (rattachée au DSBP) M. MAILLARD Renaud, Maître de conférences M. ADJOU Karim, Maître de conférences
<b>- DISCIPLINE : BIOSTATISTIQUES</b> M. SANAA Moez, Maître de conférences	

## **Remerciements**

**A monsieur le Professeur**, de la faculté de Médecine de Créteil qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de cette thèse

**A Madame le Docteur Florence Bernex**, de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, directrice de cette thèse, pour la proposition de ce sujet tout d'abord. J'ai découvert là un domaine incroyable : celui de la recherche. C'est là, en lisant tous ces travaux qu'on se rend compte du travail des chercheurs. Merci de m'avoir permis de m'en rendre mieux compte et d'avoir élargi mes connaissances sur ce domaine. Les cellules souches sont je pense, une des découvertes les plus extraordinaires et révolutionnaires de ces dernières années. Merci encore.

**A Monsieur le Docteur Laurent Tiret**, de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, en qualité d'assesseur, pour avoir accepté de travailler avec moi sur cette thèse. Merci pour votre disponibilité malgré un emploi du temps toujours chargé.

**A ma mère**, parce que sans toi je ne serais pas là où j'en suis. Merci de m'avoir accompagnée durant toutes ces années, de m'avoir épaulée dans les bons et les mauvais moments, d'avoir toujours cru en moi. Merci d'avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Merci de m'avoir permis de réaliser mes rêves.

**A mon père**, parce que je suis la même que toi. Merci de m'avoir donné le goût de la médecine et même plus encore de la chirurgie. Merci à toi de m'avoir prise dans tes bras pour visiter le bloc de chirurgie le jour de ma naissance. Et surtout merci d'être mon père tout simplement : je suis fière de toi.

**A mon frère et à ma sœur**, parce que je suis fière de vous et que je vous aimerai toujours.

**A mon ami de toujours, Jessica** : jamais on se séparera. On a grandi ensemble, muri ensemble, et surtout tellement rigolé. Pour tous les souvenirs qu'on a ensemble.

**A mes amis** de galère et de joie, Alexandra, Emilie, Julie, Marion, Alexandre et tous les autres qu'il serait trop long de citer, pour toutes les heures passées en clinique qui me sont parues bien plus courtes en votre présence et toutes les nuits ensemble qui ne me sont pas parues assez longues.... Pour tous ces moments qui ont rythmé notre vie d'étudiante vétérinaire...



## TABLE DES MATIERES

<b>Table des illustrations.....</b>	<b>5</b>
<b>Table des principales abréviations utilisées.....</b>	<b>9</b>
<b>Feuille à détacher sur les principales abréviations utilisées pour faciliter la lecture de la thèse.....</b>	<b>11</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>13</b>
<b>I. Qu'est ce qu'une cellule souche adulte ? .....</b>	<b>15</b>
A. Les propriétés des cellules souches adultes .....	15
1) Une cellule souche est douée d'auto-renouvellement .....	15
2) Les propriétés moléculaires des cellules souches .....	16
a) Une cellule souche est une cellule indifférenciée donc difficilement identifiable .....	16
b) Le concept de reprogrammation .....	20
3) Une confirmation de l'existence de cellule souche à posteriori, après culture in vitro ou injection in vivo .....	20
4) Une cellule souche peut s'engager dans une voie de différenciation et constituer un lignage cellulaire .....	21
5) La cellule souche joue un rôle dans l'homéostasie tissulaire par quiescence et activation .....	22
6) La plasticité des cellules souches .....	23
B. La notion de niche des cellules souches adultes .....	26
C. Culture et manipulation des cellules souches .....	28
1) Culture des cellules souches .....	28
2) Manipulation des cellules souches .....	28
3) Sélection des cellules souches génétiquement modifiées .....	30

<b>II. Des cellules souches dans des organes ou des tissus connus de longue date pour leur propriété de renouvellement : une présence vérifiée puis utilisée chez l'Homme et chez l'animal .....</b>	<b>31</b>
A. Les cellules souches de la moelle osseuse hématopoïétique .....	31
1) Les HSCs .....	31
a) Identification des HSCs .....	33
b) Les niches des HSCs.....	34
c) Le « homing ».....	37
2) Les cellules SP .....	39
3) Les cellules précurseurs des vaisseaux sanguins .....	41
4) Intérêt des cellules souches hématopoïétiques : traitement des troubles sanguins et immunitaires.....	42
5) La plasticité des cellules souches hématopoïétiques .....	43
a) Les HSCs et la réparation du muscle cardiaque .....	43
b) Différenciation des HSCs en cellules musculaires striées squelettiques .....	45
c) Différenciation des HSCs en hépatocytes .....	45
d) Un rôle des cellules SP et des EPCs dans la régénération rénale .....	47
B. Les cellules souches de l'épithélium intestinal.....	47
1) Nature de ces cellules et facteurs de régulation.....	47
2) La niche des cellules souches intestinales .....	49
3) Les ISCs : un rôle dans le renouvellement de l'épithélium intestinal .....	50
C. Les cellules souches de l'épiderme.....	51
1) Structure de l'épiderme et du follicule pileux .....	51
2) Les cellules souches de l'épiderme et leur localisation.....	52
3) La niche des cellules souches de l'épiderme .....	54
4) Intérêts de l'utilisation des cellules souches de l'épiderme .....	56
D. Les cellules souches de l'épithélium pulmonaire .....	57
E. Des cellules souches au niveau de la cornée et de la rétine .....	58
1) Nature de ces cellules souches.....	58
2) Intérêts de l'utilisation de ces cellules .....	61
F. Des cellules souches dans des organes ou des tissus ayant conservé une certaine capacité de renouvellement.....	62

1)	Les cellules souches hépatiques .....	62
a)	Définitions .....	62
b)	Intérêts de l'utilisation de ces cellules.....	63
2)	Les cellules souches musculaires .....	64
a)	Définitions .....	64
b)	La niche des cellules souches musculaires .....	67
c)	Intérêt de ces cellules souches dans le renouvellement du muscle.....	68
3)	Des cellules souches au niveau des reins.....	69
<b>III. Découverte de nouvelles cellules souches adultes dans des organes déjà identifiés comme en contenant et dans des organes où leur présence était beaucoup moins évidente. Nouvelles possibilités thérapeutiques associées.....</b>		<b>73</b>
A.	Une diversification des intérêts thérapeutiques liés à la moelle osseuse.....	73
1)	Découverte de nouvelles cellules souches non hématopoïétiques : les cellules souches stromales.....	73
2)	De nouvelles différenciations .....	75
3)	De nouvelles indications thérapeutiques .....	76
a)	Régénération de l'os, du cartilage, des tendons et du tissu adipeux.....	76
b)	Régénération d'autres tissus et organes distants.....	77
c)	Traitements des déficiences du système immunitaire, sanguin et de la coagulation.....	86
B.	Les cellules souches cardiaques : une présence insoupçonnée mais d'intérêt majeur pour le traitement des infarctus (et autres troubles cardiaques).....	87
1)	Le tissu cardiaque peut se régénérer.....	87
2)	Nature des cellules souches cardiaques .....	88
3)	CSCs et homéostasie cardiaque .....	93
4)	CSCs et réparation cardiaque .....	94
C.	Des cellules souches dans le système nerveux central : une perspective sur le traitement de nombreux troubles nerveux .....	96
1)	La neurogenèse a bien lieu dans le cerveau des mammifères adultes .....	96
2)	Des cellules souches et précurseurs neuraux résident dans le système nerveux central des mammifères adultes .....	97
3)	Les conditions de la neurogenèse dans le système nerveux central .....	102

4) Utilisation des NSCs dans le traitement des maladies nerveuses .....	102
D. Des cellules souches dans le tissu adipeux : une découverte majeure.....	103
1) Nature de ces cellules souches.....	103
2) Intérêts thérapeutiques .....	104
E. L'utilisation des cellules souches dans le traitement du diabète : de nouvelles avancées technologiques.....	106
1) Le diabète : une maladie importante touchant aussi bien l'Homme que l'animal.....	106
2) Les cellules souches du pancréas.....	108
a) Nature de ces cellules .....	108
3) Les cellules souches hépatiques et les cellules souches de l'épithélium intestinal ....	111
4) Les cellules souches de la moelle osseuse .....	111
5) Les cellules souches du tissus adipeux .....	112
F. Dernière découverte sur le traitement de la myopathie de Duchenne chez le Chien : un grand espoir pour la médecine humaine .....	113
<b>Conclusion et perspectives.....</b>	<b>115</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>119</b>

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

<b>Figure 1</b> : Télomères et télomérase (d'après Appendix C: human embryonic stem cells and human embryonic germ cells).....	16
<b>Figure 2</b> : Illustration de la technique d'immunomarquage par un fluorochrome .....	19
<b>Figure 3</b> : Illustration de la technique du FACS (d'après Appendix E: stem cell markers) .....	19
<b>Figure 4</b> : Principe de la division asymétrique.....	21
<b>Figure 5</b> : Hiérarchie cellulaire d'un lignage cellulaire .....	22
<b>Figure 6</b> : Exemple du lignage cellulaire des HSCs (d'après METCALF, 2005) .....	24
<b>Figure 7</b> : Transdifférenciation directe: exemple de la HSC (d'après HERZOG <i>et al.</i> , 2003).....	25
<b>Figure 8</b> : Transdifférenciation indirecte : exemple de la HSC (d'après HERZOG <i>et al.</i> , 2003).....	25
<b>Figure 9</b> : Fusion cellulaire: exemple de la HSC (d'après HERZOG <i>et al.</i> , 2003).....	26
<b>Figure 10</b> : Présence d'une cellule pluripotente vraie (d'après HERZOG <i>et al.</i> , 2003) .....	26
<b>Figure 11</b> : Cibles de la modification génétique des cellules souches (d'après ASAHARA <i>et al.</i> , 2000) .....	29
<b>Figure 12</b> : Preuve de l'existence de précurseurs hématopoïétiques (d'après TILL et MCCULLOCH, 1961) .....	31
<b>Figure 13</b> : Nodules de CFU-S sur une rate de souris après injection de cellules de la moelle osseuse (d'après TILL et MCCULLOCH, 1961) .....	32
<b>Figure 14</b> : Illustration de la niche des HSCs (d'après LI et XIE, 2005).....	35
<b>Figure 15</b> : Composants moléculaires de l'interaction entre les cellules endothéliales des vaisseaux de la moelle osseuse et les HSCs (d'après SACKSTEIN, 2004) .....	38
<b>Figure 16</b> : Migration des HSCs selon un modèle multi-étapes (d'après SACKSTEIN, 2004) .....	39
<b>Figure 17</b> : Tri par FACS des cellules de la moelle osseuse de souris par addition du colorant de Hoechst (d'après CHALLEN et LITTLE, 2006) .....	40
<b>Figure 18</b> : Schéma possible du lien entre les HSCs et les EPCs chez l'embryon puis chez l'adulte (d'après KUBO et ALITALO, 2003) .....	41
<b>Figure 19</b> : Représentation schématique de la réparation du myocarde, basée sur les cellules souches (d'après LIAO <i>et al.</i> , 2007) .....	44
<b>Figure 20</b> : Structure histologique cellulaire de l'épithélium des villosités et des cryptes de l'intestin grêle (d'après RIZVI et WONG, 2005) .....	48
<b>Figure 21</b> : Modèle du réseau de communication définissant la niche des ISCs et régulant le gradient de prolifération et de différenciation (d'après RIZVI et WONG, 2005) .....	50
<b>Figure 22</b> : Peau et couches de l'épiderme .....	51

<b>Figure 23</b> : Cycle du follicule pileux (d'après SINCLAIR, 1998).....	52
<b>Figure 24</b> : Localisation des cellules souches de la peau (d'après RIZVI et WONG, 2005) .....	53
<b>Figure 25</b> : Illustration de la niche des cellules souches épidermiques (d'après LI et XIE, 2005) .....	54
<b>Figure 26</b> : Schéma des EPUs de l'épiderme chez l'Homme (d'après GHAZIZADEH et TAICHMAN, 2005).....	55
<b>Figure 27</b> : Greffe d'épiderme issue de KSCs génétiquement modifiées pour le traitement d'une épidermolyse bulleuse chez l'Homme (d'après MEZEY, 2000).....	56
<b>Figure 28</b> : Composition de la niche des BASCs de l'épithélium broncho-alvéolaire (d'après ENGELHARDT, 2001) .....	58
<b>Figure 29</b> : Structure de la partie antérieure d'un œil de Souris (d'après PAJOOHESH-GANJI et STEPP, 2005).....	59
<b>Figure 30</b> : Niche limbique des CESCs chez la Souris (d'après PAJOOHESH-GANJI et STEPP, 2005).....	59
<b>Figure 31</b> : Division asymétrique des CESCs et obtention de cellules TA puis de cellules différencierées (d'après PAJOOHESH-GANJI et STEPP, 2005) .....	60
<b>Figure 32</b> : Représentation schématique de l'origine possible des cellules ovales hépatiques et de leur différenciation (d'après WALKUP et GERBER, 2006).....	63
<b>Figure 33</b> : Différenciation des SCs et variation de leurs marqueurs au cours de leur différenciation (d'après ZAMMIT <i>et al.</i> , 2006) .....	65
<b>Figure 34</b> : Différenciation des SCs lors d'une lésion musculaire (d'après HAWKE et GARRY, 2001) .....	65
<b>Figure 35</b> : Localisation des SCs et modifications morphologiques lors de leur activation (d'après HAWKE et GARRY, 2001) .....	66
<b>Figure 36</b> : Niche périvasculaire des SCs (d'après CHRISTOV <i>et al.</i> , 2007).....	68
<b>Figure 37</b> : Illustration des mécanismes possibles de réparation d'une lésion rénale par les cellules différencierées des tubules rénaux et par les cellules souches rénales et extra-rénales (d'après CANTLEY, 2005) .....	70
<b>Figure 38</b> : Cellules retenant le BrdU dans le rein chez un rat de 2 mois (d'après OLIVER <i>et al.</i> , 2003) .....	71
<b>Figure 39</b> : Modèle de la niche des MSCs (d'après KOLF <i>et al.</i> , 2007) .....	74
<b>Figure 40</b> : Application de MSCs sur une plaie chez l'Homme à l'aide du spray de fibrine (d'après FALANGA <i>et al.</i> , 2007).....	78
<b>Figure 41</b> : Possibles rôles des cellules souches de la moelle osseuse dans la régénération rénale après une lésion (d'après CANTLEY, 2005).....	84

<b>Figure 42</b> : CSCs, niche et renouvellement du myocarde (d'après ANVERSA <i>et al.</i> , 2006) .....	88
<b>Figure 43</b> : Hiérarchie et différenciation des CSCs (d'après ANVERSA <i>et al.</i> , 2006) .....	89
<b>Figure 44</b> : Cardiosphères humains de 25 jours, 12 jours après la collection de CSCs (d'après BARILE <i>et al.</i> , 2007).....	92
<b>Figure 45</b> : Illustration de la neurogenèse dans le cerveau adulte des mammifères (d'après TAUPIN, 2006b).....	97
<b>Figure 46</b> : Différenciations des NSCs .....	98
<b>Figure 47</b> : Neuroosphère humaine (d'après TARASENKO <i>et al.</i> , 2004) .....	99
<b>Figure 48</b> : Illustration de la niche des NSCs (d'après LI et XIE, 2005).....	101
<b>Figure 49</b> : Physiopathologie de l'hyperglycémie et de l'augmentation des acides gras dans les diabètes de type 2 chez l'Homme (d'après STUMVOLL <i>et al.</i> , 2005).....	107
<b>Figure 50</b> : Illustration des différents moyens d'obtention de cellules $\beta$ du pancréas (d'après SORIA <i>et al.</i> , 2005) .....	110
<b>Figure 51</b> : Coupe histologique d'une biopsie de muscle tibial crânial chez un des chiens GRMD (d'après BLOT <i>et al.</i> , 2006).....	114
<b>Figure 52</b> : Coupe histologique d'une biopsie du même muscle après traitement avec les mésoangioblastes chez le même chien (d'après BLOT <i>et al.</i> , 2006).....	114



## TABLES DES PRINCIPALES ABREVIATIONS UTILISEES

ADSC: <i>adipose-tissue derived stromal cell</i>	GDF-11: <i>growth differentiation factor 11</i>
ANG: <i>angiopoietin</i>	GFAP: <i>glial fibrillary acidic protein</i>
$\alpha$ FP: <i><math>\alpha</math>-fetoprotein</i>	GFP : <i>green fluorescent protein</i>
ARF: <i>acute renal failure</i>	GLP-1: <i>glucagon like peptide 1</i>
BASC: <i>bronchioalveolar stem cell</i>	GM-CSF: <i>granulocyte and macrophage-colony stimulating factor</i>
BCL-2: <i>B cell lymphoma-2</i>	GPC : <i>glial progenitor cell</i>
BDNF: <i>brain derived neurotrophic factor</i>	GRMD: <i>golden retriever muscular dystrophy</i>
BMP: <i>bone morphogenic protein</i>	HCELL: <i>hematopoietic cell E-/L-selectin ligand</i>
BMSC: <i>bone marrow stromal cell</i>	HGF : <i>hepatocyte growth factor</i>
BrdU: <i>Bromodeoxyuridine</i>	HIF-1 $\alpha$ : <i>hypoxia inducible factor-1<math>\alpha</math></i>
$\beta$ -gal: <i><math>\beta</math>-galactosidase</i>	HOC: <i>hepatic oval cell</i>
CD: <i>cluster differentiation</i>	HSC: <i>hematopoietic stem cell</i>
CDC: <i>cardiosphere-derived cell</i>	IGF: <i>insulin growth factor</i>
CESC: <i>corneal epithelial stem cell</i>	IHH: <i>intestinal hedgehog</i>
CFU-S: <i>colony forming unit in spleen</i>	IL: <i>interleukine</i>
CK: <i>cytokeratin</i>	IMSC: <i>interstitial multipotent stem cell</i>
CPg: <i>cardiac progenitor</i>	IPF-1: <i>insulin promoter factor-1</i>
CRF: <i>chronic renal failure</i>	ISC: <i>intestinal stem cell</i>
CSC: <i>cardiac stem cell</i>	ISL-1: <i>insulin-1</i>
CSp : <i>cardiosphere</i>	KLF-4 : <i>kruppel like factor-4</i>
CXCR4: <i>CX chemokine receptor 4</i>	KGF: <i>keratinocyte growth factor</i>
DG: <i>dental gyrus</i>	KSC: <i>keratinocyte stem cell</i>
EC: <i>endothelial cell</i>	KTLS: <i>KIT+ THY-/Low SCA+</i>
EGF : <i>epidermal growth factor</i>	LFA-1: <i>lymphocyte factor A</i>
eNSC: <i>epidermal neural crest stem cell</i>	LIF: <i>leukaemia inhibitory factor</i>
EPC: <i>endothelial progenitor cell</i>	LIN: <i>lineage</i>
EPg: <i>endothelium progenitor</i>	MAPC : <i>multipotent adult progenitor cell</i>
EP: <i>endothelium precursor</i>	MCP: <i>monocyte chemotactic protein</i>
EPO : <i>erythropoietin</i>	M-CSF: <i>macrophage-colony stimulating factor</i>
EPU: <i>epidermal proliferative unit</i>	MDR-1: <i>multidrug resistance-1</i>
ES: <i>embryonic stem</i>	MEF-2: <i>myocytes enhancing factor 2</i>
ESC : <i>epithelial stem cell</i>	MIAMI: <i>marrow-isolated adult multilineage inducible</i>
FACS : <i>fluorescence activated cell sorting</i>	MPC : <i>mesodermal progenitor cell</i>
FGF: <i>fibroblast growth factor</i>	MPg: <i>myocyte progenitor</i>
FISH : <i>fluorescence in situ hybridization</i>	MP: <i>myocytes precursor</i>
FOXA-2: <i>forkhead box A2</i>	MSC: <i>mesenchymal stem cell</i>
GATA-4: <i>GATA binding protein 4</i>	
G-CSF : <i>granulocyte-colony stimulating factor</i>	

MYOD: <i>myogenic differentiation</i>	SGZ: <i>subgranular zone</i>
MYOR: <i>myogenic repressor</i>	SHH : <i>sonic hedgehog</i>
N-CAM: <i>neural cell adhesion molecule</i>	SMC: <i>smooth muscle cell</i>
NGF: <i>nerve growth factor</i>	SMPg: <i>smooth muscle progenitor</i>
NGN-3: <i>neurogenin 3</i>	SMP: <i>smooth muscle precursor</i>
NOD: <i>non obese diabetic</i>	SNO: <i>spindle-shaped N-cadherin-positive osteoblastic</i>
NPC: <i>neural progenitor cell</i>	SOX-2: <i>sex determining region Y-box 2</i>
NSC: <i>neural stem cell</i>	SP: <i>side population</i>
OPC: <i>oligodendrocyte progenitor cell</i>	SVZ: <i>subventricular zone</i>
OCT-4: <i>octamer-4</i>	STRO-1 : <i>stromal-1</i>
PAX-6: <i>paired box-6</i>	STZ : <i>streptozotocine</i>
PBSC: <i>peripheral-blood stem cell</i>	TA: <i>transient amplifying</i>
PDGF: <i>platelet-derived growth factor</i>	TEF-1: <i>translational elongation factor 1</i>
PDX-1: <i>pancreas duodenum homeobox-1</i>	TGF- $\beta$ : <i>transforming growth factor-<math>\beta</math></i>
PGF: <i>placental growth factor</i>	TNF: <i>tumoral necrosis factor</i>
PMP: <i>pancreas-derived multipotential precursor</i>	VCAM-1: <i>vascular cell adhesion molecule</i>
RMS: <i>rostro migratory stream</i>	VEGF: <i>vascular endothelial growth factor</i>
RSC: <i>retinal stem cell</i>	VLA-4: <i>very late antigen-4</i>
SC: <i>satellite cell</i>	X-gal: <i>5-bromo-4-chloro-3-indolyl-<math>\beta</math>-galactopyranoside</i>
SCA-1: <i>spinocerebellar ataxia-1</i>	
SCF: <i>stem cell factor</i>	
SDF-1: <i>stromal derived factor-1</i>	



## FEUILLE A DETACHER SUR LES PRINCIPALES ABREVIATIONS UTILISEES AFIN DE FACILITER LA LECTURE DE LA THESE

ADSC: <i>adipose-tissue derived stromal cell</i>	GATA-4: <i>GATA binding protein 4</i>
ANG: <i>angiopoietin</i>	G-CSF : <i>granulocyte-colony stimulating factor</i>
αFP: <i>α-fetoprotein</i>	GDF-11: <i>growth differentiation factor 11</i>
ARF: <i>acute renal failure</i>	GFAP: <i>glial fibrillary acidic protein</i>
BASC: <i>bronchioalveolar stem cell</i>	GFP : <i>green fluorescent protein</i>
BCL-2: <i>B cell lymphoma-2</i>	GLP-1: <i>glucagon like peptide 1</i>
BDNF: <i>brain derived neurotrophic factor</i>	GM-CSF: <i>granulocyte and macrophage-colony stimulating factor</i>
BMP: <i>bone morphogenic protein</i>	GPC : <i>glial progenitor cell</i>
BMSC: <i>bone marrow stromal cell</i>	GRMD: <i>golden retriever muscular dystrophy</i>
BrdU: <i>Bromodeoxyuridine</i>	HCELL: <i>hematopoietic cell E-/L-selectin ligand</i>
β-gal: <i>β-galactosidase</i>	HGF : <i>hepatocyte growth factor</i>
CD: <i>cluster differentiation</i>	HIF-1α: <i>hypoxia inducible factor-1α</i>
CDC: <i>cardiosphere-derived cell</i>	HOC: <i>hepatic oval cell</i>
CESC: <i>corneal epithelial stem cell</i>	HSC: <i>hematopoietic stem cell</i>
CFU-S: <i>colony forming unit in spleen</i>	IGF: <i>insulin growth factor</i>
CK: <i>cytokeratin</i>	IHH: <i>intestinal hedgehog</i>
CPg: <i>cardiac progenitor</i>	IL: <i>interleukine</i>
CRF: <i>chronic renal failure</i>	IMSC: <i>interstitial multipotent stem cell</i>
CSC: <i>cardiac stem cell</i>	IPF-1: <i>insulin promoter factor-1</i>
CSp : <i>cardiosphere</i>	ISC: <i>intestinal stem cell</i>
CXCR4: <i>CX chemokine receptor 4</i>	ISL-1: <i>insulin-1</i>
DG: <i>dental gyrus</i>	KLF-4 : <i>kruppel like factor-4</i>
EC: <i>endothelial cell</i>	KGF: <i>keratinocyte growth factor</i>
EGF : <i>epidermal growth factor</i>	KSC: <i>keratinocyte stem cell</i>
eNSC: <i>epidermal neural crest stem cell</i>	KTLS: <i>KIT+ THY-/Low SCA+</i>
EPC: <i>endothelial progenitor cell</i>	LFA-1: <i>lymphocyte factor A</i>
EPg: <i>endothelium progenitor</i>	LIF: <i>leukaemia inhibitory factor</i>
EP: <i>endothelium precursor</i>	LIN: <i>lineage</i>
EPO : <i>erythropoietin</i>	MAPC : <i>multipotent adult progenitor cell</i>
EPU: <i>epidermal proliferative unit</i>	MCP: <i>monocyte chemotactic protein</i>
ES: <i>embryonic stem</i>	M-CSF: <i>macrophage-colony stimulating factor</i>
ESC : <i>epithelial stem cell</i>	MDR-1: <i>multidrug resistance-1</i>
FACS : <i>fluorescence activated cell sorting</i>	MEF-2: <i>myocytes enhancing factor 2</i>
FGF: <i>fibroblast growth factor</i>	MIAMI: <i>marrow-isolated adult multilineage inducible</i>
FISH : <i>fluorescence in situ hybridization</i>	
FOXA-2: <i>Forkhead box A2</i>	

MPC : <i>mesodermal progenitor cell</i>	SCA-1: <i>spinocerebellar ataxia-1</i>
MPg: <i>myocyte progenitor</i>	SCF: <i>stem cell factor</i>
MP: <i>myocytes precursor</i>	SDF-1: <i>stromal derived factor-1</i>
MSC: <i>mesenchymal stem cell</i>	SGZ: <i>subgranular zone</i>
MYOD: <i>myogenic differentiation</i>	SHH : <i>sonic hedgehog</i>
MYOR: <i>myogenic repressor</i>	SMC: <i>smooth muscle cell</i>
N-CAM: <i>neural cell adhesion molecule</i>	SMPg: <i>smooth muscle progenitor</i>
NGF: <i>nerve growth factor</i>	SMP: <i>smooth muscle precursor</i>
NGN-3: <i>neurogenin 3</i>	SNO: <i>spindle-shaped N-cadherin-positive osteoblastic</i>
NOD: <i>non obese diabetic</i>	SOX-2: <i>sex determining region Y-box 2</i>
NPC: <i>neural progenitor cell</i>	SP: <i>side population</i>
NSC: <i>neural stem cell</i>	SVZ: <i>subventricular zone</i>
OPC: <i>oligodendrocyte progenitor cell</i>	STRO-1 : <i>stromal-1</i>
OCT-4: <i>octamer-4</i>	STZ : <i>streptozotocine</i>
PAX-6: <i>paired box-6</i>	TA: <i>transient amplifying</i>
PBSC: <i>peripheral-blood stem cell</i>	TEF-1: <i>translational elongation factor 1</i>
PDGF: <i>platelet-derived growth factor</i>	TGF- $\beta$ : <i>transforming growth factor-<math>\beta</math></i>
PDX-1: <i>pancreas duodenum homeobox-1</i>	TNF: <i>tumoral necrosis factor</i>
PGF: <i>placental growth factor</i>	VCAM-1: <i>vascular cell adhesion molecule</i>
PMP: <i>pancreas-derived multipotential precursor</i>	VEGF: <i>vascular endothelial growth factor</i>
RMS: <i>rostro migratory stream</i>	VLA-4: <i>very late antigen-4</i>
RSC: <i>retinal stem cell</i>	X-gal: <i>5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-galactopyranoside</i>
SC: <i>satellite cell</i>	

## INTRODUCTION

L'enthousiasme et les controverses au sujet des cellules souches sont liés à deux découvertes : le **clonage** de la brebis Dolly par WILMUT *et al.* (1997) et l'établissement de cellules embryonnaires souches **humaines** par THOMSON *et al.* (1998).

Depuis, les cellules embryonnaires souches (*embryonic stem cells* ou cellules ES) sont un **grand sujet d'actualité** et sont dans la ligne de mire des médias. En effet, l'utilisation de ces cellules pose un problème éthique majeur en médecine humaine : elles sont prélevées chez un embryon. Or, l'embryon peut être considéré comme un être humain à part entière : manipuler un embryon revient à manipuler une vie humaine. Les chercheurs se sont donc retrouvés face à une opinion publique défavorable, mettant de ce fait un frein à leurs recherches.

Cependant, les travaux sur les modèles animaux ont continué. Les **modèles animaux** peuvent être, parmi les mammifères, le Rat, la Souris, mais aussi le Chien. Ce sont des modèles permettant l'étude de données de référence sur la biologie ou le comportement, ou chez lesquels on peut étudier un processus pathologique spontané ou induit, celui-ci ayant un ou plusieurs aspects communs avec un phénomène équivalent chez l'humain ou d'autres espèces animales. Ils sont ainsi utilisés car potentiellement porteurs de maladies ressemblant très fortement à celles de l'Homme et permettent donc d'étudier l'intérêt des cellules souches dans le traitement de ces maladies.

Les cellules souches sont de deux types : embryonnaires et adultes. Elles ont dans tous les cas, trois importantes caractéristiques les différenciant des autres types de cellules : premièrement, ce sont des cellules **indifférenciées** ; deuxièmement, elles sont capables de **s'auto-renouveler** pendant de longues périodes au travers de nombreuses divisions cellulaires et troisièmement, sous certaines conditions physiologiques ou expérimentales, elles peuvent se transformer en cellules spécialisées c'est-à-dire entrer dans une voie de **différenciation** ceci dans un ou plusieurs lignages cellulaires (FORTIER, 2005).

Il existe différents stades de cellules souches. Les cellules souches **totipotentes** sont capables de reconstruire seules un organisme entier. Les cellules souches **pluripotentes** sont capables de former plusieurs lignages cellulaires des trois feuillets embryonnaires : l'ectoderme, l'endoderme et le mésoderme. Les cellules souches **multipotentes** ne peuvent donner qu'un nombre restreint de lignages cellulaires (FORTIER, 2005). Les cellules souches **unipotentes** ne peuvent donner qu'un seul type cellulaire.

Les cellules **embryonnaires** souches sont des cellules souches **pluripotentes** et sont dérivées d'un groupe de cellules situé dans la masse cellulaire interne du blastocyste (embryon de 3,5 jours post-fécondation chez la Souris) (LI et XIE, 2005). Le fait qu'elles soient pluripotentes leur donne un intérêt majeur : on peut obtenir des lignages cellulaires des trois feuillets embryonnaires à savoir le mésoderme, l'endoderme et l'ectoderme. Elles ne donnent pas, par exemple, les cellules du trophectoderme. Leurs inconvénients les plus importants sont (1) qu'elles entraînent une réaction de rejet ne pouvant être contournée que par l'utilisation à vie de médicaments immunosuppresseurs

(TAUPIN, 2006a) : en effet, ces cellules peuvent entrer dans la voie de différenciation, par exemple en cellules pancréatiques endocrines, et créer une réaction de rejet lorsqu'elles sont injectées chez un individu adulte ; et (2) elles se trouvent en quantité insuffisante dans l'embryon pour leur utilisation en thérapeutique (BACHOUD-LEVI *et al.*, 2006).

Les cellules souches **adultes** sont des cellules que l'on retrouve dans des tissus adultes, c'est-à-dire après la naissance. Elles ont la capacité de s'auto-renouveler et de générer des cellules fonctionnelles différencierées afin de remplacer les cellules perdues au cours de la vie (LI et XIE, 2005). Elles appartiennent généralement à un **lignage cellulaire** particulier. Par exemple, les cellules souches hématopoïétiques (*hematopoietic stem cells* ou HSCs) sont à l'origine du lignage des cellules myéloïdes et lymphoïdes. Les cellules souches chez l'adulte sont donc plus limitées dans leur différenciation, de part leur tissu d'origine, que les cellules embryonnaires souches. Cependant, il semblerait qu'elles possèdent, en réalité, une certaine plasticité, c'est-à-dire une capacité à donner d'autres lignages cellulaires que leur lignage d'origine, ce qui augmenterait leur intérêt dans la thérapie cellulaire (FORTIER, 2005). Les cellules souches adultes sont en nombre restreint par lignage cellulaire dans les tissus adultes et les méthodes pour leur expansion *in vitro* sont, à l'heure actuelle, difficiles. Elles possèdent, cependant, un avantage majeur : il est possible de les prélever chez le patient à traiter, de les faire croître *in vitro*, de les manipuler génétiquement et de les conserver dans des banques sous forme congelées. Il est alors possible de les réinjecter au même patient : ce mode dit de greffe « **autologue** » n'entraîne pas de rejet par le système immunitaire (FIEGEL *et al.*, 2006).

Cette étude a pour but de **rassembler** ce qui est connu sur les cellules souches chez l'adulte. Elle ne se veut pas exhaustive pour autant. Les cellules souches adultes sont donc envisagées dans un premier temps selon leur définition, leurs marqueurs et leurs propriétés, puis sous un angle thérapeutique, ceci pour chaque type de cellules souches étudié. Actuellement, la caractérisation et l'évaluation thérapeutique des cellules souches adultes se fait chez l'**Homme** mais surtout sur des modèles animaux comme le **Rat**, la **Souris**, le Porc, le Cheval et le **Chien**. Leurs définitions et leurs marqueurs sont donc quasiment tout le temps liés à ceux trouvés dans ces espèces. Une extrapolation des données obtenues est totalement possible vers la médecine vétérinaire. Il sera bien sûr fait, dès que possible, référence à des études menées sur le Chien.

## **I. Qu'est ce qu'une cellule souche adulte ?**

### **A. Les propriétés des cellules souches adultes**

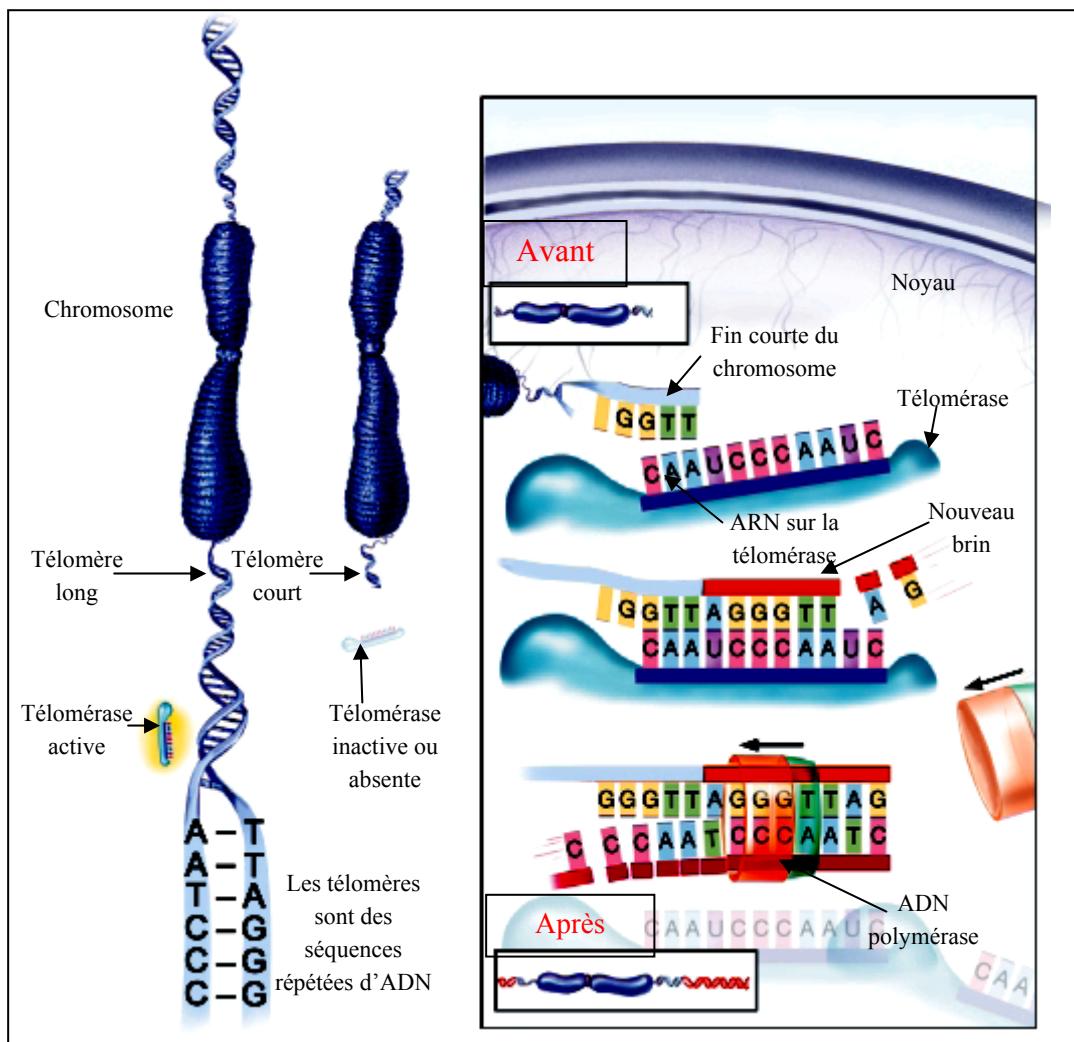
#### **1) Une cellule souche est douée d'auto-renouvellement**

Les cellules souches sont définies comme ayant une capacité d'**auto-renouvellement**, c'est-à-dire qu'elles sont capables de subir des divisions **symétriques** au travers desquelles la population originelle de cellules souches est maintenue. Les divisions symétriques impliquent que les cellules filles conservent les caractéristiques propres d'une cellule souche (ULLOA-MONTOYA *et al.*, 2005).

Les cellules souches sont capables de s'auto-renouveler pendant de **très longue période**. Il reste encore à comprendre pourquoi elles conservent aussi longtemps leur capacité d'auto-renouvellement. En effet, à chaque fois que le génome se réplique, il y a des **erreurs** dans l'ADN (acide désoxyribonucléique). Les cellules souches des mammifères possèdent des mécanismes de surveillance qui détectent les erreurs de réPLICATION et éliminent les cellules dans lesquelles apparaissent ces erreurs. Il y aurait intervention de la **protéine p53** bien connue pour son rôle de facteur anti-tumoral et pro-apoptotique, et de la protéine **Rb**, elle aussi facteur anti-tumoral. Ce mécanisme éviterait ainsi la formation de tumeur par mutation d'une cellule souche et prolifération de cette cellule mutée (MORRISON et SPRADLING, 2008).

Les cellules souches possèdent enfin une **capacité unique** à protéger les télomères de leurs chromosomes. En effet, toutes les cellules souches expriment le **marqueur de la télomérase** qui est **spécifique** de ces cellules (Figure 1). La télomérase est une enzyme qui évite qu'à chaque division cellulaire, le télomère, correspondant à l'extrémité du chromosome ne soit pas répliqué et soit alors perdu. Cela permet donc de maintenir le génome au complet (ASAHARA *et al.*, 2000).

**Figure 1 : Télomères et télomérase (d'après Appendix C: human embryonic stem cells and human embryonic germ cells)**



## 2) Les propriétés moléculaires des cellules souches

### a) Une cellule souche est une cellule indifférenciée donc difficilement identifiable

Les cellules souches sont des **cellules indifférenciées**. Cela veut dire qu'elles ne possèdent pas les marqueurs de leur lignage cellulaire. Ceci pose de nombreux problèmes quant à leur **reconnaissance** in vivo et in vitro.

Pour pouvoir isoler une cellule souche d'un tissu, il faut pouvoir l'**identifier** tout en la maintenant en vie. Or, ceci est loin d'être facile à réaliser. Les chercheurs utilisent la plupart du temps trois méthodes : (1) marquer les cellules dans un tissu vivant avec des **marqueurs moléculaires** puis déterminer à quels types de cellules elles donnent naissance ; (2) éliminer certaines cellules souches d'un organisme vivant, les marquer en culture puis les **transplanter** dans

un autre animal pour déterminer si ces cellules recolonisent leur tissu d'origine ; (3) isoler les cellules souches et les manipuler à l'aide de **facteurs de croissances** ou de **nouveaux gènes**, pour déterminer quel genre de cellules différencieront on obtient.

## **1. Identification in vivo**

Le marquage des cellules **in vivo** est encore de nos jours extrêmement délicat et représente un obstacle à l'utilisation des cellules souches (MORRISON et SPRADLING, 2008).

Certaines des propriétés des cellules souches ont donc préférentiellement été utilisées chez la Souris, pour les marquer. Ainsi, la propension qu'ont ces cellules à retenir le **Bromodéoxyuridine (BrdU)** est lié à une tendance inattendue qu'ont les cellules souches à se diviser plus lentement que leurs descendants. Ces méthodes se sont cependant montrées moins sûres que l'utilisation de marqueurs cellulaires (MORRISON et SPRADLING, 2008).

Il est également possible d'utiliser la technique du « **fate-mapping** » pour localiser et ainsi déterminer l'origine et le devenir des cellules souches chez des souris transgéniques. Cette technique vise à marquer les cellules d'intérêt au sein d'un embryon et à suivre leur migration au cours du développement embryonnaire (LI et XIE, 2005). De cette façon, il est possible de tracer le devenir d'une cellule souche au sein d'un organisme et ainsi d'identifier les lignages cellulaires qui en dérivent.

Pour suivre les cellules souches d'un donneur chez un receveur et ainsi les identifier, on utilise généralement, chez la Souris, des individus **differents** génétiquement ou phénotypiquement. C'est ce qui est utilisé le plus souvent pour suivre les cellules souches de la moelle osseuse hématopoïétique lors de greffe de moelle (HERZOG *et al.*, 2003). Le plus utilisé à l'heure actuelle est la transplantation de deux souris de sexes différents: il s'agit de la **transplantation de mâle à femelle**. Le chromosome **Y** sert alors de marqueur. Il reste malgré tout difficile de marquer et de révéler par FISH (*fluorescence in situ hybridization*) le chromosome Y sur des petits morceaux de tissus, la quantité de chromosomes étant alors négligeable. Il est possible d'obtenir de faux positifs par superposition cellulaire ou par attachement non spécifique (HERZOG *et al.*, 2003).

Pour identifier les cellules souches cibles, on utilise donc des marqueurs : un bon marqueur doit avoir les propriétés suivantes : l'expression du marqueur doit être **originalement absente** des cellules à marquer, **génétiquement transmissible**, et facilement **détectable** *in situ* (BAGNIS *et al.*, 1999).

Dans un contexte de transplantation de cellules **autologues**, différencier les cellules souches transplantées des cellules souches résidantes est impossible sans l'utilisation de marqueurs capables de **discriminer** les deux types de cellules. Cela nécessite de développer des stratégies de marquage sûres, efficaces et relativement faciles d'emploi.

L'injection de **marqueurs chimiques** non toxiques a largement été utilisée pour étudier le développement embryonnaire chez les animaux ; cependant, la fluorescéine conjuguée à un

dodécapeptide, la rhodamine conjuguée au dextran ou encore la peroxydase issue du raifort se diluent au fur et à mesure des divisions cellulaires (BAGNIS *et al.*, 1999).

L'utilisation d'un **rétrovirus défectueux** est très intéressante car c'est un vecteur naturel qui est capable de s'intégrer dans le génome d'une cellule. Cela permet la détection du provirus dans la descendance des cellules génétiquement modifiées. Mais la détection *in situ* d'un très petit nombre de cellules reste difficile (BAGNIS *et al.*, 1999). Un avantage certain de l'utilisation d'un rétrovirus est que son expression démontre que les cellules transplantées sont bien **fonctionnelles** dans le nouvel organisme (CARTER *et al.*, 1992 ; HERZOG *et al.*, 2003 ; KIEM *et al.*, 1994).

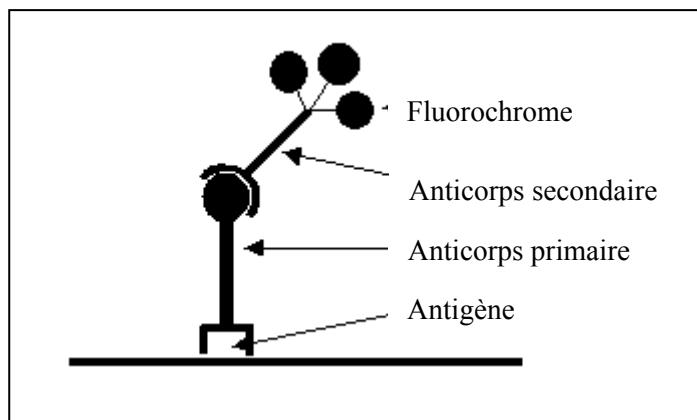
Il est également possible d'utiliser un **transgène** comme marqueur. Le plus souvent, on utilise le gène codant pour la **béta-galactosidase ( $\beta$ -GAL)** ou pour la **protéine fluorescente verte (green fluorescent protein ou GFP)** (HERZOG *et al.*, 2003). La GFP est une protéine isolée de la méduse *Aequorea Victoria* et qui fluoresce en vert lorsqu'elle est exposée à une lumière bleue (CHUDAKOV *et al.*, 2005). Les chercheurs sont capables de créer des souris génétiquement modifiées exprimant dans toutes leurs cellules la GFP. Il suffit de transplanter les cellules du donneur GFP+ qui nous intéressent chez une souris normale : on observe ensuite les cellules du donneur grâce à l'émission de la fluorescence verte de la GFP.

## **2. Identification *in vitro***

Les **marqueurs cellulaires** spécifiques des cellules souches n'ont pas été déterminés pour tous les lignages cellulaires et leur utilisation reste encore difficile. En effet, il est nécessaire que ces marqueurs soient spécifiques : il faut pouvoir distinguer les cellules souches de leurs cellules filles et des cellules différenciées du tissu environnant. Le marqueur doit pour cela être spécifique du **stade indifférencié** de la cellule souche. Il est malheureusement impossible de n'obtenir qu'un seul type de marqueur : on utilise donc le plus souvent des combinaisons de marqueurs. Il se pose de plus un autre problème qui est la **variation** des marqueurs d'une cellule souche au cours du temps suivant son environnement, le comportement des cellules voisines et son stade (quiescente ou activée) (MORRISON et SPRADLING, 2008).

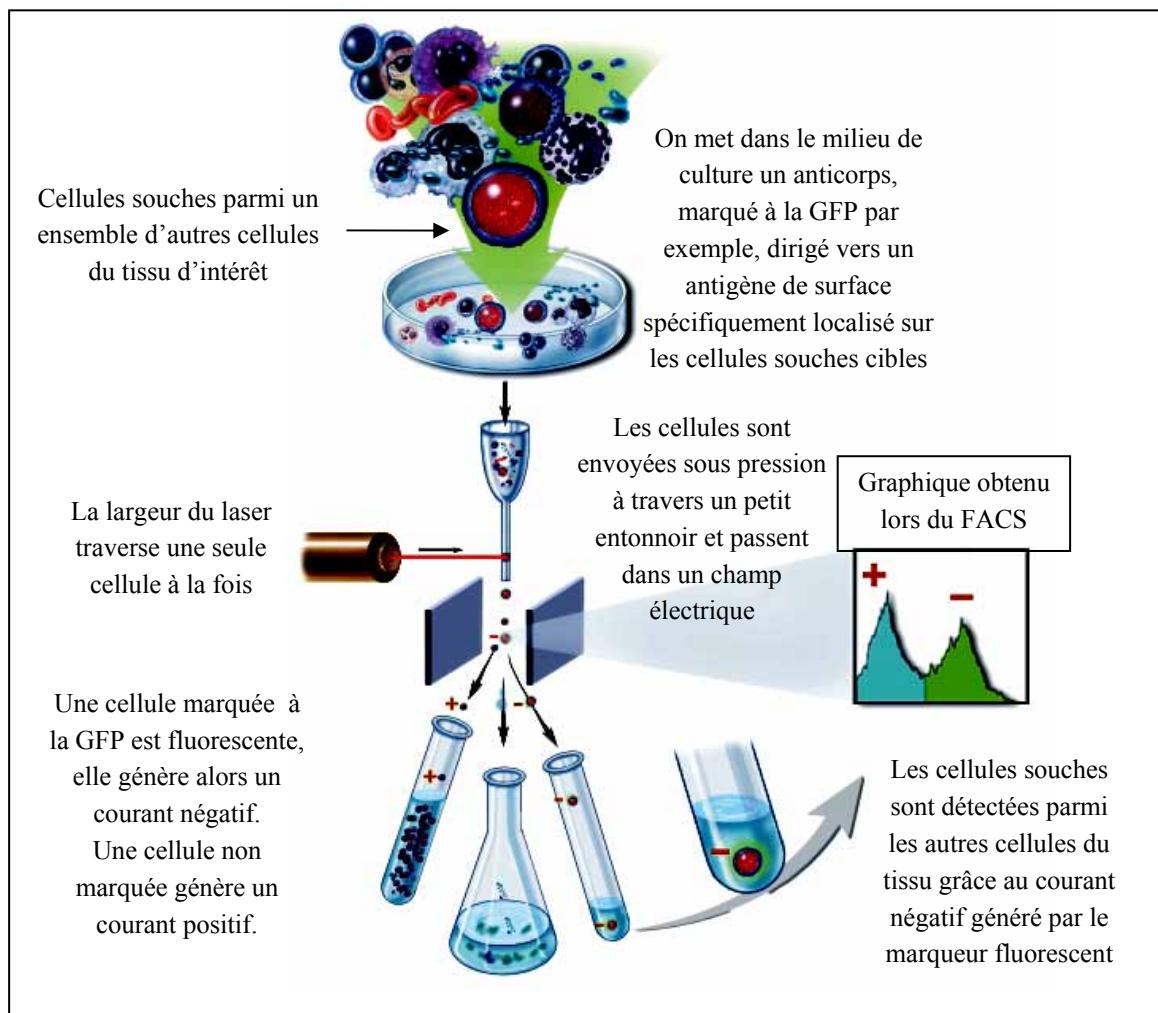
A partir de ces marqueurs, les chercheurs utilisent l'**immunomarquage**. Le principe de cette technique est de mettre les cellules prélevées chez un animal en contact avec un premier anticorps dit anticorps primaire, spécifique de l'antigène de la cellule d'intérêt; puis de révéler cet anticorps en utilisant un anticorps dit secondaire, issu d'un animal d'une autre espèce. L'anticorps secondaire, qui est l'anticorps marqué, reconnaît spécifiquement l'anticorps primaire comme étranger et se fixe donc sur lui (Figure 2).

**Figure 2 : Illustration de la technique d'immunomarquage par un fluorochrome**



Le marqueur porté par l'anticorps doit ensuite être révélé : les chercheurs utilisent soit la fluorescence : on parle **d'isolement cellulaire par fluorescence active** (*fluorescence activated cell sorting ou FACS*) (Figure 3); soit des technologies de **séparation magnétique**.

**Figure 3 : Illustration de la technique du FACS (d'après Appendix E: stem cell markers)**



Ces méthodes sont faciles à mettre en place quand les cellules souches sont en suspension comme les HSCs. Lorsque les cellules proviennent d'un tissu, il faut d'abord les extraire, en utilisant par exemple un traitement à la protéase : les cellules souches sont alors isolées des cellules voisines et de la matrice extra-cellulaire (FORTIER, 2005).

### b) Le concept de reprogrammation

Jusqu'à très récemment, la possibilité qu'une cellule souche puisse dériver d'une cellule somatique était tout simplement impensable : le mécanisme d'engagement dans une voie de différenciation ne fonctionnait conceptuellement qu'à sens unique. Grâce à une série d'expériences remarquables, l'équipe des Prs. JAENISCH et MIKKELSEN a pourtant fait tomber le dogme, tout du moins pour des cellules issues d'un embryon de Souris (MIKKELSEN *et al.*, 2008). Ainsi, il a été montré chez la Souris que l'expression ectopique des quatre facteurs de transcription OCT-4 (*octamer-4*), SOX-2 (*sex determining region Y-box 2*), KLF-4 (*kruppel like factor-4*) et C-MYC dans un fibroblaste lui confère une identité de cellule pluripotente. Cette reprogrammation nécessite quelques semaines et met en jeu des mécanismes moléculaires complexes.

Bien qu'elles expriment certains gènes propres aux cellules souches, ces cellules ne se sont pourtant pas complètement reprogrammées en cellules souches. Il semble y avoir trois raisons principales à cela : (1) les cellules pourraient activer certains gènes bloquant leur prolifération en réponse au stress cellulaire; (2) elles n'arriveraient pas à activer ou réprimer les facteurs de transcription spécifiques des cellules souches et resteraient ainsi bloquées à un stade non totalement indifférencié ; (3) elles semblent ne pas parvenir à régénérer l'hyperméthylation des gènes associés à cet état de cellule souche (MIKKELSEN *et al.*, 2008).

Ces chercheurs concluent ainsi qu'une reprogrammation de cellules somatiques différenciées est possible, mais qu'il reste à identifier d'autres facteurs de reprogrammation, ou d'autres molécules favorisant la reprogrammation, la rendant stable et sûre, afin d'utiliser ces cellules en thérapie cellulaire.

Cette expérience ouvre donc une nouvelle porte : il ne semble plus impossible d'obtenir des cellules souches autologues à partir de cellules somatiques différenciées. Cette perspective est extrêmement intéressante : on pourrait ainsi imaginer, par exemple, obtenir des cellules souches pluripotentes à partir de fibroblastes de la peau et régénérer ainsi facilement un (ou plusieurs) lignage(s) cellulaire(s) pauvre(s) en cellules souches.

### 3) Une confirmation de l'existence de cellule souche à posteriori, après culture *in vitro* ou injection *in vivo*

Il est enfin nécessaire, pour qualifier une cellule de cellule souche, de tester son **activité**. En effet, une cellule peut exprimer un marqueur de cellule souche sans pour autant en être une : certains marqueurs se retrouvent à la fois sur les cellules souches et les cellules matures d'un même tissu. On confirme donc à posteriori que la cellule souche, identifiée comme telle par ces marqueurs, est bien

une véritable cellule souche. **In vitro**, on teste leur **clonogénicité**, leur potentiel de prolifération, leur capacité d'auto-renouvellement et leur potentiel de différenciation ; alors qu'**in vivo**, on va plutôt tester leur capacité d'auto-renouvellement et leur capacité à **régénérer** des tissus (GARGETT, 2007 ; ULLOA-MONTOYA *et al.*, 2005).

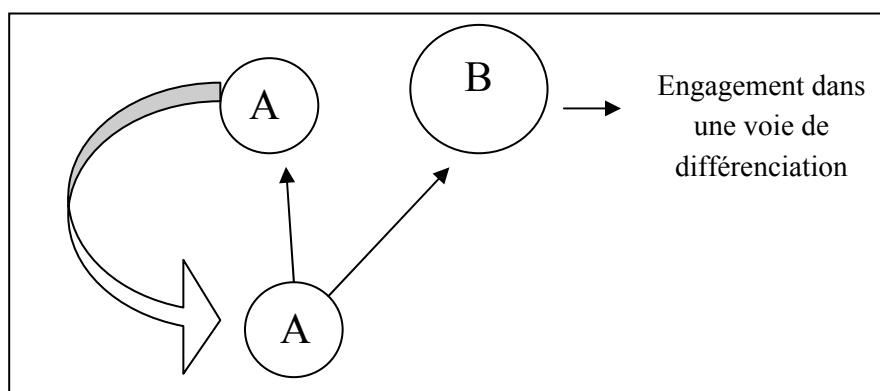
#### 4) Une cellule souche peut s'engager dans une voie de différenciation et constituer un lignage cellulaire

La **différenciation** est définie comme un changement dans le phénotype cellulaire en raison de l'expression de gènes spécifiques de la fonction de la cellule suivant le lignage auquel elle appartient (GARGETT, 2007).

Les cellules souches entrent dans la voie de différenciation par des divisions dites **asymétriques** impliquant qu'une seule des deux cellules filles conserve les caractéristiques propres des cellules souches, alors que l'autre cellule fille continue dans la voie de la différenciation (ULLOA-MONTOYA *et al.*, 2005). C'est ce qui est représenté sur la figure 4 où A représente la cellule souche mère donnant naissance à une autre cellule A identique à elle; et donnant naissance à une cellule B qui s'engage dans une voie de différenciation.

Il semblerait que l'asymétrie soit liée à une asymétrie moléculaire au sein de la cellule souche en division. Il y aurait une ségrégation asymétrique des protéines, des ARNs (acides ribonucléiques), des organelles et de l'ADN. Il semblerait également que le fuseau nécessaire à la division cellulaire soit lui aussi asymétrique (MORRISON et SPRADLING, 2008). Enfin l'environnement interviendrait aussi dans l'asymétrie des divisions.

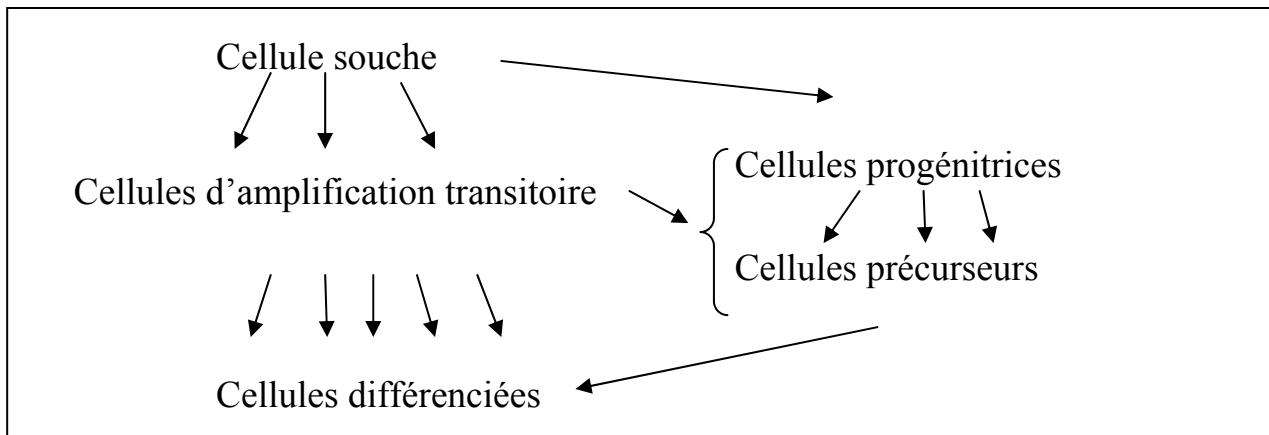
**Figure 4 : Principe de la division asymétrique**



La cellule fille obtenue entrant dans la voie de différenciation est appelé **cellule d'amplification transitoire** (*transit amplifying progenitor* ou cellule TA) (GARGETT, 2007). Ces cellules TA, aussi appelées, suivant leur stade, cellules progénitrices puis cellules précurseurs, possèdent des propriétés intermédiaires entre les cellules souches adultes et les cellules

différenciées : elles ont un potentiel de division limité, une absence de capacité à l'auto-renouvellement et donnent naissance progressivement aux cellules différenciées (Figure 5).

**Figure 5 : Hiérarchie cellulaire d'un lignage cellulaire**



La **division asymétrique** jouerait aussi un rôle dans la capacité qu'ont les cellules souches à se maintenir longtemps : les mutations de l'ADN seraient spécifiquement envoyées dans la cellule fille poursuivant la différenciation alors que l'ADN original, intact serait conservé dans la cellule souche fille responsable de l'auto-renouvellement. Ce phénomène n'a cependant pas été décrit dans tous les systèmes (MORRISON et SPRADLING, 2008).

Les **cellules souches adultes remplissent ces critères**. Les chercheurs ont pu les mettre en évidence dans de **nombreux tissus adultes**, ce que nous verrons par la suite (ASAHARA *et al.*, 2000).

## 5) La cellule souche joue un rôle dans l'homéostasie tissulaire par quiescence et activation

Les cellules souches sont gardées **quiescentes** localement ou dans la circulation sanguine et sont **réactivées** à la suite de stimuli environnementaux pour la régénération physiologique d'un tissu ou suite à un processus pathologique. La régénération d'un tissu dans un organisme vivant se fait par deux mécanismes.

Le premier est le remplacement des cellules différencierées par la **division de cellules souches**. Un exemple typique de ce phénomène est la reconstitution des cellules sanguines. La totalité des cellules sanguines proviennent d'un nombre restreint de cellules souches hématopoïétiques.

Le deuxième mécanisme est le remplacement des cellules différencierées par **des cellules différencierées**. Ceci peut s'effectuer car certaines cellules différencierées ont conservé un potentiel de division. On parle de cellules **inter-mitotiques**. Les hépatocytes, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les kératinocytes et les fibroblastes sont considérés comme des cellules

inter-mitotiques (ASAHARA *et al.*, 2000). Les cellules différencierées incapables de division sont nommées, quant à elles, cellules post-mitotiques.

A la suite d'une stimulation physiologique ou d'une lésion, des facteurs sont sécrétés par les tissus environnants et stimulent le remplacement cellulaire soit par les cellules souches soit par les cellules différencierées inter-mitotiques. Cependant, les cellules inter-mitotiques ont une capacité de multiplication limitée et sont incapables de migrer dans un autre tissu lésé ; alors que les cellules souches ont un potentiel de multiplication extrêmement important et peuvent se déplacer au sein d'un tissu et même d'un tissu à un autre.

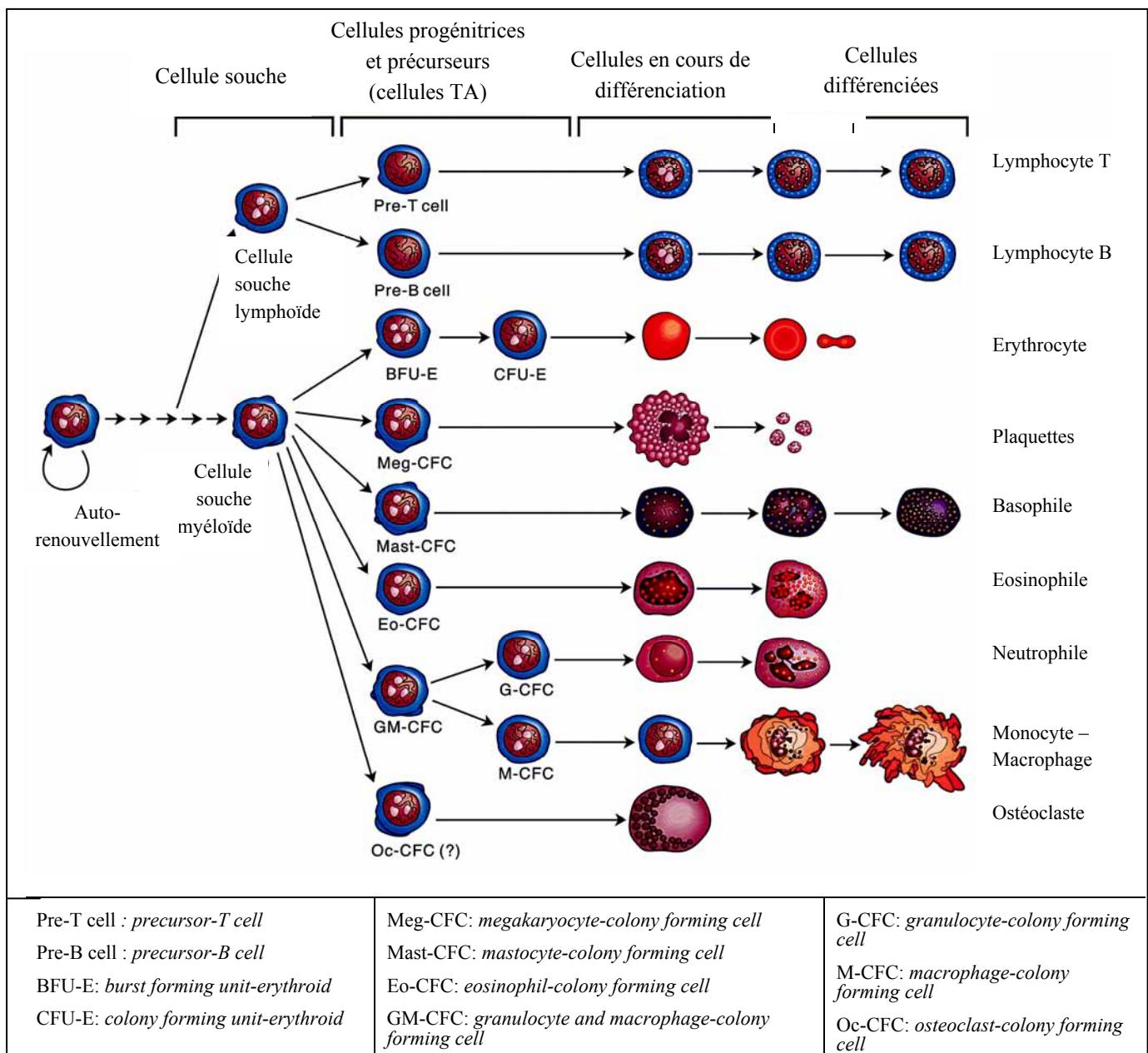
Les cellules souches adultes ont donc un rôle majeur dans l'**homéostasie** des tissus ; elles assurent la régénération physiologique des différents lignages cellulaires des tissus. Il existe ainsi une balance délicate entre l'auto-renouvellement et la différenciation (LI et XIE, 2005). Les cellules souches adultes jouent également un rôle majeur dans la **réparation des tissus** suite à une lésion : elles actent ainsi de concert avec les cellules différencierées inter-mitotiques. Cependant leur intervention est majeure dans le cas d'une réparation tissulaire, même si les cellules différencierées inter-mitotiques interviennent également.

## 6) La plasticité des cellules souches

Jusqu'à présent, on pensait que les cellules souches chez l'adulte n'étaient pas réellement pluripotentes c'est-à-dire qu'elles n'étaient capables de ne donner que des cellules d'un même lignage cellulaire.

Par exemple, les HSCs donnent naissance à tous les types de cellules sanguines : les globules rouges, les lymphocytes B, les lymphocytes T, les cellules « Natural Killer » (NK), les neutrophiles, les basophiles, les éosinophiles, les monocytes, les macrophages et les plaquettes. C'est ce qui est représenté sur la figure 6 avec la hiérarchie cellulaire.

**Figure 6 : Exemple du lignage cellulaire des HSCs (d'après METCALF, 2005)**



Mais de récentes observations ont permis de supposer que ces cellules souches possédaient un potentiel de différenciation dépassant leur lignage cellulaire: ce phénomène est nommé la **plasticité**. Cela revient à dire que les cellules souches adultes ne sont pas pluripotentes stricto sensu mais qu'elles peuvent, par différents mécanismes, se comporter comme tel. Par exemple, il a été montré que les HSCs pouvaient donner naissance non seulement au lignage hématopoïétique mais aussi à des hépatocytes (ULLOA-MONTOYA *et al.*, 2005).

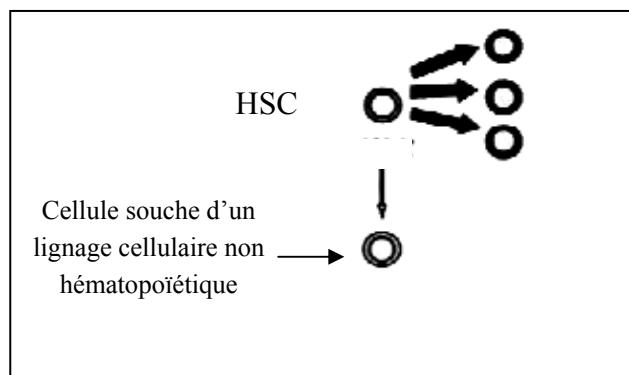
Le mécanisme exact de la plasticité des cellules souches adultes n'est pas encore bien démontré et reste sujet à controverse. Les premières études sur le sujet, ont été réalisées par VERFAILLIE et LAKSHMIPATHY (2005), mais ces études sur des souris n'on pas pu être reproduites sur d'autres modèles animaux.

Il existerait quatre mécanismes possibles : la **transdifférenciation directe** et **indirecte**, la **fusion cellulaire** et la présence d'une cellule **pluripotente vraie** (ULLOA-MONTOYA *et al.*, 2005 ; VERFAILLIE et LAKSHMIPATHY, 2005).

La **transdifférenciation** décrit la conversion d'une cellule d'un certain lignage en un autre lignage avec perte concomitante des marqueurs et des fonctions liés au tissu d'origine; et acquisition de nouveaux marqueurs et de nouvelles fonctions, **sans passer par une division cellulaire** (GARGETT, 2007). Cela implique donc des reprogrammations nucléaires avec altération des gènes clés du développement et représente de ce fait, une **forme de métaplasie**. Il existe deux types de transdifférenciation : directe et indirecte.

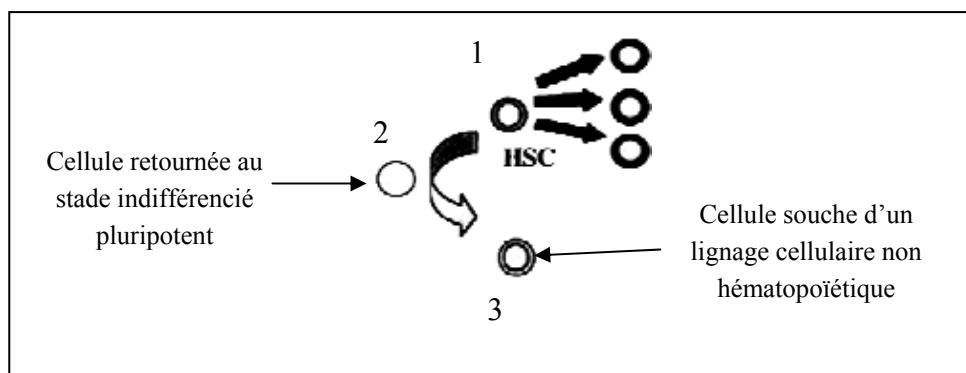
La transdifférenciation **directe**, représentée sur la figure 7, correspond à un changement de lignage cellulaire sans repasser par un stade indifférencié.

**Figure 7 : Transdifférenciation directe: exemple de la HSC (d'après HERZOG *et al.*, 2003)**



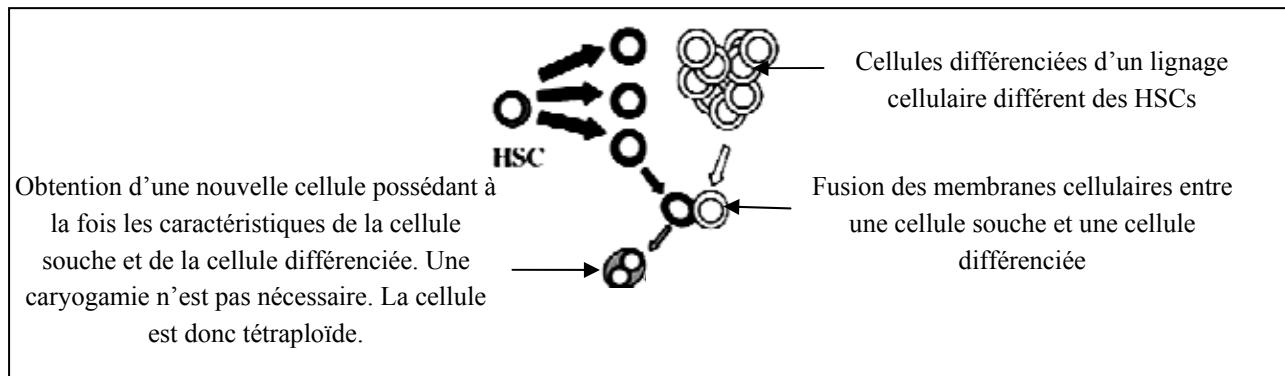
La transdifférenciation **indirecte**, représentée sur la figure 8, correspond à un **retour au stade indifférencié** puis une entrée dans une nouvelle voie de différenciation.

**Figure 8 : Transdifférenciation indirecte : exemple de la HSC (d'après HERZOG *et al.*, 2003)**



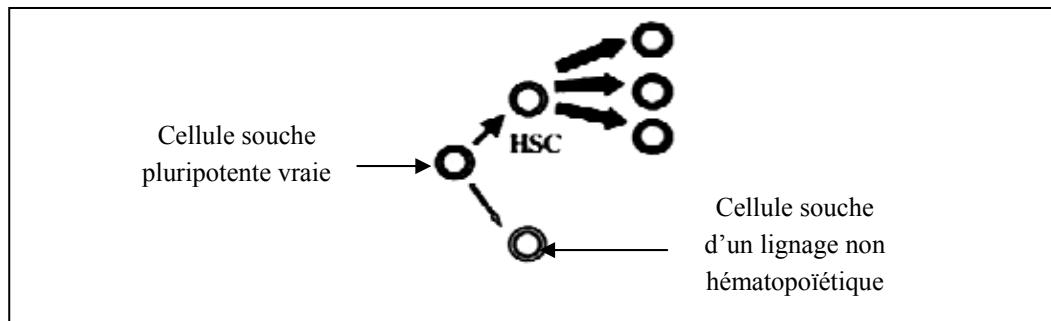
Ce concept de plasticité est difficile à mettre en évidence. C'est pour cela que les chercheurs ont avancé d'autres explications comme la **fusion cellulaire** entre une cellule souche et une cellule différenciée, représentée sur la figure 9 (GARGETT, 2007).

**Figure 9 : Fusion cellulaire: exemple de la HSC (d'après HERZOG *et al.*, 2003)**



Enfin, certains auteurs pensent qu'il existe de **réelles cellules souches pluripotentes vraies** (Figure 10) au sein de l'organisme adulte mais que l'on n'aurait pas encore mises en évidence pour le moment dans tous les tissus (GARGETT, 2007).

**Figure 10 : Présence d'une cellule pluripotente vraie (d'après HERZOG *et al.*, 2003)**



## B. La notion de niche des cellules souches adultes

Le nombre de cellules souches adultes dans un lignage cellulaire donné est extrêmement restreint. Elles sont regroupées dans des zones très spécifiques dans les tissus : on nomme ces endroits des « **niches** » (LI et XIE, 2005).

En 1978, SCHOFIELD évoque pour la première fois l'hypothèse de « niche » pour décrire le microenvironnement local physiologique qui abrite et régule les cellules souches (SCHOFIELD, 1978).

Jusqu'à très récemment, la notion de niche était plus théorique que réelle mais de nombreuses expériences ont permis de confirmer sa présence. La niche est extrêmement complexe. Elle est

composée des constituants **cellulaires** du micro-environnement entourant les cellules souches ainsi que des **signaux solubles** émanant de ces cellules. Chaque niche est très spécifique du lignage cellulaire auquel elle appartient et donc à certains types de cellules souches. Les niches seront étudiées avec leurs cellules souches correspondantes par la suite.

Afin de déterminer la présence d'une niche, il faudrait idéalement la vider provisoirement de ses cellules souches puis réintroduire les mêmes cellules souches et voir si la niche candidate est capable de les attirer et de les maintenir localement (MORRISON et SPRADLING, 2008).

Il est possible de dégager les caractéristiques communes d'une niche malgré leur grande diversité (LI et XIE, 2005) :

- Elle est constituée par un groupe de cellules dont le rôle est le **maintien** des cellules souches. La composition de ces cellules est variable d'un tissu à l'autre.
- La niche a un rôle de **support physique et nutritif**.
- Elle sécrète des **facteurs extrinsèques** qui contrôlent le devenir des cellules souches et leur nombre. Ces facteurs sont très nombreux. Certaines molécules se retrouvent chez tous les mammifères comme BMP (*bone morphogenic protein*) et WNT. Les cellules souches sont ainsi régulées à la fois par un programme intrinsèque et à la fois par des facteurs extrinsèques provenant de la niche. Les programmes intrinsèques contrôlant l'auto-renouvellement et la différenciation des cellules souches sont très variés.
- Chez les invertébrés comme chez les vertébrés, la niche possède une **structure asymétrique**. A la suite d'une division, une cellule est maintenue dans la niche et devient une cellule souche (auto-renouvellement) tandis que l'autre cellule quitte la niche, prolifère et s'engage dans une voie de différenciation.

La niche a également un rôle dans le maintien de la **vitalité** des cellules souches. C'est elle qui sécrète les facteurs responsables de la dégénération d'une cellule souche en cas de dommage au niveau de l'ADN. Elle semblerait également avoir un rôle dans le **vieillissement** de l'organisme : le vieillissement est défini comme une réduction de la capacité de régénération des tissus. Il semble que ce phénomène soit en partie attribuable à des changements au sein de la niche des cellules souches (MORRISON et SPRADLING, 2008).

Pour finir, dans les conditions normales, la niche, en contrôlant le renouvellement et donc la division des cellules souches, a un **rôle anti-tumoral**. Cependant, en cas de mutations des cellules souches, devenant ainsi réfractaires aux signaux envoyés par la niche, il peut y avoir apparition d'une tumeur (LI et XIE, 2005). De la même façon, si c'est la niche qui devient anormale, c'est elle qui entraînera la formation d'une tumeur en dérégulant les cellules souches.

Il est aussi à noter que certaines cellules souches peuvent **migrer** d'une niche à l'autre ou se localiser provisoirement dans des niches dites facultatives (MORRISON et SPRADLING, 2008).

## **C. Culture et manipulation des cellules souches**

Un des buts de l'utilisation des cellules souches adultes est la médecine régénérative à savoir la création de cellules, de tissus et même d'organes ex vivo et in vivo. Pour cela, il faut être capable de les reconnaître, de les isoler, de les **cultiver** puis de les **modifier** pour leur faire produire des cellules autres que celles obtenues par leur voie de différenciation normale.

### **1) Culture des cellules souches**

Les HSCs ont été les premières cellules souches étudiées puisqu'elles sont faciles à cultiver in vitro : elles sont en circulation dans le sang périphérique et donc aisément accessibles, et elles ont une croissance sans-substrat. Mais en ce qui concerne les cellules souches issues d'un tissu, les conditions d'isolement diffèrent selon le tissu d'origine et même, au sein d'un tissu, suivant le type de cellules souches que l'on souhaite isoler.

En culture, une cellule souche adulte doit pouvoir donner naissance à une lignée de cellules identiques à elle-même, lignée que l'on nomme **clone**, pouvant lui-même générer des cellules différenciées (ULLOA-MONTOYA *et al.*, 2005). Ainsi, dans tous les cas, la culture des cellules souches adultes doit respecter trois objectifs : le maintien des capacités **d'auto-renouvellement**, le maintien des capacités de **différenciation**, et la résistance des cellules obtenues à la **conservation** par congélation. Les chercheurs ont conçu, pour la culture des cellules souches, des **bioréacteurs** (ULLOA-MONTOYA *et al.*, 2005). Un bioréacteur est une unité technologique dans laquelle on peut cultiver aussi bien des cellules souches que des micro-organismes. L'avantage de ces unités est qu'il est possible de contrôler entièrement le milieu de culture et ainsi adapter les conditions environnementales aux types de cellules cultivées.

Les problèmes rencontrés en culture sont que certaines cellules ont des comportements différents in vitro et in vivo. Ainsi, des cellules se montrant multipotentes in vitro sont incapables de produire de multiples lignages cellulaires in vivo (MORRISON et SPRADLING, 2008).

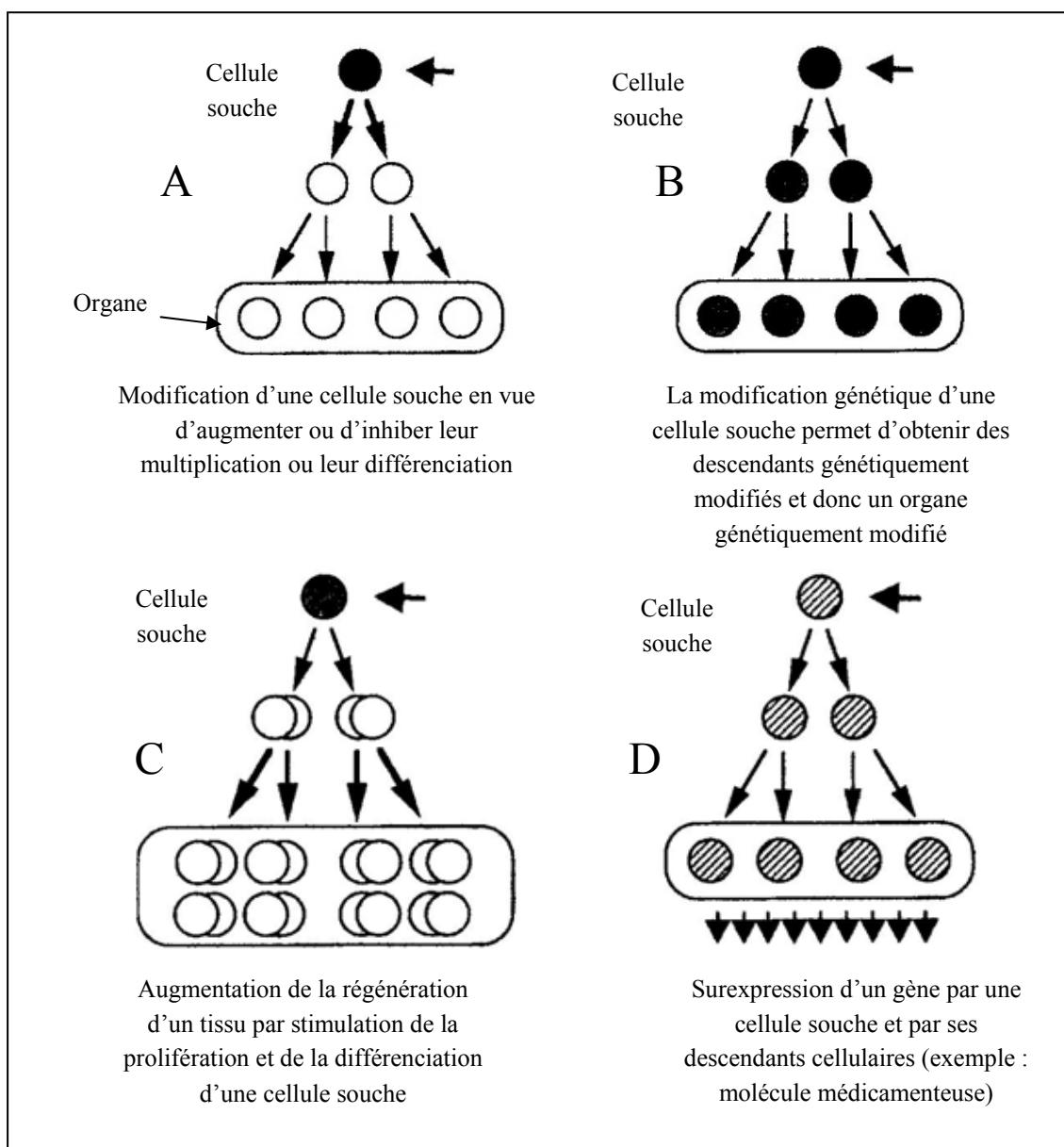
### **2) Manipulation des cellules souches**

Au regard de leur potentiel régénératif, la **modification génétique** des cellules souches possède d'énormes avantages sur les thérapies géniques classiques.

Il existe différentes cibles de modification génétique (ASAHARA *et al.*, 2000) (Figure 11). La modification génétique de facteurs de transcription ou d'enzymes (A) permettrait de maintenir, d'augmenter ou d'inhiber la capacité de prolifération ou de différenciation des cellules souches adultes. L'introduction de gène dans les cellules souches permet la transmission de ce gène à la descendance : on serait capable de remplacer des déficits dans des organes par l'expression de gènes manquants ou défectueux et cela durant tous les cycles des cellules souches et de leur descendance (B). On peut également augmenter la capacité de division des cellules souches pour accélérer le processus de régénération (C). Et enfin, il est possible de faire synthétiser des molécules comme des

médicaments de façon locale ou systémique par des cellules souches génétiquement modifiées (D). Cela serait une alternative à l'administration classique des médicaments.

**Figure 11 : Cibles de la modification génétique des cellules souches (d'après ASAHARA *et al.*, 2000)**



Pour modifier génétiquement les cellules souches *in vitro*, on est obligé d'utiliser des **vecteurs** (ASAHARA *et al.*, 2000). Les chercheurs utilisent principalement des rétrovirus, des lentivirus, des adénovirus et des vecteurs viraux associés à des adénovirus. Il existe cependant des facteurs limitant le transfert de gènes dans les cellules souches. Pour les vecteurs rétroviraux, il faut que la cellule souche soit en division et exprime des marqueurs compatibles avec leur entrée dans la cellule. Ce sont des vecteurs très utilisés malgré tout : ils ont permis la modification génétique des HSCs chez la

Souris, le Chien, les Primates et l'Homme (CARTER *et al.*, 1992 ; KIEM *et al.*, 1994). Pour les vecteurs viraux associés aux adénovirus, l'expression du gène introduit est souvent limitée à six mois. Les vecteurs lentiviraux semblent capables de s'introduire dans des cellules même quiescentes. Il pourrait représenter une alternative aux rétrovirus.

### 3) Sélection des cellules souches génétiquement modifiées

Il y a enfin nécessité de **sélectionner** les cellules qui ont été génétiquement modifiées avec succès. Ex vivo, on utilise le marquage des antigènes par des anticorps et leur révélation par fluorescence ; alors qu'in vivo, chez la Souris, on sépare les cellules génétiquement modifiées en leur conférant par exemple une résistance médicamenteuse.

Les cellules souches adultes ont des capacités thérapeutiques extraordinaires même si leur identification, leur isolement, leur culture et leur réintroduction restent encore difficiles à gérer. Il existe des cellules souches adultes dans la majorité des tissus de l'organisme, mais certaines cellules souches ont été découvertes il y a longtemps alors que d'autres l'ont été plus récemment. En effet, certains organes ou tissus comme la moelle osseuse hématopoïétique ou encore l'épiderme sont des tissus dont le processus de régénération est flagrant. Il était logique de s'intéresser à ces organes à renouvellement rapide puisque la présence de cellules souches était évidente.

## **II. Des cellules souches dans des organes ou des tissus connus de longue date pour leur propriété de renouvellement : une présence vérifiée puis utilisée chez l'Homme et chez l'animal**

### **A. Les cellules souches de la moelle osseuse hématopoïétique**

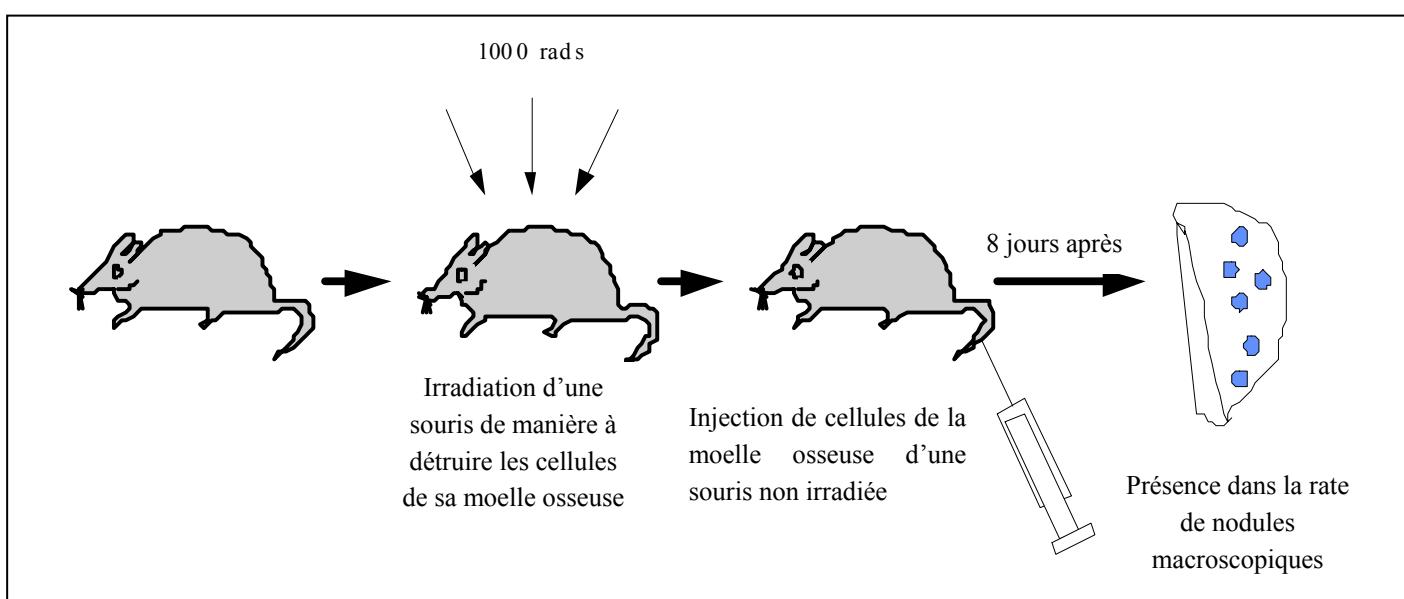
#### **1) Les HSCs**

Les HSCs sont les **premières** cellules souches à avoir été étudiées, à la fois selon les termes de l'ontogénie et de la découverte.

La première cellule souche associée à l'hématopoïèse apparaît le 10<sup>ème</sup> jour de la gestation chez la Souris et la 6<sup>ème</sup> semaine chez l'Homme (HO et PUNZEL, 2003) donc très précocement dans le développement.

Les expériences de TILL et MACCULLOCH (1961) ont, pour la première fois, démontré l'existence d'une **HSC** chez la Souris, capable de générer *in vivo* les différents types cellulaires du lignage hématopoïétique à savoir les cellules myéloïdes et les cellules lymphoïdes. Ces chercheurs ont irradié une souris à 1000 rads (Figure 12) entraînant ainsi une aplasie mortelle par destruction de l'ensemble des cellules hématopoïétiques et une hypotrophie de la rate (la rate est un organe hématopoïétique chez la Souris adulte et non chez l'Homme). Si des cellules de moelle osseuse de souris immunologiquement compatibles sont injectées après l'irradiation, les HSCs de cette moelle osseuse sont capables de reconstituer le lignage hématopoïétique et ainsi permettre une survie de la souris mortellement irradiée. On observe alors chez ces souris la formation de **nodules** dans la **rate**.

**Figure 12 : Preuve de l'existence de précurseurs hématopoïétiques (d'après TILL et MCCULLOCH, 1961)**



Ces auteurs ont pu démontrer qu'un **nodule splénique provenait d'une seule cellule**. En effet, en irradiant les cellules de moelle osseuse avant être réinjectées de façon à provoquer des cassures chromosomiques, les auteurs ont pu démontrer que toutes les cellules en mitose d'un même nodule possédaient les mêmes cassures chromosomiques. Ils ont également démontré qu'il existait une relation linéaire entre le nombre de cellules injectées et le nombre de nodules formés.

L'analyse histologique de ces nodules après 8 jours montre qu'ils sont composés soit de cellules érythroïdes, soit de cellules mégacaryocytaires, soit de cellules polynucléaires soit de cellules monocytaires, soit de cellules lymphoïdes. Les cellules précurseurs hématopoïétiques constituant les nodules dans la rate sont appelées des **CFU-S** (*colony forming unit in spleen*) (Figure 13). Chaque CFU-S est constitué d'un type cellulaire bien déterminé.

**Figure 13 : Nodules de CFU-S sur une rate de souris après injection de cellules de la moelle osseuse (d'après TILL et MCCULLOCH, 1961)**



Cependant, ces chercheurs ont réussi à mettre en évidence qu'un CFU-S d'un type cellulaire défini pouvait fournir d'autres types cellulaires. Pour démontrer cette propriété, les auteurs ont prélevé des nodules spléniques au jour 8 d'un type cellulaire donné, les ont dissociés et les ont injectés à des souris irradiées. Ils ont pu montrer que dans les nodules d'un type cellulaire donné, il y avait des CFU-S capables de générer tous les différents types cellulaires du lignage hématopoïétique. Ceci est une démonstration simple mais claire que les CFU-S sont bien issues des HSCs multipotentes car elles ont, elles-mêmes, une activité multipotente et sont ainsi capables de générer le lignage hématopoïétique au complet.

D'après cette étude, les HSCs ont été définies comme des cellules ayant la capacité de **s'auto-renouveler très longtemps** et de se **différencier** en tous les types cellulaires du lignage hématopoïétique. Cette découverte a marqué le début de la recherche moderne sur les cellules souches adultes.

### a) Identification des HSCs

Pour identifier les HSCs, la meilleure méthode est de mettre en évidence leur **efficacité in vivo**. Il est également possible d'utiliser des marqueurs cellulaires.

Un des **marqueurs** des HSCs est le **CD34** (*cluster differentiation 34*). L'expression de l'antigène CD34 correspond à une population de cellules morphologiquement et immunologiquement hétérogènes mais qui sont caractérisées par leur capacité *in vitro* de générer des agrégats de clones et leur capacité *in vivo* de reconstituer le système myélo-lymphopoïétique chez un hôte mortellement irradié (STELLA *et al.*, 1995).

Les HSCs sont également définies par l'absence d'expression de **CD38** (CD38-) (ULLOA-MONTOYA *et al.*, 2005). Plus récemment, le marqueur **KDR** (*knock down resistance*) s'est révélé comme essentiel pour mieux caractériser les HSC dans la population de cellules CD34+ (ASAHARA *et al.*, 2000). Elles semblent peu exprimer **THY-1** (HIRSCHI et GOODEL, 2002), exprimer **KIT** et **SCA-1**, mais pas de marqueurs spécifiques de lignage (**LIN-**) (LIAO *et al.*, 2007). Chez la Souris, les marqueurs sont SCA-1 et KIT et elles n'ont pas ou très peu de marqueurs spécifiques de lignage (**LIN- ou low**).

Les HSCs peuvent être obtenues par prélèvement **direct** de la moelle osseuse hématopoïétique. Dans ce cas, un immunomarquage permet l'obtention d'une population homogène de HSCs. On utilise par la suite la méthode du FACS (FORTIER, 2005).

Elles peuvent également être prélevées dans le **sang périphérique** par plasmaphérèse après avoir stimulé leur passage dans la circulation sanguine à l'aide de cytokines (SACKSTEIN, 2004).

Un marqueur très utilisé chez la Souris, est le transfert par rétrovirus de l'activité enzymatique de la protéine bactérienne  $\beta$ -galactosidase ( **$\beta$ -GAL**) codée par le gène **LacZ** (BAGNIS *et al.*, 1999). Les cellules des embryons des souris donneuses sont modifiées par recombinaison homologue avec insertion de *LacZ* dans un exon, le plus souvent à l'aide de rétrovirus. On obtient ainsi l'expression de *LacZ* dans toutes les cellules de la souris dite alors transgénique. Ce marqueur permet également de voir si la cellule est **fonctionnelle** : en effet, la révélation de l'activité de la protéine, se fait par mise en contact des cellules avec le X-GAL (*5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-galactopyranoside*), substrat qui est **dégradé** par la  $\beta$ -GAL en galactose et un produit **coloré en bleu indigo**. Ceci se fait *in vitro*, chez des souris, après fixation des cellules marquées.

L'étude de BAGNIS *et al.* (1999) a suggéré que cette technique de détection *in vivo* sous-estimait la quantité de gène exprimé par rapport à l'immunomarquage par des anticorps mono- ou polyclonaux.

Les HSCs sont ensuite réintroduites dans l'organisme soit **directement** dans l'organe lésé soit dans la **circulation sanguine**. L'injection directe est faisable seulement pour les tissus ou les organes lésés possédant une marge distincte et une localisation anatomique définie (SACKSTEIN, 2004).

On a longtemps pensé que l'irradiation du receveur était nécessaire pour permettre aux nouvelles cellules souches de coloniser l'organisme. Cependant, depuis une étude menée par CARTER *et al.* (1992) chez le Chien, il a été montré qu'il n'est pas nécessaire d'irradier le receveur.

Dans cette étude, les chercheurs ont utilisé 9 chiens : 4 chiens irradiés et 3 chiens non-irradiés. Ils ont transplanté des cellules de la moelle osseuse chez ces chiens et n'ont pas observé de différences sur l'implantation des cellules dans la moelle entre les deux lots, jusqu'à 12 mois post-transplantation. Cela signifie donc qu'il n'est pas nécessaire d'irradier mortellement l'hôte avant d'effectuer une greffe de moelle. Des études princeps sur la Souris avaient également suggéré ces résultats (MICKLEM *et al.*, 1975a ; MICKLEM *et al.*, 1975b).

### b) Les niches des HSCs

Les HSCs possèdent **une niche principale** dans la **moelle osseuse**. Les canaux médullaires des os spongieux sont très bien organisés et sont composés d'éléments basiques, comme le stroma et les cellules mésenchymateuses, et de cellules du lignage hématopoïétique (MIMEAULT et BATRA, 2006).

Elles ont aussi des niches dites **secondaires**, ou facultatives, au sein de la rate, du foie et de la peau. Les HSCs peuvent sous l'action de certains facteurs, quitter une niche et se retrouver circulantes dans le sang périphérique. Afin d'étudier ces niches, qui chez les mammifères sont extrêmement complexes, de nombreux modèles animaux comme la mouche *Drosophila melanogaster* ou le nématode *Caenorhabditis elegans* ont du être utilisés (LI et XIE, 2005).

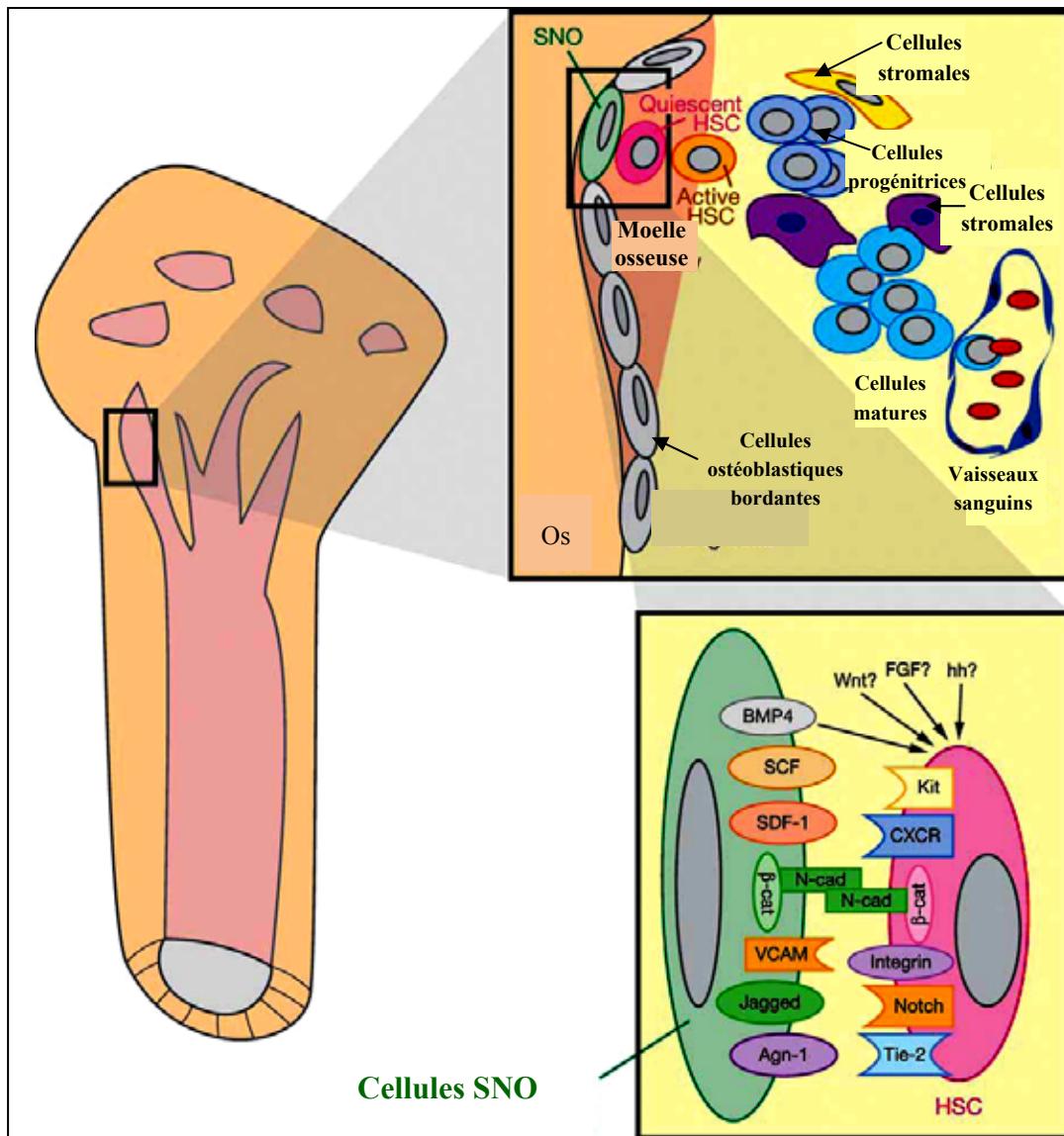
### **3. Une niche principale dans la moelle osseuse hématopoïétique**

En 2003, deux études indépendantes utilisant des souris génétiquement modifiées, ont conduit à l'identification de **cellules ostéoblastiques**, situées le long de la surface des trabéculum osseux, comme jouant un **rôle clé** dans la niche des HSCs (CALVI *et al.*, 2003 ; ZHANG *et al.*, 2003). Ces cellules ostéoblastiques fusiformes sont N-Cadhérine+ et CD45-. Elles sont nommées **cellules ostéoblastiques fusiformes N-cadhérine positives** (*spindle-shaped N-cadherin-positive osteoblastic cells* ou **cellules SNO**). La co-culture in vitro des HSCs avec des ostéoblastes montre le lien entre ces deux types de cellules : la prolifération de la population des ostéoblastes entraîne celle des HSCs et, à contrario, leur diminution entraîne une perte de tissu hématopoïétique. Ces études ont également identifié un **complexe d'adhérence** de type N-cadhérine/  $\beta$ -caténine entre les HSCs et les cellules ostéoblastiques. Il semble de plus que l'expression de JAGGED-1 par les cellules ostéoblastiques influence les HSCs par le biais d'un récepteur NOTCH. Et enfin, elles ont démontré que le nombre de cellules SNO contrôle le nombre des HSCs. D'autres études portant sur la migration des HSCs après leur marquage par la GFP et leur transplantation chez des souris, ont également montré que la **surface endostée** de l'os jouait un rôle de niche (LI et XIE, 2005).

Il semblerait de même que les HSCs soient situées à proximité des **vaisseaux sinusoïdes** (MORRISON et SPRADLING, 2008). Ces vaisseaux sont spécialisés puisqu'ils permettent le passage de cellules dans la circulation et vice versa. Il s'agit là d'une **niche périvasculaire**. Il reste à déterminer si cette niche est indépendante de celle située sur la face endostée de l'os ou s'il existe des liens entre les deux niches.

Un modèle de niche pour les HSCs est reporté sur la figure 14 (LI et XIE, 2005). On voit sur cette figure la localisation de la niche, les cellules la constituant et les facteurs assurant le lien entre les HSCs et les cellules SNO.

**Figure 14 : Illustration de la niche des HSCs (d'après LI et XIE, 2005)**



#### 4. La niche : un rôle de soutien

La première fonction d'une niche est l'**ancrage** et le maintien des cellules souches. En plus des **N-cadhéries**, il existe d'autres types de molécules d'adhésion incluant les **intégrines**. Les N-cadhéries sont des cibles clés de la voie Angiopoïétine-1 (ANG-1)/TIE-2 permettant le maintien des HSCs **quiescentes** (LI et XIE, 2005). TIE-2 est exprimée par les HSCs et ANG-1 par les ostéoblastes (MIMEAULT et BATRA, 2006).

En ce qui concerne la niche périvasculaire, il y a une association entre les HSCs, par le biais des intégrines VLA-4 (*very late antigen-4*) et LFA-1 (*lymphocyte factor A-1*), et les cellules endothéliales, par le biais des VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) (MIMEAULT et BATRA, 2006).

## **5. De nombreux signaux entre les HSCs et la niche**

Bien que l'étude des interactions entre les cellules stromales de la niche et les cellules souches n'en soit qu'à son commencement, l'étude des gènes exprimés par les HSCs a permis de déterminer quels signaux les HSCs recevaient potentiellement.

On a ainsi pu déterminer le rôle de **SHH** (*sonic hedgehog* ou SHH), **WNT**, **NOTCH** et **TGF- $\beta$**  (*transforming growth factor- $\beta$* )/ **BMP** (LI et XIE, 2005). Par exemple, la voie WNT/  $\beta$ -caténine est importante dans l'auto- renouvellement des HSCs (LI et XIE, 2005). La voie NOTCH est requise pour maintenir les HSCs à un stade indifférencié (LI et XIE, 2005). BMP joue un rôle dans le contrôle du nombre des HSCs.

Il faut signaler que les voies sont différentes selon que l'on a affaire à l'hématopoïèse classique ou à une hématopoïèse activée suite à un stress. Par exemple, WNT et NOTCH sont nécessaires à l'hématopoïèse suivant un stress, alors qu'elles ne le sont plus dans le cadre de l'hématopoïèse physiologique chez l'adulte. La voie **SDF-1/CXCR4** (*stromal derived factor-1/CX chemokine receptor-4*) semble quant à elle jouer un rôle dans le maintien dans la moelle osseuse des HSCs ainsi que dans leur différenciation (MIMEAULT et BATRA, 2006).

Malgré toutes ces avancées, il reste à l'heure actuelle encore beaucoup d'inconnues. Par exemple, le mécanisme par lequel les cellules de la surface endostée, comme les ostéoblastes et les ostéoclastes, influencent le nombre des HSCs reste encore inconnu : s'agit-il d'un contact direct entre les cellules ou y a-t-il sécrétion de facteurs agissant à distance au sein de la niche et des niches voisines (MORRISON et SPRADLING, 2008) ?

## **6. La présence de niches hématopoïétiques facultatives**

Il a été démontré l'existence de niches **facultatives** pour les HSCs. Cette existence semble liée au fait que le système hématopoïétique est capable d'une expansion extraordinaire lorsqu'il est sollicité. Le **foie** et la **rate** ne font que très peu d'hématopoïèse dans les conditions normales chez l'Homme. Mais lors d'un stress, l'hématopoïèse extra-médullaire dans ces organes peut être plus importante. Par exemple, les hémopathies, entraînant une destruction du système hématopoïétique dans la moelle osseuse, provoquent l'apparition d'une hématopoïèse dans ces organes. Lorsque cela survient, il est possible de trouver un très grand nombre de HSCs dans ces organes.

Le foie et la rate, niches facultatives chez l'Homme, peuvent **maintenir au long-terme** les HSCs et donc soutenir une hématopoïèse (MORRISON et SPRADLING, 2008). La nature précise de ces niches reste largement inconnue mais comme pour la moelle osseuse, les HSCs semblent se

localiser dans les capillaires sinusoïdes de la rate soulevant la possibilité de l'existence d'une niche périvasculaire.

Chez la Souris, il a également été possible d'identifier une **hématopoïèse cutanée** en plus de celle du foie et de la rate. Ce phénomène rare a été rencontré lors de défaillance de la moelle osseuse, lors de maladie myéloproliférative ou encore lors de stress de l'hématopoïèse (SACKSTEIN, 2004). Un **chimérisme** cutané (identification de cellules épithéliales du génotype du donneur) a été observé à la suite de transplantation de moelle osseuse chez des souris.

Les HSCs mises en évidence par la présence du marqueur CD34, se retrouvent également dans le **sang périphérique** et prennent alors le nom de **cellules souches dérivées du sang périphérique** (*peripheral-blood stem cells* ou **PBSCs**) (TARNOWSKI et SIERON, 2006). L'avantage de ces cellules circulantes est que leur prélèvement est bien plus simple et consiste en une prise de sang. De plus il semblerait que les PBSCs aient un taux de survie supérieur aux HSCs in vitro et se greffent in vivo plus rapidement qu'elles (ASAHARA *et al.*, 2000).

### c) Le « homing »

A la suite de l'utilisation du sang périphérique pour la régénération de l'hématopoïèse, il a été mis en évidence que les HSCs avaient la capacité de migrer dans des sites où il y avait besoin d'elles. Ce phénomène est appelé le « **homing** » (HO et PUNZEL, 2003). Dans la majorité des expériences, les HSCs étaient injectées dans une veine périphérique et entraînaient quand même une guérison du receveur. Cela veut dire que les HSCs injectées dans le sang veineux sont capables de **migrer** jusqu'au site défectueux (HO et PUNZEL, 2003).

Le homing possède un support moléculaire. Pour migrer dans un tissu, toute cellule circulante doit être capable d'**adhérer** à la surface de l'endothélium avec suffisamment de force pour contrecarrer le flux sanguin. Ce procédé est défini comme le « **rolling** ». Il a été décrit à partir de l'étude de la migration des lymphocytes (SACKSTEIN, 2004). Les facteurs exprimés par les cellules endothéliales des vaisseaux de la moelle osseuse sont principalement des sélectines du genre E-, P- et L- ; SDF-1 et VCAM. En ce qui concerne les HSCs, elles expriment **HCELL** (*Hematopoietic cell E-/L-selectin Ligand*) et **VLA-4** (SACKSTEIN, 2004).

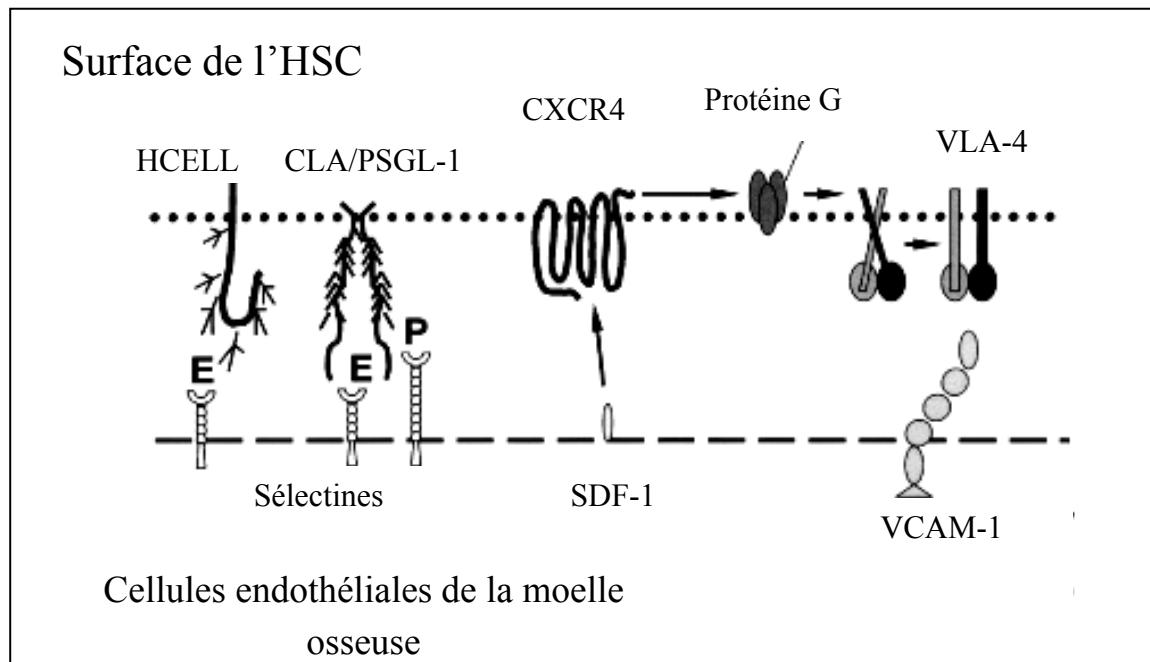
Un des facteurs prépondérant pour le homing est le gradient **SDF-1/CXCR4** (LI et XIE, 2005 ; MIMEAULT et BATRA, 2006). CXCR4 est situé à la surface de la cellule en migration. Il s'agit du récepteur du SDF-1 exprimé quand à lui à la surface des cellules du tissu cible. Il semblerait ainsi que le recrutement et le maintien des HSCs dans un site donné soient dus à un **gradient de SDF-1**. SDF-1 est retrouvé dans de nombreux tissus mais il est **surexprimé** en cas d'inflammation ou d'ischémie. Ce facteur est un des facteurs principaux du homing : il est augmenté lorsqu'un recrutement de HSCs est nécessaire. Ainsi si on bloque l'interaction de SDF-1 et de CXCR4, on abolit le homing et la greffe des HSCs dans un tissu (JUNG *et al.*, 2006).

Le facteur limitant le homing des HSCs dans des sites extra-médullaires est la capacité qu'ont les cellules en circulation à **dépasser la première étape d'attachement** aux cellules endothéliales. En effet, cela est essentiel pour que les HSCs soient ensuite sensibles au SDF-1.

Il existe également des facteurs de synergie avec le SDF-1 comme des chémokines et des facteurs chimiotactiques permettant d'orienter la migration des HSCs dans les tissus cibles.

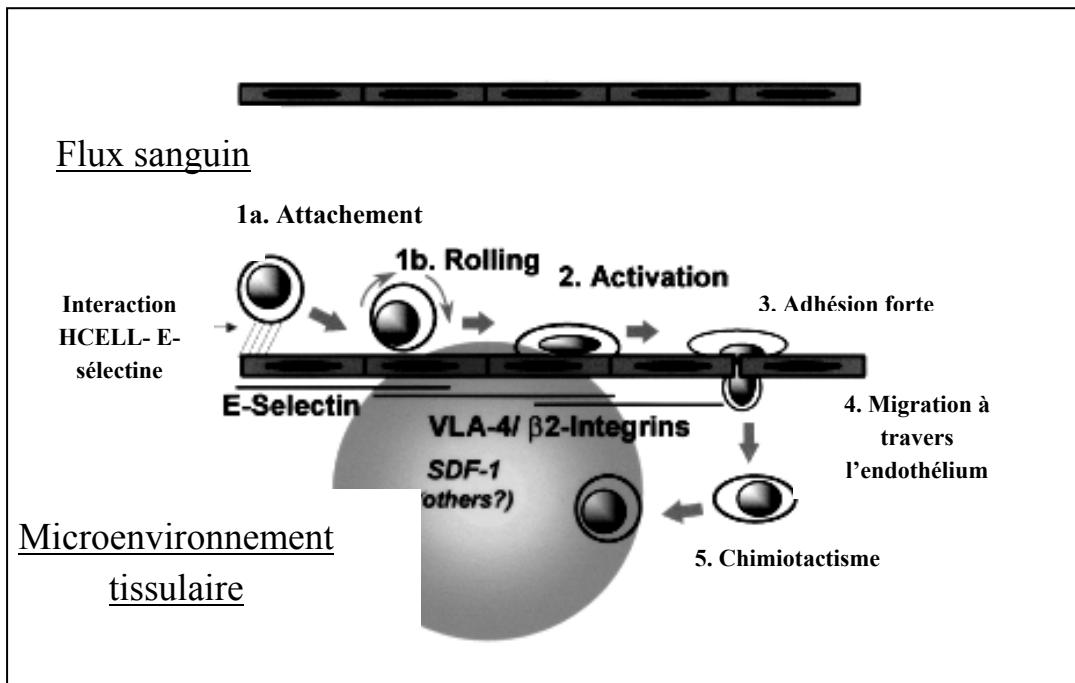
L'ensemble des molécules exprimées par les HSCs et le tissu cible, à savoir la moelle osseuse, est représenté sur la figure 15.

**Figure 15 : Composants moléculaires de l'interaction entre les cellules endothéliales des vaisseaux de la moelle osseuse et les HSCs (d'après SACKSTEIN, 2004)**



Il s'en suit une cascade d'événements aboutissant au passage des cellules sanguines au travers des vaisseaux sanguins dans les tissus et donc au **homing** (Figure 16) : la cellule s'attache à une ou deux cellules endothéliales des vaisseaux sanguins (1a) puis y adhère et subi le rolling (1b) induisant le contact de nombreuses molécules d'adhésion. Ensuite la cellule s'active (2) en augmentant ses liaisons avec l'endothélium créant une adhésion forte (3). Elle finit par migrer à travers l'endothélium (4) et se diriger par chimiotactisme vers le lieu où elle doit se rendre (5).

**Figure 16 : Migration des HSCs selon un modèle multi-étapes (d'après SACKSTEIN, 2004)**



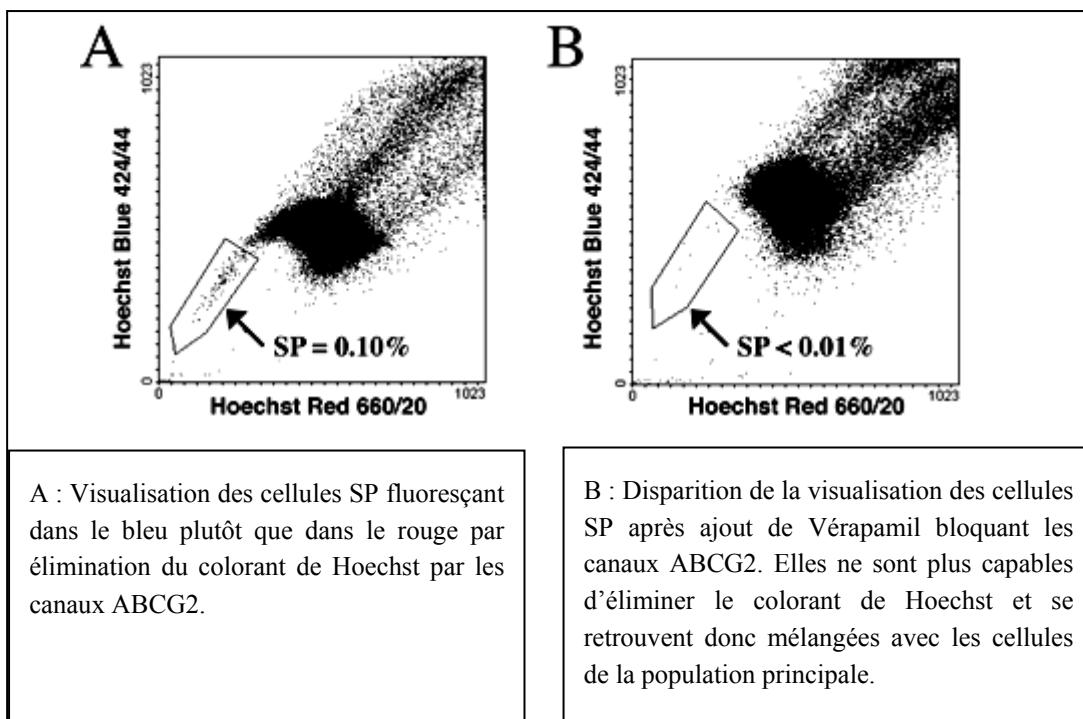
Pour que le homing des HSCs ait lieu, il faut qu'elles **soient dans le sang**. Pour cela, il existe de nombreux facteurs favorisant leur passage. Ces facteurs sont le facteur de stimulation des colonies de granulocytes (*granulocytes-colony stimulating factor* ou **G-CSF**), le facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages (*granulocytes and macrophages-colony stimulating factor* ou **GM-CSF**), le facteur des cellules souches (*stem cell factor* ou **SCF**), le facteur de croissance des hépatocytes (*hepatocytes growth factor* ou **HGF**) et l'érythropoïétine (**EPO**) (LIAO *et al.*, 2007). SCF est un facteur hématopoïétique **ligand de KIT**, régulant la prolifération, la différenciation et la survie des cellules souches de la moelle osseuse.

## 2) Les cellules SP

Il a été découvert la présence d'une population de cellules souches nommées les cellules de la « side population » (*side population cells* ou **cellules SP**) dans la moelle osseuse (HERZOG *et al.*, 2003). Ces cellules sont dites **hautement enrichies en HSCs** : elles sont obtenues après une purification poussée des HSCs. On les nomme cellules SP parce que, quand on les observe lors de l'analyse au FACS, elles se regroupent en une population séparée, éloignée du reste des autres cellules et fluorescent dans le spectre **bleu** plutôt que dans le rouge avec le colorant Hoechst 33342 (cadre A, figure 17) (CHALLEN et LITTLE, 2006). Pour cela, elles ont l'unique capacité **d'éliminer le colorant de Hoechst**. Ce colorant se fixe aux zones riches en nucléotides A-T sur l'ADN. Les cellules SP expriment le **transporteur ABCG2**, une protéine transmembranaire, qui leur permet d'éliminer activement le colorant. Elles sont donc moins marquées que les cellules dites de la

population principale. Après l'ajout de Vérapamil bloquant la protéine de transport, les cellules SP ne sont plus observées sur l'analyse au FACS (cadre B, figure 17) (CHALLEN et LITTLE, 2006).

**Figure 17 : Tri par FACS des cellules de la moelle osseuse de souris par addition du colorant de Hoechst (d'après CHALLEN et LITTLE, 2006)**



Les cellules SP ont également été retrouvées dans d'autres tissus comme le muscle squelettique ou le rein (TARNOWSKI et SIERON, 2006). Deux théories s'opposent quant à leur origine dans ces tissus: les cellules SP sont des cellules souches **tissus-spécifiques** de ces organes ou ce sont des cellules souches **dérivées de la moelle osseuse engagées** dans un autre lignage que le lignage hématopoïétique dans ces tissus (HERZOG *et al.*, 2003). Des études complémentaires ont apporté des preuves en faveur de **l'origine médullaire** de ces cellules (BARILE *et al.*, 2007 ; HO et PUNZEL, 2003).

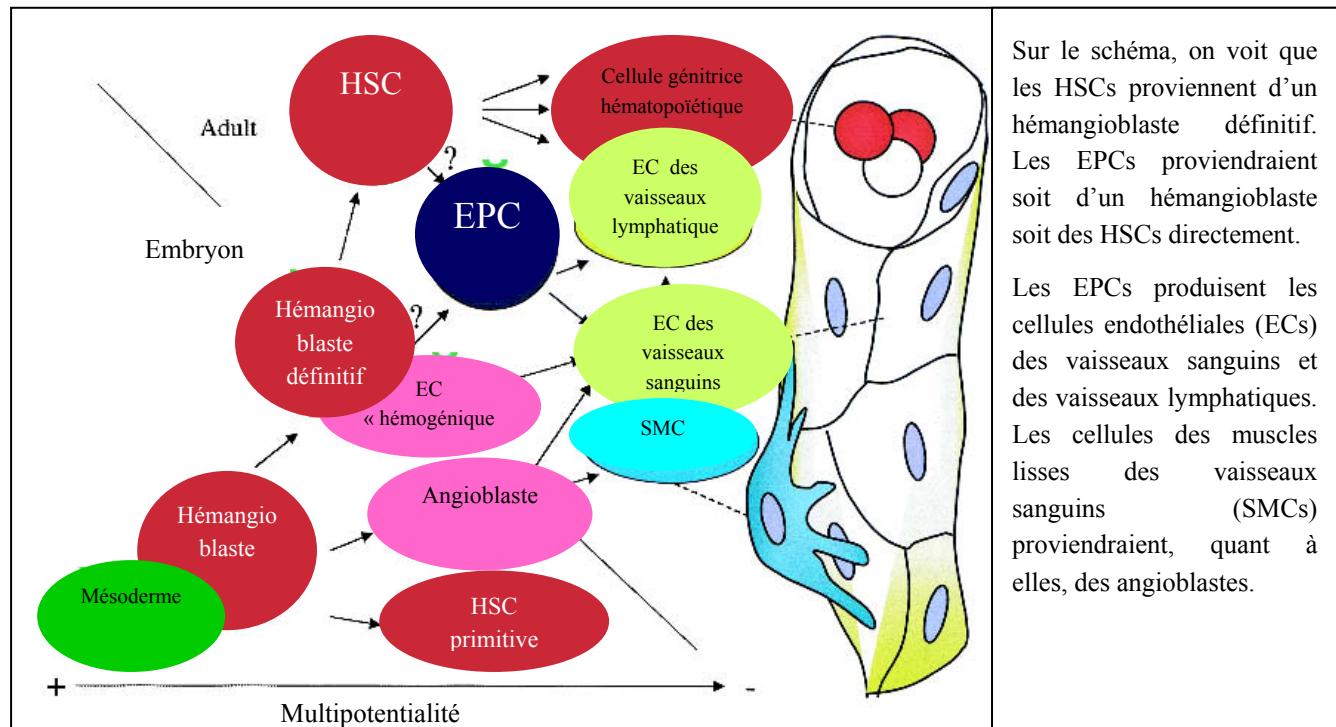
Au niveau de leur marqueur, elles n'expriment pas les marqueurs de différenciation : ni de cellules endothéliales matures (FLT-1, VE-cadhérine, facteur de Von Willebrand et facteur VIII), ni de cellules du muscle lisse (SM- $\alpha$ -actine, calponine et SM22 $\alpha$ ) et ni de cellules du muscle cardiaque ( $\alpha$ -actinine et desmine) (HIRSCHI et GOODEL, 2002). Mais elles expriment des gènes partagés par les cellules précurseurs vasculaires et hématopoïétiques embryonnaires comprenant le **PE-CAM-1** et le **TAL-1** (HIRSCHI et GOODEL, 2002). Étonnamment, d'autres marqueurs spécifiques des cellules précurseurs sanguines et endothéliales ne sont pas exprimés par les cellules SP comme le FLK-1 (HIRSCHI et GOODEL, 2002). Cependant l'expression du ligand de FLK-1, le **VEGF-A**, est présente (HIRSCHI et GOODEL, 2002). Elles sont également **KIT-positives** et **SCA-1 positives** (TARNOWSKI et SIERON, 2006).

### 3) Les cellules précurseurs des vaisseaux sanguins

Depuis toujours, l'angiogenèse physiologique ou pathologique a été définie comme provenant de la **prolifération de cellules endothéliales préexistantes** (*endothelial cells* ou ECs) (ASAHARA *et al.*, 2000). Cependant, la transplantation de cellules endothéliales différenciées ne parvient pas à rétablir la circulation dans des zones ischémiques.

Durant l'embryogenèse, les hémangioblastes dérivés du mésoderme splanchnique sont des cellules souches donnant les HSCs et possiblement les cellules précurseurs des endothéliums (*endothelial progenitor cells* ou EPCs) (Figure 18) (KUBO et ALITALO, 2003 ; RISAU et FLAMME, 1995). Les EPCs pourraient également provenir directement des HSCs (KUBO et ALITALO, 2003).

**Figure 18 : Schéma possible du lien entre les HSCs et les EPCs chez l'embryon puis chez l'adulte (d'après KUBO et ALITALO, 2003)**



Les précurseurs endothéliaux ont tout d'abord été isolés à partir du sang périphérique et seraient capables de se greffer dans des endothéliums vasculaires à un taux de 10% (HIRSCHI et GOODEL, 2002). Les EPCs possèdent des marqueurs communs avec les HSCs comme CD133 et CD34 mais elles expriment en plus un marqueur endothéial à savoir le **FLK-1** (LIAO *et al.*, 2007). A l'heure actuelle, on considère plutôt que, tout comme les cellules SP, les **EPCs sont une sous population de HSCs** ayant la capacité particulière d'acquérir un phénotype endothéial (LIAO *et al.*, 2007). Les EPCs sont extrêmement **peu nombreuses** dans le sang périphérique et dans la moelle :

leur utilisation en médecine régénérative passerait obligatoirement par leur mobilisation *in vivo* et/ou leur expansion *ex vivo*, ce qui présente ainsi une limite à leur utilisation (NAKAGAMI *et al.*, 2006).

#### 4) Intérêt des cellules souches hématopoïétiques : traitement des troubles sanguins et immunitaires

Les premières greffes de moelle osseuse réussies pour le traitement de patients atteints d'immunodéficience acquise ou de leucémie aigüe datent de la fin des **années 1960/début des années 1970** (BACH *et al.*, 1968). Ce sont les premières utilisations des cellules souches.

Les HSCs sont utilisées chez l'Homme comme chez l'**animal** pour le traitement des désordres du système hématopoïétique et des déficits du système immunitaire. En effet, les HSCs sont à l'origine du lignage des cellules myéloïdes et lymphoïdes. L'injection de HSCs ou de moelle osseuse hématopoïétique complète réalisée au niveau de la veine porte, d'une veine périphérique ou directement dans la moelle osseuse permet ainsi la régénération du lignage cellulaire hématopoïétique.

De plus, la capacité qu'ont les HSCs à se greffer dans un nouvel organisme et à rétablir un système hématopoïétique en fait des cibles idéales pour la **thérapie génique** par vecteur pour corriger des maladies congénitales ou acquises affectant le système hématopoïétique et le système immunitaire (ASAHARA *et al.*, 2000). Théoriquement, les défauts génétiques portant sur un seul gène affectant la fonction des cellules sanguines matures (comme chez l'Homme les hémoglobinopathies, les immunodéficiences, les maladies de surcharge et les défauts de fonctionnement des plaquettes), pourraient être traités en introduisant le gène manquant ou défectueux dans une HSC autologue (ASAHARA *et al.*, 2000 ; CAVAZZANA-CALVO *et al.*, 2000).

A l'heure actuelle, il a été rapporté qu'un grand nombre de cellules souches CD34+ hautement purifiées pourrait redonner un système immunitaire efficace chez un enfant atteint d'une anémie sévère réfractaire aux traitements (MIMEAULT et BATRA, 2006).

Chez le **Chien**, de nombreuses greffes de moelle osseuse ont été pratiquées pour traiter les maladies du système hématopoïétique et du système immunitaire. L'étude de CARTER *et al.* (1992), portant sur la transplantation de cellules souches hématopoïétiques autologues génétiquement identifiées par un rétrovirus a permis de montrer, sur 9 chiens, l'efficacité de la transplantation de HSCs sans irradiation au préalable. Les cellules souches ainsi marquées ont été retrouvées avec succès dans la moelle osseuse des chiens traités.

Les **cellules SP** sont bien entendu capables de régénérer le **lignage hématopoïétique au complet** puisqu'elles sont hautement purifiées en HSCs (TARNOWSKI et SIERON, 2006).

## 5) La plasticité des cellules souches hématopoïétiques

Les HSCs sont capables de se différencier en de **multiples lignages cellulaires autres que le lignage hématopoïétique** (HO et PUNZEL, 2003). Elles se différencient selon les modalités décrites précédemment à savoir la transdifférenciation et la fusion cellulaire principalement. Les modalités dépendent en partie du tissu cible.

Un choix volontaire a été effectué afin de ne privilégier que les intérêts les plus importants et les mieux décrits pour le moment. Cette partie n'est donc, en aucun cas, exhaustive.

### a) Les HSCs et la réparation du muscle cardiaque

Les HSCs ont un rôle dans la régénération du muscle cardiaque (MIMEAULT et BATRA, 2006 ; YE *et al.*, 2006). En effet, dans une étude menée par ORLIC *et al.* (2001a), des HSCs LIN-/KIT+, issues de souris transgéniques transfectées par la GFP, ont été directement injectées dans le myocarde de souris, venant de subir un infarctus par ligature d'une artère coronaire. Neuf jours après la transplantation, les régions injectées présentaient un nombre important de cellules KIT+/GFP+. Ces cellules exprimaient également la **myosine cardiaque** et certaines mêmes (75%) exprimaient les marqueurs de **cardiomyocytes immatures** à savoir l'actine  $\alpha$ -sarcomérique et l' $\alpha$ -actinine.

De nombreux groupes d'étude ont observé la **transdifférenciation** des HSCs en cardiomyocytes (TARNOWSKI et SIERON, 2006). Cependant d'autres études ont plutôt démontré que la **fusion cellulaire** serait la principale responsable (LIAO *et al.*, 2007 ; YE *et al.*, 2006).

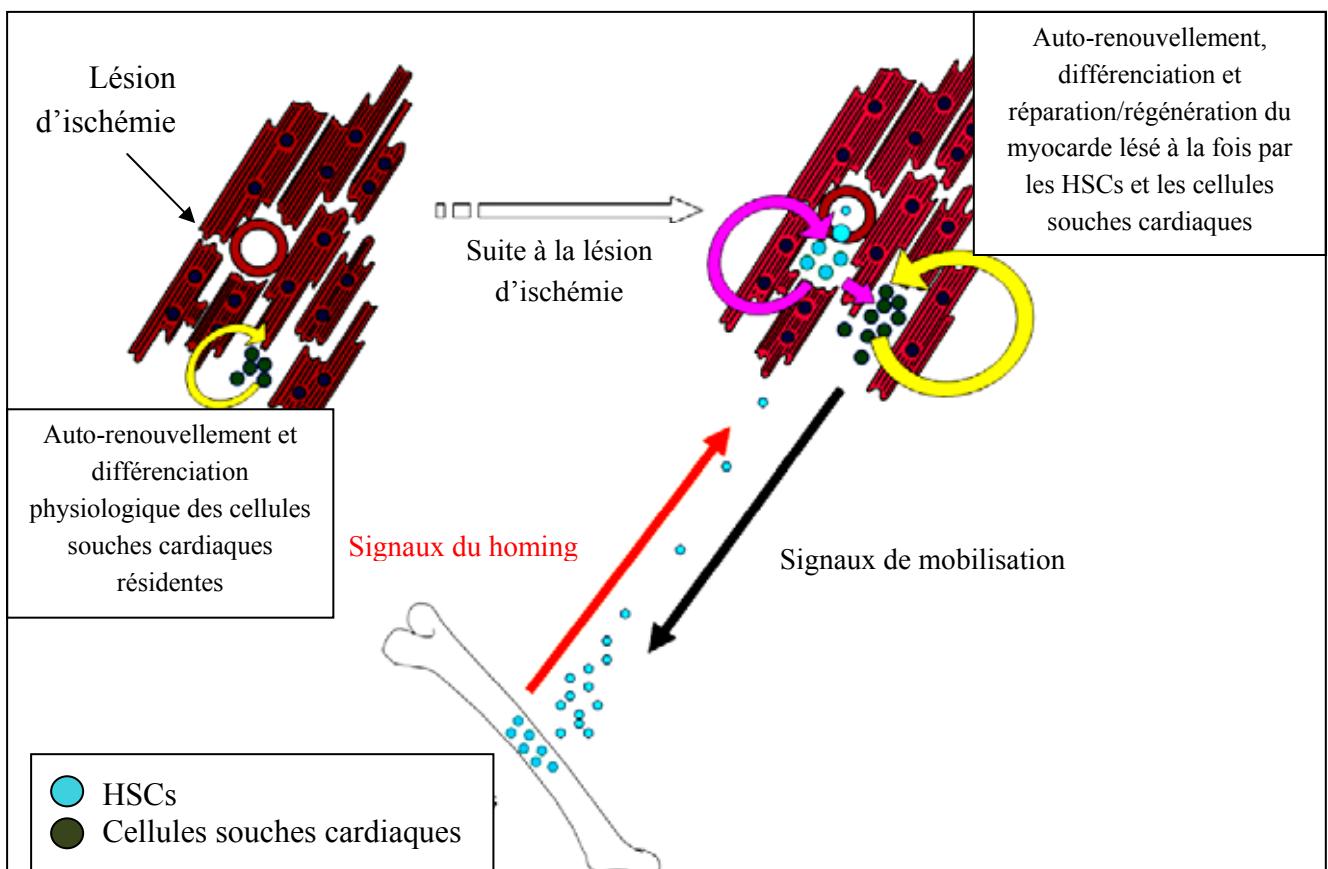
Dans tous les cas, il semblerait que la différenciation des HSCs en cardiomyocytes ne soit pas le seul facteur responsable de l'amélioration de la fonction cardiaque. En effet, les effets bénéfiques amenés par la transplantation de HSCs sont **disproportionnés** par rapport au degré de régénération physique du myocarde : le seul fait que les HSCs participent à la régénération du myocarde ne peut pas contribuer à lui tout seul à l'amélioration de la fonction cardiaque. Il semblerait que les HSCs aient en plus un **rôle paracrine** sur les cellules locales : on a ainsi pu observer une sécrétion de facteurs atténuant l'apoptose des cardiomyocytes endogènes et des cellules endothéliales suite à l'ischémie et favorisant l'angiogenèse et/ou l'activation des cellules souches cardiaques résidentes (LIAO *et al.*, 2007 ; TORELLA *et al.*, 2005).

Ils ont également souligné l'importance des **facteurs de mobilisation** des HSCs comme le G-CSF, le GM-CSF ou encore le SCF. En effet, en injectant du G-CSF plusieurs jours avant et après un infarctus expérimental chez des souris, il a été possible d'observer une diminution de la taille de l'infarctus et une diminution de la mortalité par rapport au groupe témoin. Ces facteurs de mobilisation sont retrouvés dans tous les modèles d'ischémie cardiaque chez la Souris (HERZOG *et al.*, 2003 ; HO et PUNZEL, 2003). Les HSCs sont passées dans la circulation sanguine puis ont migré dans le myocarde grâce au SDF-1 et à la E-sélectine et enfin elles **se sont différenciées en cellules matures cardiaques**.

Le myocarde lésé sécrète **de lui-même** ces facteurs pour stimuler la prolifération des HSCs et entraîner leur passage dans la circulation sanguine. Les facteurs les plus importants lors d'infarctus du myocarde sont le **G-CSF** et le couple **SCF/KIT**. Il exprime de la même manière les facteurs du homing comme le **SDF-1**, intervenant dans la voie SDF-1/CXCR4.

La figure 19 est une représentation schématique de l'intervention des cellules souches cardiaques résidentes mais surtout du **homing** des cellules souches de la moelle osseuse lors de lésion d'ischémie.

**Figure 19 : Représentation schématique de la réparation du myocarde, basée sur les cellules souches (d'après LIAO *et al.*, 2007)**



De nombreuses études n'ont **pas montré d'effets secondaires** à l'injection d'HSCs directement dans le muscle cardiaque comme des arythmies, des périodes d'ischémie per-opératoires ou des complications post-opératoires (YE *et al.*, 2006).

Cependant, elles ont montré que les HSCs n'exprimaient **pas** de protéines de jonction **GAP** : les HSCs ne sont ainsi pas intégrées dans le tissu cardiaque. En effet, les jonctions GAP sont nécessaires à la coordination des myofibres entre elles. Si les jonctions GAP ne sont pas présentes dans les nouvelles myofibres formées par les HSCs, ces myofibres seront incapables de fonctionner

de manière synchronisée avec les autres myofibres et seront donc incapables de créer une force motrice cardiaque.

Les cellules SP pourraient également donner naissance à de nombreuses cellules différenciées comme des **myocytes cardiaques**. Dans l'étude de HIRSCHI et GOODEL (2002), des cellules SP ont été transfectées par le *LacZ* et ont été injectées par transplantation de moelle osseuse, après un infarctus cardiaque chez des souris. Ces cellules se sont retrouvées au niveau de la moelle osseuse hématopoïétique mais également dans le myocarde sous forme de **cellules musculaires cardiaques** exprimant l' $\alpha$ -actinine et sous forme de **cellules endothéliales** au niveau des endothéliums des vaisseaux sanguins. Il y a eu parallèlement une **amélioration** de la fonction cardiaque par une régénération de la zone ischémie. Les cellules SP ont donc **migré** vers le site du traumatisme : elles sont donc capables de **homing** tout comme les autres cellules de la moelle osseuse.

On retrouve des cellules SP dans le myocarde dans des **conditions physiologiques** : ces cellules proviennent bien de la moelle osseuse mais résident à **temps complet** dans le muscle cardiaque. Elles sont donc considérées dans ce cas comme des **cellules souches cardiaques** (BARILE *et al.*, 2007).

La mobilisation des **EPCs** à l'aide de cytokines permet l'augmentation de ces cellules dans le sang périphérique (LIAO *et al.*, 2007). Mais, en plus des facteurs de mobilisation bien connus pour les HSCs comme le G-CSF, le SCF, le VEGF et l'EPO, des **statines** ont été identifiées comme facteurs de recrutement. Ces EPCs interviendraient ensuite dans l'amélioration de la fonction cardiaque par amélioration de la vascularisation.

### b) Différenciation des HSCs en cellules musculaires striées squelettiques

Les HSCs ont la capacité de **régénérer** le tissu musculaire une fois injectées, que ce soit après une **lésion musculaire** ou dans le cadre de **myopathies** (HO et PUNZEL, 2003). L'injection de HSCs dans le muscle entraîne l'expression par ces cellules de gènes spécifiques des myocytes comme l'actine et la myosine (HERZOG *et al.*, 2003). Des études sur des souris mutantes mdx (*X-linked muscular dystrophy*), modèle de la myopathie de Duchenne, ont montré qu'à la fois la transplantation des cellules de la moelle osseuse et le recrutement *in vivo* des HSCs augmentaient les performances musculaires (HO et PUNZEL, 2003). Ainsi, les HSCs peuvent restaurer une **faible expression de dystrophine** (HERZOG *et al.*, 2003).

Il y a également présence de **cellules SP** dans le muscle squelettique (HO et PUNZEL, 2003). Bien qu'ayant une origine médullaire, ces cellules sont considérées comme des cellules souches musculaires et sont donc traitées comme telles.

### c) Différenciation des HSCs en hépatocytes

De nombreuses études sur le Rat et la Souris ainsi que chez l'Homme ont montré que les HSCs pouvaient se **différencier en hépatocytes** après leur transplantation aidant à la régénération du foie (HERZOG *et al.*, 2003 ; HO et PUNZEL, 2003 ; JUNG *et al.*, 2006 ; TARNOWSKI et SIERON,

2006). L'intérêt de l'utilisation des cellules souches dans la régénération du foie est lié au manque crucial d'organe pour les transplantations.

L'utilisation des hépatocytes matures est chose courante : en effet, ce sont des cellules **intermitotiques** qui ont conservé un potentiel de croissance. Le problème majeur est qu'ils n'ont qu'une croissance limitée *in vivo* et *in vitro*.

Dans l'étude de JUNG *et al.* (2006), après une injection de tétrachlorure de carbone entraînant une atteinte hépatique importante chez des souris, ces chercheurs ont fait une transplantation de cellules de la moelle osseuse marquées CD34+. Ils ont alors observé une réduction de l'hépatosplénomégalie induite par le tétrachlorure de carbone, une augmentation de près de 45 fois du nombre de cellules CD34+ dans le foie, une augmentation significative de l'expression du SDF-1 par le foie lésé, une augmentation significative du nombre de cellules exprimant le récepteur CXCR4 au SDF-1 dans le foie et une normalisation du taux d'enzymes hépatiques. Ceci permet de mettre en évidence le homing des HSCs dans le tissu lésé et la régénération des fonctions de cet organe. Après une atteinte du foie, celui-ci se met à augmenter la sécrétion des facteurs du homing comme le **SDF-1** (JUNG *et al.*, 2006). Ceci est nécessaire et indispensable au homing des HSCs au niveau du tissu lésé : sans cela, les HSCs iraient en priorité dans leur niche principale à savoir la moelle osseuse et dans la rate chez les souris.

Dans l'étude de LAGASSE *et al.* (2000), ces chercheurs ont montré que des HSCs s'étaient mises à exprimer des marqueurs et des protéines ainsi que des fonctions d'hépatocytes après une greffe de moelle osseuse chez des souris. En ce qui concerne le moyen de différenciation, la fusion cellulaire a été trouvée dans une étude (WANG *et al.*, 2003) tandis que la transdifférenciation a été démontrée dans deux études (ISHIKAWA *et al.*, 2003 ; NEWSOME *et al.*, 2003). La méthode de différenciation est encore à l'heure actuelle **controversée**.

L'expression des gènes spécifiques des hépatocytes c'est-à-dire l'**Albumine** et le **CK-18** par des HSCs CD34+ a été démontrée comme étant induite en culture par le **HGF** (FIEGEL *et al.*, 2006). De nombreux stimuli sont nécessaires pour la différenciation des cellules souches *in vitro* en hépatocytes : l'addition d'hormones de croissance et de cytokines dans le milieu de culture, l'utilisation de récipients de culture couverts avec des molécules de la matrice extra-cellulaire et la nécessité d'une co-culture avec d'autres types de cellules (FIEGEL *et al.*, 2006). Par exemple, l'utilisation d'un milieu de culture couvert d'hépatocytes et supplémenté en HGF et en EGF (*epidermal growth factor*) permet la différenciation des HSCs en hépatocytes.

Cependant, il reste encore un problème à l'heure actuelle : en effet, il est nécessaire pour régénérer un foie de régénérer à la fois le tissu hépatique et à la fois les canaux biliaires. Il faut donc que les cellules utilisées pour la thérapie cellulaire soient capables de se différencier en au moins deux types cellulaires. Or, d'après FIEGEL *et al.* (2006), les HSCs n'exprimaient en culture **que** le phénotype des **hépatocytes** et non celui des canaux biliaires à savoir CK-19. Ceci limite donc l'utilisation des HSCs.

#### d) Un rôle des cellules SP et des EPCs dans la régénération rénale

La présence de **cellules SP** a été mise en évidence au niveau du rein (HISHIKAWA et FUJITA, 2006). Elles sont tout comme celles du myocarde ou du muscle squelettique considérées comme des cellules souches endogènes à ces organes. Elles sont donc traitées dans la partie correspondante aux cellules souches rénales.

Les **EPCs** semblent avoir un rôle dans le traitement de l'insuffisance rénale aigue en augmentant la **vascularisation rénale** (HISHIKAWA et FUJITA, 2006).

Les HSCs sont donc des cellules relativement bien caractérisées et largement utilisées dans le traitement des dégénérescences de la moelle osseuse et des déficits immunitaires. C'est par ce biais qu'elles furent découvertes et c'est pour le moment leur mode d'utilisation principal. Mais ces HSCs possèdent une certaine plasticité permettant ainsi d'envisager le traitement de maladies cardiaques, hépatiques et musculaires. Il reste encore des inconnues dans le domaine de leur plasticité, mais les envisager sous cet angle permet d'accroître leurs intérêts thérapeutiques.

Les cellules SP sont moins bien caractérisées mais semblent posséder un potentiel équivalent aux HSCs. Les EPCs sont encore moins caractérisées mais il semble que leur rôle dans la néovascularisation soit non négligeable. On le verra par la suite mais les cellules SP sont retrouvées dans d'autres organes comme le rein ou le muscle et ont un rôle important dans la régénération physiologique et pathologique de ces organes.

### B. Les cellules souches de l'épithélium intestinal

Ces cellules souches font partie des cellules souches **épithéliales** des tissus à **renouvellement rapide** comprenant l'épiderme, la cornée et l'épithélium intestinal. Ce sont des tissus dont l'épithélium est exposé à l'environnement **extérieur**. Le premier rôle de ces tissus est la **protection** sous forme de barrière avec le milieu extérieur. C'est pour cela que leur épithélium est rapidement remplacé et que les cellules TA obtenues à partir des cellules souches résidentes sont en constante prolifération.

Ces tissus ont des **niches** extrêmement bien **définies** physiquement entraînant la formation d'une hiérarchie très stricte au sein des cellules souches et d'un support protecteur très important (RIZVI et WONG, 2005).

#### 1) Nature de ces cellules et facteurs de régulation

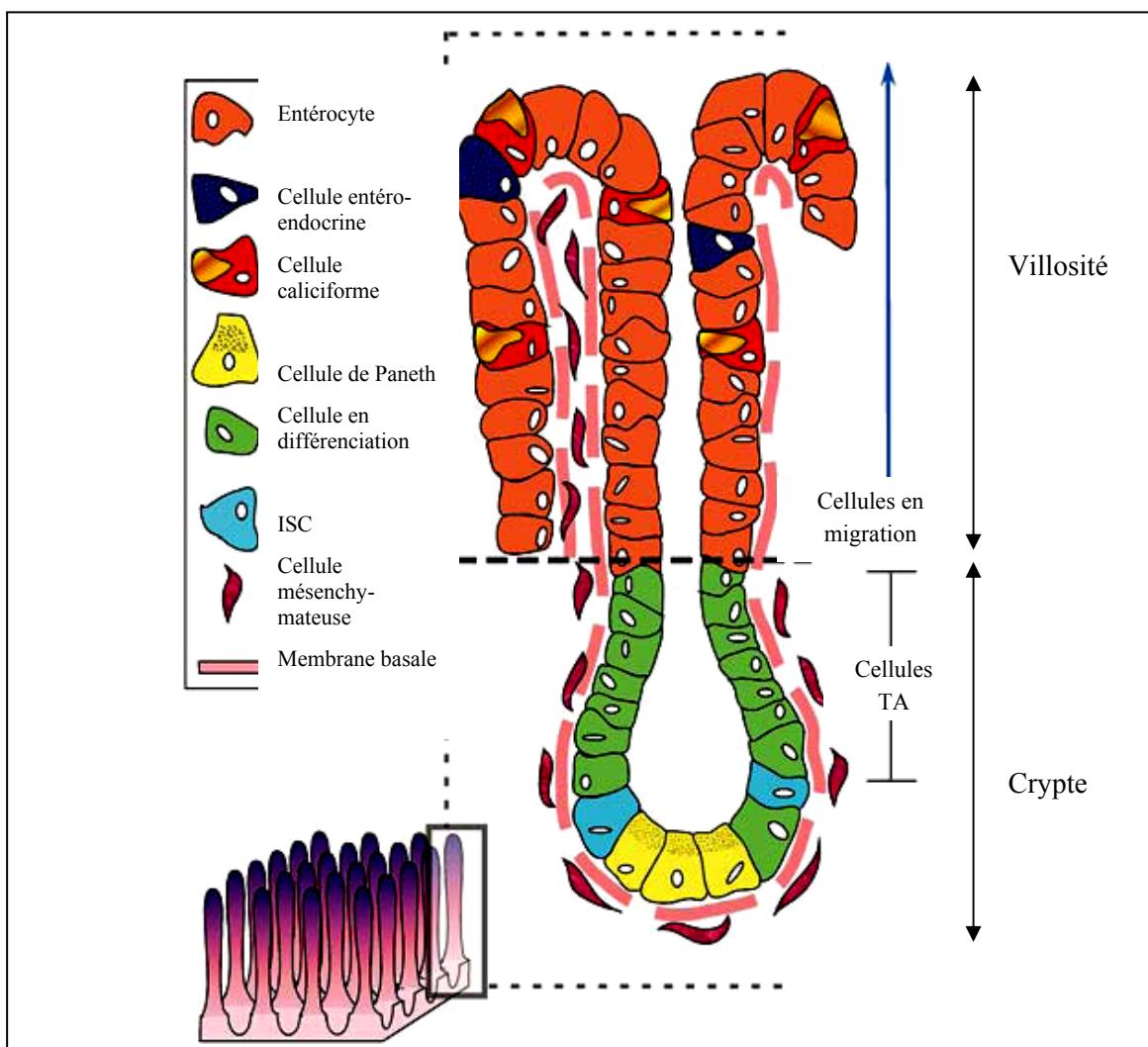
Les cellules souches intestinales (*intestinal stem cells* ou **ISCs**) résident dans les **cryptes** ou **glandes de Lieberkühn**.

Leurs marqueurs cellulaires semblent être Musashi-1 (**MSI-1**), **CD-24** et **KIT** (REYA et CLEVERS, 2005).

Sur la figure 20, il est possible de voir les ISC, leurs descendants et leur disposition au sein des villosités et des cryptes.

Les ISC sont multipotentes et donnent naissance à 4 principales lignages cellulaires : les entérocytes ayant un rôle d'absorption, les cellules mucipares caliciformes, les cellules entéro-endocrines sécrétant les hormones peptidiques, et les cellules de Paneth. Les trois premiers lignages se différencient en migrant vers l'extrémité des cryptes sur les villosités en 3 à 5 jours. Arrivées en haut des villosités, ces cellules subissent l'apoptose et desquamant dans la lumière intestinale. La quatrième lignée, celle des cellules de Paneth, se différencie en migrant vers la base de la crypte. Ces cellules sont impliquées dans l'immunité et sécrètent de nombreuses protéines, incluant le facteur de nécrose tumorale (*tumoral necrosis factor* ou TNF), des lysozymes et des cryptines. Les cellules de Paneth ont une durée de vie plus longue que les autres types cellulaires et survivent de 18 à 23 jours avant d'être phagocytées par les cellules environnantes.

**Figure 20 : Structure histologique cellulaire de l'épithélium des villosités et des cryptes de l'intestin grêle (d'après RIZVI et WONG, 2005)**



## 2) La niche des cellules souches intestinales

L'épithélium de l'intestin est extrêmement bien organisé et peut être divisé en deux régions : une région **fonctionnelle** abritant les différents types cellulaires (**villosités**) et une région de **prolifération** (**cryptes de Lieberkühn**). Toutes les cellules formant les villosités proviennent des cryptes. Les ISCs sont localisées en 4<sup>ème</sup> ou 5<sup>ème</sup> position au dessus des cellules de Paneth (MORRISON et SPRADLING, 2008).

En ce qui concerne le nombre de cellules souches par crypte, deux théories s'opposent.

La première théorie affirme qu'il n'y a qu'une seule ISC par crypte et se base sur une théorie monoclonalement (WINTON *et al.*, 1988 ; WONG *et al.*, 2000). Cela a été mis en évidence par le suivi de mutation génétique au cours des divisions : en induisant une mutation stable chez la supposée cellule souche mère, ils se sont rendus compte que la mutation était conservée dans tous les lignages cellulaires signifiant alors que toutes les cellules différenciées obtenues provenaient de la même cellule souche mère.

La deuxième théorie affirme qu'il y a au moins 5 à 6 cellules souches par crypte (POTTEN *et al.*, 1990). Cela a été observé par des techniques de méthylation de l'ADN dans les cellules des cryptes, par irradiation chez des souris. Les chercheurs ont suivi l'index des méthylations au cours du temps et ont ainsi déterminé que les premières cellules touchées devaient être les ISCs car ce sont des cellules en division active ; et qu'elles semblaient être plusieurs par crypte.

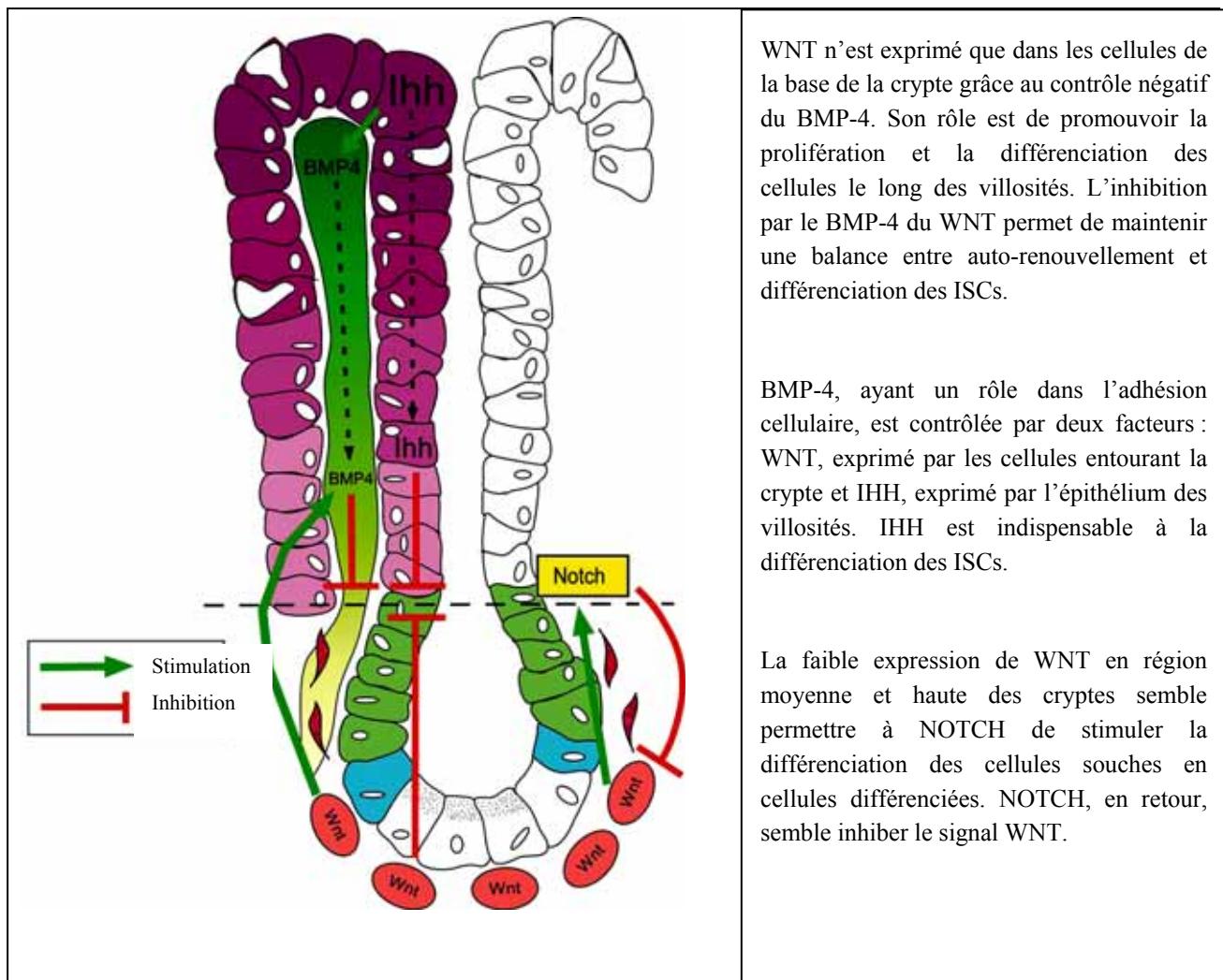
Il y a cependant une idée en commun dans ces deux théories : il semblerait qu'il n'y ait qu'**une seule cellule souche ancestrale par crypte** qui devient quiescente immédiatement après avoir donné naissance à un grand nombre de cellules souches actives. Ces cellules souches actives sont ensuite responsables du renouvellement rapide de la population des cellules intestinales en produisant les cellules TA. Ces dernières, au nombre de 20 à 30 par crypte, sont engagées dans le développement des différents lignages cellulaires.

La niche des ISCs comporte comme toute une structure de **base** mésenchymateuse : celle-ci est composée de la matrice extra-cellulaire, des neurones entériques, des vaisseaux sanguins, des lymphocytes intra-épithéliaux et des fibroblastes péri-cryptaux (RIZVI et WONG, 2005). Il y a une **communication** permanente entre ces cellules et les ISCs.

La **communication** entre les cellules de la niche et les ISCs est représentée sur la figure 21. A l'heure actuelle, les facteurs responsables de cette communication ne sont pas bien identifiés. Il semblerait que les fibroblastes sécrètent des facteurs comme **HGF**, **TGF-β** et **KGF** (*keratinocyte growth factor*). Il existe des récepteurs pour ces facteurs sur les cellules épithéliales adjacentes. D'autres facteurs sécrétés par des cellules environnantes semblent jouer un rôle dans le renouvellement de l'épithélium : le facteur de croissance dérivé des plaquettes (*platelet-derived growth factor* ou **PDGF**), **SHH** et plus particulièrement le **SHH intestinal** ou **IHH** (*intestinal hedgehog*), le **BMP-4**, le facteur Forkhead-6 (**FKH-6**), **WNT**, **NOTCH** et le facteur de transcription nucléaire **NKX3-3** (RIZVI et WONG, 2005). Il semblerait également que les cellules entéro-

endocrines en sécrétant le **glucagon** stimulent les ISC s vers leur prolifération et leur différenciation (RIZVI et WONG, 2005).

**Figure 21 : Modèle du réseau de communication définissant la niche des ISC s et régulant le gradient de prolifération et de différenciation (d'après RIZVI et WONG, 2005)**



Ce gradient de concentration des différents facteurs crée un **microenvironnement** permettant l'**adhésion** des ISC s, la **prolifération** des cellules TA et la **différenciation** en cellules épithéliales.

### 3) Les ISC s : un rôle dans le renouvellement de l'épithélium intestinal

Le remplacement de l'épithélium intestinal est un processus fréquent apparaissant tous les 2 à 7 jours dans les conditions physiologiques : les ISC s sont à l'origine de ce renouvellement.

Les ISC s présentes peuvent également permettre un renouvellement de l'épithélium dans des conditions **pathologiques**. Celles-ci surviennent lors d'inflammation ou d'abrasion (MIMEAULT et

BATRA, 2006). Elles sont capables de régénérer toutes les cellules épithéliales de **l'ensemble cryptes-vilosités**.

On pourrait ainsi les utiliser dans le traitement des entérites hyporégénératives ou des maladies inflammatoires de l'intestin chez l'Homme et l'animal.

Les ISCs sont donc des cellules souches multipotentes permettant la régénération de l'épithélium intestinal dans des conditions physiologiques et pathologiques. Elles sont situées dans une niche bien définie et hautement organisée. Les cellules de la niche communiquent avec les ISCs pour promouvoir leur quiescence ou leur activation. Les signaux de cette niche ne sont pas encore totalement caractérisés, mais leur connaissance permettra de considérer les ISCs dans le traitement de nombreuses maladies digestives chez l'Homme ou chez l'animal.

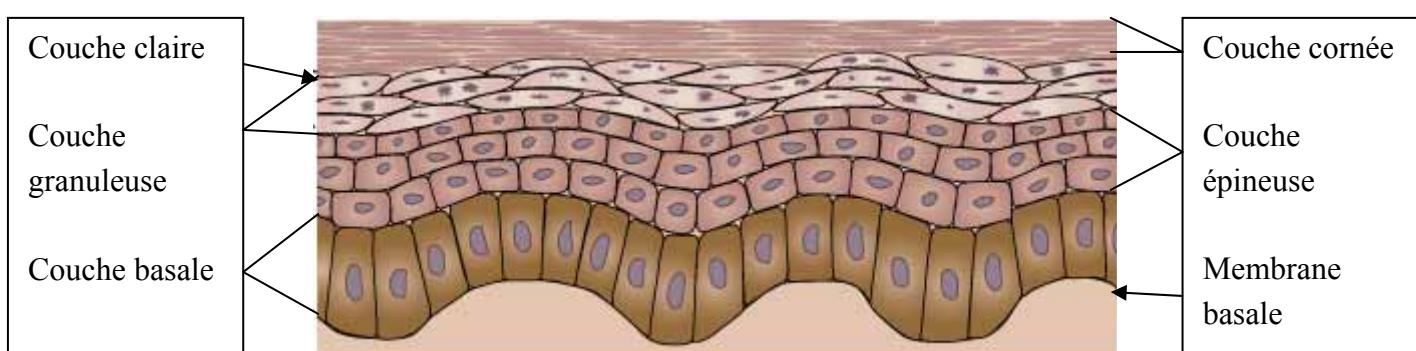
### C. Les cellules souches de l'épiderme

Comme l'épithélium intestinal, la peau représente une **barrière** physique avec le milieu extérieur. L'épiderme est en permanence sollicité par de nombreux traumatismes et donc constamment en **renouvellement**. Chez l'Homme, il est renouvelé entièrement en 14 à 21 jours alors que chez la Souris, il l'est en 10 à 14 jours (RIZVI et WONG, 2005).

#### 1) Structure de l'épiderme et du follicule pileux

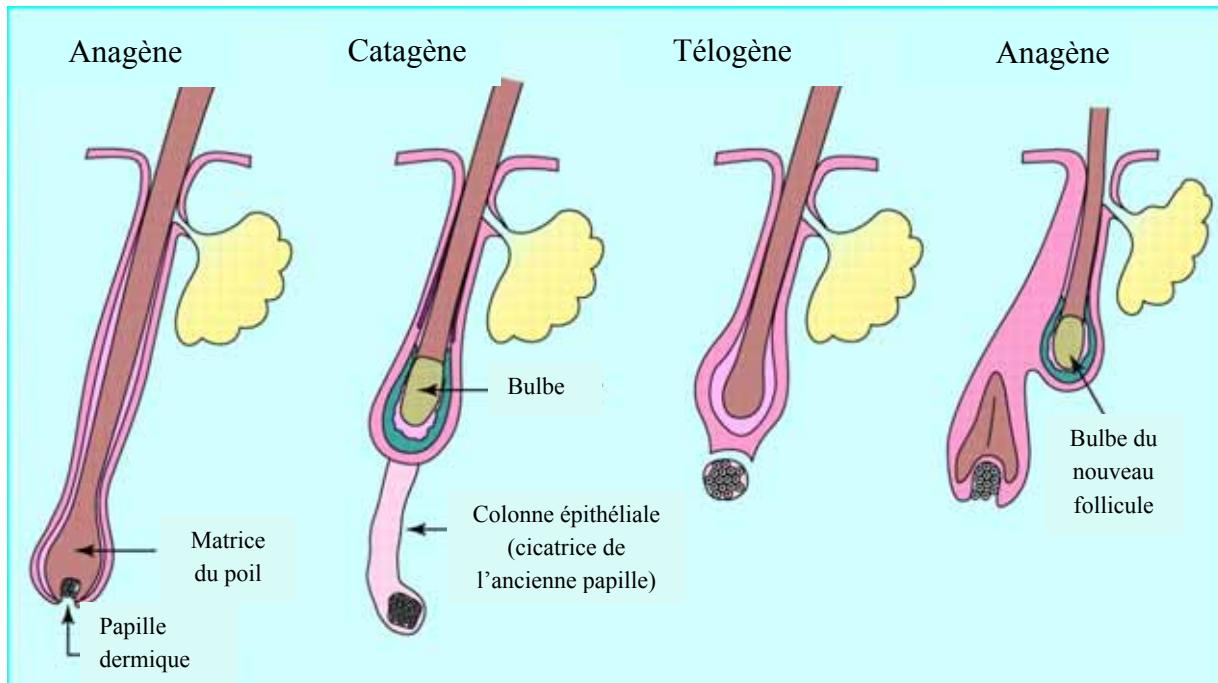
L'épiderme est constitué de **5 couches** (Figure 22) : une **couche basale**, une couche épineuse, une couche granuleuse, une couche claire et une couche cornée constituée de cellules mortes (RIZVI et WONG, 2005).

**Figure 22 : Peau et couches de l'épiderme**



Chaque follicule pileux est composé d'une portion permanente, incluant les glandes sébacées et le bulbe folliculaire sous-jacent, et une portion en renouvellement, subissant des cycles de phase anagène (croissance), catagène (apoptose et rétraction du bulbe) et télogène (repos) (Figure 23). Le bulbe folliculaire est irrigué et innervé par la papille dermique (*dermal papilla* ou DP).

**Figure 23 : Cycle du follicule pileux (d'après SINCLAIR, 1998)**



## 2) Les cellules souches de l'épiderme et leur localisation

Les kératinocytes, constituant la couche basale de l'épiderme, doivent être en renouvellement fréquent. Ils doivent remplacer les cellules de la couche cornée après que celles-ci aient subi la **desquamation**.

Il existe ainsi une petite population de cellules souches multipotentes exprimant des marqueurs spécifiques comme la **K15** (*keratin 15*), capables **d'auto-renouvellement** et exprimant une grande quantité de **molécules d'adhésion** comme des  $\beta$ 1-intégrines, des E-cadhérines et des  $\beta$ -caténines. Elles sont nommées **cellules souches des kératinocytes** (*keratinocyte stem cells* ou **KSCs**) (WATT, 2002). Ces KSCs ont un taux d'auto-renouvellement faible et donnent rapidement des cellules TA qui se détachent de la membrane basale et se différencient.

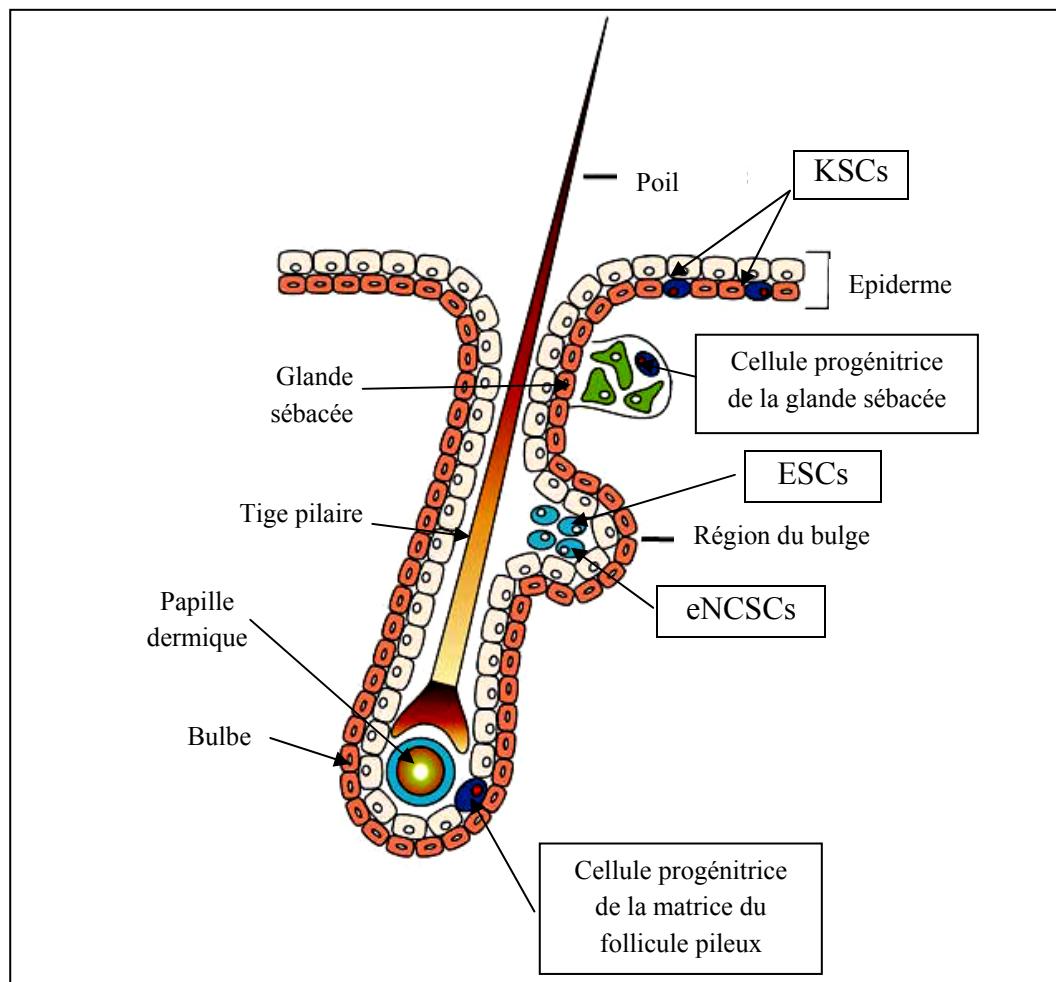
La présence de ces KSCs, localisées au niveau de la couche basale (Figure 24), a été supposée en observant l'expansion continue des kératinocytes de la membrane basale pour le renouvellement des cellules de l'épiderme. Les chercheurs ont alors identifié ces KSCs comme étant des cellules souches des kératinocytes et des cellules différencierées de l'épiderme. On a ainsi des KSCs au niveau

de la couche basale associée à des cellules TA, des cellules TA dans la couche épineuse, des cellules différencierées dans la couche granuleuse et des cellules mortes dans la couche cornée.

Chaque KSCs est en réalité issue d'une autre cellule souche multipotente nommée **cellule souche de l'épiderme** (*epithelial stem cell* ou **ESC**). Ces cellules ont pour marqueurs le **CD34**, le **K5** et la  **$\alpha$ 6-intégrine** (MIMEAULT et BATRA, 2006). Ces cellules sont à l'origine des KSCs donc à l'origine du renouvellement ou de la réparation de l'épiderme ; mais elles donnent également naissance aux cellules progénitrices de la matrice du **follicule pileux**, aux cellules de la **papille dermique** et aux cellules progénitrices des **glandes sébacées**. Elles ont été différencierées des KSCs étant donné que ces cellules souches donnent naissance à la fois aux cellules de l'épiderme et à la fois aux cellules progénitrices de la matrice du follicule ; alors que les KSCs ne donnent naissance qu'aux cellules épidermiques.

De nombreuses études ont démontré que les ESCs se situent dans une niche localisée dans l'**enveloppe du follicule pileux**, nommée « **bulge area** » ou **région du bulge** (Figure 24) (MORRISON et SPRADLING, 2008).

**Figure 24 : Localisation des cellules souches de la peau (d'après RIZVI et WONG, 2005)**



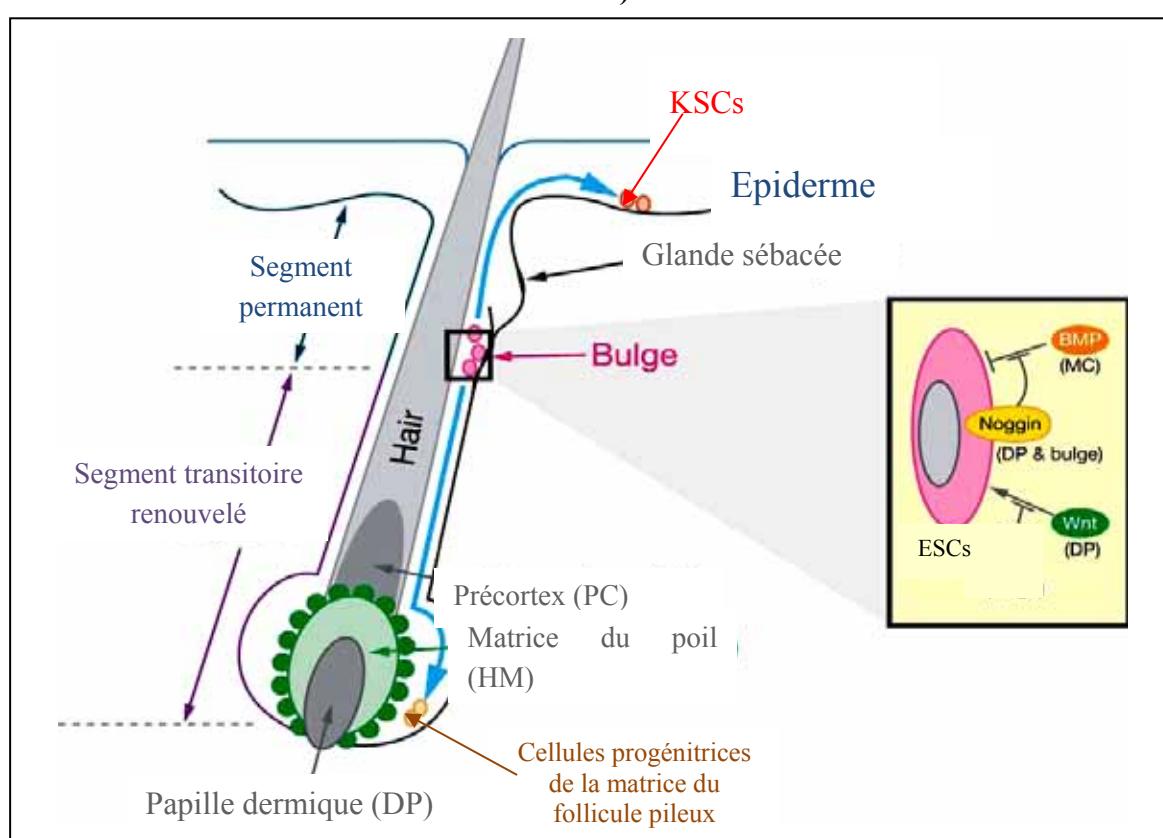
La peau contient également des **cellules souches pluripotentes épidermiques issues de la crête neurale** (*epidermal neural crest stem cells* ou eNCSCs). Ces cellules souches ont été découvertes en 2003 par LI *et al.*: la **Nestine** (marqueur des cellules de la crête neurale) a été marquée par la GFP chez des souris transgéniques et les cellules ainsi marquées ont été retrouvées en partie au niveau du bulge du follicule pileux. Ces cellules auraient comme marqueur **CD34** et **THY-1**. Les eNCSCs peuvent se différencier en de **multiples lignages cellulaires** incluant des mélanocytes, des neurones et des cellules de Schwann (MIMEAULT et BATRA, 2006). Elles pourraient également se différencier en cellules de Merkel en exprimant comme marqueur le K8 (SIEBER-BLUM et GRIM, 2004).

Les eNCSCs semblent localisées au **bulge du follicule pileux** (Figure 24) mais leur localisation varie suivant le cycle folliculaire : en phase télogène et au début de la phase anagène, elles se situent principalement au niveau du bulge ; et en milieu et fin de phase anagène, elles se situent au niveau de la gaine externe de la tige pilaire et au niveau du bulge (LI *et al.*, 2003).

### 3) La niche des cellules souches de l'épiderme

La **couche dermique**, sous le bulge, est composée de cellules mésenchymateuses et joue le rôle de niche (Figure 25).

**Figure 25 : Illustration de la niche des cellules souches épidermiques (d'après LI et XIE, 2005)**

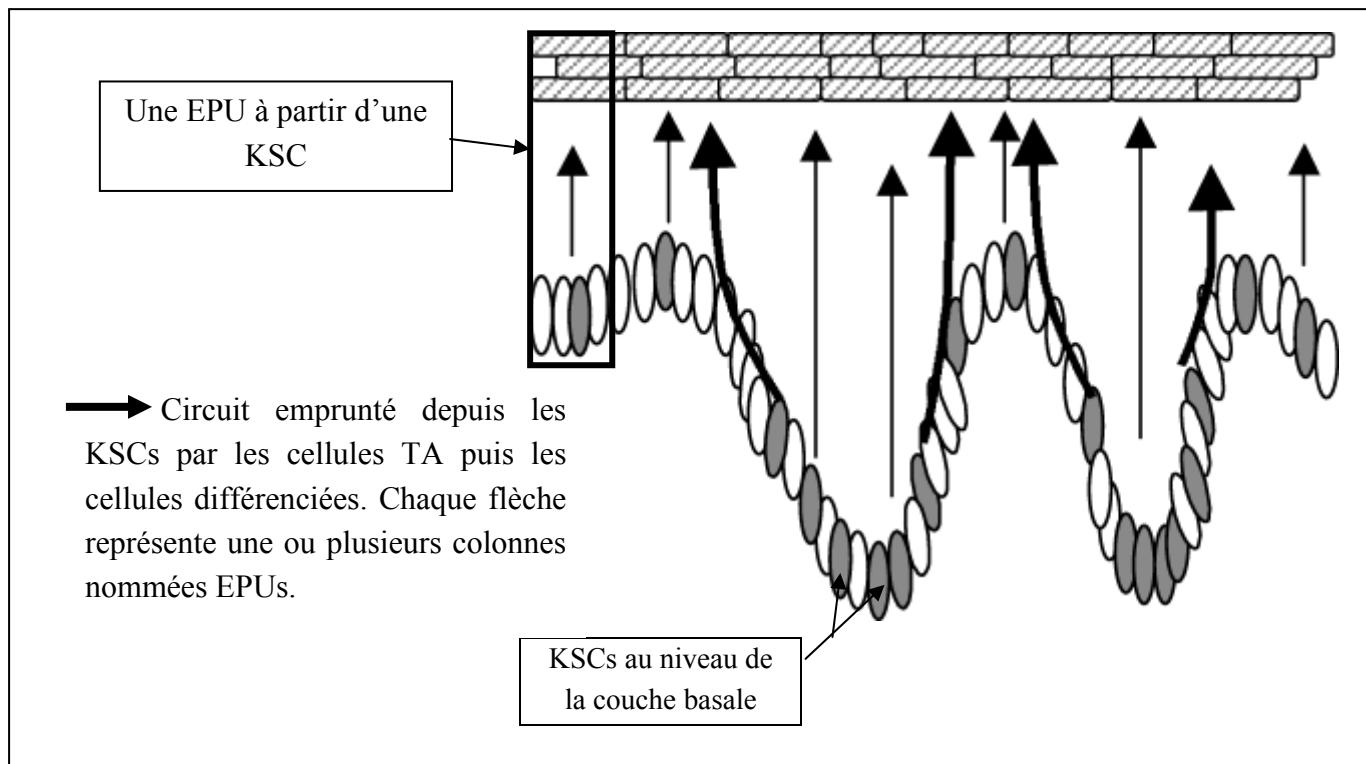


Ainsi les ESCs expriment des molécules d'**adhésion** pour créer un lien avec cette niche et de nombreux facteurs (Figure 25) comme **TGF $\beta$** , **BMP**, **WNT**, DKK, SFRP et WIF (LI et XIE, 2005) ; et des composants des voies **SHH** et **NOTCH**, facteurs contribuant à la maintenance et/ou à la régénération des follicules pileux.

On retrouve ici un **modèle comparable à celui de l'épithélium intestinal**, ces deux tissus étant des épithéliums à renouvellement rapide. WNT et BMP sont des facteurs indispensables au contrôle du comportement des cellules souches : WNT contrôle l'activation et la différenciation des cellules souches, et BMP contrôle leur différenciation et inhibe le signal WNT pour éviter un débordement de leur prolifération (LI et XIE, 2005).

L'épiderme est formé de **multiples petites unités**. Chez la Souris comme chez l'Homme, il y a présence d'unités nommées **unités de prolifération épidermique** (*epidermal proliferative units ou EPUs*) : chaque EPU est responsable de la formation de 1 à 10 colonnes de cellules en maturation. La figure 26 représente des EPUs dans l'épiderme de l'Homme (GHAZIZADEH et TAICHMAN, 2005). Des études ont montré que des KSCs étaient présentes dans chaque EPU au niveau de la couche basale de la peau. Il semblerait que l'expression très élevée des  $\beta 1$ -intégrines et de NOTCH soit responsable du peu de mobilité de ces cellules dans l'épiderme (LI et XIE, 2005).

**Figure 26 : Schéma des EPUs de l'épiderme chez l'Homme (d'après GHAZIZADEH et TAICHMAN, 2005)**



#### 4) Intérêts de l'utilisation des cellules souches de l'épiderme

Les ESCs sont responsables du **renouvellement** permanent de la **peau** et des **follicules pileux**. Elles sont également responsables de la **réparation** de la peau après une blessure. Ces cellules souches présentent donc un intérêt majeur dans la reconstruction cutanée après des cicatrices ou des brûlures.

Il faut cependant noter que les **cellules différenciées** de l'épithélium cutané sont déjà utilisées dans la création de la peau in vitro. En effet, ces cellules sont douées d'une capacité de prolifération relativement importante et permettent ainsi la régénération de l'épiderme. Cependant, ces cellules différenciées n'ont pas les capacités des cellules souches à savoir une multiplication pendant de très longues périodes et la capacité de régénérer à la fois l'épiderme et les follicules pileux.

La figure 27 représente une greffe de lambeau d'épiderme issue de KSCs génétiquement modifiées chez l'Homme (MEZEY, 2000). Ces KSCs ont été modifiées grâce à un rétrovirus pour exprimer *Lam-5* (*Laminin-5*), gène défectueux entraînant l'épidermolyse bulleuse de l'Homme. La LAM-5 est un composant de la membrane basale nécessaire pour l'attachement de l'épiderme au derme. Après 8 jours, les chercheurs ont observé une prise du greffon parfaite et aucune complication n'est apparue un an après la chirurgie. Les KSCs représentent donc un avenir dans le traitement des maladies cutanées.

**Figure 27 : Greffe d'épiderme issue de KSCs génétiquement modifiées pour le traitement d'une épidermolyse bulleuse chez l'Homme (d'après MEZEY, 2000).**



Mis à part le renouvellement de la peau, il a été possible de montrer que les eNCSCs étaient capables de régénérer du **tissu nerveux**. Dans l'étude de HOFFMAN (2005), des eNCSCs marquées par la GFP ont été injectées en sous-cutané chez des souris. Il a alors retrouvé des neurones GFP+ au site de l'injection.

Ces cellules sont en effet, capables de se transformer en **neurosphère** en culture tout comme les cellules souches nerveuses. Selon l'étude de AMOH *et al.* (2005), ces cellules, injectées entre les deux parties du nerf sciatique sectionné chez des souris, ont permis de **régénérer ce nerf**. Le mécanisme de la régénération passe par la différentiation en cellules de Schwann des eNCSCs permettant ainsi la reformation de la gaine de myéline entourant les axones. Il y a alors une croissance axonale et une union des deux extrémités. Par la suite, ce nerf a été stimulé et il y a eu apparition d'une contraction musculaire : la souris a donc pu récupérer une marche fonctionnelle.

Ces eNCSCs présentent des **avantages** considérables : elles sont **facilement disponibles** sur n'importe quel sujet, elles sont **facilement cultivables** in vitro, elles sont **pluripotentes**, elles permettent la **régénération nerveuse** et elles ne posent **pas** de problème **éthique**. Elles pourraient facilement être utilisées chez l'Homme mais surtout chez l'animal : on pourrait ainsi régénérer de la moelle épinière chez des chiens ayant subi un traumatisme. En effet, il y a nécessité en médecine vétérinaire que les cellules souches soient faciles d'accès pour **diminuer les coûts**. La peau en tant que source de cellules souches nerveuses est une perspective **extrêmement intéressante** en **médecine vétérinaire** et en médecine humaine.

Les cellules souches de l'épithélium cutané sont des cellules très facile d'accès et capables de régénérer non seulement l'épiderme mais aussi les follicules pileux. Elles peuvent également être génétiquement modifiées pour traiter des maladies génétiques comme l'épidermolyse bulleuse chez l'Homme. Ces cellules souches possèdent également d'autres capacités comme la régénération nerveuse. Les études sur le sujet ne sont pas encore très développées mais ceci ouvre une perspective extraordinaire pour le traitement des maladies nerveuses. L'avantage non négligeable de ces cellules souches par rapport à d'autres, est leur grand nombre et leur facilité d'accès.

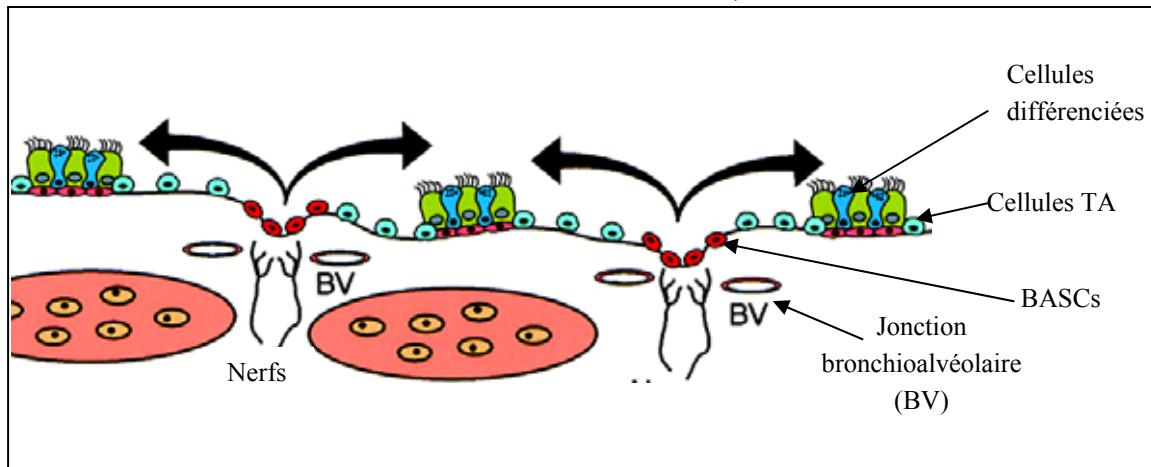
## D. Les cellules souches de l'épithélium pulmonaire

L'existence de cellules souches multipotentes résidant dans **l'épithélium pulmonaire**, capables de se différencier en cellules ciliées et en cellules mucipares des glandes sous-muqueuses, a rapidement été supposée par les chercheurs (MIMEAULT et BATRA, 2006). En suivant cette voie, KIM *et al.* (2005) ont identifié des **cellules souches bronchio-alvéolaires multipotentes** (*bronchioalveolar stem cells* ou **BASCs**) capables d'auto-renouvellement, localisées à la jonction bronchio-alvéolaire (Figure 28) (ENGELHARDT, 2001). Ces BASCs contribuent certainement au **maintien** des cellules bronchiques de Clara et des cellules alvéolaires distales du poumon.

Les **cellules de Clara** sont déjà définies comme des cellules « **souches** » pour les cellules **épithéliales pulmonaires** ; et les **pneumocytes de type 2**, comme les cellules « **souches** » des

**cellules alvéolaires.** En effet, les pneumocytes 2 sont capables d'auto-renouvellement en nouveaux pneumocytes 2 mais ils sont aussi capables de se différencier en pneumocytes de type 1 (HERZOG *et al.*, 2003). Il semblerait ainsi que les BASCs soient à l'origine de ces cellules : les cellules de Clara et les pneumocytes 2 seraient alors considérés comme des **cellules TA**.

**Figure 28 : Composition de la niche des BASCs de l'épithélium broncho-alvéolaire (d'après ENGELHARDT, 2001)**



L'**EGF** (*epidermal growth factor*) et le **SHH** au niveau de l'épithélium pulmonaire semblent contribuer à l'**homéostasie** tissulaire du poumon en stimulant la prolifération et la différenciation des BASCs. Ils semblent également contribuer à la **réparation** de l'épithélium pulmonaire après une lésion (MIMEAULT et BATRA, 2006).

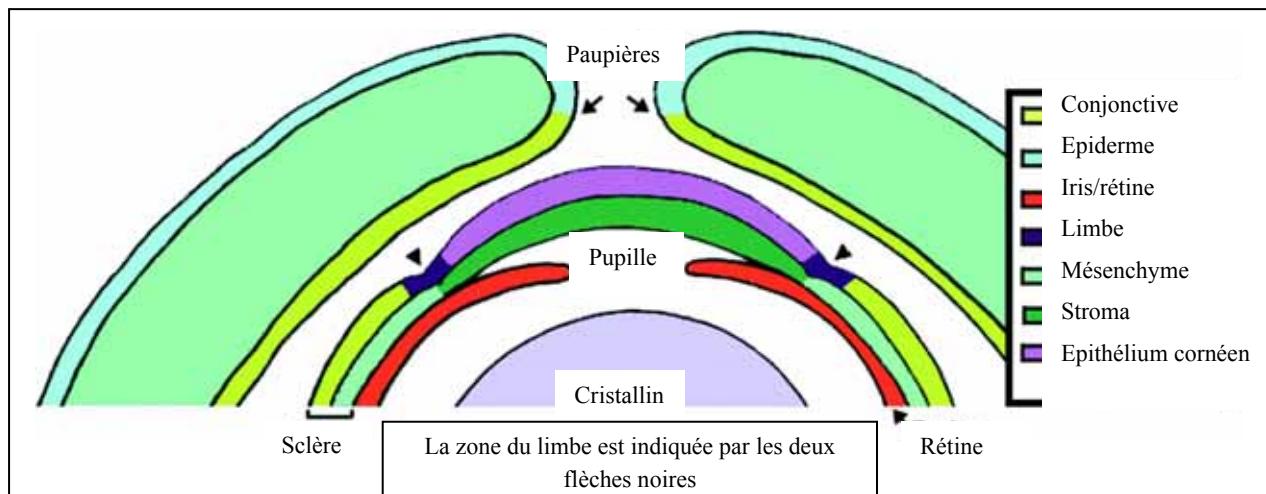
Enfin, des lésions inflammatoires étendues au niveau de l'épithélium pulmonaire sont responsables d'une hypersécrétion de mucus comme dans les bronchites chroniques, l'asthme, la fibrose kystique et les cancers (MIMEAULT et BATRA, 2006). En **inhibant la prolifération** de ces BASCs, on pourrait peut-être limiter ces réactions inflammatoires excessives et ainsi réduire l'impact destructeur de ces phénomènes.

## **E. Des cellules souches au niveau de la cornée et de la rétine**

### **1) Nature de ces cellules souches**

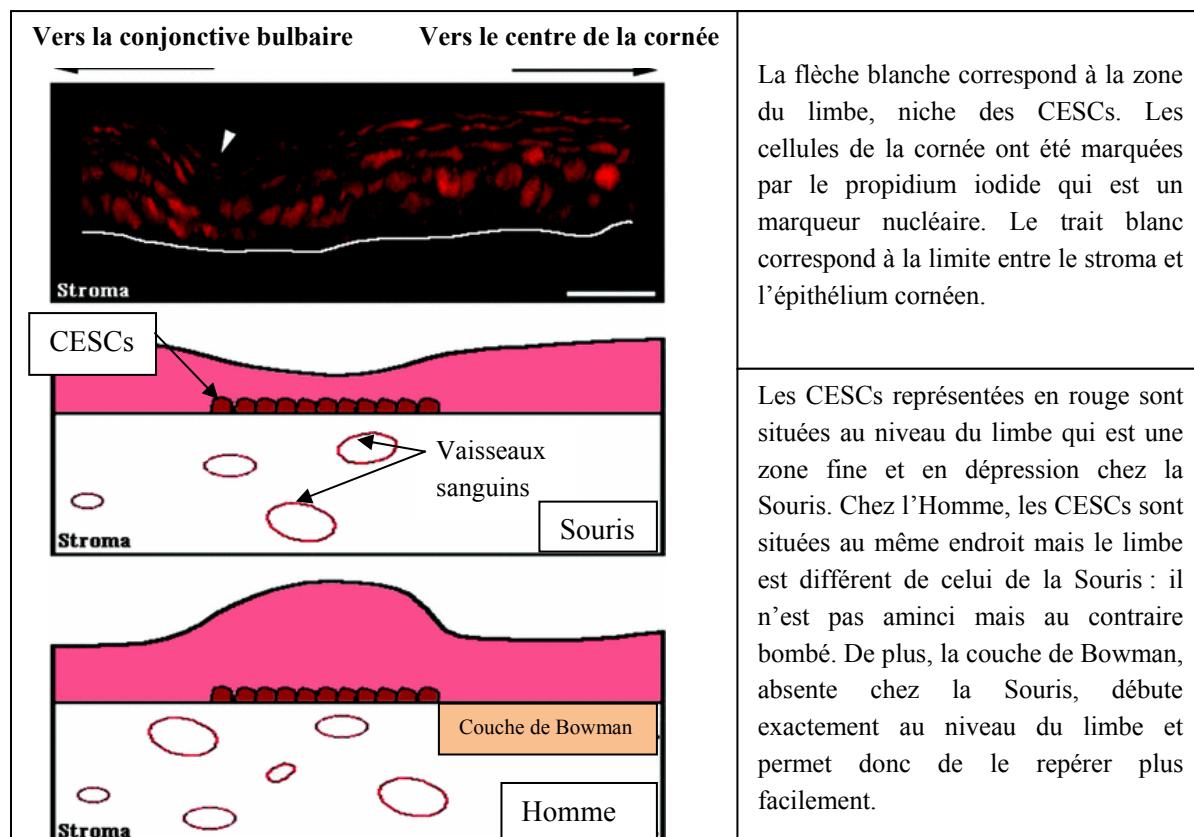
L'épithélium de la surface des yeux comprend la cornée, le limbe, et l'épithélium stratifié conjonctival (Figure 29). Etant exposé au milieu extérieur, il subit des agressions et doit donc régulièrement se régénérer.

**Figure 29 : Structure de la partie antérieure d'un œil de Souris (d'après PAJOOHESH-GANJI et STEPP, 2005)**



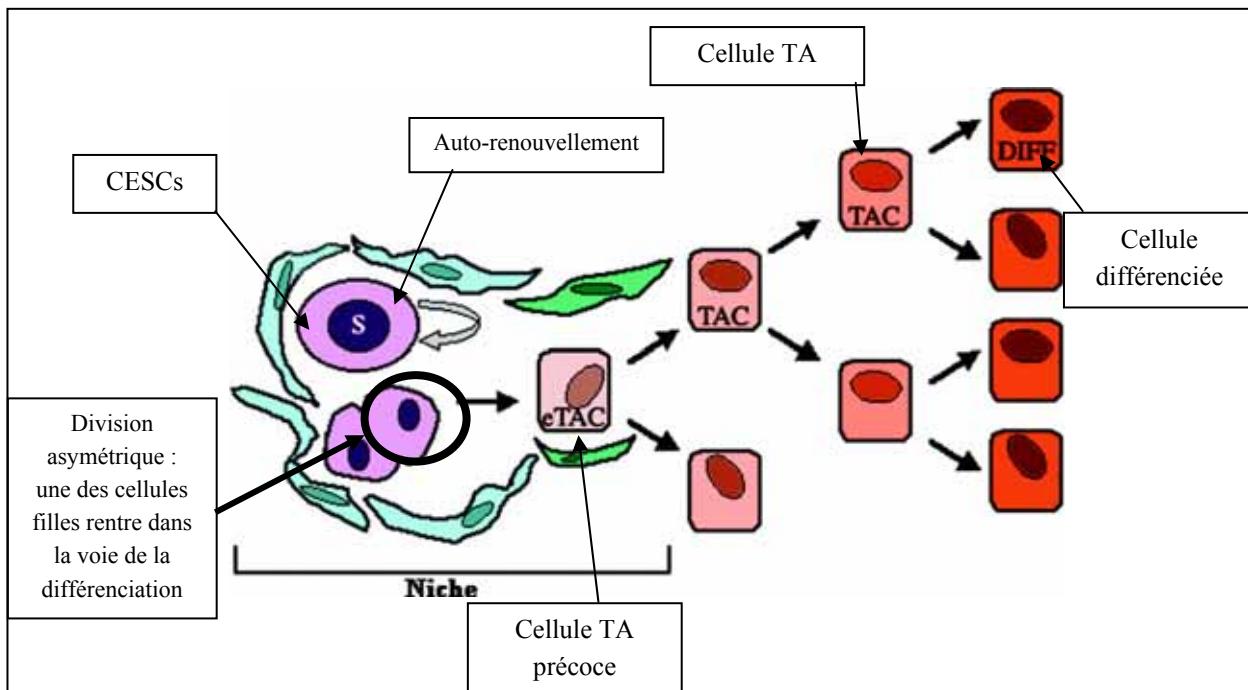
Des recherches récentes ont identifiées des cellules souches au niveau de la cornée appelées **cellules souches de l'épithélium cornéen** (*corneal epithelial stem cells* ou **CESCs**). Ces cellules sont localisées au niveau de la couche de cellules basales à la périphérie de la cornée et plus particulièrement au niveau du **limbe** dans des cryptes épithéliales (Figure 30) (LAVKER *et al.*, 2004 ; PAJOOHESH-GANJI et STEPP, 2005).

**Figure 30 : Niche limbique des CESCs chez la Souris (d'après PAJOOHESH-GANJI et STEPP, 2005)**



Les CESCs sont responsables de la formation de cellules TA puis de cellules différencierées de la cornée (Figure 31) (LI *et al.*, 2007 ; PAJOOHESH-GANJI et STEPP, 2005).

**Figure 31 : Division asymétrique des CESCs et obtention de cellules TA puis de cellules différencierées (d'après PAJOOHESH-GANJI et STEPP, 2005)**



Ces cellules souches expriment de nombreux marqueurs incluant le p63, l'ABCG2, les  $\alpha$ 9- et  $\beta$ 1-intégrines, l'EGF-R, le K19, l' $\alpha$ -énolase, et le CD71 (LAVKER *et al.*, 2004).

Il existe également une petite population de **cellules souches neurales** quiescentes située dans l'**épithélium ciliaire**, une région adjacente à la rétine chez les mammifères, qui pourrait proliférer à la suite d'un traumatisme de la rétine *in vivo* ou après stimulation par des facteurs de croissance *in vitro* (DAS *et al.*, 2005). Ces cellules souches sont aussi désignées sous le terme de **cellules souches rétinienennes** (*retinal stem cells* ou RSCs). Elles sont capables de s'auto-renouveler et d'exprimer de multiples marqueurs comme la **télomérase**, la **Nestine** et **PAX-6**, spécifique des cellules précurseurs de la rétine (DAS *et al.*, 2005).

La prolifération et la différenciation de ces RSCs sont régulées par de nombreux facteurs et voies de signalisation incluant FGF (*fibroblast growth factor*), EGF, SHH, KIT ou encore NOTCH (DAS *et al.*, 2005).

## 2) Intérêts de l'utilisation de ces cellules

Les CESCs possèdent la capacité de **reconstituer** *in vivo* un épithélium cornéen intact et fonctionnel. Elles donnent ainsi naissance à des cellules progénitrices capables de migrer au niveau de l'épithélium cornéen. Ces cellules progénitrices possèdent un taux de prolifération inférieur aux CESCs *in vitro* et correspondent à une population de cellules basales impliquées dans le renouvellement des cellules cornéennes, dont la durée de vie est estimée à moins d'un an.

Il a été rapporté que les CESCs, isolées au niveau de leur niche, entre les cellules de l'endothélium cornéen et le réseau trabéculaire, étaient aussi bien capables de donner naissance aux cellules de **l'endothélium cornéen** qu'au **trabéculum** (MIMEAULT et BATRA, 2006).

La découverte dans l'œil adulte des CESCs et des RSCs possédant des propriétés de cellules épithéliales et neurales immatures, offre la possibilité de les utiliser pour **la réparation des lésions de la cornée ou de la rétine**.

Ainsi des traitements ont été testés sur des modèles animaux puis mis en place chez l'Homme. Ils sont basés sur la **transplantation** de CESCs limbiques et la **création *in vitro*** de surfaces oculaires artificielles pour le remplacement de surfaces oculaires endommagées. Le choix du traitement dépend de plusieurs facteurs comprenant la sévérité de la destruction cornéenne et le degré de perte en CESCs.

Dans une situation où le limbe cornéen est détruit, comme dans la pemphigoïde oculaire ou les brûlures sévères, la greffe de CESCs combinée avec une transplantation de membrane amniotique peut être utilisée. Une nouvelle technique est proposée chez l'Homme pour le traitement des déficits en CESCs limbiques: il s'agit de réaliser une biopsie du limbe au niveau de l'œil sain du donneur afin de récupérer des CESCs puis de les cultiver *in vitro* sur une membrane amniotique humaine (prélevée à la naissance d'enfants sur les membranes placentaires). Cette culture permettra de les faire proliférer et migrer sur la membrane qui sera ensuite greffée sur l'œil atteint du donneur. Il s'agit donc là d'une **greffe autologue** (NAKAMURA *et al.*, 2004).

De récentes observations ont permis de considérer les RSCs comme une source de cellules **précurseurs rétinien**nes pour le traitement de diverses maladies dégénératives de la rétine incluant le glaucome, et de certaines maladies associées à la formation de cicatrices rétiniennes (MIMEAULT et BATRA, 2006).

D'autres méthodes sont en cours d'expérimentation et notamment la **stimulation *in vivo*** des CESCs et des RSCs pour la récupération de la fonction visuelle (MIMEAULT et BATRA, 2006).

La greffe de CESCs représente une alternative intéressante à la perte des CESCs lors de traumatismes, de brûlures ou de défaut congénital. Les RSCs, quant à elle, pourraient être utilisées dans le traitement des maladies rétiniennes comme les dégénérescences de la rétine : les recherches sont extrêmement actives sur le sujet à l'heure actuelle.

## **F. Des cellules souches dans des organes ou des tissus ayant conservé une certaine capacité de renouvellement**

Il y a dans l'organisme des tissus à renouvellement **possible** mais non permanent. Ainsi, certains tissus peuvent se renouveler si des conditions physiologiques ou pathologiques l'imposent. La présence de cellules souches dans le foie, les muscles et les reins a donc fortement été suspectée.

### **1) Les cellules souches hépatiques**

#### **a) Définitions**

Dans des conditions physiologiques, le foie est au repos. Après un traumatisme ou après une infection, il répond rapidement en initiant sa régénération. Il y a trois types de cellules responsables du renouvellement du foie.

Les cellules intervenant en première ligne sont les **hépatocytes et les cholangiocytes** ou **cellules des canaux biliaires** : ces cellules sont **inter-mitotiques** et peuvent donc, après stimulation, entrer en division cellulaire. Ceci peut suffire pour des lésions mineures mais ne permet pas une régénération plus importante.

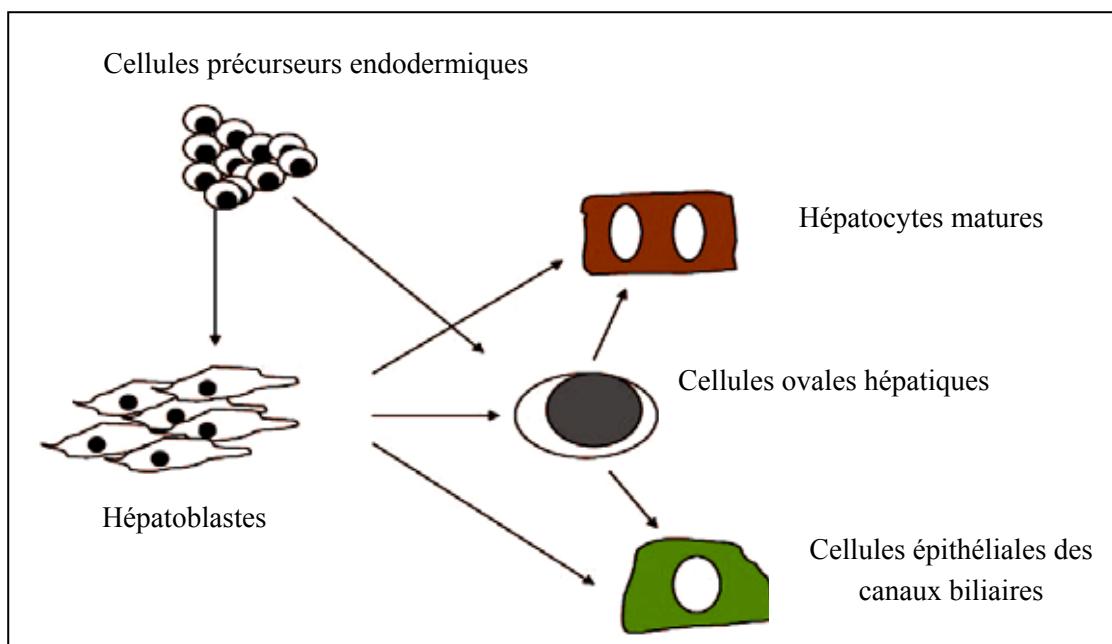
Les chercheurs se sont alors focalisés sur la recherche de cellules souches. Ils ont ainsi découvert une région susceptible d'être une **niche** pour des cellules souches : il s'agit des canaux biliaires dans la région péri-portale nommés **canaux de Hering**. En effet, à ce niveau les cellules ont un phénotype intermédiaire entre les hépatocytes péri-portaux et les cellules des canaux biliaires (TARNOWSKI et SIERON, 2006).

Ils ont par la suite mis en évidence à cet endroit, une petite population de cellules souches nommées **cellules ovales hépatiques** (*hepatic oval cells* ou **HOCs**). Elles sont responsables de la régénération du foie sous certaines conditions : par exemple, après des dégâts tissulaires importants, elles donnent naissance **à la fois aux hépatocytes et aux cellules des canaux biliaires**, *in vitro* et *in vivo* (MIMEAULT et BATRA, 2006).

Ces cellules ovales hépatiques seraient issues soit d'hépatoblastes eux mêmes issus de cellules précurseurs endodermiques ; soit des cellules précurseurs endodermiques directement (Figure 32) (WALKUP et GERBER, 2006).

Le marqueur **OV-6** (*ovalbumine-6*) est le marqueur spécifique des HOCs (TARNOWSKI et SIERON, 2006). Ces cellules expriment également les marqueurs des hépatocytes immatures et des cellules des canaux biliaires comme le CK18, l' $\alpha$ -fétoprotéine ( $\alpha$ FP), la  $\gamma$ -glutamyl-transférase, l'albumine (ALB), le CK19, et l'OC.2 ainsi que des marqueurs de cellules hématopoïétiques comme CD34, THY-1, FLT-3 et KIT. Les facteurs intervenant dans la régulation de la prolifération et de la différenciation de ces cellules durant la régénération hépatique sont : HGF, EGF/TGF- $\alpha$ , VEGF (*vascular endothelium growth factor*), SCF, WNT/ $\beta$ -caténine, TGF- $\beta$ , et SDF-1.

**Figure 32 : Représentation schématique de l'origine possible des cellules ovales hépatiques et de leur différenciation (d'après WALKUP et GERBER, 2006)**



Selon l'étude de LAGASSE *et al.* (2000), ces HOCs auraient une source **extra-hépatique** : la **moelle osseuse**. Ainsi, la transplantation de moelle osseuse ou d'HSCs chez des modèles animaux, avec une atteinte hépatique, a permis de restaurer le pool de HOCs et par la même, de restaurer la fonction hépatique. Il semblerait que le foie, lors d'atteinte, se mette à surexprimer le facteur **SDF-1** entraînant le homing des cellules souches hématopoïétiques (TARNOWSKI et SIERON, 2006).

La transdifférenciation des HSCs en HOCs en conditions pathologiques ou physiologiques semble être un événement rare. La **fusion cellulaire** entre une cellule souche de la moelle osseuse et une cellule hépatique semble être plutôt le mode principal (FIEGEL *et al.*, 2006).

### b) Intérêts de l'utilisation de ces cellules

L'utilisation de cellules ayant un potentiel de prolifération infini est très intéressante pour la régénération du foie. On utilise à l'heure actuelle des matrices avec des HOCs pour la régénération hépatique sous forme tri-dimensionnelle.

Une **matrice tri-dimensionnelle** a déjà été utilisée pour servir de support à la culture cellulaire et à la transplantation d'hépatocytes matures (FIEGEL *et al.*, 2006). L'utilisation de matrice de polymères avec les HOCs permet une formation tri-dimensionnelle d'un néo-tissu. De plus, le recouvrement de la matrice par des molécules isolées de la matrice extra-cellulaire du foie ou plus particulièrement par le FGF permet la différenciation des HOCs en cellules hépatiques matures. L'avantage de cette matrice est que la transplantation des HOCs sur celle-ci permet l'obtention d'un nombre de cellules suffisant pour permettre la régénération d'un organe entier.

L'avantage de l'utilisation des HOCs est leur bipotentialité : elles peuvent se différencier en cellules hépatiques et en cellules des canaux biliaires.

Cependant, les cellules souches majoritairement utilisées à l'heure actuelle, dans la régénération du foie sont les **cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse** (JUNG *et al.*, 2006).

## 2) Les cellules souches musculaires

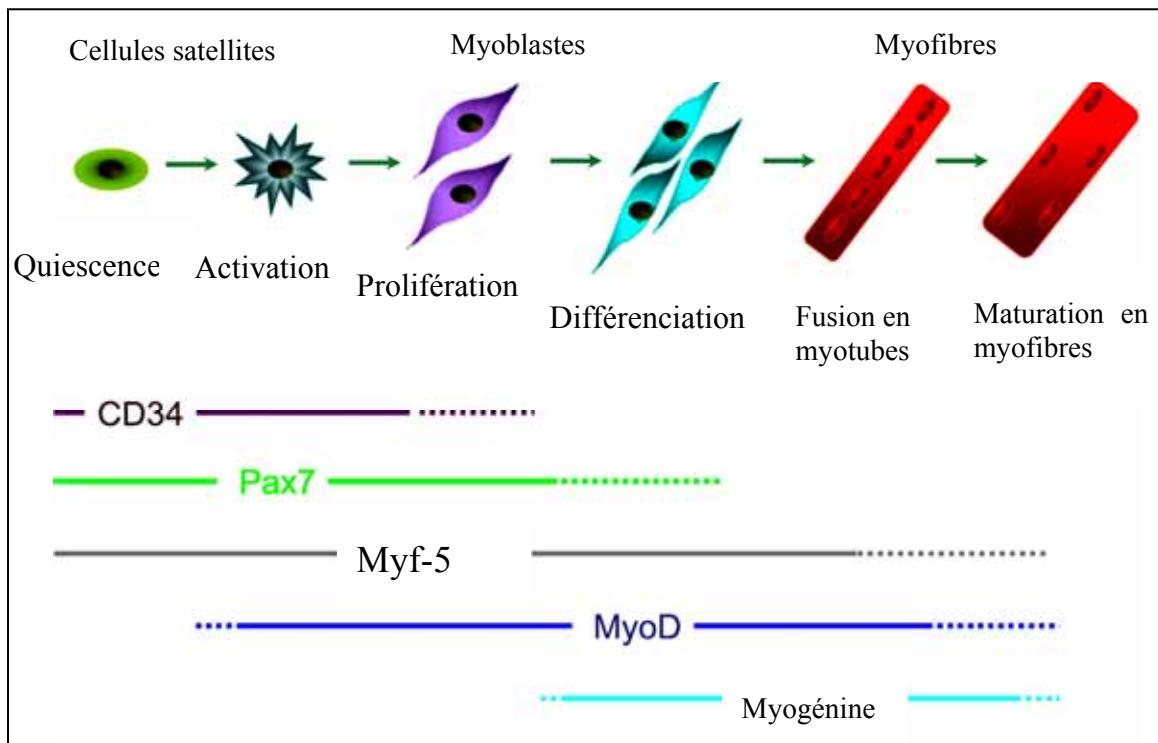
### a) Définitions

La réparation du tissu musculaire strié squelettique est un processus biologique complexe qui nécessite absolument l'activation de cellules souches. Le muscle squelettique contient **deux** types de cellules souches différentes (CHRISTOV *et al.*, 2007) : 1) des cellules souches myogéniques nommées **cellules satellites** (*satellite cells* ou SCs) résidant entre deux couches de lame basale, cette dernière l'entourant, et exprimant à la fois les marqueurs N-CAM (*neural cell adhesion molecule*)/CD56 et les marqueurs précoce des cellules musculaires comme la M-cadhérine, PAX-7, MYO-D (*myogenic differentiation*) et MYF-5; 2) des **cellules souches multipotentes interstitielles** (*interstitial multipotent stem cells* ou IMSCs) qui sont des cellules situées à l'extérieur de la lame basale possédant un phénotype fibroblastique et n'exprimant pas de marqueurs des fibres musculaires.

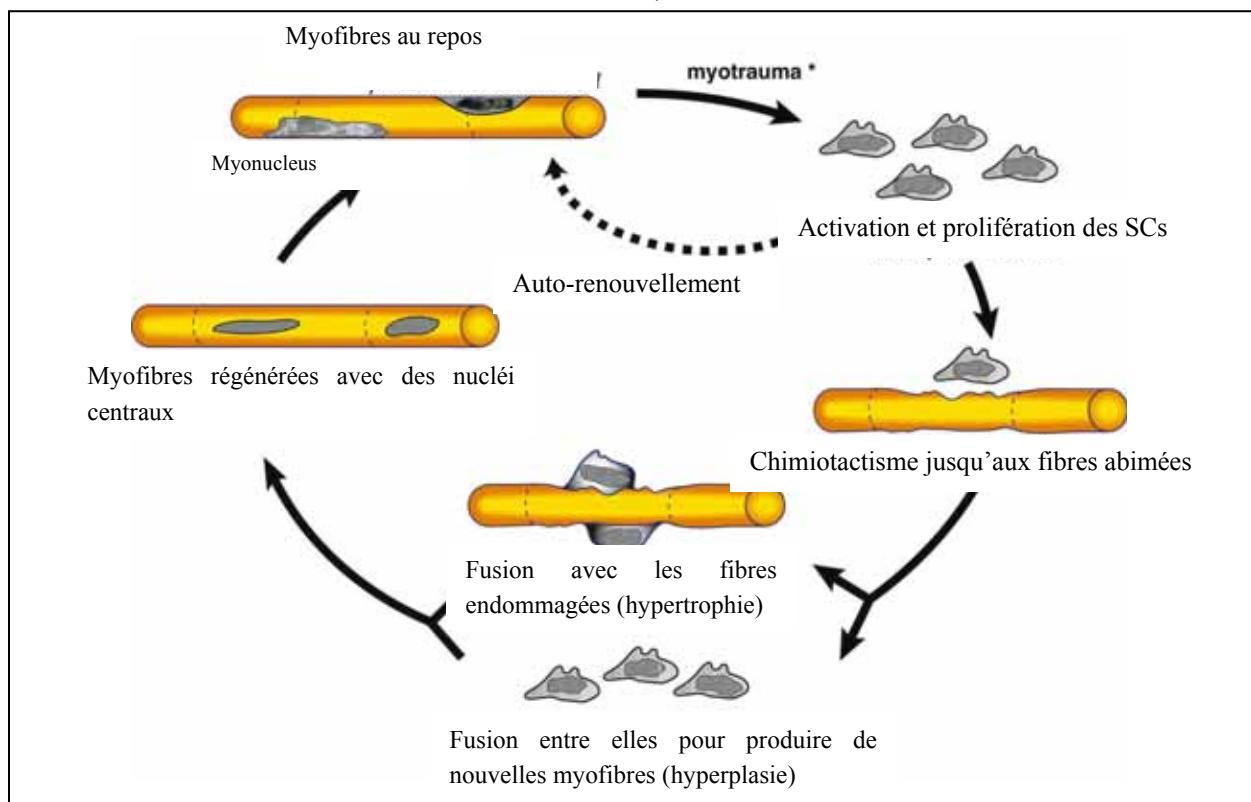
Les marqueurs des SCs sont différemment exprimés suivant leur stade: ils varient entre la quiescence et la différenciation (Figure 33) (ZAMMIT *et al.*, 2006).

Les SCs sont originaiement quiescentes dans le muscle squelettique mais elles sont capables de **s'auto-renouveler** et suite à une activation (blessure, traumatisme, toxine expérimentale...), de proliférer, de se **differencier** en myoblastes compétents et de fusionner afin de permettre la régénération des fibres musculaires (Figure 34) (CHRISTOV *et al.*, 2007 ; HAWKE et GARRY, 2001).

**Figure 33 : Différenciation des SCs et variation de leurs marqueurs au cours de leur différenciation (d'après ZAMMIT *et al.*, 2006)**

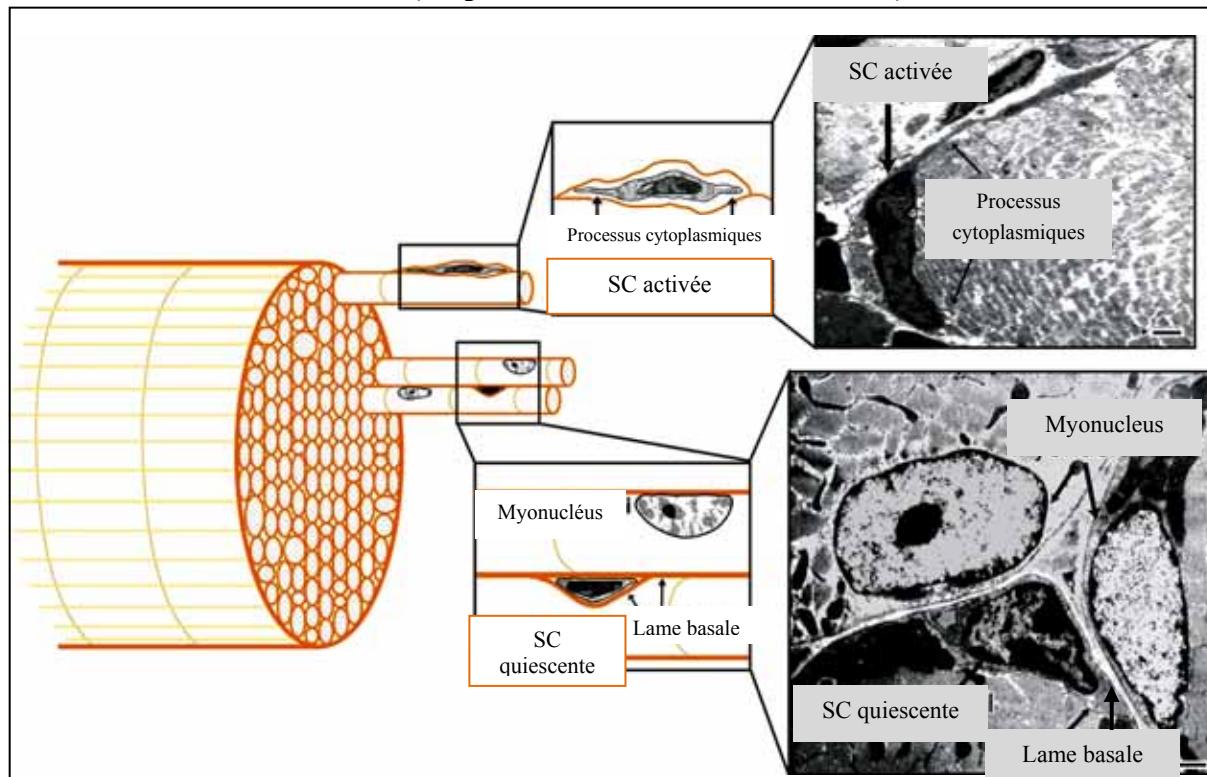


**Figure 34 : Différenciation des SCs lors d'une lésion musculaire (d'après HAWKE et GARRY, 2001)**



Lorsque les SCs se différencient, elles subissent des changements morphologiques à savoir : formation de processus cytoplasmiques, réduction de l'hétérochromatine, augmentation du ratio cytoplasme / noyau et augmentation du nombre d'organelles intracellulaires (Figure 35) (HAWKE et GARRY, 2001 ; TARNOWSKI et SIERON, 2006).

**Figure 35 : Localisation des SCs et modifications morphologiques lors de leur activation (d'après HAWKE et GARRY, 2001)**



Les **SCs** sont largement caractérisées comme étant les cellules souches **responsables** de la croissance, de la réparation et de la régénération musculaire.

Les IMSCs donnent naissance à de nombreuses lignées cellulaires *in vitro* et permettent en même temps la reconstruction des **vaisseaux sanguins** (les péricytes, les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales), des **nerfs périphériques** (cellules de Schwann) et des **cellules musculaires** (SCs et myofibres) (CHRISTOV *et al.*, 2007). Cependant, la participation de ces IMSCs apparaît **très limitée** dans la réparation physiologique du muscle squelettique *in vivo*.

Une autre population de cellules souches a été découverte dans le muscle squelettique : les **cellules SP**. Ces cellules proviennent en réalité de la **moelle osseuse hématopoïétique** (TARNOWSKI et SIERON, 2006). Elles expriment les mêmes marqueurs que les cellules SP de la moelle osseuse à savoir **PE-CAM-1, TAL-1 et VEGF-A** (HIRSCHI et GOODEL, 2002). Elles sont également **KIT-positives** et **SCA-1 positives** (TARNOWSKI et SIERON, 2006). Etant résidentes en permanence dans le muscle, elles sont considérées comme des cellules souches musculaires. Il

semble que ces cellules soient capables de se différencier en **cellules musculaires** mais aussi en SCs et en **cellules endothéliales** (HO et PUNZEL, 2003).

**b) La niche des cellules souches musculaires**

Un des objectifs de l'étude des cellules souches musculaires est de définir la **niche** des SCs, son organisation et les interactions entre les différentes cellules la constituant.

Il semble que des contacts de cellules à cellules entre les SCs et les myofibres jouent un rôle dans le maintien des SCs dans un stade **quiescent** (CHRISTOV *et al.*, 2007). A proximité de cette niche quiescente, il existe un compartiment **en maturation** constitué de cellule progénitrice et de cellule stromale.

Il a également été montré que les SCs interagissaient de manière prépondérante avec les **macrophages** recrutés au niveau du site musculaire en régénération et recevaient des signaux de division de ces macrophages.

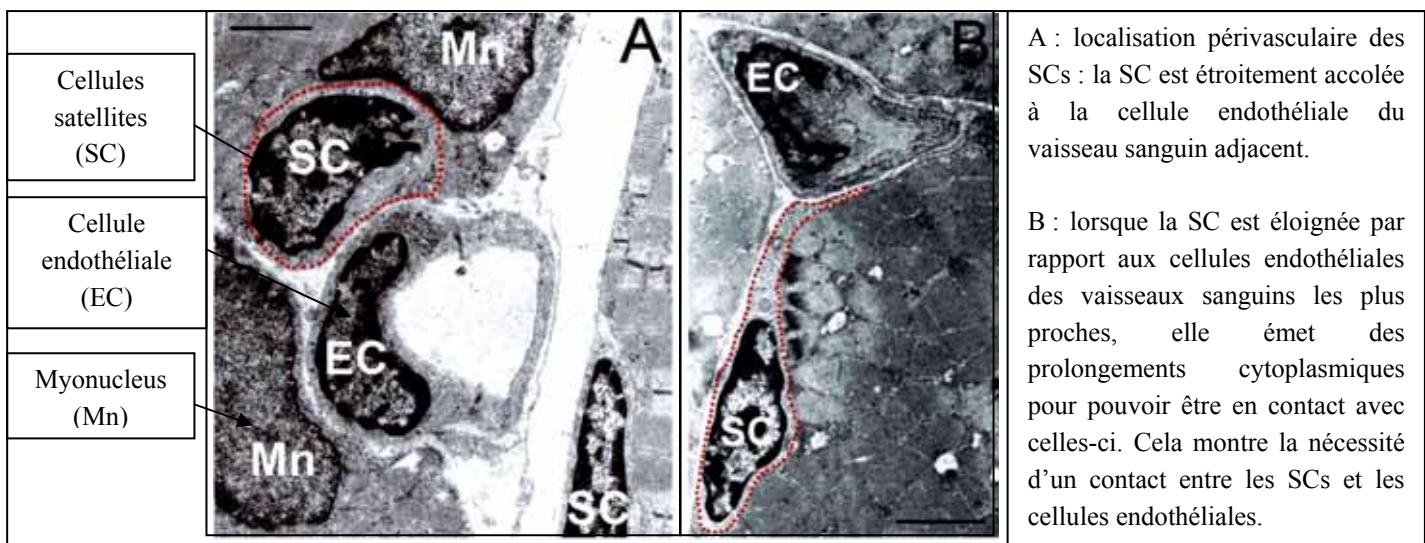
Certaines études se penchent actuellement sur un autre composant de la niche : **la partie vasculaire**. En effet, les cellules endothéliales et les cellules musculaires dérivent d'un précurseur **commun** au stade du développement embryonnaire (CHRISTOV *et al.*, 2007). Il est important de noter que cette niche périvasculaire existe également chez d'autres cellules souches comme dans la moelle osseuse par exemple.

Dans une étude menée par CHRISTOV *et al.* (2007), il a été démontré que la niche des SCs était bien **juxtaposée aux vaisseaux** (Figure 36), que les SCs restaient en proche contact avec les capillaires et cela, quelque soit leur stade (quiescence, prolifération, différenciation), et que la différenciation en cellules musculaires des SCs était spatio-temporellement associée avec la formation de vaisseaux sanguins.

Sur la figure 36, le cadre A représente une SC étroitement accolée aux cellules endothéliales et sur le cadre B, on voit que la SC, étant loin de la cellule endothéliale, émet un prolongement cytoplasmique pour rester en contact avec elle. Cela montre la réelle nécessité d'un contact entre la SC et les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins.

Le nombre de SCs varie également d'un type de fibre à l'autre, les fibres musculaires lentes comportent plus de SCs que les fibres rapides. Les capillaires sanguins sont également plus nombreux dans les fibres lentes que dans les fibres rapides.

**Figure 36 : Niche périvasculaire des SCs (d'après CHRISTOV *et al.*, 2007)**



Dans l'étude de EMSLIE-SMITH et ENGEL (1990), ils ont étudié le comportement des SCs sur un modèle murin de myopathie atrophiante (*atrophic dystrophy muscular* ou aDM). Cette maladie est définie comme une perte progressive de vaisseaux sanguins n'entrant pas de dommage musculaire massif. Il a été montré que la **perte des SCs était proportionnelle à la perte des capillaires**. Cela signifie que la diminution du nombre de SCs lors d'aDM, est liée à la perte des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins c'est-à-dire à la perte de **signaux paracrinés** provenant de ces cellules. Ceci est conforté par le fait que les SCs sont plus résistantes à l'ischémie que les cellules endothéliales des vaisseaux : c'est donc bien la perte des contacts avec les cellules endothéliales qui est à l'origine de la perte de muscle et non l'ischémie en elle-même.

Les cellules musculaires en cours de différenciation sécrètent du **VEGF**. Dans des conditions physiologiques, les cellules endothéliales matures des vaisseaux sanguins n'expriment pas de VEGF mais expriment le **récepteur** à ce facteur, le **VEGF-R1**. L'**exercice**, en induisant une augmentation de la sécrétion de VEGF, par stimulation de la myogenèse, est accompagné d'**angiogenèse physiologique**. L'expression de VEGF-R1 n'est pas limitée aux cellules endothéliales : on le retrouve également sur les cellules myogéniques. Ainsi, il a été montré *in vitro* que le VEGF stimulait la croissance des cellules musculaires, les protégeait de l'apoptose, stimulait leur migration, augmentait l'expression de myoglobine et favorisait la création de myofibrilles centro-nucléées (CHRISTOV *et al.*, 2007). L'angiogenèse et la myogenèse partagent de ce fait, pour leur activation, un même couple ligand/récepteur: le **VEGF/VEGF-R1**.

### c) Intérêt de ces cellules souches dans le renouvellement du muscle

La réparation du muscle strié squelettique après un dommage est associée à la fois à l'augmentation de la vascularisation et à la fois à la régénération des fibres musculaires. Selon le même procédé, on a découvert que l'hypertrophie musculaire compensatoire était associée à une croissance musculaire selon un rapport **linéaire** entre les fibres et les vaisseaux. Cette relation est

surement liée à la présence de la niche mettant en contact tous les acteurs de la régénération du muscle.

Ainsi, un des objectifs de la thérapie cellulaire par les SCs est de **recréer un environnement** c'est-à-dire une niche favorable aux cellules souches transplantées. Cela permettrait la régénération musculaire à partir de ces cellules en les mettant en contact avec des cellules qui normalement les régulent.

En ce qui concerne l'intérêt thérapeutiques de telles cellules, les chercheurs se focalisent sur le traitement des **myopathies** et en particulier la Myopathie de Duchenne chez l'Homme. Ces maladies extrêmement graves, se caractérisent par **l'absence ou la diminution de la Dystrophine**. Le rôle de cette protéine est de connecter le cytosquelette des fibres musculaires à la matrice extra-cellulaire : la maladie se traduit donc par une incapacité fonctionnelle du muscle à se contracter en engendrant une force motrice. Pour l'instant, les expériences utilisant les SCs sont **peu convaincantes** dans ce domaine (TARNOWSKI et SIERON, 2006).

En ce qui concerne les **cellules SP**, elles ont été observées comme pouvant donner naissance à des **myofibres Dystrophine-positives** et des SCs après leur transplantation chez des souris mutantes mdx (HO et PUNZEL, 2003).

Les SCs peuvent également être envisagée dans le traitement d'autres maladies des muscles et notamment les cardiomyopathies. Ainsi, dans de nombreuses études, des SCs ont été transplantées chez des modèles animaux suite à un infarctus cardiaque expérimental, et ont permis une **amélioration de la fonction cardiaque** (NIESLER, 2004). Cependant ces cellules, une fois injectées dans le myocarde, ne **sont pas couplées électro-mécaniquement avec les cellules myocardiques**. Il semblerait alors que le rôle des SCs dans l'amélioration de la fonction cardiaque soit plus lié à des phénomènes trophiques plutôt qu'à une réelle reconstruction du myocarde. Ceci est confirmé par le fait que dans d'autres études, malgré l'amélioration de la fonction cardiaque après un infarctus chez des souris, les chercheurs n'ont pas réussi à observer une quelconque différenciation des SCs en myocytes cardiaques (REINECKE *et al.*, 2002). L'amélioration serait là aussi due à des phénomènes paracritiques. L'utilisation des SCs pour le traitement des infarctus du myocarde est encore en cours d'exploration.

L'utilisation des cellules souches musculaires n'est pas à l'heure actuelle très répandue et il reste encore beaucoup d'inconnues quant à leur mode de différenciation et leur potentiel régénératif. Leur étude est cependant intéressante puisqu'il pourrait s'agir d'une source de cellules souches **facile d'accès** aussi bien chez l'Homme que chez l'**animal**.

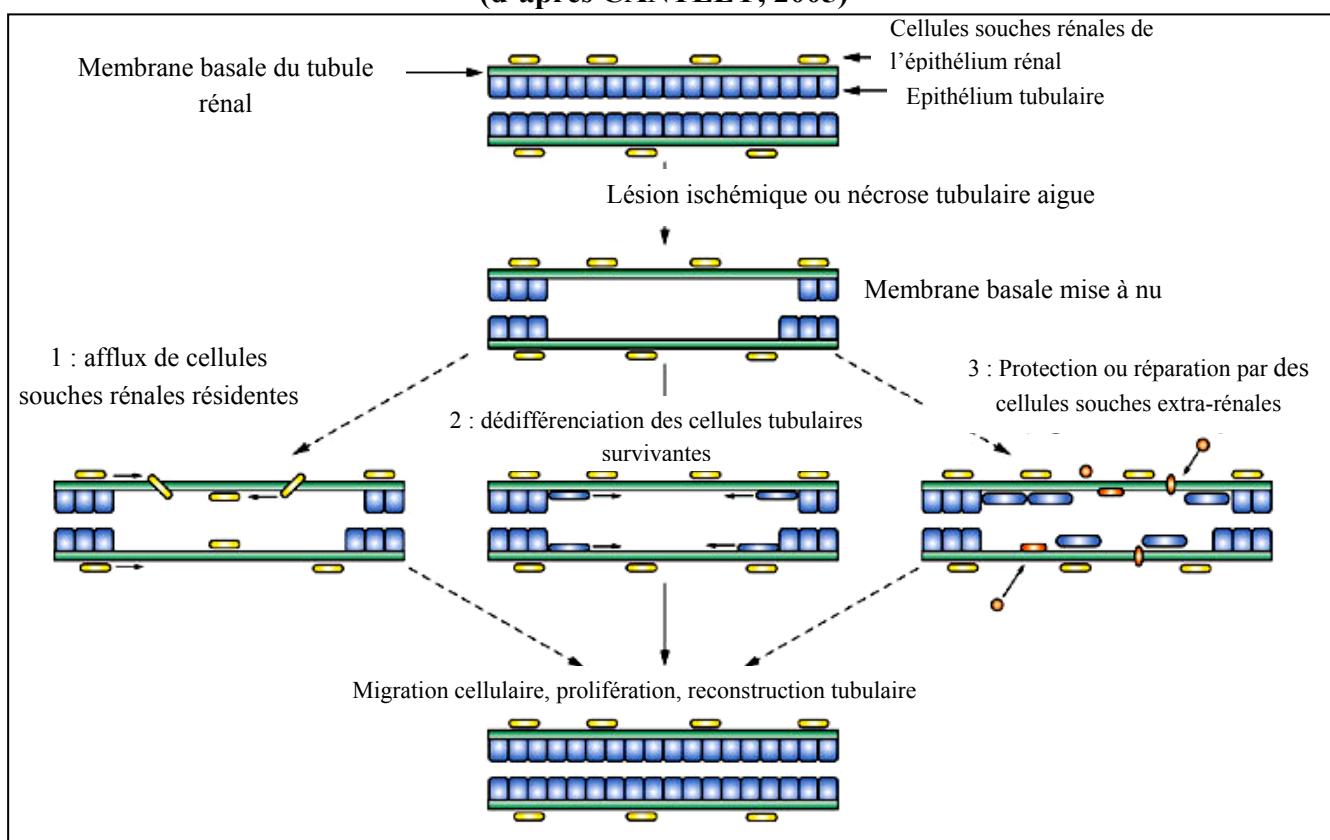
### 3) Des cellules souches au niveau des reins

Il est possible d'observer une **régénération** des capacités des reins à la suite d'insuffisance rénale aigue (*acute renal failure* ou ARF) (HISHIKAWA et FUJITA, 2006). Le rein adulte est

reconnu comme ayant une certaine capacité de régénération et de réparation (HISHIKAWA et FUJITA, 2006).

Il faut alors déterminer si cette réparation est due à une simple prolifération de cellules in situ ou/et s'il y a intervention de cellules souches adultes rénales ou extrarénales. Dans la plupart des modèles, il semblerait qu'il y ait intervention à la fois des cellules différenciées et à la fois des cellules souches rénales et extra-rénales (Figure 37) (CANTLEY, 2005). Selon le même modèle que dans le muscle strié squelettique, les cellules souches rénales seraient positionnées sous la membrane basale de l'épithélium rénal.

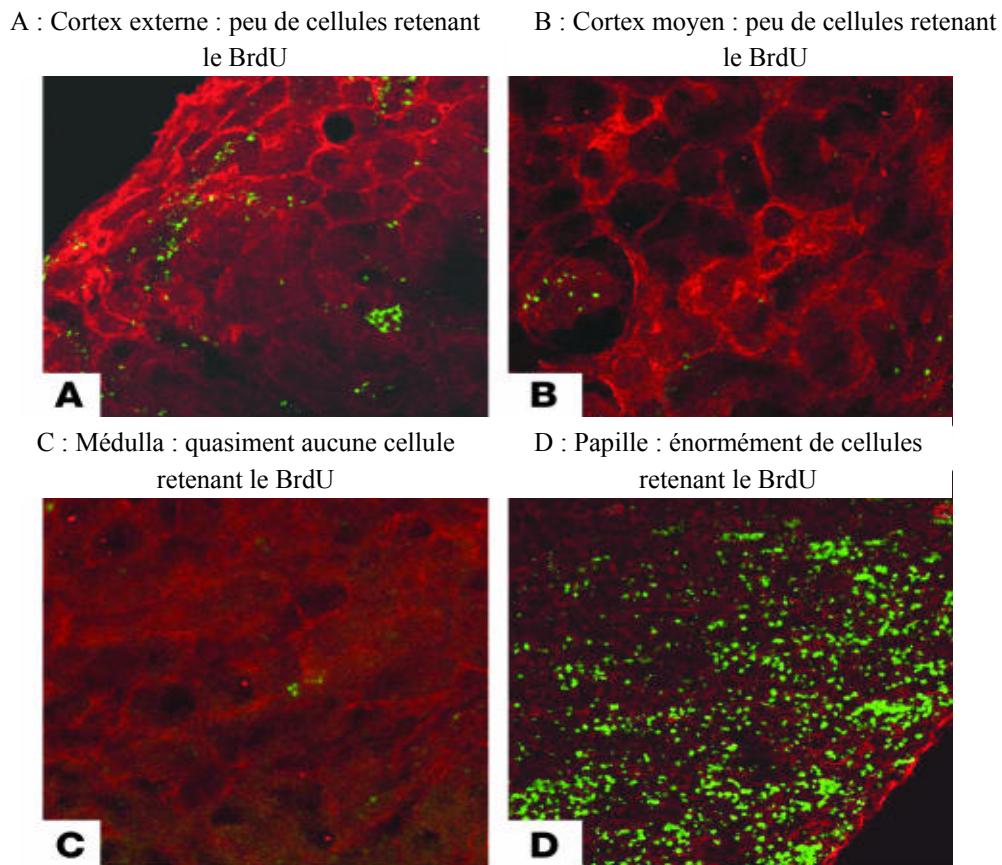
**Figure 37 : Illustration des mécanismes possibles de réparation d'une lésion rénale par les cellules différenciées des tubules rénaux et par les cellules souches rénales et extra-rénales (d'après CANTLEY, 2005)**



Des cellules souches dites « à faible taux de division » ont été découvertes très récemment au niveau de la **papille rénale**. Ces cellules ont été découvertes par l'utilisation du **BrdU** (Figure 38) (OLIVER *et al.*, 2003): seul l'interstitium de la papille rénale contenait en très grand nombre des cellules marquées par le BrdU après l'injection du produit à des souriceaux et à des rats. Comme le montre la figure 38, on voit très nettement la forte proportion de cellules BrdU positives dans le cadre D représentant l'interstitium de la papille rénale. Des chercheurs ont aussi découvert que lors d'ischémie rénale, le marquage BrdU disparaissait très rapidement de l'interstitium de la papille

rénale, traduisant une entrée active en division de ces cellules. Elles ne sont à l'heure actuelle pas mieux caractérisées (HISHIKAWA et FUJITA, 2006).

**Figure 38 : Cellules retenant le BrdU dans le rein chez un rat de 2 mois (d'après OLIVER *et al.*, 2003)**



La présence de **cellules SP** a également été mise en évidence au niveau du rein (HISHIKAWA et FUJITA, 2006). Ces cellules sont localisées au niveau de l'**interstitium rénal**. Elles peuvent être stimulées vers la différenciation en cellules interstitielles rénales et en néphrocytes en présence de **LIF** (*leukaemia inhibitory factor*). De plus ces cellules SP rénales sont régulées dans leur fonctionnement par le **MYOR** (*myogenic repressor*), qui est un facteur basique de type hélice-tour-hélice et qui est nécessaire au maintien des cellules SP. Elles sont considérées comme des cellules souches **endogènes** au rein, même si elles sont en réalité issues de la **moelle osseuse hématopoïétique** et résident en permanence dans l'interstitium rénal (HISHIKAWA et FUJITA, 2006).

On a trouvé également des **cellules CD133+** dans l'**interstitium** du rein (HISHIKAWA et FUJITA, 2006). CD133+ est un marqueur des cellules progénitrices endothéliales, des HSCs et des cellules souches neurales. Ces cellules expriment de plus **PAX-2**, qui est un marqueur précoce du rein au cours du développement, et de nombreux marqueurs des cellules souches de la moelle

osseuse (mais ni CD45 ni CD34). In vitro, ces cellules sont **pluripotentes** et ont la capacité de se différencier en **néphrocytes**.

On a enfin isolé des cellules **rKS56** (HISHIKAWA et FUJITA, 2006). Ces cellules ont été découvertes lors de la culture de néphrons de rats adultes. Ces cellules expriment des marqueurs de cellules rénales immatures et des marqueurs de cellules tubulaires matures. Elles ont une capacité **d'auto-renouvellement**, sont **multipotentes** et sont capables de se différencier en cellules **matures des tubules** exprimant les aquaporines 1 et 2 dans certaines conditions. La localisation de ces cellules n'est pas encore déterminée à l'heure actuelle.

Il est important de noter que des questions se posent quant à savoir si toutes ces cellules ne sont pas en réalité **une seule et même cellule** mais isolée en culture de manières différentes (HISHIKAWA et FUJITA, 2006).

Dans tous les cas, l'injection de ces cellules dans le rein permet une **augmentation de la réparation** du rein après une ARF (HISHIKAWA et FUJITA, 2006). La réparation des dégâts causés lors d'une insuffisance rénale chronique (*chronic renal failure* ou CRF) semble moins évidente : cependant, il ne faut pas arrêter dans cette direction puisque déjà deux groupes de recherche ont réussi à le faire (FIORETTO *et al.*, 1998 ; ZISBERG *et al.*, 2003).

A l'heure actuelle, les cellules souches rénales sont utilisées pour le traitement des **ARFs chez l'Homme** et pourrait potentiellement être utilisées **chez l'animal**. Il reste cependant de nombreuses inconnues dans leur identification et leur mode de différenciation. Le traitement des **CRFs**, quant à lui, est moins avancé mais reste un domaine de recherche extrêmement actif : il ouvre en effet la perspective d'une possible réversibilité des lésions de CRFs. Jusqu'à maintenant, le traitement d'une CRF reste la **greffe chez l'Homme** et le **traitement palliatif chez l'animal**.

### **III. Découverte de nouvelles cellules souches adultes dans des organes déjà identifiés comme en contenant et dans des organes où leur présence était beaucoup moins évidente. Nouvelles possibilités thérapeutiques associées.**

Avec l'évolution des technologies, de nouvelles cellules souches ont été découvertes dans des tissus ou des organes dans lesquels leur présence **n'était pas évidente**. De même, les chercheurs ont pu découvrir de **nouvelles indications possibles** pour des cellules souches déjà connues.

#### **A. Une diversification des intérêts thérapeutiques liés à la moelle osseuse**

Depuis le début de l'ère des cellules souches, les HSCs ont été les cellules les plus étudiées et les mieux identifiées. Mais la moelle osseuse n'avait pas encore révélé toutes ses capacités. Les chercheurs ont ainsi pu mettre en évidence de nouvelles cellules souches : des cellules souches non hématopoïétiques. La découverte de ces nouvelles cellules a relancé l'étude sur la moelle osseuse et a permis d'élargir son panel thérapeutique.

##### **1) Découverte de nouvelles cellules souches non hématopoïétiques : les cellules souches stromales**

Le stroma de la moelle osseuse est une structure complexe richement **vascularisée** contenant des cellules souches mésenchymateuses (*mesenchymal stem cells* ou **MSCs**) et une matrice extracellulaire support de l'hématopoïèse (MIMEAULT et BATRA, 2006). Ces MSCs ont été identifiées en utilisant des techniques différentes mais qui ont toutes révélé que ces cellules se multipliaient *in vitro* en **adhérant fortement** au support plastique de la culture, et avaient une durée de vie assez limitée *in vitro* (HERZOG *et al.*, 2003). Cette courte durée de vie *in vitro* semble être due soit à une sénescence progressive par manque d'activité télomérase soit à un engagement précoce dans les lignages de cellules différencierées (ULLOA-MONTOYA *et al.*, 2005). Ces MSCs sont physiologiquement des cellules **quiescentes** avec un **faible taux de renouvellement** *in vivo* (ASAHARA *et al.*, 2000) et sont présentes en **très faible nombre** dans la moelle de l'ordre de 10/10000 à 10/1000 du total des cellules nucléées, soit 10 fois moins que les HSCs (LIAO *et al.*, 2007).

Leurs marqueurs ne sont pas bien définis à l'heure actuelle. Il a été rapporté chez l'Homme qu'elles possédaient de nombreux marqueurs comme STRO-1 (*stromal-1*), CD13, CD49a et CD49b, CD29, CD44, CD71, CD73, THY-1, VCAM-1 et CD124 (HERZOG *et al.*, 2003). Elles ne semblent pas posséder de marqueurs des HSCs comme le CD45, le CD34 et le CD14 chez l'Homme, mais elles expriment le CD45 chez la souris (KOLF *et al.*, 2007 ; LIAO *et al.*, 2007). **STRO-1, CD73** et

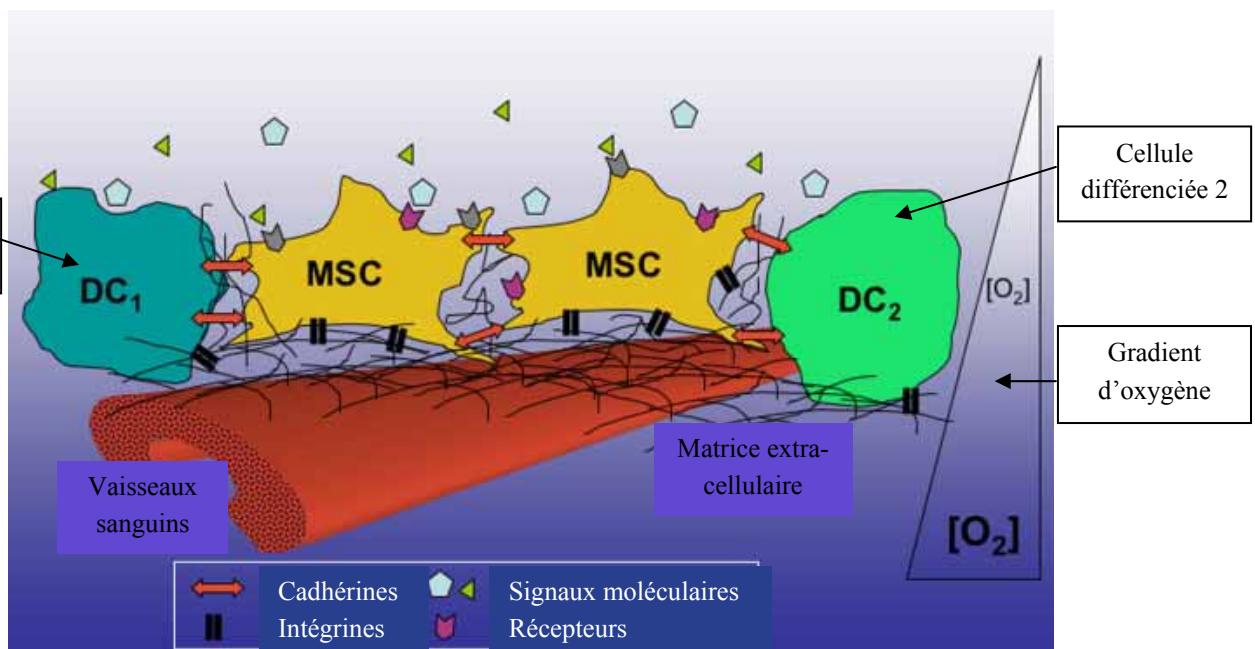
**VCAM-1** sont les marqueurs les plus utilisés chez l'Homme car ce sont à priori les plus spécifiques (KOLF *et al.*, 2007).

La population des MSCs du stroma médullaire donne naissance aux cellules mésenchymateuses stromales matures et elles sont ainsi capables de **régénérer** le **microenvironnement** de la moelle osseuse.

Ces MSCs ont été localisées dans une niche correspondant à une région **périvasculaire** dans le tissu de la moelle osseuse (Figure 39) (KOLF *et al.*, 2007). Cette niche est un milieu **hypoxique** contenant un grand nombre de **facteurs solubles** encore peu identifiés à l'heure actuelle. Elle repose sur une matrice extra-cellulaire classique. Le contact des MSCs avec les cellules environnantes -qui sont les mêmes que pour les HSCs- a un rôle très important dans leur régulation. Les mécanismes des contacts entre ces cellules sont identiques à ceux des HSCs.

Les MSCs présentent enfin un avantage certain sur d'autres cellules : elles sont **immuno-privilégiées** (FORTIER, 2005). En effet, il semblerait que ces cellules inhibent la prolifération et la maturation des cellules lymphoïdes T par des mécanismes de contact direct et de sécrétion de facteurs solubles.

**Figure 39 : Modèle de la niche des MSCs (d'après KOLF *et al.*, 2007)**



Au milieu de ces MSCs, les chercheurs ont découvert d'autres cellules souches : des cellules précurseurs mésodermiques (*mesodermal progenitor cells* ou **MPCs**) et des cellules précurseurs adultes multipotentes (*multipotent adult progenitor cells* ou **MAPCs**) qui ont été co-purifiées avec d'autres cellules souches stromales qualifiées de cellules stromales de la moelle osseuse (*bone marrow stromal cells* ou **BMSCs**) (MIMEAULT et BATRA, 2006). Plus récemment un autre type de cellule souche a été identifié : il s'agit de cellules dérivées de la moelle osseuse adulte pouvant,

grâce à une induction, donner une multitude de lignées cellulaires in vitro (*marrow-isolated adult multilineage inducible* ou **MIAMIs**) (ULLOA-MONTOYA *et al.*, 2005).

Les **MAPCs** ont été isolées de la moelle osseuse adulte tout d'abord chez l'Homme puis chez des souris et des rats (HERZOG *et al.*, 2003 ; ULLOA-MONTOYA *et al.*, 2005). A la différence des MSCs, elles peuvent se **multiplier indéfiniment** dans des milieux de culture relativement pauvres (ULLOA-MONTOYA *et al.*, 2005). Cependant, la nécessité pour ces cellules de croître avec une faible densité cellulaire in vitro afin de garder leur multipotence, fait de leur culture un vrai challenge.

Les **BMSCs** sont des cellules souches ayant **une grande plasticité** (HERZOG *et al.*, 2003). Leur origine n'est pas encore bien admise : il pourrait s'agir d'une population de cellules enrichies en cellules pré-hématopoïétiques conservant une pluripotentialité supérieure aux HSCs ou une population issue de la transdifférenciation des HSCs. Elles n'expriment pas OCT-4 et ne subissent pas de modification dans la longueur de leurs télomères après 120 cycles de division (ULLOA-MONTOYA *et al.*, 2005).

Les **MIAMIs** expriment la télomérase, OCT-4 et REX-1 (ULLOA-MONTOYA *et al.*, 2005).

## 2) De nouvelles différenciations

Les **MSCs** donnent naissance aux lignées d'**ostéocytes**, d'**adipocytes** et de **chondrocytes** de même qu'à des cellules **neurone-like** ou **gliales** comme cela a pu être observé pour les MPCs in vivo et in vitro dans des milieux de culture bien définis (MIMEAULT et BATRA, 2006). Les MSCs peuvent aussi se différencier en cellules du **muscle squelettique** que ce soit in vitro ou in vivo (ULLOA-MONTOYA *et al.*, 2005), en **cellules épithéliales** (NAKAGAMI *et al.*, 2006) et en **cardiomyocytes** (LIAO *et al.*, 2007). L'addition de FGF et de BMP dans des milieux de culture contenant des MSCs stimulent respectivement la prolifération et la différenciation en lignées ostéoblastiques. A l'inverse, l'activation du EFG empêche de manière réversible la différenciation de ces cellules en adipocytes, ostéocytes et chondrocytes.

Les **MAPCs** peuvent se différencier en cellules exprimant les marqueurs des **trois feuillets** : ectoderme, endoderme et mésoderme (HERZOG *et al.*, 2003). Pour l'instant, il a été possible de mettre en évidence que la transplantation de MAPCs entraînait une greffe et une différenciation de ces cellules en **cellules hématopoïétiques** dans la moelle osseuse, le sang et la rate et en **cellules épithéliales** dans le foie, le poumon et l'intestin de souris mutées non-irradiées (MIMEAULT et BATRA, 2006 ; HERZOG *et al.*, 2003).

Les **MAPCs** et les **MSCs** ont été observées comme ayant une capacité de **migration** au travers de la circulation sanguine (MIMEAULT et BATRA, 2006). Elles ont ainsi une capacité de **homing** selon les mêmes critères que pour les HSCs.

Les **MPCs** peuvent se différencier en de multiples types de **cellules mésenchymateuses** et ainsi participer activement à la **formation de la matrice extra-cellulaire calcifiée**. Elles donnent naissance aux ostéocytes, aux ostéoblastes et aux chondrocytes, ainsi qu'aux adipocytes

(MIMEAULT et BATRA, 2006). Elles semblent également capables de se différencier en **d'autres lignages cellulaires** comme des myoblastes, des cellules endothéliales, des hépatocytes, des cellules neurone-like, et le lignage hématopoïétique *in vitro* et *in vivo* (MIMEAULT et BATRA, 2006).

Les **BMSCs** sont **pluripotentes** comme les MAPCs (HERZOG *et al.*, 2003 ; ULLOA-MONTOYA *et al.*, 2005).

Les **MIAMIs** peuvent se différencier en cellules d'origine **mésodermique** ainsi qu'en cellules neurales (ULLOA-MONTOYA *et al.*, 2005).

### 3) De nouvelles indications thérapeutiques

La **grande plasticité** et l'**immense potentiel migratoire** des cellules souches stromales de la moelle osseuse offrent une possibilité de les mobiliser *in vivo* ou de les injecter dans la circulation pour régénérer des tissus autre que les tissus de la moelle osseuse (MIMEAULT et BATRA, 2006).

#### a) Régénération de l'os, du cartilage, des tendons et du tissu adipeux

Il a été rapporté que les cellules souches stromales de la moelle osseuse étaient impliquées dans le remodelage osseux permanent mais aussi dans la **régénération osseuse** lors de traumatisme, et dans la formation de **cartilage** (MIMEAULT et BATRA, 2006).

Les **MSCs** peuvent recréer du cartilage *in vivo* (KOLF *et al.*, 2007). Dans un modèle d'ostéoarthrite chez la Chèvre, la thérapie par les MSCs a permis une régénération des tissus méniscaux et un retardement du processus arthrosique (MURPHY *et al.*, 2003). Les articulations traitées par thérapie cellulaire ont ainsi subi une régénération du cartilage par implantation des MSCs et une réduction de la dégradation du cartilage, de la production d'ostéophytes et de la sclérose de l'os sous-chondral.

En se basant sur la réussite de l'utilisation des MSCs dans le traitement de l'ostéoarthrite chez le **Cheval** (DAHLGREN *et al.*, 2006), les vétérinaires commencent à **les utiliser chez le Chien** (GINGERICH *et al.*, 2007).

Les facteurs BMP (en particulier le BMP-2 et le BMP-6) stimulent fortement l'ostéogenèse des MSCs (KOLF *et al.*, 2007). Les facteurs GDF (*growth and differentiation factor*) stimulent la formation de tendons *in vivo* à partie des MSCs (KOLF *et al.*, 2007).

Très récemment, dans l'étude de HIYAMA *et al.* (2008), ces chercheurs ont transplanté des MSCs chez des **chiens** qui avaient subi une ablation du **disque intervertébral**. On sait déjà que l'utilisation des MSCs **diminue la dégénérescence** du disque intervertébral chez les **petits animaux** comme le Rat et la Souris ; mais on en sait très peu quand à leur potentiel chez l'Homme ou chez les plus grandes espèces. **FAS-L**, exprimé dans les tissus immunoprivilégiés comme le placenta ou la cornée par exemple, est exprimé au niveau du disque intervertébral et plus particulièrement au niveau du **noyau pulpeux**. C'est une protéine qui permet de shunter le système immunitaire : elle induit l'apoptose des lymphocytes. C'est pour cela que la disparition du FAS-L, comme dans

certaines dégénérescences du disque, entraîne une forte inflammation due à l'activation du système immunitaire. Maintenir une expression importante de FAS-L dans le disque intervertébral est donc très important. Pour étudier ceci, ces chercheurs ont implanté des MSCs dans des disques atteints de dégénérescence chez des Beagles adultes, 4 semaines après une ablation du noyau pulpeux. Ils ont ensuite suivi les chiens pendant 12 semaines : ils ont observé que les MSCs permettaient bien la **régénération des disques intervertébraux et exprimaient bien le *Fas-L*** à un niveau protéique. Les résultats de cette étude indiquent que la transplantation de MSCs peut contribuer à une **régénération du disque à son état d'origine**.

Cela ouvre les portes du traitement chez l'animal des **hernies discales dégénératives** de type Hansen 1 chez les races chondrodystrophiques. L'utilisation des MSCs permettrait bien sûr de traiter toutes les pathologies du disque qu'elles soient infectieuses ou dégénératives.

## b) Régénération d'autres tissus et organes distants

### 1. La cornée et la rétine

Les **MSCs** ont été utilisées pour la **reconstruction** de la surface de la **cornée** chez des rats à la suite de brûlure chimique. Elles ont pour cela été prélevées sur un donneur sain et multipliées sur une membrane amniotique humaine. Il semblerait cependant que l'effet thérapeutique de cette transplantation soit plus lié à une **inhibition des processus inflammatoires** et de l'**angiogenèse** qu'à la différenciation des MSCs en cellules cornéennes (MA *et al.*, 2005).

Les cellules souches stromales de la moelle osseuse pourraient également servir comme une source alternative de cellules progénitrices **rétiennnes** afin de traiter diverses maladies dégénératives comme le glaucome, et certaines maladies associées à des cicatrices sur la rétine (HAYNES et DEL RIO-TSONIS, 2004).

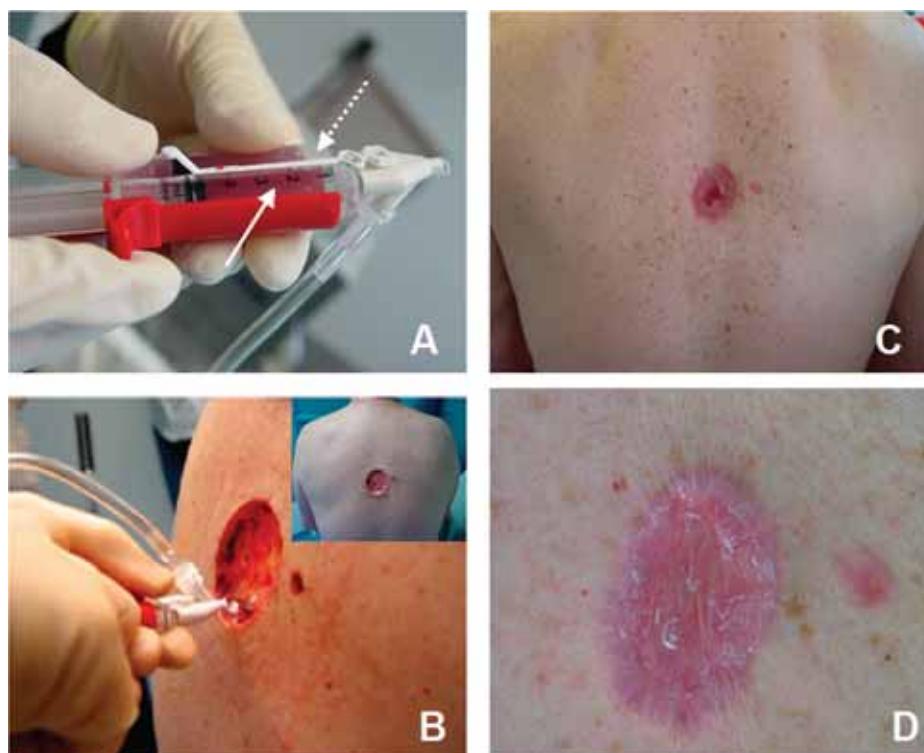
### 2. La peau

On se trouve actuellement dans la nécessité d'**accélérer** la cicatrisation des blessures aigües et chroniques qui répondent très mal aux traitements mis en place. La thérapie cellulaire par les cellules souches devient donc un domaine actif de la recherche pour le traitement des blessures à cicatrisation difficile.

Il existe des preuves selon lesquelles les **fibroblastes** dermiques résidants dans des lésions guérissant mal, possèdent un phénotype anormal et entraînent ainsi une mauvaise réparation tissulaire (FALANGA *et al.*, 2007). En effet, les fibroblastes issus de lésions non cicatrisantes ne répondent pas, en culture, à l'action de certains facteurs de croissance comme PDGF et TGF- $\beta$ 1. De ce fait, incorporer des cellules souches à ces lésions semble très prometteur étant donné leur capacité de différenciation cellulaire : elles pourraient **prendre le relais** des fibroblastes devenus incomptents.

Il y a un grand **challenge** à l'utilisation des **MSCs** dans la cicatrisation des plaies : il faut pouvoir les administrer dans une préparation restant **au contact** du lit de la lésion et les maintenir **viables** dans un milieu souvent hostile. Ensuite, il faut que les cellules **migrent** dans la plaie pour y exercer leur action. Dans l'étude de FALANGA *et al.* (2007), ils ont réussi à cultiver et à faire proliférer des MSCs de moelle osseuse chez l'Homme pour ensuite les appliquer de manière **autologue** et sous forme **topique** sur des plaies (Figure 40). L'établissement des cultures cellulaires s'est avéré rapide et la caractérisation du phénotype des MSCs évidente et stable en culture. Cela a été permis par l'utilisation de la morphologie de ces cellules, de la cytométrie de flux, de l'immunomarquage et d'essais fonctionnels. Ils ont ainsi montré que ces MSCs pouvaient être appliquées sur le lit d'une plaie en utilisant un système de **spray de fibrine** (cadre A et B, figure 40). Pour cela, ils ont modifié les concentrations du fibrinogène et de la thrombine pour délivrer un spray fin se polymérisant automatiquement en fibrine au contact du lit de la plaie. Les MSCs sont alors viables et capables de migrer dans cette matrice de fibrine.

**Figure 40 : Application de MSCs sur une plaie chez l'Homme à l'aide du spray de fibrine (d'après FALANGA *et al.*, 2007)**



A : Spray de fibrine : les flèches montrent le corps de la seringue séparé en deux parties contenant de la thrombine et les MSCs dans du fibrinogène. Le tube en plastique visible est l'arrivée de CO<sub>2</sub> pour mettre en spray le mélange des MSCs.

B : Application des MSCs sur la plaie.

C : Etat de la plaie 6 semaines plus tard : on voit un comblement important de la surface de la plaie.

D : cicatrisation totale 7 semaines après l'application du spray de fibrine.

Les MSCs permettent une **diminution significative** de la taille de la plaie (cadre C et D, figure 40) et cela avec une bonne corrélation avec le nombre de cellules appliquées par cm<sup>2</sup> de blessure. Il a été déterminé qu'une concentration de  $1 \times 10^6$  cellules par cm<sup>2</sup> était nécessaire pour diminuer significativement la taille de la plaie.

Le principal avantage des MSCs de la moelle osseuse est leur transplantation **autologue** et leur **disponibilité** chez tous les individus. Les principaux avantages du spray de fibrine sont l'apport d'un **support protecteur** maintenant les MSCs dans un état stable et viable et la **stimulation** de l'attachement cellulaire ainsi que la **dissémination** des cellules dans les marges de la plaie.

Ce mécanisme est observé chez l'Homme et chez la Souris et cette technique de spray de fibrine pourrait être appliquée chez les **carnivores domestiques** même si le coût du traitement semble être un obstacle important.

### **3. Le myocarde**

La première transplantation de moelle osseuse pour le traitement des infarctus du myocarde chez l'animal a été menée par ORLIC *et al.* (2001a).

Dans cette étude, la **transplantation** intracardiaque de **MSCs** a permis une **augmentation** de la fonction cardiaque par **régénération de la zone infarctée**.

Les MSCs agissent d'au moins trois manières : elles **augmentent la vascularisation** en se différenciant en cellules endothéliales ; elles **réparent le myocarde** en se différenciant en myocytes cardiaques ; et elles **produisent des cytokines et autres facteurs** stimulant la réparation du myocarde et empêchant l'apparition de la fibrose (ORLIC *et al.*, 2001a).

Il est important de noter ici que les cellules souches extracardiaques n'ont **en aucun cas** un rôle dans le **renouvellement physiologique** du myocarde (BARILE *et al.*, 2007). Elles n'interviennent qu'en cas de lésions.

Les méthodes d'utilisation des cellules souches non hématopoïétiques sont les mêmes que pour les HSCs : injection directe en intracardiaque, injection intraveineuse ou mobilisation interne par des facteurs de croissance (LIAO *et al.*, 2007 ; NIESLER, 2004). Cependant, la transplantation de moelle osseuse *in toto* entraîne une inflammation notable en liaison avec la présence de cellules inflammatoires dans la moelle (YE *et al.*, 2006). Après l'injection en intracardiaque de MSCs, les chercheurs n'ont pas mis en évidence d'arythmies, d'inflammation du myocarde et d'augmentation de la taille de la cicatrice (YE *et al.*, 2006). Par contre, il est arrivé que les MSCs se différencient en fibroblastes plutôt qu'en myocytes cardiaques et que des calcifications apparaissent au point d'injection, 2 semaines après la transplantation de MSCs chez des rats (YOON *et al.*, 2004).

La **mobilisation** *in vivo* de HSCs, de MSCs et de leur descendance depuis la moelle osseuse vers la circulation par l'utilisation de cytokines comme le G-CSF, et l'augmentation de leur homing dans le myocarde lésé par l'utilisation de facteurs de croissance comme le VEGF, représente une **stratégie** extrêmement attractive pour induire la régénération du myocarde et des vaisseaux coronaires (MIMEAULT et BATRA, 2006). Il semblerait plus particulièrement que MMP-9, SCF et KIT aient un rôle très important dans l'initiation de la mobilisation des cellules souches de la moelle osseuse (NIESLER, 2004). Le **homing** des MSCs est régi par les mêmes facteurs que ceux vus pour les HSCs à savoir les facteurs du **rolling** et le gradient **SDF-1/CXCR4** (NIESLER, 2004). L'étude de ORLIC *et al.* (2001b) a ainsi permis de montrer que les facteurs SCF et G-CSF étaient capables

d'augmenter le pool circulant de MSCs de plus de 40 fois et ainsi d'améliorer la fonction cardiaque après un infarctus.

Le **mode de différenciation** des MSCs en cardiomyocytes reste encore sujet à **controverse** (TARNOWSKI et SIERON, 2006) ; et pour l'instant très peu de groupes ont réussi à mettre en évidence une transdifférenciation des cellules souches stromales de la moelle osseuse en cardiomyocytes (LIAO *et al.*, 2007). En effet, elles ne remplissent pas deux conditions : elles sont **incapables de se coupler électriquement** avec les cellules cardiaques locales et incapables de **générer une force mécanique active** (BARILE *et al.*, 2007) : elles n'expriment **pas** de protéines de jonctions GAP comme la **connexine 43**.

Il semblerait alors que les effets bénéfiques des cellules souches stromales soient basés sur leur **rôle paracrine** sur les cellules endogènes et sur un rôle de **promotion de l'angiogenèse**. En effet, les MSCs sont capables de produire des facteurs angiogéniques comme VEGF, FGF, des facteurs chimiотactiques comme MCP-1 (*monocytes chemotactic protein-1*) et PGF (*placental growth factor*). Cela entraînerait un recrutement des monocytes et une stimulation de l'angiogenèse au niveau de la lésion myocardique. Ce rôle paracrine semble vraiment être prépondérant dans l'amélioration de la fonction cardiaque (TORELLA *et al.*, 2005).

Une expérience intéressante a été réalisée chez le **Chien** sur un modèle d'insuffisance cardiaque chronique par BARTUNEK *et al.* (2006). Dans cette étude, ils ont utilisé 30 chiens sur lesquels ils ont créé expérimentalement un infarctus du myocarde par ligature d'une artère coronaire. Ils ont ensuite prélevé de la moelle osseuse dans la crête iliaque de chaque chien et isolé les MSCs sur le principe de leur adhérence sur le plastique en culture. Les MSCs ont ensuite été cultivées dans un milieu contenant des facteurs de croissance cardiomyogéniques à savoir du FGF, du BMP-2 et de l'ISL-1 (*insulin like-1*) pendant 6 jours. Une fois l'obtention de **cellules prédifférenciées**, ils les ont injectées directement dans la zone de l'infarctus, 3 semaines post-infarctus, chez le chien à partir desquelles elles avaient été prélevées. En parallèle, ils ont injectés des MSCs non prédifférenciées à un groupe de chiens témoins.

Ils ont alors observé qu'il n'y avait **aucune** modification de la morphologie du myocarde lors de l'injection de **MSCs non prédifférenciées** mais qu'il y avait une **augmentation significative** de l'épaisseur du myocarde visible jusqu'à 12 semaines après l'injection de **MSCs prétraitées**. Ils ont donc conclu aux choses suivantes : 1) le **prétraitement de MSCs autologues** avec des facteurs de croissance myocardique est **réalisable** et entraîne leur **différenciation** en cardiomyocytes et 2) les **effets fonctionnels et biologiques** sur la régénération cardiaque après un infarctus sont bien **supérieurs** lors de l'injection de MSCs prédifférenciées que lors d'injection de MSCs non prédifférenciées.

Il a enfin été avancé que le prétraitement des MSCs permettait d'éviter des **effets indésirables** comme leur différenciation en fibroblastes et l'apparition de calcifications par métaplasie osseuse.

Cette modalité est donc intéressante et est à considérer pour le traitement des infarctus du myocarde chez le **Chien** et bien sûr chez l'**Homme**.

Les MSCs ont également été utilisées chez le **Chien**, comme vecteur du *Hcn2* (*Hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 2*), pour recréer un **pacemaker biologique** (ROSEN *et al.*, 2004). Les pacemakers électroniques sont fiables et entraînent très peu de morbidité. Ils sont utilisés en première intention chez l'Homme pour traiter les blocs atrio-ventriculaires complets et les dysfonctions du nœud sinusal. Cependant ils possèdent de nombreux aspects négatifs comme leur absence d'adaptation à l'effort; la nécessité de maintenir des électrodes au niveau du cœur, et la nécessité de changer la batterie. Ces problèmes ont entraîné le développement de pacemakers biologiques.

Dans l'étude de ROSEN *et al.* (2004), les auteurs ont décidé de travailler avec le *Hcn2* codant pour les canaux responsables de l'activité électrique du nœud sinusal. Ils ont donc pour cela, transfecté des MSCs humaines par électroporation avec le *Hcn2* et les ont introduites dans la branche gauche du réseau de Purkinje chez des chiens. Ils se sont rendu compte que les MSCs transfectées se mettaient à **produire du courant spontanément** et cela de manière autonome pendant la durée de l'expérimentation soit 3 mois. Un problème persiste cependant : les MSCs se dépolarisent bien spontanément mais comme on l'a vu, elles sont incapables de se coupler avec les cardiomyocytes : elles n'entraînent **pas** le fonctionnement **synchrone** du cœur. Les chercheurs ont donc conclu que ces cellules pourraient être dans l'avenir utilisées comme pacemaker biologique, une fois qu'on réussirait à les coupler avec les autres cellules cardiaques.

Les cellules souches de la moelle osseuse sont principalement utilisées cliniquement, chez l'Homme pour **améliorer la réparation** du myocarde après un **infarctus** (NIESLER, 2004) mais aussi chez l'**animal** expérimentalement, pour le traitement des **cardiomyopathies** non-ischémiques (comme la myocardiopathie dilatée) (FEDAK *et al.*, 2003).

#### **4. Le muscle squelettique**

L'injection de cellules souches de la moelle osseuse dans un muscle endommagé entraîne l'expression des **gènes spécifiques** des myocytes par les cellules médullaires (HERZOG *et al.*, 2003).

La transplantation de moelle osseuse restaure ainsi un faible niveau d'expression de **Dystrophine** dans les muscles de souris mutées mdx (GUSSONI *et al.*, 1999).

Les cellules souches de la moelle osseuse sont capables d'**intégrer la niche** juxtaposée aux vaisseaux des SCs et de se **differencier** en SCs exprimant alors leurs marqueurs précoce (CHRISTOV *et al.*, 2007). Cependant, ces SCs ont moins de capacité de prolifération que les SCs résidentes.

## **5. Le foie**

L'existence de cellules souches hépatiques dans la moelle osseuse a pour la première fois été étudiée par PETERSEN *et al.* (1999). Dans leur étude, ils ont montré que la transplantation de moelle osseuse chez des souris mortellement irradiées entraînait la **greffe des MSCs** dans le foie et leur **différenciation en HOCs** ou en **hépatocytes matures**.

Dans une étude démontrant le potentiel de plasticité hors du commun des MSCs, une transplantation de cellules KIT+ THYlow LIN- SCA-1+ (**KTLS**) issues de la moelle osseuse a permis de **corriger un déficit congénital** en fumarylacetoacétate hydrolase (FAH) chez des souris irradiées (LAGASSE *et al.*, 2000). Les cellules du donneur ont été identifiées par manipulation des cellules de la moelle osseuse de souris par une recombinaison homologue avec insertion de *LacZ* dans un exon. Le gène correspondant à l'exon est alors inactivé mais comme les souris utilisées sont hétérozygotes pour ce gène, elles expriment à la fois *LacZ* et le gène d'origine. *LacZ* code pour la β-GAL, enzyme donnant un produit coloré bleu indigo au contact avec du X-GAL. L'intérêt de cette étude est que les hépatocytes issus des MSCs ont pu être identifiés comme **fonctionnels** puisque pour être révélés, ils ont du exprimer la β-GAL et donc être actifs. Dans cette expérience, il semble que les nouveaux hépatocytes soient obtenus par **fusion cellulaire**. Cette capacité de fusion cellulaire avec les hépatocytes est maintenant **bien démontrée** (ALBERA *et al.*, 2005).

La différenciation des **MSCs** en HOCs est stimulée par des facteurs comme le **HGF** par l'intervention notamment du récepteur **C-MET** (FIEGEL *et al.*, 2006). En ce qui concerne les marqueurs, des MSCs chez le rat, suite à leur culture en présence d'hépatocytes, se mettent à exprimer le marqueur **CK19**, spécifique des **canaux biliaires**, et l'**albumine**, spécifique des **hépatocytes**. Ces MSCs sont donc capables de se différencier en **deux types cellulaires** responsables de la régénération réelle du foie.

Les **BMSCs** ont été identifiées chez l'Homme, le Rat et la Souris comme capables de se greffer au niveau de lésions hépatiques, lors d'hépatites par exemple, lors de transplantations de moelle osseuse de mâle à femelle (HERZOG *et al.*, 2003). La technique de FISH sur le chromosome Y a permis de démontré que les hépatocytes obtenus étaient bien issus des BMSCs.

Les **MAPCs** ont également la capacité de régénérer le foie (ULLOA-MONTOYA *et al.*, 2005). Leur différenciation nécessite comme facteurs le **FGF-4** et le **HGF** et elles ont été identifiées en culture comme exprimant les marqueurs des cellules hépatiques à savoir l'**albumine**, **CK18** et **αFP** (FIEGEL *et al.*, 2006).

A la grande différence des **MSCs**, **toutes les autres** cellules souches stromales de la moelle osseuse ne peuvent exprimer *in vitro* **que les marqueurs des hépatocytes** et non ceux des canaux biliaires (FIEGEL *et al.*, 2006). Les MSCs sont donc les **meilleures candidates** sans aucun doute pour la régénération hépatique.

Le **milieu de culture** *in vitro* des cellules souches de la moelle osseuse pour leur différenciation en cellules hépatiques est maintenant bien déterminé (FIEGEL *et al.*, 2006). Il faut : apporter des **facteurs de croissance et des cytokines** dans le milieu de culture ; apporter au milieu

de culture des **molécules extraites de la matrice extra-cellulaire**; et enfin **cultiver** les cellules souches avec **d'autres types cellulaires** appartenant à notre objectif de thérapie. Ainsi, il est important de mettre des hépatocytes dans le milieu de culture des cellules souches de la moelle osseuse pour obtenir une différenciation de ces dernières en hépatocytes: ceux-ci ont une influence majeure sur la différenciation de ces cellules souches par la sécrétion de facteurs de différenciation.

Pour l'administration *in vivo* des cellules obtenues, le meilleur modèle semble être la **matrice de fibrine** (FIEGEL *et al.*, 2006). Il s'agit d'éponges hautement poreuses fabriquées à partir de polymères d'acides lactiques et d'acides glycoliques. Elles servent à la fois de support pour la culture des cellules, et à la fois de support pour leur implantation *in vivo*. Ces éponges ont été utilisées pour la culture d'hépatocytes et leur transplantation chez des animaux de laboratoire. Cette technique peut totalement être utilisée pour la culture de cellules souches hépatiques.

## 6. Le rein

Un effet bénéfique des **MSCs** a été mis en évidence dans des modèles d'ischémie rénale chez des souris dans lesquels les MSCs se **sont différenciées** en **cellules des tubules rénaux** (HISHIKAWA et FUJITA, 2006). Les cellules du donneur ont été identifiées par manipulation des cellules de la moelle osseuse de souris par une recombinaison homologue avec insertion de *LacZ* dans un exon. *LacZ* code pour la  $\beta$ -GAL, enzyme donnant un produit coloré en bleu indigo au contact avec du X-gal. Les chercheurs ont alors retrouvé des cellules exprimant la  $\beta$ -GAL au niveau des cellules tubulaires. Ils n'ont pas pu identifier le mode de différenciation des MSCs.

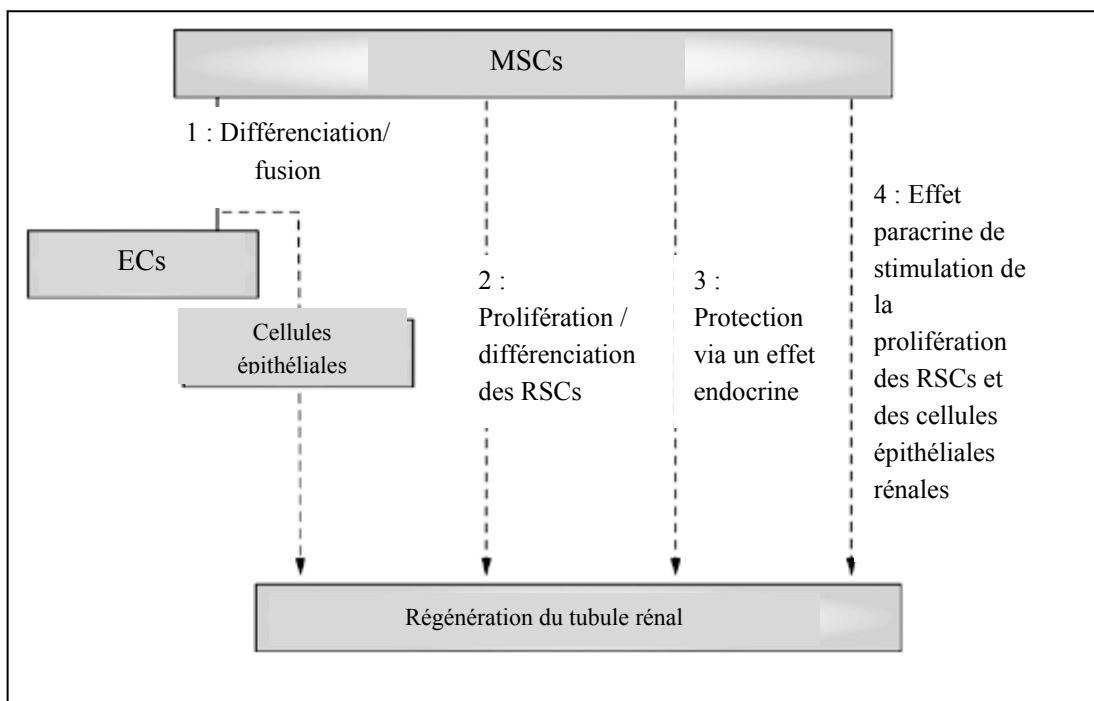
Des études supplémentaires ont montré la greffe de **BMSCs** sous forme de cellules **mésangiales non-épithéliales** et de **cellules interstitielles** dans le rein.

Dans l'étude de ANJOS-AFONSO *et al.* (2004), les chercheurs ont transfété des MSCs de souris avec un vecteur lentiviral porteur du gène codant pour la GFP. Ils ont ensuite injecté ces MSCs GFP+ chez des souris irradiées sans lésion rénale. Dans les reins, les cellules GFP+ étaient localisées de manière éparses dans tout le rein et ont été retrouvées sur 2 des 13 souris utilisées, à raison de 5 à 10 cellules par section de rein. Cette étude montre donc que les MSCs de la moelle osseuse sont capables de se greffer dans le rein **en l'absence de lésion rénale**. Mais de nombreuses autres études n'ont **pas réussi** à mettre en évidence la présence de MSCs après transplantation de moelle dans le rein **en l'absence de lésion rénale** (HISHIKAWA et FUJITA, 2006). Même si ce phénomène existe bien, il semble que ce soit un phénomène **rare** qui ne possède pas un rôle prédominant dans la **régénération physiologique** de l'épithélium tubulaire; le rôle majeur étant donné aux cellules souches rénales.

Les MSCs sont également capables de se greffer dans le rein en présence de lésion d'ischémie par exemple chez des souris. Le mécanisme des effets bénéfiques des cellules souches de la moelle osseuse n'est pas à l'heure actuelle bien défini: elles pourraient soit fusionner avec des cellules différenciées rénales, soit se différencier en cellules souches rénales résidentes, soit avoir un rôle paracrine de protection des cellules résidentes, soit un rôle paracrine de stimulation de la

prolifération des cellules souches résidentes et des cellules différencierées (Figure 41) (CANTLEY, 2005).

**Figure 41 : Possibles rôles des cellules souches de la moelle osseuse dans la régénération rénale après une lésion (d'après CANTLEY, 2005)**



## 7. Le poumon

La greffe de **BMSCs** a été observée dans de nombreuses expériences sous forme de **pneumocytes 2**. Elles ont ainsi entraîné la réparation de lésions pulmonaires chez des souris (HERZOG *et al.*, 2003). Afin d'étudier les possibilités thérapeutiques de la moelle osseuse, les chercheurs ont spécifiquement sélectionné **une seule cellule souche** dérivée de la moelle, une BMSC, selon sa taille, son absence de marqueur de lignage, et sa capacité de homing extrêmement rapide dans la moelle osseuse. Elle seule a ensuite été transplantée chez une souris mortellement irradiée selon une transplantation de mâle à femelle (KRAUSE *et al.*, 2001). Cette **unique BMSC** ne s'est pas seulement implantée dans le tissu hématopoïétique mais s'est également implantée en tant que **pneumocytes 2** dans les poumons (et en tant que cellules épithéliales dans la peau et le tractus digestif).

Les **MSCs** peuvent aussi contribuer à la réparation de l'épithélium pulmonaire après une lésion par exemple de type inflammatoire. Après une injection de MSCs chez des souris ayant subi une atteinte pulmonaire, elles se sont retrouvées sous forme de **pneumocytes 1** dans les poumons (HERZOG *et al.*, 2003).

En réalité, on a découvert que **toutes** les cellules souches non hématopoïétiques de la moelle osseuse à savoir les MSCs, les BMSCs, les MPCs, les MAPCs et les MIAMIs pouvaient se différencier en **cellules épithéliales pulmonaires** (ALBERA *et al.*, 2005). Elles sont **recrutées** dans la circulation après avoir été stimulées lors de lésion du poumon. Elles vont alors **se greffer** au niveau de l'épithélium pulmonaire et le **régénérer** conjointement avec les cellules souches locales.

La différenciation par **fusion cellulaire** a été montrée *in vitro* mais n'a pas été mise en évidence chez l'Homme lors de transplantations mâle à femelle (ALBERA *et al.*, 2005). A contrario, des expériences *in vivo* chez des souris ont mis en évidence une **transdifférenciation** de cellules souches de la moelle osseuse en cellules épithéliales (HARRIS *et al.*, 2004). Le mode de différenciation est encore en exploration à l'heure actuelle.

L'utilisation de cellules souches de la moelle osseuse par le biais de **transplantation** est actuellement envisagée pour le traitement de la **mucoviscidose** chez l'**Homme** (ALBERA *et al.*, 2005). Une autre optique d'utilisation serait l'**introduction de gène** dans ces cellules souches afin de remplacer un gène défectueux au niveau du poumon : des expériences chez l'animal ont montré que lorsque ces cellules souches intégraient l'épithélium pulmonaire, elles ne perdaient pas l'expression du transgène (ALBERA *et al.*, 2005).

## **8. Le système nerveux central**

Dans une étude, des souris adultes mortellement irradiées, ayant reçu une **greffe** de moelle osseuse complète en intraveineuse, ont développé des **cellules nerveuses**, dérivées des cellules du donneur, portant les antigènes **NeuN** et **β-tubuline de classe 3**, deux marqueurs neuronaux (BRAZELTON *et al.*, 2000). Dans une autre étude, des cellules de la moelle osseuse, après avoir été injectées chez des souriceaux irradiés, ont migré dans leur cerveau où elles se sont mises à exprimer le marqueur NeuN (MEZEY *et al.*, 2000).

Les **MSCs** peuvent alors s'avérer utilisables dans le traitement des maladies du système nerveux central comme cela a été fait sur un modèle murin de la maladie humaine de **Niemann-Pick** (JIN *et al.*, 2002). Il s'agit d'une maladie de surcharge en lysosomes entraînant un déficit en cellules de Purkinje. Les souris recevant la greffe sont des souris mutées acide-sphingomyélase nulle de 3 semaines. Leur mort a été retardée après l'injection dans l'hippocampe et le cervelet, de MSCs génétiquement modifiées par un rétrovirus pour surexprimer la sphingomyélase et marquées par la GFP. Les chercheurs ont identifiées chez les souris receveuses mutantes nulles, des cellules de Purkinje exprimant la sphingomyélase dérivées de la moelle osseuse de la souris donneuse donc GFP+. Il s'agit là d'une preuve de la différenciation en cellules nerveuses **fonctionnelles** de cellules de la moelle osseuse.

Les MSCs peuvent également être utilisées dans le traitement des **traumatismes de la moelle épinière** (HERZOG *et al.*, 2003). Il semble cependant que l'effet bénéfique des transplantations de MSCs soit **indirect**. Une différenciation en oligodendrocytes *in vivo* n'a pas pu clairement être identifiée dans les axones mais il semblerait que les MSCs servent plutôt de **cellules de support** pour la reconstruction axonale. Un rôle **trophique** et **paracrine** des MSCs a été mis en évidence dans des

nombreuses études chez les rats sur des traumatismes de la moelle osseuse (GINGERICH *et al.*, 2007 ; STEINDLER, 2007): il semblerait que les MSCs se mobilisent jusqu'au site de la lésion, se mettent à exprimer des cytokines et des facteurs de croissance qui stimulent la réparation par les cellules souches locales ou activent des mécanismes compensateurs.

L'utilisation de cellules souches de la moelle osseuse dans le traitement des traumatismes médullaires serait très intéressante en **médecine vétérinaire** car le prélèvement est relativement facile et la prévalence des traumatismes extrêmement élevée.

### c) Traitements des déficiences du système immunitaire, sanguin et de la coagulation

Il a été rapporté que l'injection de **BMSCs modifiées** avec le gène humain du facteur de coagulation IX (***hFIX***) chez des souris immunodéficientes sévères, avait permis la **synthèse biologique de hFIX active** dans leur circulation (MIMEAULT et BATRA, 2006).

Les **MSCs** ont été définies comme de **très bons véhicules** pour le remplacement de gènes responsables de déficience en protéines circulantes (ASAHARA *et al.*, 2000). Des essais thérapeutiques ont ainsi été menés chez l'Homme pour le traitement de l'hémophilie B ou des formes sévères d'ostéogenèse imparfaite : des MSCs humains ont été modifiées avec un gène codant pour le facteur IX ou pour le collagène de type I (ASAHARA *et al.*, 2000).

La moelle osseuse est donc une source incroyable de cellules souches : les HSCs, les cellules SP, les EPCs mais aussi toutes les cellules souches stromales à savoir les MSCs, les MPCs, les MAPCs, les BMSCs et les MIAMIs. Les HSCs et les cellules SP ont comme rôle principal la régénération du lignage hématopoïétique. Mais ces cellules souches possèdent aussi une grande plasticité. C'est aussi le cas pour les cellules souches stromales qui non seulement régénèrent les constituants de la moelle osseuse et des os mais sont également capables de régénérer le muscle cardiaque ou squelettique ou encore l'épiderme et la cornée. La moelle osseuse est la première source de cellules souches découverte et utilisée ; et ses possibilités thérapeutiques sont bien plus incroyables que ce que l'on imaginait.

## **B. Les cellules souches cardiaques : une présence insoupçonnée mais d'intérêt majeur pour le traitement des infarctus (et autres troubles cardiaques)**

### **1) Le tissu cardiaque peut se régénérer**

Le cœur a toujours été considéré comme un organe constitué de cellules post-mitotiques incapables de se régénérer. Ce dogme a largement conditionné la recherche clinique et fondamentale en cardiologie depuis ces 30 dernières années. Selon cette hypothèse, les **cardiomyocytes** subissent des **hypertrophies cellulaires** et ne peuvent pas être remplacés. L'unique réponse des cardiomyocytes au stress est l'**hypertrophie et/ou la mort**.

Il existe un second dogme selon lequel, durant la période embryonnaire, les cellules souches cardiaques **s'engagent** dans le lignage des cellules cardiaques et entraînent ainsi une perte irréversible des capacités de renouvellement du tissu cardiaque chez l'adulte (ANVERSA *et al.*, 2006).

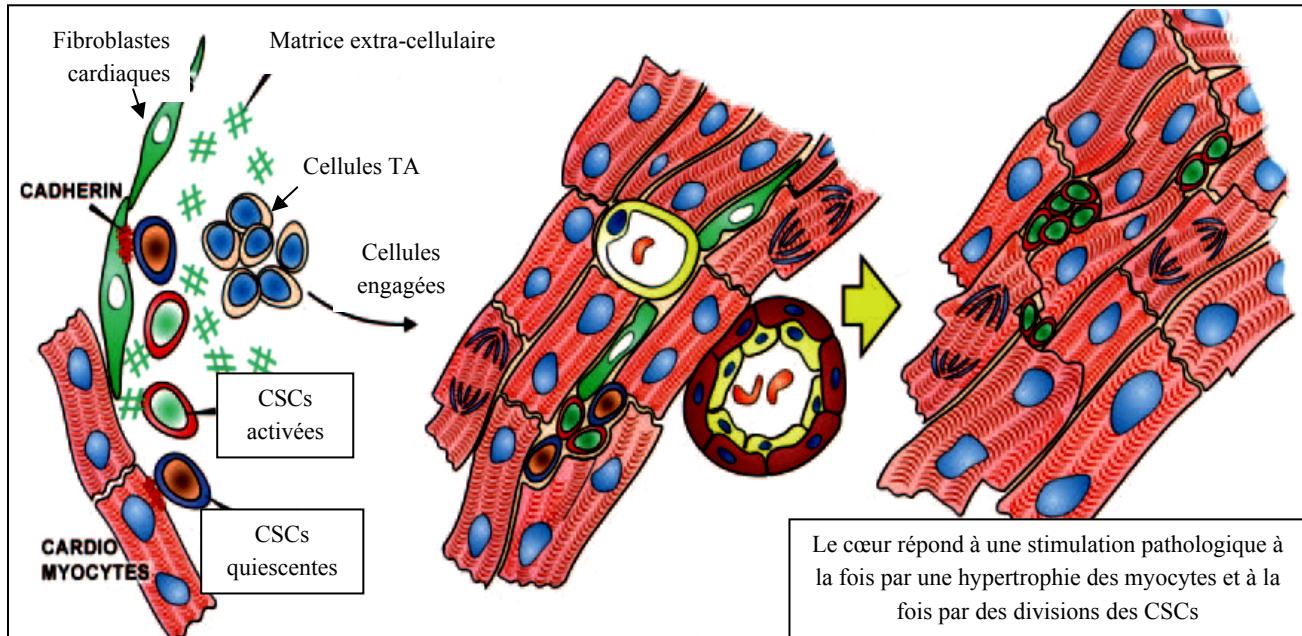
Chez l'adulte, les **myocytes** différenciés (d'un volume d'environ  $25\ 000\ \mu\text{m}^3$  par cellule) conservent une **capacité de division**. Le volume des cellules en mitose avant la cytokinèse serait alors estimé à  $50\ 000\ \mu\text{m}^3$  et chaque cellule donnant 2 cellules filles, on aurait l'obtention de cellules filles de  $25\ 000\ \mu\text{m}^3$  de volume. Étonnamment, chez l'Homme, les myocytes en mitose ont une taille variant de moins de  $1000\ \mu\text{m}^3$  à  $5000\ \mu\text{m}^3$  au maximum, prouvant ainsi qu'un **autre mécanisme** de formation des myocytes est nécessaire dans le cœur adulte. Ces données ainsi que des expériences de transplantations cardiaques de mâle à femelle ont permis d'identifier **des cellules souches cardiaques** (ANVERSA *et al.*, 2006).

La découverte de **cellules souches cardiaques** (*cardiac stem cells* ou CSCs) résidant dans le myocarde et donnant naissance aux myocytes, aux cellules musculaires lisses des vaisseaux et aux cellules endothéliales du cœur (Figure 42) (ANVERSA *et al.*, 2006), a permis la création d'une **nouvelle perspective** concernant la biologie du cœur et les mécanismes de son homéostasie tissulaire et de sa régénération.

Le nombre de cardiomyocytes dans le cœur adulte n'est donc **pas défini** à la naissance : le dogme selon lequel les cardiomyocytes définissent l'âge du cœur et de l'organisme s'effondre. De même, le dogme selon lequel les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales des vaisseaux se renouvellent par elles mêmes en entrant de nouveau dans des cycles de division est remis en question. Ces cellules seraient obtenues, dans le cœur, par division de cellules souches cardiaques.

Un nouveau concept est né : le tissu cardiaque est **capable d'auto-renouvellement** et les myocytes sont régénérés durant toute la vie de l'organisme (ANVERSA *et al.*, 2006 ; BARILE *et al.*, 2007). De même, les CSCs ne s'engagent pas irréversiblement en se différenciant : elles sont, même après la naissance, capables d'**auto-renouvellement**.

**Figure 42 : CSCs, niche et renouvellement du myocarde (d'après ANVERSA *et al.*, 2006)**



Les myocytes sont les descendants des CSCs résidant dans des niches. Les **niches** contrôlent le renouvellement des cellules myocardiques, mais aussi la croissance, la migration et l'engagement de cellules précurseurs. Ces dernières quittent alors la niche et migrent dans le tissu cardiaque pour remplacer les cellules mortes. Chez l'adulte ce renouvellement existe dans le cœur sain même en l'absence de lésion (ANVERSA *et al.*, 2006).

## 2) Nature des cellules souches cardiaques

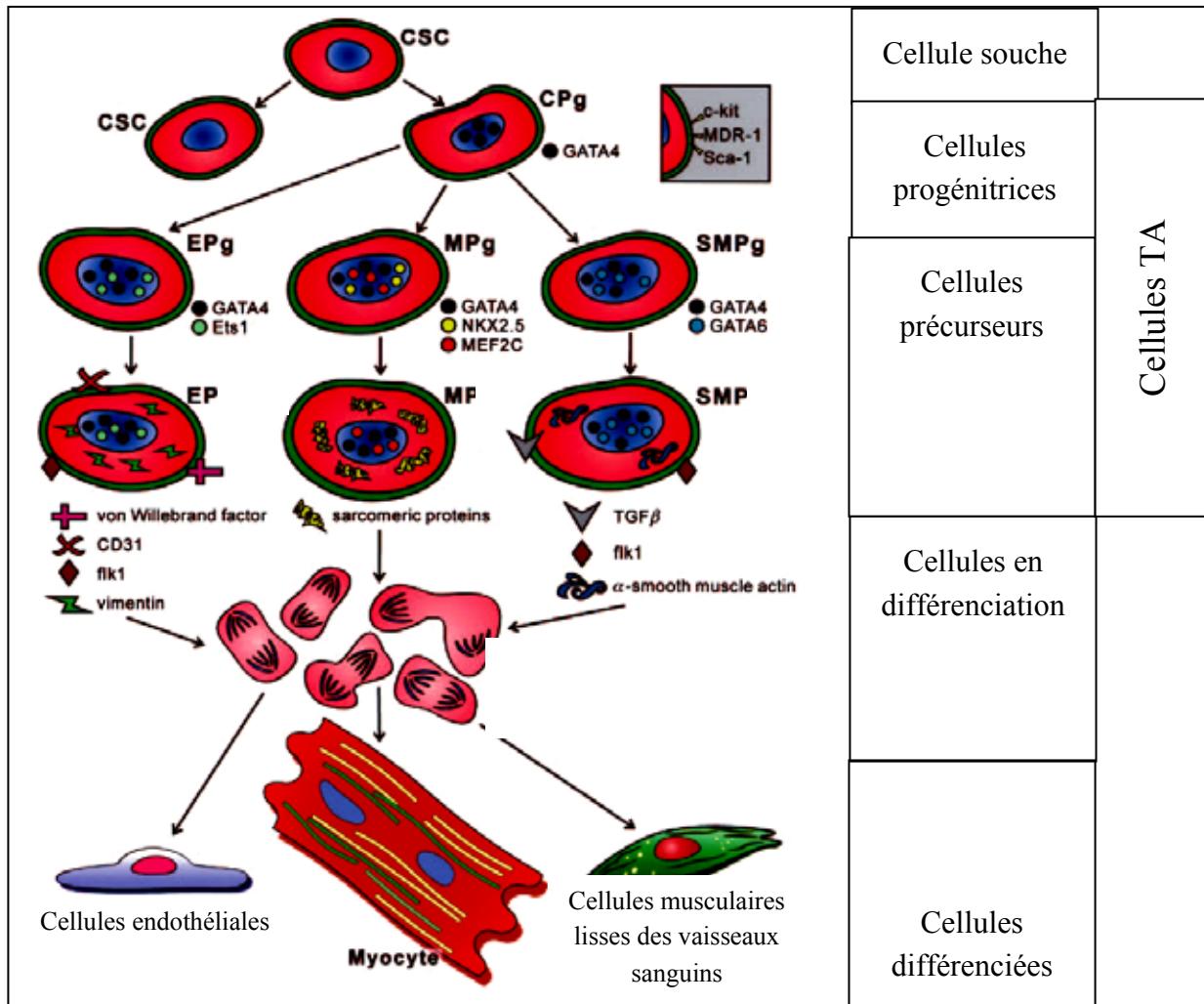
Les informations sur le phénotype des CSCs sont encore incomplètes. La nomenclature est imprécise et souvent, des cellules ayant des comportements de prolifération différents sont identifiées de la même manière.

Les **CSCs** sont des cellules **indifférenciées**, **LIN-** possédant un potentiel de **prolifération** important (ANVERSA *et al.*, 2006). Elles sont capables d'**auto-renouvellement**, de clonogénicité et de se **différencier** en cellules matures in vitro et in vivo. Le nombre actuel de CSCs reste controversé. Des études chez l'Homme, le Rat, la Souris et le Chien indiquent qu'il y a une cellule souche pour environ 8 000 à 20 000 myocytes (ANVERSA *et al.*, 2006).

Un classement en **4 classes** des cellules immatures a été proposé et est représenté sur la figure 43. On a les CSCs, les cellules progénitrices, les cellules précurseurs et les cellules en différenciation. Sur la figure 43, on voit que la **CSC originelle**, se divise **asymétriquement** pour donner une cellule fille CSC et une cellule fille nommée cellule progénitrice (CPg). Cette cellule progénitrice donne naissance à une cellule progénitrice de myocytes (MPg) et une cellule

précurseur de myocytes (MP) ; une cellule progénitrice d'endothélium (EPg) et une cellule précurseur d'endothélium (EP) ; et enfin, une cellule progénitrice de muscle lisse (SMPg) et une cellule précurseur de muscle lisse (SMP). Les précurseurs deviennent des cellules en différenciation qui aboutissent à la formation de myocytes matures, de cellules endothéliales et de cellules du muscle lisse des vaisseaux sanguins.

**Figure 43 : Hiérarchie et différenciation des CSCs (d'après ANVERSA *et al.*, 2006)**



Les **CSCs n'expriment pas** les marqueurs de différenciation des différents lignages et expriment les marqueurs **SCA-1**, **MDR1**, et/ou **KIT**. Les cellules progénitrices expriment les marqueurs de cellules souches et les facteurs de transcription des cellules cardiaques mais ne montrent pas de protéines plasmatiques spécifiques. Les cellules précurseurs ne possèdent pas les antigènes des cellules souches mais possèdent les facteurs de transcription et les protéines plasmatiques spécifiques des myocytes, des cellules endothéliales ou des cellules de muscle lisse. Les cellules en différenciation portent tous les marqueurs de leur lignage spécifique mais sont négatives pour les autres marqueurs.

La reconnaissance de ces cellules reste complexe et délicate. L'analyse par FACS est extrêmement efficace pour séparer des cellules en catégories spécifiques selon l'expression des épitopes de surface. Cependant, la distinction entre les cellules LIN- et les cellules engagées requiert l'analyse des protéines nucléaires et cytoplasmiques. Ceci ne peut être obtenu que par la fixation des cellules les rendant ainsi perméables pour la détection des composants intracellulaires (ANVERSA *et al.*, 2006). Le problème est que les marqueurs KIT, MDR1 et SCA-1 sont exprimés **non seulement** sur les cellules primitives mais aussi sur les cellules **TA**. Ceci complique grandement leur identification et mène à des problèmes dans leur classification.

Les cellules **KIT positives** sont des cellules de petite taille n'exprimant pas les marqueurs spécifiques de lignage comme CD34, CD45, CD20, CD45-RO (marqueur des lymphocytes O activés) et CD8 (BARILE *et al.*, 2007). Dans une étude de BELTRAMI *et al.* (2003), ces cellules ont été marquées par la GFP puis injectées dans le bord de la zone d'un infarctus expérimental chez des rats. Une **bande de myocarde régénéré** GFP+ a été observée au microscope chez 19 des 20 rats. Les cellules marquées expriment les protéines du sarcomère et sont plus petites que les myocytes matures, mais elles ont une striation visible et expriment la connexine 43. Une augmentation de la densité en artéries et en capillaires a aussi été observée par contribution des cellules GFP+ à la **genèse des vaisseaux sanguins**. Il y a bien sûr eu une **augmentation des performances cardiaques**. L'hypothèse de la fusion cellulaire comme mode d'apparition a été proposée mais selon BELTRAMI *et al.* (2003), très peu d'indices dans leurs expériences permettent de confirmer ceci : en effet, le nombre de myocytes obtenus est bien supérieur au nombre de myocytes injectés et les nouvelles cellules sont diploïdes et non tétraploïdes.

Les CSCs **KIT positives** sont localisées dans une **niche** propre au cœur (ANVERSA *et al.*, 2006). Les cellules de cette niche permettent de **séquestrer** les cellules souches dans un microenvironnement **stable** les protégeant ainsi des signaux de différenciation, d'apoptose, et d'autres signaux pouvant diminuer la réserve des cellules souches. La niche **protège** aussi le cœur **contre une production excessive** de cellules et donc potentiellement contre le cancer. Les CSCs sont principalement regroupées dans les **atria**, **l'apex** mais sont aussi détectables dans les **ventricules** (ANVERSA *et al.*, 2006).

Les CSCs **SCA-1** sont des **cellules progénitrices** qui n'expriment pas les marqueurs CD45, CD34, LMO2, GATA-2 et TAL (BARILE *et al.*, 2007). Elles expriment la télomérase, les marqueurs cardiaques précoces comme GATA-4, MEF-2 et TEF-1 mais n'expriment pas le NKX2.5 ou des gènes codant pour les protéines des sarcomères. Elles sont **multipotentes**. L'injection intraveineuse de ces cellules chez des souris après un infarctus expérimental, a montré qu'elles se retrouvent au niveau du myocarde atteint et se différencient en cardiomyocytes en exprimant l' $\alpha$ -actine sarcomérique et la connexine 43 (BARILE *et al.*, 2007).

Le **potentiel régénératif** des cellules KIT et SCA-1 après un infarctus ou une lésion d'ischémie-reperfusion diffère de manière significative : on obtient une réponse régénérative robuste avec les cellules KIT positives alors que les cellules SCA-1 positives se greffent mal sur le site de la lésion et provoque peu de régénération au long terme (ANVERSA *et al.*, 2006).

Il existe de plus des **cellules SP** dans le cœur qui expriment les marqueurs SCA-1, KIT et CD34 mais qui n'expriment pas le marqueur CD45 (BARILE *et al.*, 2007); et qui sont présentes dans le cœur de l'Homme à un taux de 2% environ (ANVERSA *et al.*, 2006). Il y a une cellule SP pour 30 000 cellules cardiaques dans le cœur de souris (ANVERSA *et al.*, 2006). Les cellules SP sont dites **hautement enrichies en HSCs** : elles sont obtenues après une purification poussée des HSCs et proviennent donc de la moelle osseuse hématopoïétique. Etant résidentes permanentes dans le tissu cardiaque, elles sont considérées comme des cellules souches cardiaques. Elles ont comme propriétés de se regrouper en une population séparée, éloignée du reste des autres cellules à l'analyse par FACS et de fluorescer dans le spectre **bleu** plutôt que dans le rouge avec le colorant Hoechst 33342 (CHALLEN et LITTLE, 2006). Pour cela, elles ont l'unique capacité **d'éliminer le colorant de Hoechst**.

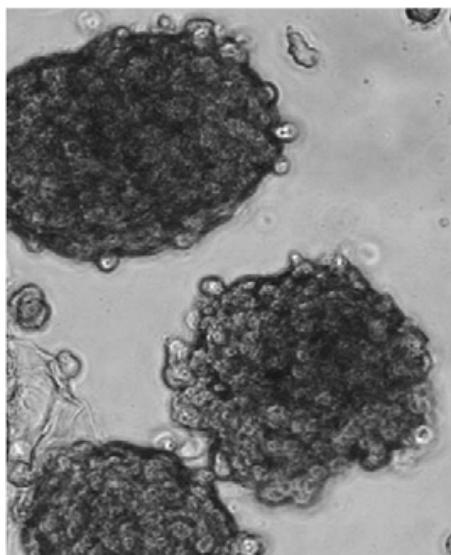
Un dernier type de cellules souches cardiaques a été isolé par l'utilisation de ***Isl-1*** (BARILE *et al.*, 2007). ISL-1 se retrouve sur des cellules ayant un rôle important dans la formation du cœur embryonnaire chez l'Homme et les rongeurs. Ces cellules perdent ensuite ce marqueur en rentrant dans la voie de la différenciation des cardiomyocytes. On ne devrait donc pas les observer à l'âge adulte. Cependant, des cellules ISL-1 positives ont été identifiées dans le cœur adulte des Hommes et des rongeurs, dans lequel, elles restent à un stade indifférencié. Elles sont majoritairement localisées au niveau des **atrias** et du **ventricule droit**. Elles expriment NKX2.5 et GATA-4 mais n'expriment pas SCA-1, CD31 et KIT. Ces cellules peuvent se **différencier** en myocytes cardiaques *in vivo* et *in vitro* (BARILE *et al.*, 2007) : en effet, lorsqu'elles sont cultivées en présence de cardiomyocytes matures, elles se mettent à exprimer des marqueurs de myocytes cardiaques matures ainsi que leurs caractéristiques électro-physiologiques (incluant leur réponse au système sympathique) (BARILE *et al.*, 2007). Cependant ces cellules n'ont été isolées que chez des **organismes très jeunes** et leur nombre décroît rapidement avec l'âge (BARILE *et al.*, 2007). Il reste donc à voir si ces cellules sont bien présentes chez l'adulte tout au long de sa vie.

Dans une étude, une population hétérogène de CSCs a été isolée du myocarde de l'Homme et cultivée *ex vivo* : elles se sont spontanément mises à former des masses de multiples cellules nommées **cardiosphères (CSps)** dans des cultures en suspension (Figure 44) (BARILE *et al.*, 2007).

Ces CSps sont constituées de CSCs **KIT positives** en leur **centre** et des cellules **en différenciation** exprimant des marqueurs de cellules endothéliales et cardiaques **à la périphérie**. Ces CSps deviennent par la suite partiellement différenciées en lignée cardiaque.

Il semblerait que leur différenciation soit modulable : en effet, lorsqu'on les soumet en culture, pendant cinq jours à un champ magnétique de très basse fréquence, elles modulent leur différenciation en passant de la cardiogenèse à l'angiogenèse (BARILE *et al.*, 2007).

**Figure 44 : Cardiosphères humains de 25 jours, 12 jours après la collection de CSCs  
(d'après BARILE *et al.*, 2007)**



Cette formation en CSps est indispensable car elle imite la **structure tri-dimensionnelle** du tissu cardiaque : cela permet les contacts cellules à cellules et ainsi la reconstruction de l'anatomie normale de la niche des CSCs.

L'activation de la prolifération et de la migration des CSCs semble due à l'activation des récepteurs C-MET et IGF-R1 par leur ligand respectifs HGF et IGF (*insulin growth factor*) (MIMEAULT et BATRA, 2006). Il y a également d'autres facteurs impliqués dans la cardiogenèse et l'angiogenèse dans le cœur comme VEGF, HGF, EPO, TGF- $\beta$ , HIF-1 $\alpha$  (*hypoxia inducible factor-1 $\alpha$* ) et IL8 (MIMEAULT et BATRA, 2006).

Les chercheurs, à l'heure actuelle, ont encore des doutes sur une **origine éventuelle extracardiaques** de ces CSCs (BARILE *et al.*, 2007). En effet, il existe un pool de cellules souches circulantes qui intervient dans la régénération du myocarde. La principale source serait donc la **moelle osseuse**. Ceci est aussi conforté par le fait que certaines CSCs expriment le marqueur KIT, marqueur de nombreuses cellules souches dont les HSCs. Le rôle de la moelle osseuse a de plus été largement démontré dans la régénération cardiaque suite à une lésion.

Les **CSCs** ont été isolées à partir du cœur du **Chien** (LINKE *et al.*, 2005). En adéquation avec les résultats obtenus chez le Rat, la Souris et l'Homme, les CSCs canines exprimant **3** antigènes de surface (KIT, MDR1, SCA-1) constituent la population prévalente (environ **60%**) ; celles exprimant **2** des 3 antigènes, la deuxième population (environ **25%**) ; et celles n'exprimant qu'**un** seul antigène parmi les 3, la dernière population (environ **15%**).

### **3) CSCs et homéostasie cardiaque**

Les chercheurs de 8 laboratoires ont montré que des cellules souches étaient présentes dans le cœur adulte des petits et des gros mammifères (ANVERSA *et al.*, 2006).

Cependant, le nouveau dogme d'un cœur capable de régénération a encore du mal à être accepté et ceci parce que cela nécessite de répondre à 4 questions (ANVERSA *et al.*, 2006) : 1) Est-ce que les CSCs sont responsables de l'**homéostasie** du tissu cardiaque et donc du remplacement physiologique des cellules cardiaques incluant les cardiomyocytes ? 2) Est-ce que le pool de CSCs est **activé** après une lésion et si c'est le cas est ce que cela permet une **augmentation significative** du nombre de myocytes et de vaisseaux sanguins ? 3) Si elles sont bien activées, est-ce que les CSCs sont capables de **migrer** au niveau du site de la lésion et de se **différencier** pour régénérer le myocarde ? 4) En considérant que le cœur possède une réserve de croissance importante, est-ce que le vieillissement et l'insuffisance cardiaque chronique **réduisent** le pool de CSCs et, si c'est le cas, une réduction drastique des CSCs est-elle responsable des stades de décompensation terminale ? C'est en répondant à toutes ces questions que les chercheurs pourront effondrer le dogme du cœur « statique », incapable de régénération.

L'**homéostasie cardiaque** est un juste balancement entre régénération et mort cellulaire. Comme on l'a vu, les CSCs sont localisées au niveau des atrias et de l'apex mais sont également présentes au niveau du myocarde ventriculaire (ANVERSA *et al.*, 2006). La régénération et la mort des cellules se fait de **manière équilibrée** sur tout le myocarde. Chez l'Homme, on estime qu'il y a environ  $5 \times 10^9$  myocytes dans le ventricule gauche et le septum interventriculaire. Environ  $3 \times 10^6$  myocytes sont générés par jour par l'engagement et la prolifération des CSCs, et le taux de nécrose /apoptose des myocytes est d'environ  $3 \times 10^6$  myocytes par jour. Ce degré de prolifération indique que le cœur humain **se renouvelle complètement tous les 4,5 ans** : il remplace toute sa population cellulaire environ **18 fois** au cours d'une vie hors maladie cardiaque.

L'homéostasie cardiaque touche aussi bien les myocytes que les **vaisseaux sanguins** c'est-à-dire les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales (ANVERSA *et al.*, 2006). Il a été possible d'identifier des cellules progénitrices de ces cellules dans le myocarde de l'Homme, la Souris, le Rat et le Chien (ANVERSA *et al.*, 2006). Ce sont les CSCs KIT positives qui donnent naissance aux myocytes, aux cellules endothéliales et aux cellules musculaires lisses des vaisseaux (BARILE *et al.*, 2007). Il semblerait que l'angiogenèse ait également lieu par l'entrée des cellules endothéliales et musculaires lisses différencierées dans de nouveaux cycles de division.

En résumé, le cœur adulte n'est pas un organe statique mais plutôt **dynamique** dont l'homéostasie est gouvernée par un compartiment de CSCs qui repeuple continuellement le myocarde en remplaçant les cellules cardiaques et vasculaires ayant subi l'apoptose ou la nécrose. Le cœur a donc une réserve de croissance pouvant restaurer un grand nombre de myocytes et reconstituer son compartiment plusieurs fois au cours d'une vie.

Le vieillissement et la mort du myocarde semblent être dus au **manque de télomérase** dans les CSCs induisant un raccourcissement des télomères et donc une mort cellulaire (ANVERSA *et al.*, 2006). On retrouve ceci dans le vieillissement cardiaque normal mais aussi dans l'insuffisance cardiaque terminale.

#### 4) CSCs et réparation cardiaque

Les CSCs offrent plus de potentiel à créer du myocarde que les autres cellules souches : elles sont sur place, elles expriment fréquemment des facteurs de transcription des cellules progénitrices cardiaques, et elles sont capables de se différencier *in vivo* et *ex vivo* en lignées cardiaques (BARILE *et al.*, 2007). Leur utilisation pour le traitement des maladies cardiaques est donc une **opportunité exceptionnelle** : elles peuvent être utilisées selon un mode **autologue**, elles sont plus **cardiogéniques** que toutes les autres cellules souches et elles ont un rôle majeur dans l'**angiogenèse**. Les CSCs peuvent soit être stimulées localement soit être injectées. Les modes d'injection des CSCs sont intra cardiaque, intra veineux et percutanée (BARILE *et al.*, 2007). Des injections dans les coronaires sont également possibles (LIAO *et al.*, 2007).

Les conséquences d'un **infarctus** sont identiques d'un organe à l'autre : la formation d'une cicatrice. Cette évolution est dictée par 2 facteurs primordiaux : 1) les cellules souches présentes dans la région de l'infarctus **meurent** comme toutes cellules privées d'oxygène et 2) les cellules du tissu sain **ne peuvent pas migrer** dans le tissu lésé, s'ancrer, proliférer et se différencier pour remplacer les cellules mortes (LINKE *et al.*, 2005). Ainsi, des CSCs mortes sont communément rencontrées dans la zone de l'infarctus ainsi qu'une prolifération des CSCs viables et une division amplifiée des myocytes dans le myocarde sain (ANVERSA *et al.*, 2006).

La question est : est-ce que le pool de CSCs viable est capable de régénérer le myocarde restant, pour permettre le maintien de la fonction de l'organe ?

Chez l'Homme, la **formation de myocytes** est extraordinairement **amplifiée** en cas d'insuffisance cardiaque aigue et chronique (ANVERSA *et al.*, 2006). Cette augmentation de production de myocytes est permise par l'augmentation de la division et de l'entrée en différenciation des CSCs. Un ventricule ayant subi un infarctus, peut régénérer, dans la zone saine, environ  $2,2 \times 10^8$  myocytes par jour (ANVERSA *et al.*, 2006). Cette valeur est **70 fois supérieure** au taux de renouvellement basal du cœur. En cas de cardiomyopathie à un **stade terminal** après un infarctus, le renouvellement est de l'ordre de **11 fois** le renouvellement basal. A ceci, il faut rajouter que le nombre de myocytes mourant dans le myocarde survivant est de  $1,8 \times 10^8$  juste après un infarctus et d'environ  $10^8$  au stade final de l'insuffisance cardiaque après un infarctus. Sur la base de ces observations, la quantité de myocytes produite est légèrement supérieure à la quantité de myocytes détruite juste après l'infarctus ; mais leur production est beaucoup moins importante par rapport à leur perte sur le long terme. C'est ainsi **qu'au long terme**, on obtient une **diminution de la masse de myocarde**.

Les CSCs sont vraiment utiles **juste après** un infarctus. Dans ce sens, des études ont été menées chez la Souris et chez le Chien (ANVERSA *et al.*, 2006). L'activation locale de facteur de

croissance des CSCs dans le myocarde peut sauver une Souris avec un large infarctus au long terme, grâce à une reconstruction de la paroi du ventricule atteint, une normalisation du rapport chambre-paroi du ventricule, et une acquisition d'un phénotype adulte par des myocytes nouvellement constitués.

Des expériences menées sur des souris immunodéficientes sévères ont montré que l'administration de CSCs humaines ou de cellules issues de ces CSCs **dans le myocarde** suite à une lésion, provoque une migration, une greffe et une régénération du myocarde et permet ainsi une amélioration du fonctionnement du ventricule (BARILE *et al.*, 2007). L'injection **intra coronaire** de CSCs KIT positives, 4 heures après une occlusion des vaisseaux coronaires de coeurs de rats d'une durée de 90 minutes, a permis de limiter l'extension de la zone de l'infarctus, d'atténuer le remodelage cardiaque et d'améliorer la fonction cardiaque cinq semaines après l'infarctus (DAWN *et al.*, 2005).

Une étude menée par BARILE *et al.* (2007) sur les CSps, a permis de montrer que **l'injection de CSps** dans la zone entourant l'infarctus chez des souris permettait une amélioration significative de la fonction cardiaque avec une greffe solide des CSps dans le cœur. Il a également démontré que l'injection de 10 CSps entraîne la même amélioration de la fonction cardiaque que l'injection de 10 000 CSCs (ANVERSA *et al.*, 2006 ; BARILE *et al.*, 2007).

Un des problèmes majeurs lors de la régénération cardiaque est le couplage des cellules nouvellement formées entre elles, notamment par l'expression de la **connexine 43**, comme pour les cellules souches de la moelle osseuse. En effet, en l'absence de couplage électro-physiologique, les nouveaux cardiomyocytes ne peuvent pas adhérer aux autres cardiomyocytes et fonctionner simultanément. **Cependant**, à la fois les **CSCs** et les **CSps expriment la connexine 43** en culture tri-dimensionnelle ou en monocouche (BARILE *et al.*, 2007). Cela signifie qu'elles sont capables de se coupler électro-physiologiquement avec les autres cardiomyocytes.

Des études complémentaires sur le porc ont montré que les **cellules issues de ces CSps** (*cardiosphere-derived cell* ou **CDCs**) émettaient des **potentiels d'action répétitifs** spontanément après six jours en culture avec des cellules nodales (SMITH *et al.*, 2005). Elles pourraient donc être raisonnablement envisagées comme un **pacemaker biologique** qui, à la différence de celui obtenu avec les cellules de la moelle osseuse, entraînerait le fonctionnement synchrone du cœur et la création d'une force mécanique.

Dans une étude menée sur le Chien par LINKE *et al.* (2005), il a également été montré que ces CSCs étaient capables de régénérer le myocarde et d'améliorer la fonction cardiaque après un infarctus.

Les CSCs sont donc des cellules souches à haut potentiel de régénération cardiaque et offrent une perspective de thérapie très intéressante pour les insuffisances cardiaques aigues et chroniques chez l'Homme et chez l'animal. Les cellules **KIT positives** sont les clés de la régénération cardiaque. Leur prélèvement semble quant à lui délicat étant donné la nécessité de pratiquer cela à

cœur ouvert. Il faudrait que l'on soit capable de stimuler le passage dans la circulation sanguine de ces cellules pour pouvoir les prélever par simple prise de sang par la suite.

## **C. Des cellules souches dans le système nerveux central : une perspective sur le traitement de nombreux troubles nerveux**

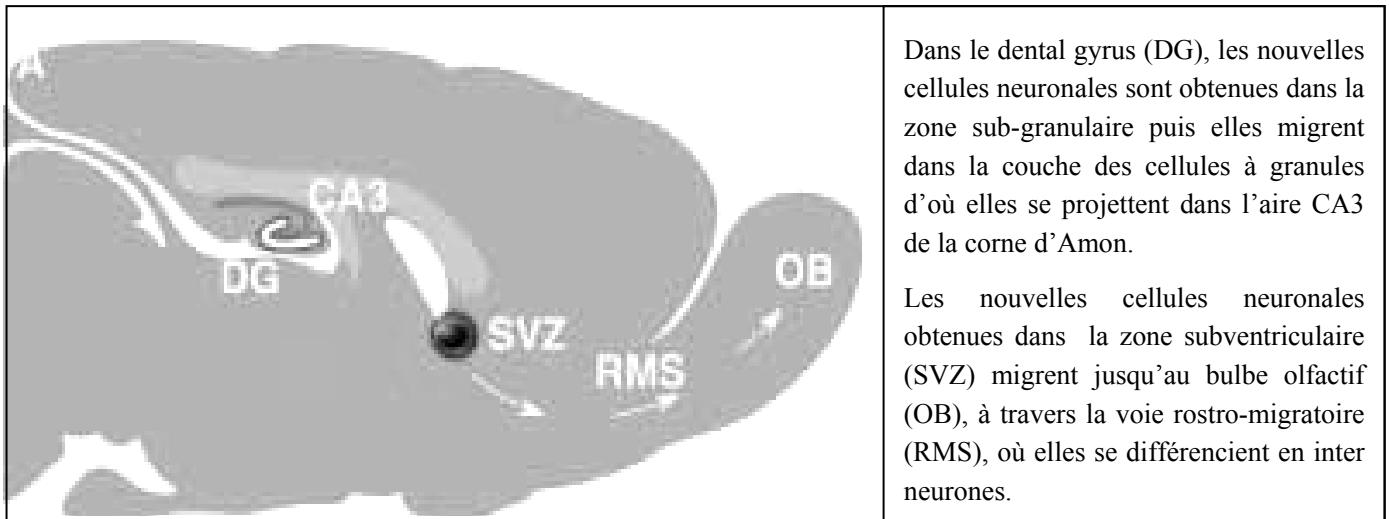
Il existe depuis toujours un **dogme** selon lequel le cerveau **ne peut pas se renouveler** par lui-même et que le nombre de neurones est décroissant tout au long de la vie de l'individu.

Mais dans les années 1960, des études sur des rongeurs, utilisant l'autoradiographie à la 3H-thymidine ont rapporté qu'il y avait une **neurogenèse** dans certaines zones du cerveau adulte de mammifères (ALTMAN, 1963 ; ALTMAN, 1969 ; ALTMAN et DAS, 1965). Des études dans les années 1970 et 1980, ont confirmé qu'il y avait de la neurogenèse au niveau de l'**hippocampe** et de la **zone subventriculaire** du ventricule latéral (*subventricular zone* ou **SVZ**) chez des rongeurs (BAYER, 1982 ; KAPLAN et HINDS, 1977). La neurogenèse a tout d'abord été considérée comme infime chez les rongeurs et impossible dans le cerveau des primates. Mais dans les années 1990, avec l'arrivée de nouvelles méthodes de marquage comme le marquage rétroviral ou le marquage par le BrdU, les chercheurs ont découvert que la **neurogenèse** avait bien lieu dans le cerveau des **primates adultes** et de l'Homme (KUHN *et al.*, 1996 ; LUSKIN, 1993 ; SEKI et ARAI, 1993).

### **1) La neurogenèse a bien lieu dans le cerveau des mammifères adultes**

La neurogenèse survient en premier lieu dans deux zones du cerveau : le gyrus dental (*dental gyrus* ou **DG**) de l'hippocampe et la **SVZ** (TAUPIN, 2006b). Dans le DG, les nouvelles cellules neuronales sont obtenues au niveau de la **zone sub-granulaire** (*subgranular zone* ou **SGZ**) puis elles migrent dans la couche des cellules à granules d'où elles se projettent dans l'aire CA3 de la corne d'Amon. Les nouvelles cellules neuronales obtenues dans la SVZ migrent jusqu'au bulbe olfactif (*olfactory bulb* ou **OB**), à travers la voie rostro-migratoire (*rostro-migratory stream* ou **RMS**), où elles se différencient en inter neurones (Figure 45).

**Figure 45 : Illustration de la neurogenèse dans le cerveau adulte des mammifères  
(d'après TAUPIN, 2006b)**



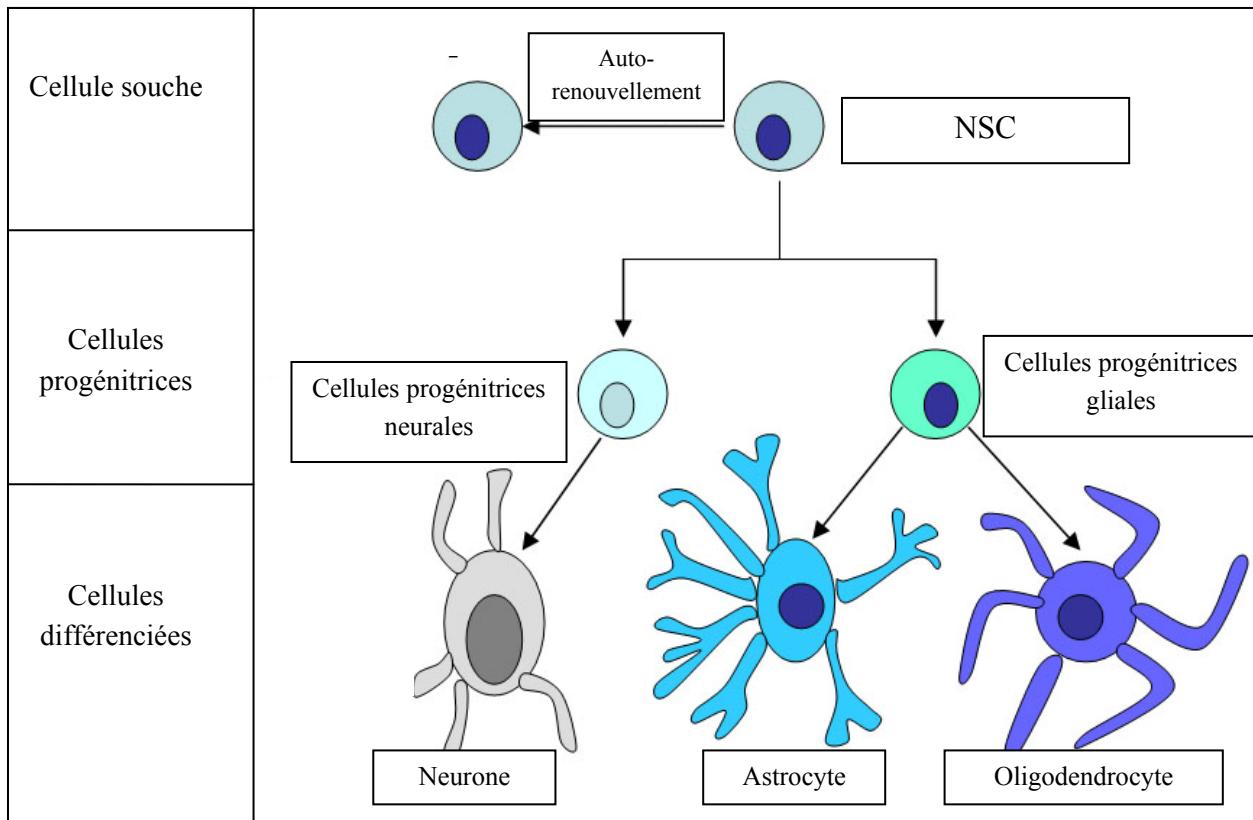
La SVZ et la SGZ sont les deux régions responsables de la majorité de la neurogenèse dans le cerveau adulte, et la SVZ est celle où la neurogenèse est la plus importante (LI et XIE, 2005 ; TARNOWSKI et SIERON, 2006). Il est estimé que 9000 nouvelles cellules neuronales sont créées par jour dans le DG des rongeurs, contribuant ainsi au renouvellement de 3,3% des cellules granuleuses par mois.

La neurogenèse a été rapportée comme survenant dans d'autres zones du cerveau mais à un niveau beaucoup plus faible, comme dans l'aire CA1, le corps strié et le 3<sup>ème</sup> ventricule chez les rongeurs, ainsi que dans le néo cortex chez les primates non humains (TAUPIN, 2006b).

## 2) Des cellules souches et précurseurs neuraux résident dans le système nerveux central des mammifères adultes

Il existe une hypothèse selon laquelle les nouvelles cellules nerveuses sont obtenues à partir de **cellules souches neurales** (*neural stem cells* ou **NSCs**) dans le cerveau adulte. Ces NSCs ont été démontrées comme étant **multipotentes** puisque les trois grands phénotypes de cellules nerveuses à savoir les **neurones**, les **astrocytes** et les **oligodendrocytes** peuvent être générés à partir d'une seule NSC (Figure 46) (TAUPIN, 2006b). Ces cellules sont également capables d'**auto-renouvellement**.

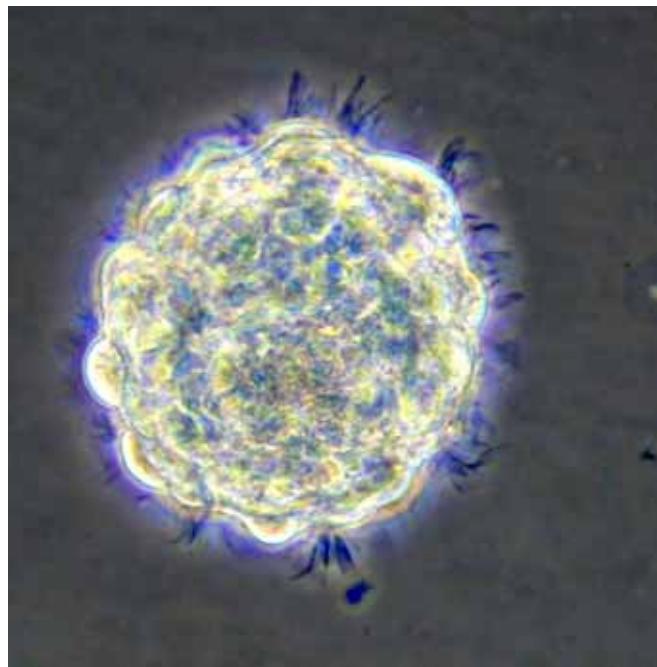
**Figure 46 : Différenciations des NSCs**



Il existe deux types de cellules dérivées des NSCs : les **cellules progénitrices neurales** (*neural progenitor cells* ou **NPCs**) et les **cellules progénitrices gliales** (*glial progenitor cells* ou **GPCs**) qui sont des cellules indifférenciées avec une capacité de prolifération limitée et une incapacité à s'auto-renouveler (TAUPIN, 2006b).

REYNOLD et WEISS (1992) ont effectué le premier isolement et la première caractérisation des NSCs in vitro. Ces chercheurs ont isolé, depuis l'aire striée contenant la **SVZ** du cerveau de souris adultes, une population de cellules indifférenciées exprimant la Nestine et se différenciant en neurones, en astrocytes et en oligodendrocytes. Les cellules ainsi isolées se développent sous la forme de **neurospères** (Figure 47) in vitro dans un milieu contenant de l'EGF. La Nestine est un filament intermédiaire qui a été défini comme le marqueur des cellules souches neuro-épithéliales et des cellules du système nerveux central durant le développement embryonnaire. Les cellules souches formant ces neurospères expriment aussi de nombreux autres marqueurs comme LEX/SSEA-1, AC133 et NG2 (TARNOWSKI et SIERON, 2006).

**Figure 47 : Neuroosphère humaine (d'après TARASENKO *et al.*, 2004)**



GAGE *et al.* (1995) ont isolé et caractérisé *in vitro* une population de cellules ayant des propriétés similaires dans l'**hippocampe** de cerveau de rats adultes. Les cellules isolées ont été cultivées en monocouches en présence de FGF-2. D'autres études *in vitro* ont démontré que cette population de cellules contenait des **NSCs** multipotentes capables d'auto-renouvellement (TAUPIN, 2006b).

Depuis ces études, de nombreuses NSCs ont été isolées dans le cerveau adulte mais aussi dans des zones comme la **moelle épinière** chez de nombreuses espèces y compris l'Homme (LI et XIE, 2005 ; TAUPIN, 2006b). Elles sont à l'origine à la fois des **neurones** et à la fois des **cellules gliales** (STEINDLER, 2007).

Il y a à l'heure actuelle 3 théories pour l'origine des cellules souches potentielles dans le cerveau de souris adultes (TAUPIN, 2006b).

La première théorie repose sur le fait que les nouvelles cellules neuronales proviennent de **cellules épendymaires** exprimant la Nestine dans la SVZ. En effet, il semblerait que les cellules ciliées de l'épendyme soient multipotentes et capables d'auto-renouvellement *in vitro*. Une origine épendymaire des nouvelles cellules neuronales a été rapportée plus récemment au niveau du 3<sup>ème</sup> ventricule dans le cerveau des rongeurs adultes.

La deuxième théorie identifie les cellules à l'origine des nouvelles cellules neuronales comme des **cellules astrocyte-like** exprimant la protéine fibrillaire gliale (*glial fibrillary acidic protein* ou GFAP) dans le SVZ et la SGZ.

La troisième théorie identifie les NSCs comme des cellules n'exprimant **pas la GFAP**.

Jusqu'à présent, le fait que les cellules épendymaires soient des NSCs n'est toujours pas confirmé aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* (TAUPIN, 2006b). Par contre, l'origine gliale des NSCs a reçu plus de support même si de nombreuses recherches penchent pour une existence de NSCs GFAP-négatives (TAUPIN, 2006b).

On retient donc que les **NSCs astrocyte-like GFAP+** sont les candidates les plus probables pour la neurogenèse dans le cerveau adulte que ce soit dans la SVZ ou la SGZ (LI et XIE, 2005). Ces cellules sont également retrouvées sous le nom de cellules souches astrocytaires multipotentes (*multipotent astrocytic stem cells* ou **MASCs**) (STEINDLER, 2007).

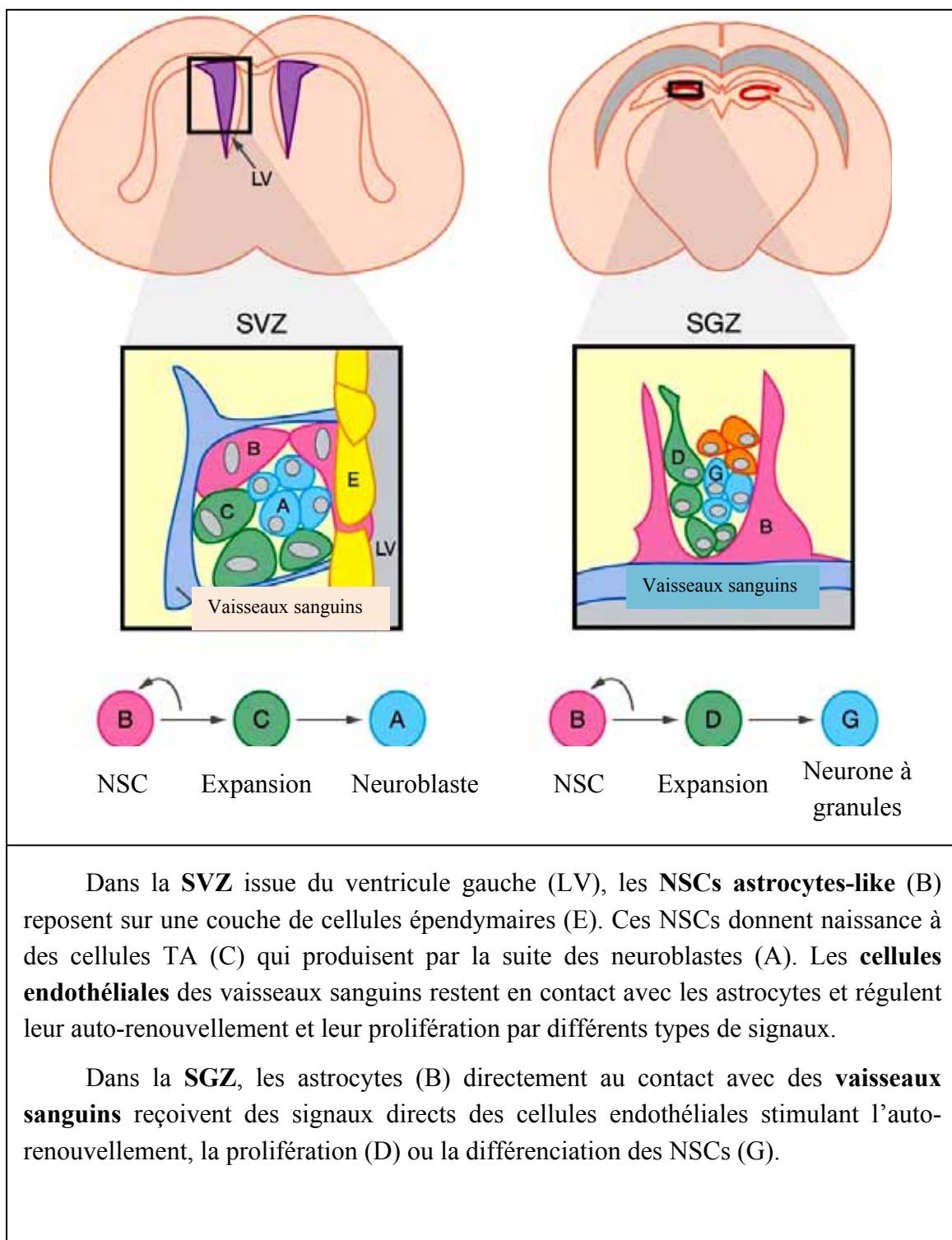
Dans la **SVZ** issue du ventricule gauche (*left ventricular* ou LV) (Figure 48), les **NSCs astrocytes-like** reposent sur une couche de cellules épendymaires. Ces NSCs donnent naissance à des cellules TA qui produisent par la suite des neuroblastes principalement. Ces cellules TA sont également nommées cellules de type C ; et se situent bien au niveau de la SVZ (TARNOWSKI et SIERON, 2006). Ces cellules sont immatures, prolifèrent très rapidement et n'expriment pas de caractéristiques ni des neuroblastes ni des cellules gliales. Certains auteurs rapportent en plus que ces cellules sont plus que des cellules progénitrices puisqu'elles conservent certaines propriétés des cellules souches (TARNOWSKI et SIERON, 2006). Les **cellules endothéliales** des vaisseaux sanguins restent en contact avec les astrocytes et régulent leur auto-renouvellement et leur prolifération par différents types de signaux.

Dans la **SGZ** (Figure 48), les NSCs astrocytes-like reposent directement au contact des **vaisseaux sanguins** et reçoivent des signaux directs des cellules endothéliales afin de stimuler leur auto-renouvellement, leur prolifération ou leur différenciation. Elles sont à l'origine principalement des neurones à granules.

Dans ces deux niches, les **cellules endothéliales** formant les vaisseaux sanguins, les **fibroblastes**, les **macrophages** et la **lame basale spécifique** faite de collagène de type 1 sont des composants **essentiels** de la niche des NSCs (MIMEAULT et BATRA, 2006). Ces cellules endothéliales donnent un **soutien** et un attachement aux NSCs de la SVZ et de la SGZ et génèrent de multiples **signaux** qui contrôlent l'auto-renouvellement et la différenciation de ces cellules. Ces signaux sont BMP, NOGGIN, FGF, IGF, VEGF, TGF $\alpha$  et BDNF (*brain derived neurotrophic factor*) (LI et XIE, 2005). BMP favorise la différenciation en lignage astrocytaire en inhibant le lignage neuronale. A l'inverse, NOGGIN inhibe le signal BMP et favorise donc la neurogenèse. Une jonction adhérente composée de  $\beta$ -caténines et de cadhérines joue aussi un rôle dans le maintien des cellules souches (LI et XIE, 2005). La surexpression des  $\beta$ -caténines entraîne l'expansion des cellules souches ; cela a priori par la voie WNT. Les facteurs EGF et FGF sont capables de stimuler l'expansion des NSCs *in vitro*, de même que les voies NOTCH et PTEN/PI3K. Les NSCs répondent également à l'activation de SHH en proliférant (MIMEAULT et BATRA, 2006).

Il semblerait enfin que les astrocytes et les cellules épendymaires forment des canaux spécifiques de migration nommés **tubes gliaux** (TARNOWSKI et SIERON, 2006). Dans ces tubes, les astrocytes apportent un support trophique aux cellules en migration et permettent un isolement de ces cellules par rapport aux signaux chimiques et électriques du parenchyme environnant.

**Figure 48 : Illustration de la niche des NSCs (d'après LI et XIE, 2005)**



### **3) Les conditions de la neurogenèse dans le système nerveux central**

La neurogenèse dans le DG et le bulbe olfactif du cerveau adulte est modulée par de nombreux **stimuli environnementaux** et selon des **conditions physiopathologiques** (TAUPIN, 2006b).

En ce qui concerne l'environnement, de nombreuses formes d'exercice comme la course volontaire, la course forcée et la nage ont été rapportées comme augmentant la neurogenèse dans l'hippocampe des rongeurs. Cette neurogenèse est dépendante du rythme circadien vu qu'elle ne survient que lorsque les rongeurs ont accès à une roue durant la nuit, période normale de leur activité.

L'isolement social, l'alcoolisme, le stress et le manque de sommeil diminuent la neurogenèse. Le taux de renouvellement dans le DG et la SVZ décroît également avec l'âge, aussi bien chez des animaux de laboratoires que chez des animaux vivants en liberté.

Il y a également des preuves sur le fait que la neurogenèse survient aussi dans les processus de mémoire et d'apprentissage chez l'adulte ; mais la contribution des nouvelles cellules formées à ces mécanismes n'est pas encore bien déterminée (TAUPIN, 2006b).

Dans des conditions pathologiques, comme les maladies neurologiques et les traumatismes du cerveau, la neurogenèse est augmentée dans le DG et la SVZ et de nouvelles cellules neurales ont été retrouvées au niveau des sites de la lésion (TAUPIN, 2006b). Il est rapporté que 0,2% des cellules nerveuses dégénérées au niveau des sites de la lésion sont remplacées au niveau du corps strié après l'occlusion expérimentale d'une artère moyenne chez des rongeurs. Des marquages cellulaires ont montré que les nouvelles cellules formées proviennent de la SVZ et migrent jusqu'aux sites de la lésion en partie par la voie rostro-migratoire.

### **4) Utilisation des NSCs dans le traitement des maladies nerveuses**

La thérapie par les cellules souches du système nerveux central passe par la stimulation *in vivo* et la transplantation (TAUPIN, 2006b). L'avantage de la greffe des NSCs est qu'elle peut se faire selon un mode **autologue** à la différence d'autres cellules (TAUPIN, 2006a).

La **stimulation de la neurogenèse *in vivo***, par l'apport de facteurs de croissance et de cytokines tels que G-SCF et SCF, constitue une nouvelle stratégie prometteuse pour restaurer les fonctions défectueuses dans les zones du cerveau endommagées, après par exemple une ischémie, des convulsions, un traumatisme ou après une maladie dégénérative (MIMEAULT et BATRA, 2006). Ainsi, il a été rapporté que l'injection intraventriculaire de FGF et d'EGF stimule le recrutement des cellules progénitrices neuronales et permet une régénération massive des neurones pyramidaux de l'hippocampe après une lésion d'ischémie chez des rats WISTAR (NAKATOMI *et al.*, 2002). De même, l'**injection de NSCs** ou de cellules progénitrices directement dans des régions du cerveau pourraient représenter une stratégie attractive dans le traitement des maladies neurologiques, comme l'épilepsie, ou dans certains troubles neuro-dégénératifs comme les maladies

de Huntington, de Parkinson et d'Alzheimer ainsi que dans les lésions de la moelle épinière (MIMEAULT et BATRA, 2006).

Préserver les oligodendrocytes et donc la myéline pourrait résulter en une amélioration significative de l'issue d'un traumatisme de la moelle épinière, étant donné que la cause majeure des lésions neurologiques, dans de tels cas, est la **mort des oligodendrocytes** (MIMEAULT et BATRA, 2006). Il a ainsi été rapporté que l'ajout de facteurs permettant la genèse d'oligodendrocytes tels que SHH, FGF et PDGF, entraîne une différenciation des NSCs en **cellules progénitrices d'oligodendrocytes** (*oligodendrocyte progenitor cells* ou **OPCs**) *in vitro*. Malheureusement le taux de différenciation ne serait que de l'ordre de 10%. Selon certaines études, la transplantation de ces OPCs en association au facteur SHH chez des rats adultes après un traumatisme de la moelle épinière, pourrait conduire à une amélioration de leur fonctionnement nerveux (BAMBAKIDIS et MILLER , 2004).

Il est possible de **modifier génétiquement** les NSCs avant de les réimplanter : on peut ainsi orienter la différenciation des NSCs vers un type cellulaire en particulier (ASAHARA *et al.*, 2000). On peut également modifier les cellules souches pour leur faire exprimer des protéines ou des enzymes manquantes : on utilise pour cela des **vecteurs** associés à des adénovirus. Ainsi des NSCs ont été génétiquement modifiées pour exprimer le facteur de croissance nerveuse (*nerve growth factor* ou NGF) et ainsi limiter les conséquences de la mort des neurones de l'aire striée chez des rats adultes après une ischémie focale (ASAHARA *et al.*, 2000).

Il a récemment été montré que les cellules souches neurales et les cellules progénitrices neurales résistent bien **après le décès** de l'organisme : on pourrait donc utiliser des cerveaux de cadavres d'hommes ou de souris pour récupérer ces cellules souches (STEINDLER, 2007).

La présence de NSCs ouvre les portes à la régénération du système nerveux central. Cette découverte est capitale en médecine humaine étant donné l'importance des maladies neurologiques. En médecine vétérinaire, ces NSCs seraient surtout extrêmement intéressantes dans la régénération de la moelle épinière après des traumatismes étant donné la prépondérance de ces affections.

## **D. Des cellules souches dans le tissu adipeux : une découverte majeure**

### **1) Nature de ces cellules souches**

Récemment, les chercheurs se sont intéressés aux cellules souches stromales du tissu adipeux. En effet, ce tissu est **abondant, faciles d'accès** et considéré comme une potentielle source de cellules pour des transplantations **autologues**.

Il y a effectivement des cellules souches dans le tissu adipeux qui sont équivalentes à des MSCs comme celles que l'on retrouve dans la moelle osseuse mais qui prennent le nom de **cellules stromales dérivées du tissu adipeux** (*adipose tissue-derived stromal cells* ou **ADSCs**) (NAKAGAMI *et al.*, 2006).

De nombreux groupes d'étude ont démontré que les cellules mésenchymateuses au niveau du stroma vasculaire du tissu adipeux sous cutané étaient **multipotentes**. Ces cellules sont des ADSCs mais leur nomenclature est encore très mal définie et il n'y a pas encore de consensus quand à leur définition (NAKAGAMI *et al.*, 2006).

Les **ADSCs** ont beaucoup de **similitudes** avec les **MSCs** de la moelle osseuse. Les deux types de cellules sont isolées d'une fraction de cellules stromales obtenue à partir d'un amas adipeux : le tissu sous cutané pour les ADSCs et la moelle osseuse pour les MSCs. Cet isolement est possible dans les deux cas, par leur **adhérence au plastique** en culture in vitro (NAKAGAMI *et al.*, 2006). L'identification de leurs marqueurs n'en est qu'à son début. Selon NAKAGAMI *et al.* (2006), ces cellules expriment **SCA-1** et **CD44** mais pas les marqueurs KIT, CD11b, CD31, CD34 ou CD45 ; ceci pour des ADSCs de souris. Ces marqueurs sont conservés après de nombreuses divisions cellulaires en culture. Au microscope, ces cellules **ressemblent à des fibroblastes** et peuvent se **différencier** non seulement en **adipocytes** mais aussi en **lignées ostéoblastiques** et **chondroblastiques** in vitro.

Comme il est bien connu le tissu adipeux sécrète un grand nombre de cytokines, NAKAGAMI *et al.* (2006) se sont intéressés à la sécrétion de cytokines reliées à l'**angiogenèse** par les ADSCs. Selon une étude par PCR (*polymerase chain reaction*), ils ont découvert qu'elles exprimaient HGF, VEGF, PGF, TGF $\beta$ , FGF, ANG-1 et ANG-2. Il a de plus été montré qu'elles exprimaient des facteurs angiogéniques comme le **VEGF** et le **HGF** à des niveaux les rendant bioactives. Ils se trouvent que de nombreux gènes exprimés par les ADSCs ont des similitudes avec ceux des MSCs de la moelle osseuse.

Un groupe d'étude a identifié chez l'Homme une sous population au sein des ADSCs exprimant 3 marqueurs de cellules souches : **CD34**, **CD133** et **ABCG2** ; et il a montré que 90% des ADSCs étaient positives pour CD34 (PLANAT-BENARD *et al.*, 2004). Cela signifie que certaines ADSCs fraîchement isolées sont positives pour les marqueurs des **lignages hématopoïétique** et **endothélial** (CD45, CD14, CD144, CD34) et **décroissent très rapidement** après 3 à 5 jours en culture.

## 2) Intérêts thérapeutiques

L'**angiogenèse thérapeutique**, une stratégie pour traiter l'ischémie tissulaire en stimulant la prolifération des vaisseaux collatéraux, est considérée comme la thérapie la plus prometteuse jusqu'à présent. Récemment, la transplantation autologue de BMSCs et de EPCs a entraîné une stimulation de l'angiogenèse et une augmentation du flux sanguin périphérique ; et ces cellules se sont retrouvées greffées au niveau des sites d'ischémie dans la jambe, la rétine et le myocarde (RAFII et LYDEN, 2003).

NAKAGAMI *et al.* (2006) ont créé un modèle d'ischémie de la jambe chez des souris et ont évalué l'effet thérapeutique d'une **injection d'ADSCs** comparé à une injection de moelle osseuse. Ils n'ont trouvé aucune différence entre les deux types de cellules et dans les deux cas, il y a eu **augmentation du flux sanguin**.

Comme on l'a dit auparavant, il y aurait **deux populations** de ADSCs : celles de type **hématopoïétique** et celles de type **mésenchymateux**. Il semble que ces deux types de cellules peuvent restaurer le flux sanguin après une ischémie mais par des mécanismes différents. Celles de type hématopoïétique se différencient en **cellules endothéliales** et participent ainsi à la néoangiogenèse ; alors que celles de type mésenchymateux **stimulent** l'expression des cytokines favorisant l'angiogenèse.

De récents rapports ont également montré que les ADSCs avaient la capacité de se différencier en **myocytes cardiaques**, tout comme les cellules de la moelle osseuse, ce qui pourrait être une excellente thérapie cellulaire pour les insuffisances cardiaques (NAKAGAMI *et al.*, 2006).

Un des **avantages** les plus importants des **ADSCs** est qu'elles peuvent être **facilement prélevées** chez un patient par une méthode simple et très peu invasive, et qu'elles sont **très facilement cultivables** ( $1 \times 10^5$  cellules à partir d'une Souris et de 20 mL de lipoaspiration chez un Homme) (NAKAGAMI *et al.*, 2006). De plus les ADSCs **prolifèrent plus rapidement** en culture que les cellules de la moelle osseuse (multiplication par 10 en 1 semaine) et au long-terme, les ADSCs **conservent leur multipotentialité** avec l'expression de SCA-1 et CD44.

Il semblerait également que les ADSCs soient capables de se différencier en **neurones** (TAUPIN, 2006a). Cela permettrait leur utilisation pour le traitement des maladies du système nerveux central.

Les **vétérinaires** utilisent les ADSCs autologues depuis **2003** pour traiter les lésions tendineuses et ligamentaires ainsi que les lésions articulaires chez les **chevaux** (GINGERICH *et al.*, 2007). Sur un modèle équin de tendinite, DAHLGREN *et al.* (2006) et BLACK *et al.* (2007) ont mis en évidence leurs effets bénéfiques. Ces cellules ont également été testées sur d'autres espèces, comme le lapin et la chèvre, pour leurs effets bénéfiques sur les lésions tendineuses et ligamentaires ainsi que sur les lésions articulaires (GINGERICH *et al.*, 2007).

Chez le **Chien**, ces ADSCs sont en voie d'être utilisées dans le traitement des **maladies dégénératives chroniques de l'articulation coxo-fémorale** (GINGERICH *et al.*, 2007). Les MSCs de la moelle osseuse, tout comme les ADSCs, ont la capacité de se différencier en ostéocytes, en chondrocytes et en adipocytes. Cependant les ADSCs sont beaucoup plus avantageuses **surtout chez les animaux**. En effet, l'accès facile et répétable au tissu adipeux sous cutané, la procédure d'isolement facile, et le nombre très important d'ADSCs dans le tissu adipeux en font des candidates très avantageuses. Pour les isoler du tissu adipeux, ils ont utilisé une digestion par des collagénases puis une centrifugation. Les amas obtenus sont remis en suspension et utilisés en l'état pour les traitements. Ces amas contiennent un mélange de fibroblastes, de péricytes, de cellules endothéliales, de cellules sanguines circulantes et d'ADSCs.

L'**arthrose** est la première cause de douleur chronique chez le Chien avec plus de 20% de la population canine soit 10 à 12 millions de chiens atteints aux Etats-Unis (GINGERICH *et al.*, 2007). Cette pathologie est caractérisée par la dégénération du cartilage articulaire avec une perte de la matrice, une fibrillation du cartilage et une formation de fissures dans le cartilage. Les chondrocytes

supportent l'homéostasie de la matrice extra-cellulaire via la sécrétion de nombreux composants comme le collagène, les glycosaminoglycans et l'acide hyaluronique. Dans l'arthrose, il y a une surproduction de médiateurs pro-inflammatoires entraînant une augmentation du catabolisme du cartilage et donc sa destruction.

Les traitements médicaux courants ne permettent pas un soulagement complet de la douleur. A la différence de ces traitements, la thérapie cellulaire ne se base pas que sur une cible, comme un récepteur ou une voie de signalisation. Les ADSCs fonctionnent de manière **trophique** en sécrétant des cytokines et des facteurs de croissance, en recrutant des cellules endogènes vers le site de la lésion et en se **différenciant** en cellules résidentes (GINGERICH *et al.*, 2007). Dans l'étude de GINGERICH *et al.* (2007), ces chercheurs ont traités 18 chiens par injection intra-articulaire d'ADSCs et ont obtenu une amélioration clinique constatée par les vétérinaires traitants et par les propriétaires.

Les cellules souches du tissu adipeux représentent une optique de thérapie extrêmement intéressante chez les **animaux** puisque leur prélèvement est facile, qu'elles croissent bien en culture et qu'elles sont multipotentes. Ainsi, un des problèmes majeurs en médecine vétérinaire qu'est le **coût du traitement**, serait moindre avec ces cellules souches plutôt qu'avec d'autres cellules comme celles de la moelle osseuse ou du cœur.

## **E. L'utilisation des cellules souches dans le traitement du diabète : de nouvelles avancées technologiques**

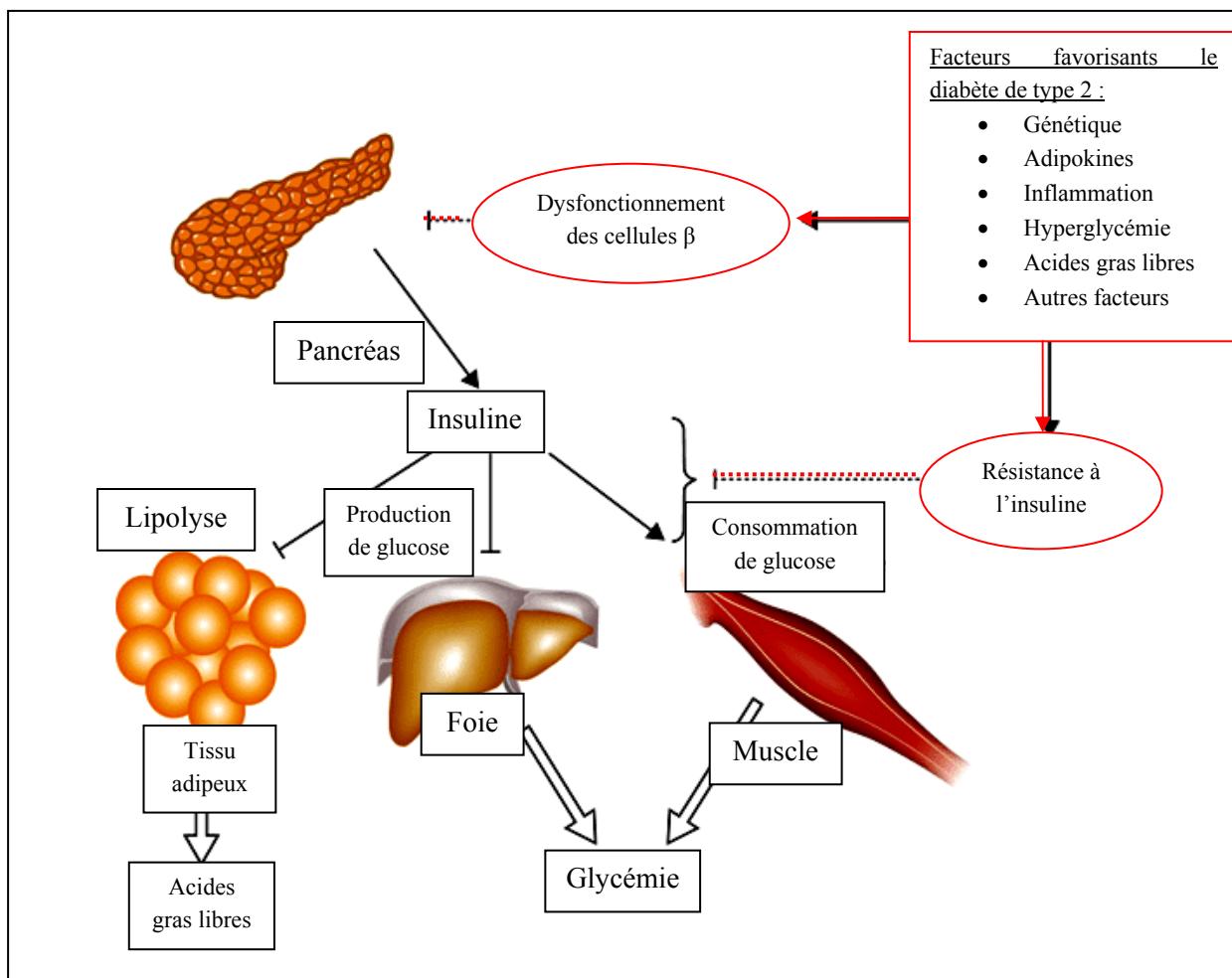
### **1) Le diabète : une maladie importante touchant aussi bien l'Homme que l'animal**

Le pancréas comprend une partie **exocrine** et **endocrine**. La partie exocrine est composée d'acini, produisant les enzymes digestives et de canaux sécréteurs, permettant le passage des enzymes jusque dans le duodénum. Le tissu endocrine (**îlots de Langerhans**) est quant à lui constitué de quatre types de cellules : les cellules  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  et PP. Ces cellules produisent respectivement le glucagon, l'insuline, la somatostatine et le polypeptide pancréatique (ZHANG *et al.*, 2005).

En l'an 2000, 150 millions de personnes étaient déclarées diabétiques et ce nombre devrait doubler en 2025 (SANTANA *et al.*, 2006). Il existe chez l'Homme deux types de diabète : le **diabète de type 1** causé par une destruction auto-immune des cellules  $\beta$  productrices d'insuline et le **diabète de type 2** présentant des étiologies beaucoup plus complexes (Figure 49). Le diabète de type 2 affecte 95% des diabétiques : il touche le plus souvent de personnes adultes et il est souvent associé à des prédispositions génétiques. Mais on le retrouve également associé avec l'obésité souvent due à une alimentation déséquilibrée et à un mode de vie sédentaire. La maladie progresse dans le sens d'une résistance à l'insuline vers une intolérance au glucose et une destruction des cellules  $\beta$  par

apoptose. A l'opposé du diabète de type 1 qui présente une évolution rapide et mortelle malgré le traitement, le diabète de type 2 peut voir son évolution retardée par des médicaments et un régime adapté.

**Figure 49 : Physiopathologie de l'hyperglycémie et de l'augmentation des acides gras dans les diabètes de type 2 chez l'Homme (d'après STUMVOLL *et al.*, 2005)**



Les **carnivores domestiques**, que ce soit le Chat ou le Chien, sont touchés par les diabètes. En effet il existe chez l'animal deux types de diabètes : le diabète primaire et le diabète secondaire.

Dans le diabète  **primaire** chez le **Chien**, on retrouve des **diabètes insulino-dépendants vrais** chez certaines races prédisposées comme le Spitz Loup, le Labrador retriever ou le Golden retriever. Les diabètes de l'adulte sont des **diabètes forcément insulino-nécessitants**.

Chez le **Chat**, il n'y a quasiment pas de diabètes juvéniles et les diabètes chez l'adulte sont **forcément insulino-nécessitants** et multifactoriels.

Les diabètes **secondaires** sont dus soit à une absence de sécrétion d'insuline soit à une absence de signal insulinaire. On retrouve ainsi, chez le Chien comme chez le Chat, les atteintes

pancréatiques **inflammatoires** ou **tumorales** induisant une **absence** de production d'insuline. Les facteurs comme les corticoïdes, les progestagènes, le syndrome de Cushing, le post-œstrus et enfin l'obésité chez le Chien; et les corticoïdes, l'acétate de mégestrol, l'acromégalie, le syndrome de Cushing et enfin l'obésité chez le Chat, induisent un défaut de signal insulinique.

Que ce soit chez l'Homme ou chez l'animal, les **conséquences** sont les mêmes : instauration d'un état d'**hyperglycémie** chronique entraînant de nombreux symptômes et des complications pouvant être gravissimes comme des rétinopathies, des hypoglycémies, des maladies cardio-vasculaires.

Le **traitement** du diabète, à savoir l'injection d'**insuline**, consiste à diminuer la glycémie dans des valeurs normales chez l'Homme et dans des valeurs permettant la disparition des signes cliniques chez l'animal. Il s'agit d'un traitement **à vie**, extrêmement contraignant et de nombreuses rechutes sont possibles.

La recherche d'autres thérapies est à l'heure actuelle en pleine expansion. Chez l'Homme, des **transplantations de pancréas entier** sont effectuées mais la technique doit encore faire face à de nombreux problèmes comme le rejet, l'ischémie du greffon et l'activation des enzymes du pancréas exocrine *in situ* (SANTANA *et al.*, 2006). La **transplantation d'ilots de Langerhans** permet d'outrepasser certains effets indésirables mais il reste encore le problème de l'effet diabétogène de certains médicaments immunosuppresseurs, de l'adéquation du traitement immunosuppressif et du manque cruel de donneurs (ZULEWSKI, 2006).

L'utilisation des cellules souches dans ce domaine prend alors un grand intérêt. Pour le diabète, la cellule souche doit être capable de sécréter de l'insuline mais aussi être capable d'exprimer tout un groupe de protéines fonctionnelles nécessaires pour mimer le plus fidèlement possible les **cellules  $\beta$** . Ce groupe de protéines comprend tout le système de sensibilité au glucose, l'appareil d'exocytose et la voie de synthèse de l'insuline. La sensibilité des cellules au glucose permet de détecter les variations du taux de glucose extra-cellulaire et ainsi d'adapter la production d'insuline.

## 2) Les cellules souches du pancréas

### a) Nature de ces cellules

Afin de remplacer les cellules  $\beta$ , il a d'abord été logique de rechercher la présence de cellules souches dans le pancréas. Ainsi certaines études sur des modèles animaux ont permis de montrer la création de nouveaux îlots par prolifération de **l'épithélium des canaux pancréatiques** que ce soit après ligature partielle du canal pancréatique (WANG *et al.*, 1995), pancréatectomie partielle (PLACHOT *et al.*, 2001), ou encore après destruction des cellules  $\beta$  par la streptozotocine (STZ) (FERNANDES *et al.*, 1997).

Dans cette optique, de nombreux mécanismes ont été proposés : la genèse à partir de cellules souches des canaux ou des îlots, la division des cellules  $\beta$  préexistantes et la transdifférenciation de

cellules du pancréas exocrine. Il existe un pool de cellules  $\beta$  préexistante, mais il semble peu probable que la production d'insuline soit uniquement permise par un nombre défini de cellules  $\beta$  à la naissance. L'identification de ce pool est un domaine très actif de la recherche chez l'Homme.

Certaines études indiquent l'**épithélium des canaux pancréatiques** comme une **niche** potentielle de cellules souches puisque une structure en îlots a été obtenue in vitro, à partir de ces cellules, à la fois chez l'Homme et chez l'animal (SANTANA *et al.*, 2006). Des cellules précurseurs des canaux pancréatiques résideraient dans cette niche dans laquelle elles se différencieraient puis migreraient pour former de nouveaux îlots. Cela est encore corroboré par le fait que des cellules des canaux pancréatiques chez l'Homme se différencient en cellules endocrines et que chez la Souris, une culture de cellules des canaux pancréatiques a permis la création d'îlots fonctionnels contenant des cellules  $\alpha$ ,  $\beta$ , et  $\delta$  (ZHANG *et al.*, 2005). Il semblerait que ces cellules expriment le **CK19** qui est le marqueur des **cellules des canaux différenciées**, l'**insuline** et la **Nestine**; et durant leur différenciation, elles exprimeraient PDX-1 qui est normalement exprimé uniquement au niveau des cellules  $\beta$  et  $\delta$  chez l'adulte (NOGUSHI, 2007).

Il y a eu ensuite isolement de précurseurs multipotents dérivés du pancréas (*pancreas-derived multipotential precursor cells* ou **PMPs**) (SORIA *et al.*, 2005). Ces cellules peu nombreuses, principalement situées dans les îlots pancréatiques, ont la capacité de proliférer in vitro. Les PMPs expriment des **marqueurs neuronaux** comme la synaptophysine, des marqueurs **pancréatiques** immatures et matures comme le PDX-1, l'insuline, le glucagon, la somatostatine et le polypeptide pancréatique, et des marqueurs hépatiques comme l' $\alpha$ FP. Elles n'expriment pas le CK19 et la Nestine (ZHANG *et al.*, 2005). On les retrouve chez l'Homme et chez le **Chien**. Elles possèdent un potentiel de différenciation très important notamment en cellules  $\alpha$ ,  $\beta$ , et  $\delta$  (SANTANA *et al.*, 2006). Les cellules  $\beta$  créées de novo à partir de ces cellules sont capables de sécréter de l'insuline sous dépendance de la concentration de glucose extra-cellulaire. Ces précurseurs restent quiescents dans le pancréas adultes et sont capables de générer in vitro à la fois des précurseurs neuronaux et pancréatiques selon la condition de culture (SANTANA *et al.*, 2006).

D'autres cellules ont été identifiées dans le pancréas comme étant des cellules souches potentielles. Dans l'étude de ZULEWSKI *et al.* (2001), des cellules **Nestine-positives** résidant dans les îlots pancréatiques chez l'Homme comme chez le rat ont été découvertes; et ont été définies comme des cellules immatures, hormones-négatives, multipotentes et pouvant proliférer de manière extensive in vitro. Elles expriment des marqueurs spécifiques du **foie** ( $\alpha$ FP), des cellules du **pancréas exocrine** (amylase), des **cellules des canaux** (CK19) et des **cellules endocrines** (ISL-1, glucagon, PDX-1) (MIMEAULT et BATRA, 2006).

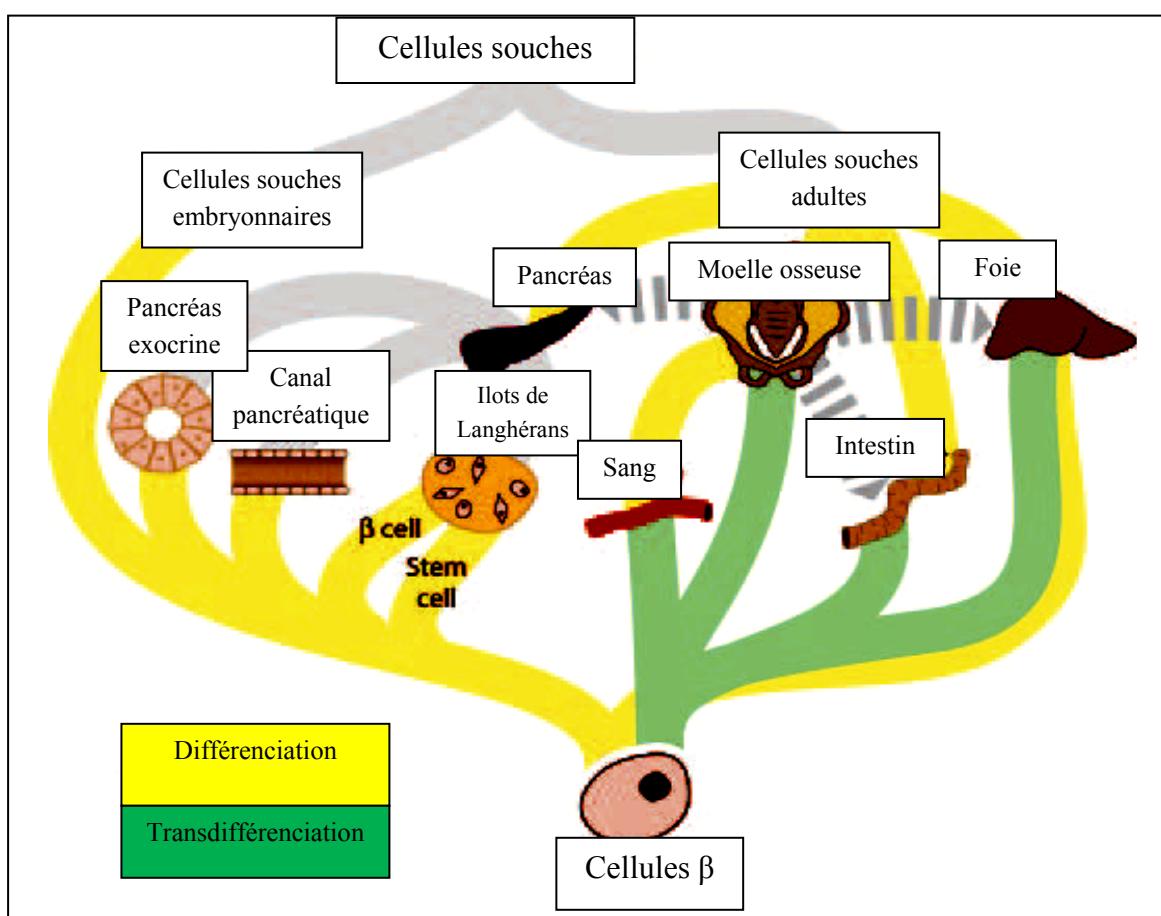
Il semblerait également que certaines cellules du **pancréas exocrine** soient capables de générer des cellules  $\beta$  (SANTANA *et al.*, 2006). Ainsi des cellules des acini peuvent se transdifférencier en cellules sécrétrices d'insuline avec des propriétés de sécrétion similaires aux cellules  $\beta$  natives (NOGUSHI, 2007). Cela a été mis en évidence par l'apparition de cellules transitionnelles exprimant à la fois l'amylase et l'insuline.

Des données récentes indiquent également la présence de cellules **Neurogénine-3 positives** (NGN-3) dans le pancréas adulte et embryonnaires (SORIA *et al.*, 2005). Ce seraient des cellules souches de tissu endocrine.

La question se pose de savoir si des cellules souches **existent vraiment** dans le pancréas : en effet, le renouvellement des cellules  $\beta$  aussi bien dans des conditions physiologiques que pathologiques résultent majoritairement de la **duplication des cellules  $\beta$  préexistantes** (ZHANG *et al.*, 2005). De plus, les chercheurs ont le plus grand mal à isoler des lignages de cellules possiblement souches. Ce domaine est encore en recherche active.

L'utilisation des cellules souches pancréatiques chez l'adulte reste encore **peu importante** car peu caractérisée. Cependant d'autres cellules souches adultes peuvent être utilisées dans le traitement du diabète principalement les cellules de la moelle osseuse, du foie et du tractus gastro-intestinal (Figure 50).

**Figure 50 : Illustration des différents moyens d'obtention de cellules  $\beta$  du pancréas (d'après SORIA *et al.*, 2005)**



### **3) Les cellules souches hépatiques et les cellules souches de l'épithélium intestinal**

Le pancréas, le foie et le tractus gastro-intestinal dérivent **tous de l'endoderme antérieur** et de nombreuses publications montrent que leurs cellules souches respectives sont capables de se différencier en cellules sécrétrices d'insuline (NOGUSHI, 2007).

Des **HOCs** de rat hautement purifiées, capables de se différencier en hépatocytes et en cellules épithéliales des canaux biliaires, peuvent se **développer** en cellules du pancréas endocrine productrices d'hormone quand elles sont cultivées dans un environnement très riche en glucose (YAN *et al.*, 2002 ; ZULEWSKI, 2006). De nombreuses expériences rapportent que la **transduction d'HOCs** par un vecteur adénoviral porteur des facteurs de transcription spécifiques des cellules  $\beta$ , comme PDX-1 ou BETA-2/NEUROD, a entraîné une production d'insuline par ces cellules (SANTANA *et al.*, 2006). Cependant, les vecteurs porteurs de *Pdx-1* induisent une très forte hépatotoxicité non retrouvée avec ceux porteurs de *NeuroD*.

L'induction d'**ISCs** immatures de rat par des facteurs comme PDX-1 et/ou ISL-1 a permis leur **développement** en cellules productrices d'insuline (YOSHIDA *et al.*, 2002). Il a également été montré que le GLP-1-(1-37) induisait une production d'insuline par des ISCs chez un organisme foetal en développement et à moindre importance chez l'adulte *in vitro* et *in vivo* (SUZUKI *et al.*, 2003). Il s'agit sûrement d'un procédé médié par la stimulation de l'expression de *Ngn-3* reliée à *Notch*. Ces cellules souches intestinales adultes sont aussi de bonnes candidates pour de nouvelles approches thérapeutiques du diabète sucré. Cependant, une fois différencierées en cellules  $\beta$ , même si elles expriment de nombreux marqueurs de ces cellules, elles sont **incapables** de sécréter de l'insuline en **s'adaptant à la concentration de glucose sanguin** (SANTANA *et al.*, 2006).

### **4) Les cellules souches de la moelle osseuse**

La capacité des cellules souches de la moelle osseuse à se différencier en cellules  $\beta$  a été mise en évidence par des **transplantations de mâle à femelle** chez la Souris réalisées par LECHNER *et al.* (2004): un petit nombre de cellules sécrétrices d'insuline dans le pancréas de la souris receveuse contenaient le chromosome Y des cellules de la souris donneuse.

Selon les études de IANUS *et al.* (2003) et de ZULEWSKI *et al.* (2006), les cellules souches de la moelle osseuse sont capables de **migrer**, de se **greffer** dans le pancréas et de se **développer** *in vivo* en cellules  $\beta$  compétentes et fonctionnelles sans évidence de fusion cellulaire. Cependant, d'autres études n'ont pas réussi à mettre en évidence une différenciation (NOGUSHI, 2007). Ainsi, bien que les cellules souches dérivées de la moelle osseuse réduisent la glycémie chez des souris diabétiques, il semblerait que leur action soit plus liée au fait qu'elles se **développent en cellules endothéliales** et servent ainsi de **support protecteur** au tissu endogène pancréatique par rapport aux agressions subies (HERZOG *et al.*, 2003; NOGUSHI, 2007; SANTANA *et al.*, 2006). Ainsi, elles font barrière aux agents agressants et diminuent la perte des cellules  $\beta$ . Les cellules  $\beta$  restantes

continuent ainsi à produire de l'insuline et à se diviser pour remplacer les cellules  $\beta$  mortes. Elles contribuent donc indirectement au maintien de la glycémie dans les normes.

Il a également été possible d'observer la migration et le homing d'autres cellules de la moelle osseuse. En effet, des **EPCs** ont migré jusque dans le pancréas chez des souris, en réponse à une lésion pancréatique, et ont stimulé la **néo vascularisation** pour augmenter la survie des cellules  $\beta$  restantes (MATHEWS *et al.*, 2004).

Des **MSCs** chez l'Homme ont été identifiées comme exprimant à faible taux le facteur de transcription des îlots NKX6.1 et ont été capables de se **differencier** en cellules sécrétrices d'insuline après **transduction** par un vecteur adénoviral codant pour les facteurs de transcription IPF-1, HLBX-9 ou FOXA-2 (ZULEWSKI, 2006).

On peut également utiliser des transplantations de cellules souches de la moelle osseuse mais en les prélevant dans la **rate**, organe hématopoïétique au même titre que la moelle osseuse chez les rongeurs. Dans l'étude de KODAMA *et al.* (2003), l'injection simultanée de l'adjuvant de Freud et de cellules de la rate chez des souris NOD (*non obese diabetic*) a permis le renversement de l'auto-immunité anti-ilots et la différenciation des cellules spléniques en cellules sécrétrices d'insuline.

Des cellules souches issues du sang périphérique (**PBSCs**) ont été exposées à l'IL-3 (*interleukin-3*) et au M-CSF (*macrophage-colony stimulating factor*). Elles se sont ensuite **differencierées** en cellules sécrétrices d'insuline par l'addition d'HGF et de nicotinamide (SANTANA *et al.*, 2006). Leur transplantation chez des souris diabétiques a permis un bref retour à une glycémie normale avant leur rejet.

## 5) Les cellules souches du tissus adipeux

D'autres cellules souches comme les **ADSCs** peuvent également être utilisées pour la génération de cellules productrices d'insuline (NOGUSHI, 2007).

ZULEWSKI *et al.* (2006) ont isolé des **ADSCs** de 4 donneurs humains et les ont fait proliférer dans un milieu de culture contenant du FGF. Les ADSCs en prolifération se sont mises à exprimer des marqueurs de cellules souches comme ABCG2, Nestine, SCF, et THY-1 mais aussi à produire des **ARNs messagers de Isl-1**. En utilisant l'immuno-histochimie, ils ont trouvé ISL-1 dans approximativement 10 % des noyaux des ADSCs en culture. Quand ces cellules ont été mises en culture dans un milieu sans sérum, ils ont pu observer une surexpression de IPF-1, ISL-1 et NGN-3 ainsi que la production d'**insuline**, de glucagon et de somatostatine. En parallèle, ils ont observé l'apparition après la différenciation des ADSCs de cellules positives pour le peptide C.

La possibilité d'utiliser les ADSCs dans le traitement du diabète est une découverte **extraordinaire** chez l'Homme mais surtout **chez l'animal**. En effet, comme cela a été dit, les ADSCs sont dans le tissu adipeux, un tissu toujours présent, abondant et facile à prélever ; et ce sont des cellules faciles à manipuler. S'il était possible de les utiliser dans le traitement du diabète, cela

serait une **réelle révolution** par rapport aux traitements actuels qui sont très contraignants chez l'Homme, mais qui le sont encore plus chez le Chat ou le Chien.

## **F. Dernière découverte sur le traitement de la myopathie de Duchenne chez le Chien : un grand espoir pour la médecine humaine**

Dans l'étude de Blot *et al.* (2006), ils ont étudié 10 Golden Retrievers GRMD (*Golden Retriever muscular dystrophy*) et ont découvert que des cellules souches dites **mésoangioblastes** améliorent le fonctionnement musculaire chez ces animaux.

La **myopathie de Duchenne** est une maladie génétique incurable qui limite très sévèrement la mobilité et l'espérance de vie des enfants affectés. Le seul modèle animal qui reproduit spécifiquement les altérations du gène de la Dystrophine et le spectre au complet de la pathologie humaine est le **Golden Retriever GRMD**. Ces chiens ont une absence totale de Dystrophine. La mort survient vers 1 an à la suite d'une défaillance des muscles respiratoires.

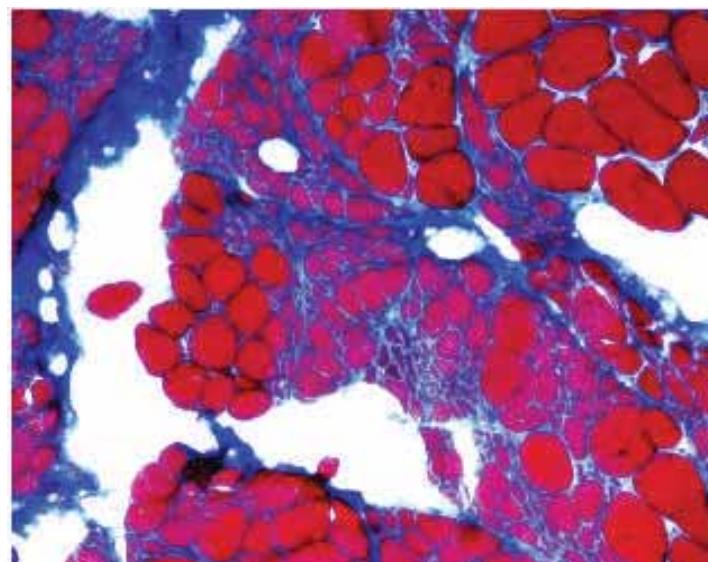
Dans cette étude, les chercheurs ont transplanté chez ces chiens, des mésoangioblastes génétiquement modifiés ou non, associé ou non avec un traitement immunosuppresseur.

Les **mésoangioblastes** sont isolés chez le Chien, à partir de la paroi des vaisseaux sanguins issus de petits fragments de tissu obtenus par biopsie musculaire, par leurs marqueurs **CD44** et **CD13**. Ils sont prélevés sur des chiots de 15 jours. Ces cellules sont très similaires à celles de la Souris, prolifèrent efficacement en culture et montrent un caryotype euploïde de 78 chromosomes. Elles dégénèrent au bout de 25 doublements de population. Ces cellules se **diférencient** en **myofibres multinucléées** quand elles sont cultivées en présence de myoblastes C2C12 de Souris ou quand elles sont transfectées avec le *MyoD*.

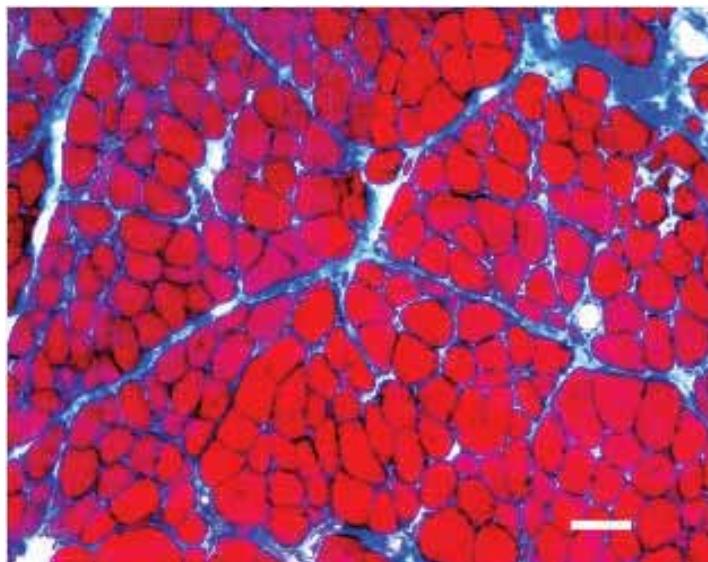
Ils ont alors montré que l'injection intra-artérielle de mésoangioblastes entraînait une **expression de la Dystrophine** et un retour à un fonctionnement et à une morphologie acceptable des fibres musculaires (figure 51 et 52). Sur ces figures on voit très bien l'amélioration de la structure du muscle après le traitement.

Il semblerait que la transplantation hétérologue de mésoangioblastes de phénotype sauvage conduise à de meilleurs résultats que la transplantation autologue de mésoangioblastes génétiquement modifiés.

**Figure 51 : Coupe histologique d'une biopsie de muscle tibial crânial chez un des chiens GRMD (d'après BLOT *et al.*, 2006)**



**Figure 52 : Coupe histologique d'une biopsie du même muscle après traitement avec les mésoangioblastes chez le même chien (d'après BLOT *et al.*, 2006)**



Cette étude permet donc de qualifier le mésoangioblaste comme un **candidat à une future thérapie cellulaire de la myopathie de Duchenne**. C'est là un exemple flagrant et concret de l'efficacité de la thérapie cellulaire et de son avenir chez l'Homme comme chez l'animal (CHAMBERLAIN, 2006).

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les cellules souches chez l'adulte sont des cellules indifférenciées, multipotentes mais plastiques : elles peuvent se différencier en de multiples lignages cellulaires.

Elles sont présentes dans tout organisme adulte et dans la majorité des organes. On les retrouve ainsi dans des tissus en renouvellement rapide: leur présence a alors rapidement été devinée par les chercheurs, identifiée puis utilisée. Ces tissus sont l'épithélium intestinal, l'épiderme et la moelle osseuse. La moelle osseuse a été la première identifiée comme source de cellules souches et la première étudiée puis utilisée dans le traitement de maladies sanguines aussi bien chez l'Homme que chez l'animal. C'est avec la moelle osseuse que les chercheurs ont concrètement appliqué la notion de cellule souche et de thérapie cellulaire.

Les cellules souches adultes ont ensuite été découvertes dans d'autres tissus en renouvellement comme l'épithélium pulmonaire, la cornée, la rétine, le muscle squelettique et le rein. Dans tous ces tissus, les cellules souches sont relativement bien identifiées et sont localisées dans des niches bien organisées.

Ils ont ensuite, grâce aux progrès des techniques d'identification, isolé d'autres cellules souches dans la moelle osseuse et complété les possibilités thérapeutiques des cellules souches déjà connues. La moelle osseuse est à l'heure actuelle une source intarissable de cellules souches que ce soit les cellules souches hématopoïétiques, dont les intérêts thérapeutiques sont encore loin d'être identifiés totalement, ou les cellules souches stromales, possédant des possibilités thérapeutiques incroyables.

Dans un deuxième temps, les cellules souches ont été cherchées dans d'autres organes qui, au premier abord, n'étaient pas de bons candidats. Les chercheurs ont ainsi mis en évidence des cellules souches dans le cœur, le cerveau et le tissu adipeux.

Le cœur n'est plus à l'heure actuelle considéré comme un organe statique mais bien un organe dynamique contenant des cellules souches. Cela ouvre de grandes perspectives dans le traitement des infarctus du myocarde ou des cardiomyopathies. Un autre grand dogme a aussi été renversé : les mammifères ne naissent pas avec un nombre défini de neurones. Le cerveau contient des cellules souches : il s'agit là d'une découverte majeure pour le traitement des troubles nerveux. Ce domaine là est bien sûr d'une importance capitale en médecine humaine avec le traitement possible de maladies comme l'Alzheimer ou la Parkinson, mais aussi de grande importance en médecine vétérinaire avec un traitement possible des traumatismes de la moelle épinière. Et enfin, ils ont découvert des cellules souches dans un endroit inattendu : le tissu adipeux. Cette partie de l'organisme qui, au premier abord, n'est pas un tissu d'un grand intérêt est en réalité une source inconsiderable de cellules souches mésenchymateuses. Ces cellules souches sont très similaires aux cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse et ont donc des propriétés de différenciation similaires. Cette niche de cellules souches est une découverte majeure dans le monde humain mais surtout dans le monde animal : son prélèvement est simple, peu coûteux, réalisable sur

tous les chiens adultes et de plus, la culture de ces cellules souches in vitro est très simple. Cela pourrait être à l'avenir une des sources principales de cellules souches en médecine vétérinaire.

On peut également, et il s'agit d'une avancée extraordinaire, envisager un traitement pour le diabète. Cette maladie touchant aussi bien l'Homme que l'animal va enfin pouvoir être traitée, non plus par des injections quotidiennes à vie d'insuline, mais par une thérapie cellulaire par les cellules souches. Les chercheurs ont ainsi identifié des cellules souches pancréatiques mais surtout, ils ont réussi à utiliser d'autres cellules souches mieux définies ou plus faciles d'accès comme celles du tissu adipeux, pour former des cellules sécrétrices d'insuline. C'est une découverte incroyable qui sera sûrement extrêmement prometteuse dans un avenir proche.

Une autre découverte récente va aussi révolutionner le traitement des myopathies : l'utilisation de cellules souches, les mésoangioblastes, constitue un traitement potentiel des myopathies humaines et notamment de la myopathie de Duchenne. Cette découverte a été réalisée sur des chiens. On pourrait donc envisager de la même manière un traitement pour les myopathies canines.

Les cellules souches ouvrent également d'autres perspectives et notamment la **médecine régénérative**. A l'heure actuelle, on est capable de remplacer par exemple un bras entier : ceci est permis par la transplantation chirurgicale ou l'implantation de prothèse. L'ingénierie tissulaire s'oriente vers le passage de cellules à tissus en combinant les cellules dans des échafaudages imitant la matrice extra-cellulaire. De futures approches incluront les cellules souches dans la production de tissus artificiels, ou l'implantation de matériaux artificiels pour guider le comportement de ces cellules souches. Le passage de cellule à organe requiert l'identification des « maîtres d'œuvre » identiques à ceux produisant une jambe entière ou une régénération d'appendices chez les organismes inférieurs (FODOR, 2003 ; INGBER et LEVIN, 2007).

La médecine, grâce à la recherche, progresse très rapidement. En effet, la notion de cellule souche adulte date de 1961 avec la découverte des cellules souches hématopoïétiques et en 2008, on a découvert un très grand nombre de cellules souches dans la quasi-totalité des organes des mammifères. La médecine régénérative quant à elle, est déjà bien exploitée avec l'utilisation de cellules différencierées pour la création de peau ex-vivo, de cartilage, de tendons ou encore de lobules hépatiques ou de lobules pancréatiques (INGBER et LEVIN, 2007). Il ne reste plus qu'à combiner ces deux domaines de recherche pour envisager la création d'organes complets ex vivo à partir de cellules souches.

Il reste une perspective au sujet des cellules souches : le **cancer**. En effet, les notions de niche et de cellules souches cancéreuses ont changé ces perspectives.

Ainsi la cellule souche et son auto-renouvellement est une des clés. En effet, les cellules souches sont par définition capables d'auto-renouvellement indéfiniment. Si elles mutent et ne sont plus régulées, elles vont alors proliférer anarchiquement : n'est-ce pas là la définition même d'un cancer ? Chez l'adulte, la niche empêche la carcinogénèse en contrôlant le comportement des cellules souches et la balance entre leur auto-renouvellement et leur différenciation (LI et XIE,

2005). Dans ce contexte, toutes mutations induisant les cellules souches à échapper au contrôle de la niche pourraient entraîner la formation d'une tumeur. Il est alors possible de dire qu'une des différences entre une cellule souche et une cellule souche cancéreuse est que cette dernière n'est plus dépendante des signaux de la niche (MORRISON et SPRADLING, 2008). Selon les oncologues et les biologistes, il semblerait que les masses cancéreuses contiennent un petit nombre de cellules possédant les propriétés des cellules souches. Ces cellules seraient responsables de la croissance et de l'apparition des métastases dans les cancers. A l'heure actuelle, les chercheurs tentent de trouver les marqueurs pour différencier les cellules souches cancéreuses des cellules souches normales.

Une autre possibilité pour la Cancérogenèse est qu'un dysfonctionnement de la niche peut entraîner la formation d'une tumeur (MORRISON et SPRADLING, 2008). C'est ce qui a été retrouvé dans des cancers comme la neurofibromatose chez l'Homme et les maladies myéloprolifératives, où il y a à la fois des mutations des cellules souches et à la fois des modifications dans leur niche (WALKLEY *et al.*, 2007). La niche pourrait également jouer un rôle dans l'apparition des métastases : ainsi, les cellules mésenchymateuses situées autour ou dans la tumeur augmentent la capacité invasive et métastatique des cellules du cancer du sein (KARNOUB *et al.*, 2007).

La découverte des cellules souches et de leur niche a donc amené les chercheurs à découvrir les notions de cellule souche cancéreuse et de niche pro-carcinogène. Une nouvelle perspective de traitement du cancer, basée sur la **neutralisation** de ces cellules souches et de leur niche, est en train de voir le jour (MORRISON et SPRADLING, 2008).

La thérapie liée aux cellules souches va sûrement toucher la **médecine vétérinaire** dans les années à venir. Cependant, elle est en partie bloquée par une contrainte inhérente à cette médecine : le coût. La thérapie cellulaire est extrêmement prometteuse mais c'est une médecine individuelle extrêmement couteuse. En effet, chez l'Homme, il est déjà difficile de la mettre en place. Il est donc à l'heure actuelle très difficile d'envisager une telle thérapie à grande échelle en médecine vétérinaire. Mais la recherche avance très vite et on devrait voir apparaître de plus en plus d'utilisation des cellules souches chez l'Homme dans les années à venir.



## BIBLIOGRAPHIE

ALBERA C, POLAK JM, JANES S, GRIFFITHS MJD, ALISON MR, WRIGHT NA *et al.* (2005). Repopulation of human pulmonary epithelium by bone marrow cells: a potential means to promote repair. *Tissue Eng.*, **11**(7), 1115-1121.

ALTMAN J (1963). Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. *Anat. Rec.*, **145**, 573-91.

ALTMAN J (1969). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.*, **137**, 433-57.

ALTMAN J, DAS GD (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J. Comp. Neurol.*, **124**, 319-35.

AMOH Y, LI L, KATSUOKA K, PENMAN S, HOFFMAN RM (2005). Multipotent nestin-positive, keratin-negative hair-follicle-bulge stem cells can form neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 5530-5534.

ANJOS-AFONSO F, SIAPATI E, BONNET D (2004). In vivo contribution of murine mesenchymal stem cells into multiple cell-types under minimal damage conditions. *J. Cell. Sci.*, **117**, 5655-5664.

ANVERSA P, KAJSTURA J, LERI A, BOLLI R (2006). Life and death of cardiac stem cells: a paradigm shift in cardiac biology. *Circulation*, **113**, 1451-1463.

Appendix C: human embryonic stem cells and human embryonic germ cells. In: *Stem Cell Information* [en ligne]. 2006 (modifiée en Octobre 2006), U.S.A.: Department of Health and Human Services, [<http://stemcells.nih.gov/info/scireport/appendixc>] (consulté le 28 mai 2008).

Appendix E: stem cell markers. In: *Stem Cell Information* [en ligne]. 2006 (modifiée en Octobre 2006), U.S.A.: Department of Health and Human Services, [<http://stemcells.nih.gov/info/scireport/appendixe>] (consulté le 28 mai 2008).

ASAHARA T, KALKA C, ISNER J (2000). Stem cells therapy and gene transfer for regeneration. *Gene Ther.*, **7**, 451-457.

BACH FH, ALBERTINI RJ, ANDERSON JL (1968). Bone-marrow transplantation in a patient with the Wiskott-Aldrich syndrome. *Lancet*, **2**, 1364-1366.

BACHOUD-LEVI AC, GAURA V, BRUGIERES P, LEFAUCHEUR J-P, BOISSE M-F, MAISON 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.

BADIAVAS EV, ABEDI M, BUTMARC J, FALANGA V, QUESENBERRY P (2003). Participation of bone marrow derived cells in cutaneous wound healing. *J. Cell. Physiol.*, **196**, 245-250.

BAGNIS C, CHABANNON C, MANNONI P (1999). Beta-galactosidase marker genes to tag and track human hematopoietic cells. *Cancer Gene Ther.*, **6**(1), 3-13.

BAMBAKIDIS N, MILLER RH (2004). Transplantation of oligodendrocytes precursors and sonic hedgehog results in improved function and white matter sparing in the spinal cords of adult rats after contusion. *Spine J.*, **4**, 16-26.

BARILE L, MESSINA E, GIACOMELLO A, MARBAN E (2007). Endogenous cardiac stem cells. *Prog. Cardiovasc. Dis.*, **50**(1), 31-48.

BARTUNEK J, CROISSANT JD, WINJS W, GOFFLOT S, DE LAVAREILLE A, VANDERHEYDEN M *et al.* (2006). Pretreatment of adult bone marrow mesenchymal stem cells with cardiomyogenic growth factors and repair of chronically infarcted myocardium. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **292**, 1095-1104.

BAYER SA (1982). Changes in the total number of dentate granule cells in juvenile and adult rats: a correlated volumetric and 3H-thymidine autoradiographic study. *Exp. Brain Res.*, **46**, 315-323.

BELTRAMI A, BARLUCCI L, TORELLA D, BAKER M, LIMANA F, CHIMENTI S *et al.* (2003). Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*, **114**, 763-776.

BLACK LL, GAYNOR J, GAHRING D, ADAMS C, ARON D, ARMAN S *et al.* (2007). Effect of adipose-derived nucleated cell fractions on tendon repair in a collagenase-induced tendinitis model. *Vet. Ther.*, **8**(4), 272-284.

BLOT S, SAMPAOLESI M, D'ANTONA G, GRANGER N, TONLORENZI R, INNOCENZI A *et al.* (2006). Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. *Nature*, **444**, 574-579.

BRAZELTON TR, ROSSI FMV, KESHET GI, BLAU HM (2000). From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science*, **290**, 1775-1779.

CALVI L, ADAMS GB, WEIBRECHT KW, WEBER JM, OLSON DP, KNIGHT MC *et al.* (2003). Osteoblastic cells regulate the hematopoietic stem cell niche. *Nature*, **425**, 841-846.

CANTLEY LG (2005). Adult stem cells in the repair of the injured renal tubule. *Nat. Clin. Pract. Nephrol.*, **1**, 22-32.

CARTER R, ABRAMS-OGG ACG, DICK JE, KRUTH SA, VALLI VE, KAMEL-REID S *et al.* (1992). Autologous transplantation of canine long term marrow culture cells genetically marked by retroviral vectors. *Blood*, **79**(2), 356-364.

CALLEN GA, LITTLE MH (2006). Tissue-specific stem cells-concise review. *Stem Cells*, **24**(1), 3-12.

CAVAZZANA-CALVO M, HACEIN-BEY S, DE SAINT BASILE G, GROSS F, YVON E, NUSBAUM P *et al.* (2000). Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science*, **28**(288), 669-672.

CHAMBERLAIN JS (2006). A move in the right direction. *Nature*, **444**, 552-553.

CHRISTOV C, CHRETIEN F, ABOU-KHALIL R, BASSEZ G, VALLET G, AUTHIER F-J *et al.* (2007). Muscle satellite cells and endothelial cells: close neighbors and privileged partners. *Mol. Biol. Cell*, **18**, 1397-1409.

CHUDAKOV DM, LUKYANOV S, LUKYANOV KA (2005). Fluorescent proteins as a toolkit for in vivo imaging. *Trends Biotechnol.*, **23**(12), 605-613.

DAHLGREN LA (2006). Use of adipose derived stem cells in tendon and ligament injuries. *Am. Coll. Vet. Surg. Symp. Equine Small Anim. Proc.*, 150-151.

DAWN B, STEIN AB, URBANEK K, ROTA M, WHANG B, RASTALDO R *et al.* (2005). Cardiac stem cells delivered intravascularly traverse the vessel barrier, regenerate infarcted myocardium, and improve cardiac function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 3766-3771.

DAS AV, JAMES J, RAHNENFUHRER J (2005). Retinal properties and potential of the adult mammalian ciliary epithelium stem cells. *Vision Res.*, **45**, 1653-1666.

EMSLIE-SMITH A, ENGEL A (1990). Microvascular changes in early and advanced dermatomyositis: a quantitative study. *Ann. Neurol.*, **27**, 343-356.

ENGELHARDT JF (2001). Stem cell niches in the mouse airway. *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.*, **24**(6), 649-652.

FALANGA V, IWAMOTO S, CHARTIER M, YUFIT T, BUTMARC J, KOUTTAB N *et al.* (2007). Autologous bone marrow-derived cultured mesenchymal stem cells delivered in a fibrin spray accelerate healing in murine and human cutaneous wounds. *Tissue Eng.*, **13**(6), 1299-1312.

FEDAK PW, WEISEL RD, VERMA S, MICKLE DAG, LI RK (2003). Restoration and regeneration of failing myocardium with cell transplantation and tissue engineering. *Semin. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **15**, 277-286.

FERNANDES A, KING LC, GUZ Y, STEIN R, WRIGHT CVE, TEITELMAN G (1997). Differentiation of new-insulin-producing cells is induced by injury in adult pancreatic islets. *Endocrinology*, **138**, 1750-1762.

FIEGEL HC, LANGE C, KNESER U, LAMBRECHT W, ZANDER AR, ROGIERS X *et al.* (2006). Fetal and adult liver stem cells for liver regeneration and tissue engineering. *J. Cell. Mol. Med.*, **10**(3), 577-587.

FIORETTO P, STEFFES MW, SUTHERLAND DE, GOETZ FC, MAUER M (1998). Reversal of lesions of diabetic nephropathy after pancreas transplantation. *N. Engl. J. Med.*, **339**, 69-75.

FODOR WL (2003). Tissue engineering and cell based therapies, from the bench to the clinic: the potentiel to replace, repair and regenerate. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, **1**, 102-108.

FORTIER LA (2005). Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. *Vet. Surg.*, **34**, 415-423.

GAGE FH, COATES PW, PALMER TD, KUHN HG, FISHER LJ, SUHONEN JO *et al.* (1995). Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 11879-11883.

GARGETT CE (2007). Uterine stem cells: what is the evidence? *Hum. Reprod. Update*, **13**(1), 87-101.

GHAZIZADEH S, TAICHMAN LB (2005). Organization of stem cells and their progeny in human epidermis. *J. Invest. Dermatol.*, **124**, 367-372.

GINGERICH DA, ADAMS C, GARHING D, ARON D, GAYNOR J, BLACK LL *et al.* (2007). Effect of adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on lameness in dogs with chronic osteoarthritis of the coxofemoral joints: a randomized, double-blinded, multicenter, controlled trial. *Vet. Therapeut.*, **8**(4), 272-284.

GUSSONI E, SONEOKA Y, STRICKLAND CD, BUZNEY EA, KHAN MK, FLINT AF *et al.* (1999). Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cells transplantation. *Nature*, **401**, 390-394.

HARRIS RG, HERZOG EL, BRUSCIA EM, GROVE JE, VAN ARNAM JS, KRAUSE DS (2004). Lack of fusion requirement for development of bone-marrow epithelia. *Science*, **305**(5680), 90-93.

HAWKE JH, GARRY DJ (2001). Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J. Appl. Physiol.*, **91**, 534-551.

HAYNES T, DEL RIO-TSONIS K (2004). Retina repair, stem cells and beyond. *Curr. Neurovasc. Res.*, **1**, 231-239.

HERZOG EL, CHAI L, KRAUSE DS (2003). Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood*, **102**, 3483-3493.

HIRSCHI KK, GOODEL MA (2002). Hematopoietic, vascular and cardiac fates of marrow derived stem cells. *Gene Ther.*, **9**, 648-652.

HISHIKAWA K, FUJITA T (2006). Stem cell and kidney disease. *Hypertens. Res.*, **29**, 745-749.

HIYAMA A, MOCHIDA J, IWASHINA T, OMI H, WATANABE T, SERIGANO K *et al.* (2008). Transplantation of mesenchymal stem cells in a canine disc degeneration model. *J. Orthop. Res.*, **26**(5), 589-600.

HO AD, PUNZEL M (2003). Hematopoietic stem cells: can old cells learn new tricks? *J. Leukoc. Biol.*, **73**, 547-555.

HOFFMAN RM (2005). The pluripotency of hair follicle stem cells. *Cell Cycle*, **5**(3), 232-233.

IANUS A, HOLZ GG, THEISE ND, HUSSAIN MA (2003). In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J. Clin. Invest.*, **111**, 843-850.

INGBER DF, LEVIN M (2007). What lies at the interface of regenerative medicine and developmental biology? *Development*, **134**, 2541-2547.

ISHIKAWA F, CHRISTOPHER JD, SU Y, FLEMING PA, MINAMIGUCHI H, VISCONTI RP *et al.* (2003). Transplanted human cord blood cells give rise to hepatocytes in engrafted mice. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **996**, 174-185.

JIN HK, CARTER JE, HUNTLEY GW, SCHUCHMAN EH (2002). Intracerebral transplantation of mesenchymal stem cells into acid sphingomyelinase-deficient mice delays the onset of neurological abnormalities and extends their life span. *J. Clin. Invest.*, **109**, 1183-1191.

JUNG Y-J, RYU K-H, CHO SJ, WOO S-Y, SEOH J-Y, CHUN CH *et al.* (2006). Syngenic bone marrow cells restore hepatic function in carbon tetrachloride-induced mouse liver injury. *Stem Cells Dev.*, **15**, 687-695.

KAPLAN MS, HINDS JW (1977). Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science*, **197**, 1092-1094.

KARNOUB AE, DASH AB, VO AP, SULLIVAN A, BROOKS MW, BELL GW *et al.* (2007). Mesenchymal stem cells within tumor stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*, **449**, 557-563.

KIEM HP, DAROVSKY B, VON KALLE C, GOEHLE S, STEWART D, GRAHAM T *et al.* (1994). Retrovirus mediated gene transduction into canine peripheral blood repopulating cells. *Blood*, **83**(6), 1467-1473.

KIM CFB, JACKSON EL, WOOLFENDEN AE, LAWRENCE S, BABAR I, VOGEL S *et al.* (2005). Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell*, **121**, 823-835.

KODAMA S, KUHTREIBER W, FUJIMURA S, DALE EA, FAUSTMAN DL (2003). Islet regeneration during the reversal of autoimmune diabetes in NOD mice. *Science*, **302**, 1223-1227.

KOLF CM, CHO E, TUAN RS (2007). Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res. Ther.*, **9**(1), 204-217.

KRAUSE DS, THEISE N, COLLECTOR M, HENEGARIU O, HWANG S, GARDNER R *et al.* (2001). Multiorgan, multi-lineage engraftment by a single bone-marrow stem cell. *Cell*, **105**, 369-377.

KUBO H, ALITALO K (2003). The bloody fate of endothelial stem cells. *Genes Dev.*, **17**, 322-329.

KUHN HG, DICKINSON-ANSON H, GAGE FH (1996). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J. Neurosci.*, **16**, 2027-2033.

LAGASSE E, CONNORS H, AL-DHALIMY M, REITSMA M, DOHSE M, OSBORNE L *et al.* (2000). Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat. Med.*, **6**, 1229-1234.

LAVKER RM, TSENG SC, SUN TT (2004). Corneal epithelial stem cells at the limbus: looking at some old problems from a new angle. *Exp. Eye Res.*, **78**, 433-446.

LEICHNER A, YANG YG, BLACKEN RA (2004). No evidence for significant transdifferentiation of bone marrow into pancreatic beta-cells in vivo. *Diabetes*, **53**, 616-623.

LI L, XIE T (2005). Stem cell niche: structure and function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **21**, 605-631.

LI L, MIGNONE J, YANG M, MATIC M, PENMAN S, ENIKOLOPOV G *et al.* (2003). Nestin expression in hair follicle sheath progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 9958-9961.

LI W, HAYASHIDA Y, CHEN YT, TSENG SC (2007). Niche regulation of corneal epithelial stem cells at the limbus. *Cell Res.*, **17**(1), 26-36.

LIAO R, PFISTER O, JAIN M, MOUQUET F (2007). The bone marrow-cardiac axis of myocardial regeneration. *Progr. Cardiovasc. Dis.*, **50**(1), 18-30.

LINKE A, MULLER P, NURZYNSKA D, CASARSA C, TORELLA D, NASCIMBENE A *et al.* (2005). Stem cells in dog heart are self-renewing, clonogenic, and multipotent and regenerate infarcted myocardium, improving cardiac function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 8966-8971.

LUSKIN MB (1993). Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron*, **11**, 173-189.

MA Y, XU Y, XIAO Z, YANGA W, ZHANGB C, SONGA E *et al.* (2006). Reconstruction of chemically burned rat corneal surface by bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, **24**, 315-321.

MATHEWS V, HANSON PT, FORD E, FUJITA J, POLONSKY KS, GRAUBERT TA (2004). Recruitement of bone marrow derived endothelial cells to site of pancreatic beta-cell injury. *Diabetes*, **53**, 91-98.

MAVILIO F, PELLEGRINI G, FERRARI S, DI NUNZIO F, DI IORIO E, RECCHIA A *et al.* (2006). Correction of junctional epidermolysis bullosa by transplantation of genetically modified epidermal stem cells. *Nat. Med.*, **12**(12), 1397-1402.

METCALF D (2005). *Blood Lines: An Introduction to Characterizing Blood Diseases of the Post-Genomic Mouse*. Durham, NC: AlphaMed Press, 251p.

MEZEY E, CHANDROSS KJ, HARTA G, MAKI RA, MCKERCHER SR (2000). Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science*, **290**, 1779-1782.

MICKLEM HS, FORD CE, EVANS EP, OGDEN DA (1975a). Compartments and cell flows within the mouse hematopoietic system. I. Restricted interchange between hematopoietic sites. *Cell Tissue Kinet.*, **8**(3), 219-232.

MICKLEM HS, OGDEN DA, EVANS EP, FORD CE, GRAY JG (1975b). Compartments and cell flows within the mouse hematopoietic system. II. Estimated rates of interchange. *Cell Tissue Kinet.*, **8**(3), 233-248.

MIKKELSEN TS, JAENISCH R, HANNA J, ZHANG X, KU M, WERNING M *et al.* (2008). Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Science*, à paraître.

MIMEAULT M, BATRA SK (2006). Concise review: recent advances on the significance of stem cells in tissue regeneration and cancer therapies. *Stem cells*, **24**, 2319-2345.

MORRISON SJ, SPRADLING AC (2008). Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell*, **132**, 598-611.

MURPHY JM, FINK DJ, HUNZIKER EB, BARRY FP (2003). Stem cells therapy in a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum.*, **48**(12), 3464-3474.

NAKAGAMI H MORISHITA R, MAEDA K, KIKUSHI Y, OGIHARA T, KANEDA Y (2006). Adipose tissue-derived stromal cells as a novel option for regenerative cell therapy. *Arterioscler. Thromb.*, **13**, 77-81.

NAKAMURA T, TSUTOMU I, CHIE S, NORIKO K, SHIGERU K (2004). Successful primary culture and autologous transplantation of corneal limbal epithelial cells from minimal biopsy for unilateral severe ocular surface disease. *Acta. Ophthalmol. Scand.*, **82**, 468-471.

NAKATOMI H, KURIU T, OKABE S, YAMAMOTO S, HATANO O, KAWAHARA N *et al.* (2002). Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell*, **110**, 429-441.

NEWSOME PN, JOHANNESSEN I, BOYLE S, DALAKAS E, MCAULAY KA, SAMUEL K *et al.* (2003). Human cord blood-derived cells can differentiate into hepatocytes in the mouse liver with no evidence of cellular fusion. *Gastroenterology*, **124**, 1891-1900.

NIESLER CU (2004). Old dogmas and new hearts: a role of adult stem cells in cardiac repair. *Cardiovasc. J. S. Afr.*, **15**, 184-189.

NOGUSHI H (2007). Stem cells for the treatment of diabetes. *Endocr. J.*, **54**(1), 7-16.

OLIVER JA, MAAROUF O, CHEEMA FH, MARTENS TP, AL-AWQATI Q (2004). The renal papilla is a niche for adult kidney stem cells. *J. Clin. Invest.*, **114**(6), 795-804.

ORLIC D, KAJSTURA J, CHIMENTI S, JAKONIUK I, ANDERSON SM, LI B *et al.* (2001a). Bone marrow cells regenerate myocardium. *Nature*, **410**, 701-705.

ORLIC D, KAJSTURA J, CHIMENTI S, LIMANA F, JAKONIUK I, QUAINI F *et al.* (2001b). Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 10344-10349.

PAJOOHESH-GANJI A, STEPP MA (2005). In search of markers for stem cells of corneal epithelium. *Biol. Cell*, **97**, 265-276.

PETERSEN BE, BOWEN WC, PATRENE KD, MARS WM, SULLIVAN AK, MURASE N *et al.* (1999). Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science*, **284**, 1168-1170.

PLACHOT C, MOVASSAT J, PORTHA B (2001). Impaired beta-cell regeneration after partial pancreatectomy in the adult Goto-Kakizaki rat, a spontaneous model of type II diabetes. *Histochem. Cell Biol.*, **116**, 131-139.

PLANAT-BENARD V, SILVESTRE J-S, COUSIN B, ANDRE M, NIBBELINK M, TAMARAT R *et al.* (2004). Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation*, **109**(5), 656-663.

POTTEN CS, OWEN G, ROBERTS S (1990). The temporal and spatial changes in cell proliferation within the irradiated crypts in murine small intestine. *Int. J. Radiat. Biol.*, **57**(1), 185-199.

RAFII S, LYDEN D (2003). Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat. Med.*, **9**(6), 702-712.

REINECKE H, POPA V, MURRY CE (2002). Skeletal muscle stem cells do not transdifferentiate into cardiomyocytes after cardiac grafting. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **34**(2), 241-249.

REYA T, CLEVERS H (2005). Wnt signaling in stem cells and cancer. *Nature*, **434**(7035), 843-850.

REYNOLD BA, WEISS S (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, **255**(5052), 1707-1710.

RISAU W, FLAMME I (1995). Vasculogenesis. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, **11**, 73-91.

RIZVI AZ, WONG MH (2005). Epithelial stem cells and their niche: there's no place like home. *Stem Cells*, **23**(2), 150-165.

ROSEN MR, ROBINSON RB, BRINK P, COHEN IS (2004). Recreating the biological pacemaker. *Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell Evol. Biol.*, **280**(2), 1046-1052.

SACKSTEIN R (2004). The bone marrow is akin to skin: HCELL and the biology of hematopoietic stem cells homing. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, **9**(3), 215-223.

SANTANA A, ENSENAT-WASER R, ARRIBAS MI, REIG JA, ROCHE E (2006). Insulin-producing cells derived from stem cells: recent progress and future directions. *J. Cell. Mol. Med.*, **10**(4), 866-883.

SCHOFIELD (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the hematopoietic stem cell. A hypothesis. *Blood cells*, **4**(1-2), 7-25.

SEKI T, ARAI Y (1993). Highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) is expressed by newly generated granule cells in the dentate gyrus of the adult rat. *J. Neurosci.*, **13**(6), 2351-2358.

- SIEBER-BLUM M, GRIM M (2004). The adult hair follicle: cradle for pluripotent neural crest stem cells. *Birth Defect Res. C. Embryo Today*, **72**(2), 162-172.
- SINCLAIR R (1998). Male pattern androgenetic alopecia. *B.M.J.*, **317**(7162), 865-869.
- SMITH RR, POCHAMPALLY R, PERRY A, HSU SC, PROCKOP DJ (2005). Electrophysiology of human and porcine adult cardiac stem cells isolated from endomyocardial biopsies. Late-breaking developments in stem cell biology and cardiac growth regulation. *Circulation*, **111**, 1720.
- SORIA B, BEDOYA FJ, MARTIN F (2005). Gastro-intestinal stem cells I. Pancreatic stem cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **289**(2), 177-180.
- STEINDLER DA (2007). Stem cells, regenerative medicine, and animal models of disease. *I.L.A.R. J.*, **48**(4), 323-338.
- STELLA CC, CAZZOLA M, DE FABRITIIS P, DE VINCENTIIS A, GIANNI AM, LANZA F et al. (1995). CD34-positive cells: biology and clinical relevance. *Haematologica*, **80**, 367-387.
- STUMVOLL M, GOLDSTEIN BJ, HAEFTEN TWV (2005). Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet*, **365**, 1333-1346.
- SUZUKI A, NAKAUCHI H, TANIGUSHI H (2003). Glucagon-like peptide 1 (1-37) converts intestinal epithelial cells into insulin-producing cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 5034-5039.
- TARASENKO YI, YU Y, JORDAN PM, BOTTENSTEIN J, WU P (2004). Effect of mitogenic growth factors on proliferation and phenotypic differentiation of fetal human neural stem cells. *J. Neurosci. Res.*, **78**, 625-636.
- TARNOWSKI M, SIERON AL (2006). Adult stem cells and their ability to differentiate. *Med. Sci. Monit.*, **12**(8), 154-163.
- TAUPIN P (2006a). Autologous transplantation in the central nervous system. *Indian J. Med. Res.*, **124**, 613-618.
- TAUPIN P (2006b). Neural progenitor and stem cells in the adult central nervous system. *Ann. Acad. Med. Singapore*, **35**, 814-820.
- THOMSON J (1998). Embryonic stem cells lines derived from human blastocysts. *Science*, **282**, 1145-1147.
- TILL JE, MCCULLOCH EA (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat. Res.*, **14**, 213-222.
- TORELLA D, ELLISON GM, NADAL-GINARD B, INDOLFI C (2005). Cardiac stem cells and progenitor cell biology for regenerative medicine. *Trends Cardiovasc. Med.*, **15**, 229-236.
- ULLOA-MONTOYA F, VERFAILLIE C, HU W-S (2005). Culture systems for pluripotent stem cells. *J. Biosci. Bioeng.*, **100**(1), 12-27.
- VERFAILLIE C, LAKSHMIPATHY U (2005). Stem cell plasticity. *Blood Rev.*, **19**, 29-38.

WALKLEY CR, OLSEN GH, DWORKIN S, FABB SA, SWANN J, MCARTHUR GA *et al.* (2007). A microenvironnement-induced myeloproliferative syndrome caused by retinoic acid receptor gamma deficiency. *Cell*, **129**, 1097-1110.

WALKUP MH, GERBER DA (2006). Hepatic stem cells: in search of. *Stem Cells*, **24**, 1833–1840.

WANG RN, KLOPPEL G, BOUWENS L (1995). Duct-to-islet-cell differentiation and islet growth in the pancreas of duct-ligated rats. *Diabetologia*, **38**, 1405-1411.

WANG X, WILLENBING H, AKKARI Y, TORIMARU Y, FOSTER M, AL-DHALIMY *et al.* (2003). Cell fusion is the principal source of bone-marrow derived hepatocytes. *Nature*, **422**, 897-901.

WATT FM (2002). Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation. *E.M.B.O. J.*, **21**, 3919-3926.

WILMUT I, SCHNIEKE AE, MCWHIR J, KIND AJ, CAMPBELL KHS (1997). Viable offsprings derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, **385**, 810-813.

WINTON DJ, BLOUNT MA, PONDER AJ (1988). A clonal marker induced by mutation in mouse intestinal epithelium. *Nature*, **333**, 463-466.

WONG MH, SAAM JR, STAPPENBECK TS, REXER CH, GORDON JI (2000). Genetic mosaic analysis based on Cre recombinase and navigated laser capture microdissection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 12601-12606.

YAN L, LI S, HATCH H, AHRENS K, CORNELIUS JG, PETERSEN BE *et al.* (2002). In vitro trans-differentiation of adult hepatic stem cells into pancreatic endocrine hormone-producing cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 8078-8083.

YE L, HAIDER HK, SIM EKW (2006). Adult stem cells for cardiac repair: a choice between skeletal myoblasts and bone marrow stem cells. *Exp. Biol. Med.*, **231**, 8-19.

YOON YS, PARK JS, TKEBUCHAVA T, LUEDEMAN C, LOSORDO DW (2004). Unexpected severe calcification after transplantation of bone marrow cells in acute myocardial infarction. *Circulation*, **109**, 3154–3157.

YOSHIDA S, KAJIMOTO Y, YASUDA T, WATADA H, FUJITANI Y, KOSAKA H *et al.* (2002). PDX-1 induces differentiation of intestinal epithelioid IEC-6 into insulin-producing cells. *Diabetes*, **51**, 2505-2513.

ZAMMIT PS, PARTRIDGE TA, YABLONKA-REUVENI Z (2006). The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold. *J. Histochem. Cytochem.*, **54**(11), 1177-1191.

ZHANG J, NIU C, YE L, HUANG H, HE X, TONG W-G *et al.* (2003). Identification of the hematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature*, **425**, 836-841.

ZHANG Y-Q, KRITZIK M, SARVETNICK N (2005). Identification and expansion of pancreatic stem/progenitor cells. *J. Cell. Mol. Med.*, **9**(2), 331-344.

ZHAO X, DAS AV, THORESON WB, JAMES J, WATTNEM TE, RODRIGUEZ-SIERRA J *et al.* (2002). Adult corneal limbal epithelium. A model for studying neural potential of non-neural stem cells/progenitors. *Dev. Biol.*, **250**(2), 317-331.

ZEISBERG M, HANAI J-I, SUGIMOTO H, MAMMOTO T, CHARYTAN D, STRUTZ F *et al.* (2003). BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial to mesenchymal transition and reverse chronic renal injury. *Nat. Med.*, **9**, 964-968.

ZULEWSKI H (2006). Stem cells with potential to regenerate insulin-producing cells in man. *Swiss Med. Wkly*, **136**, 647-654.

ZULEWSKI H, ABRAHAM EJ, GERLACH MJ, DANIEL PB, MORITZ W, MULLER W *et al.* (2001). Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex-vivo into pancreatic endocrine, exocrine and hepatocytes phenotypes. *Diabetes*, **50**, 521-533.